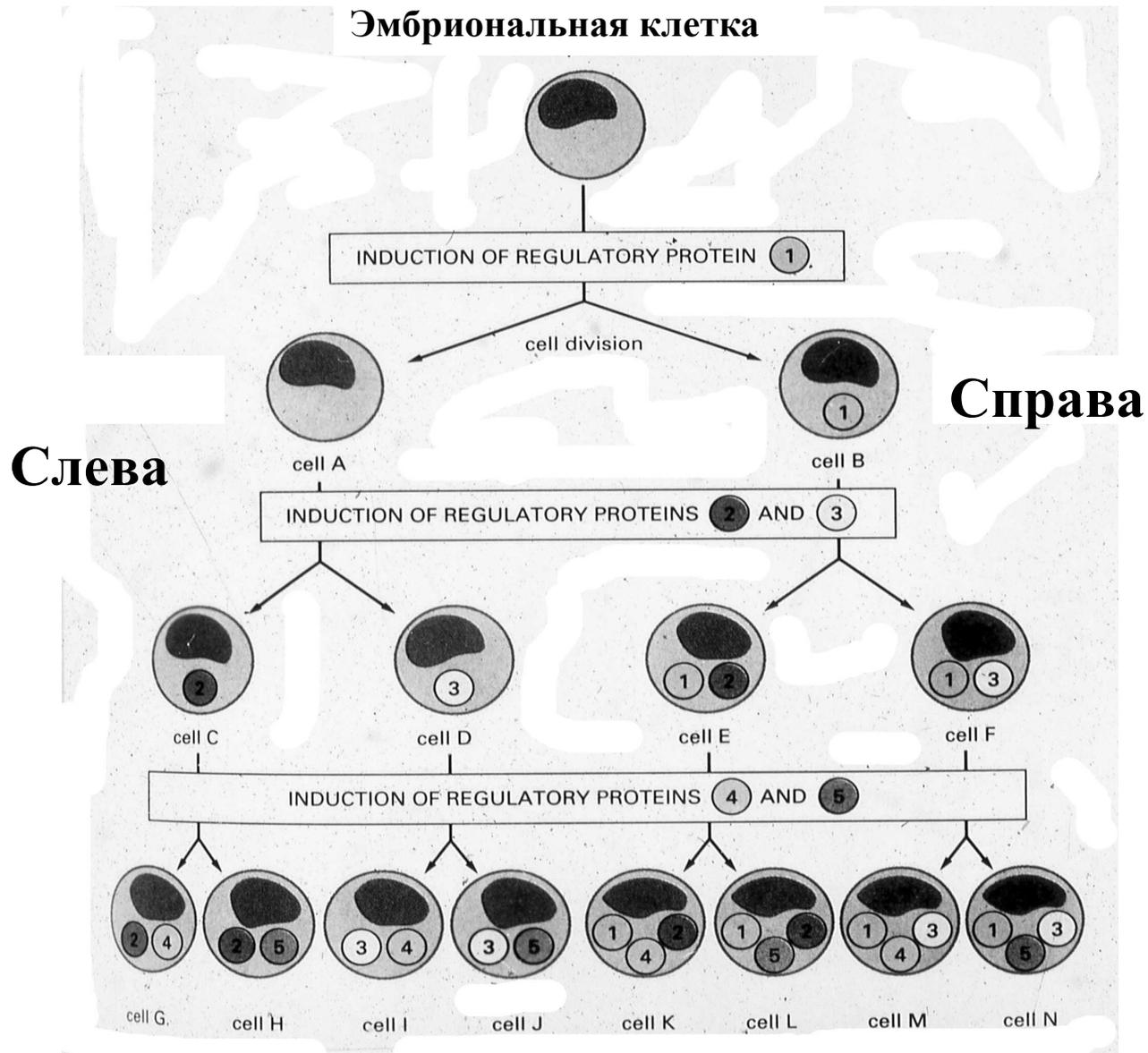


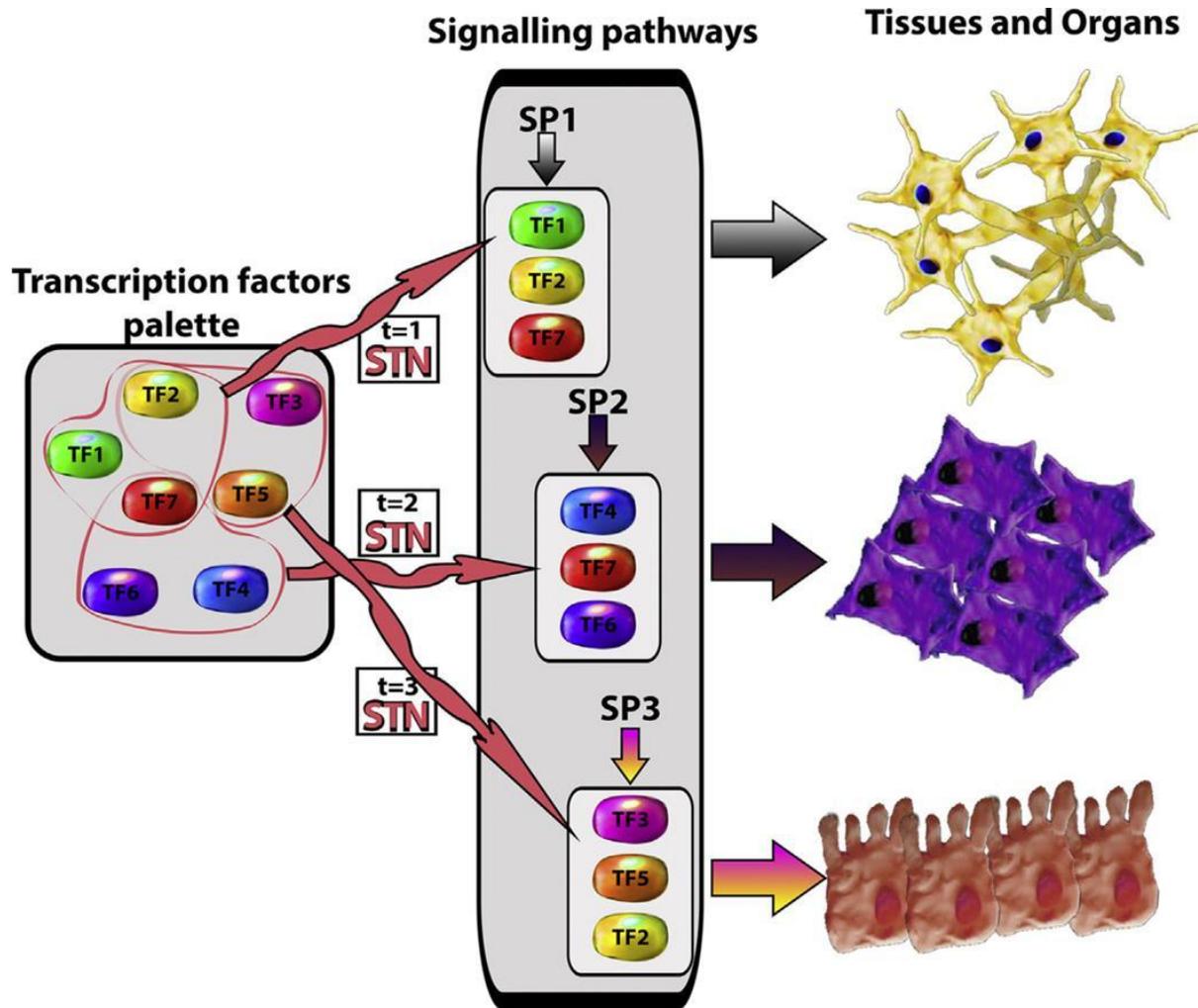
Лекция 6

Факторы транскрипции в онтогенезе

Схема комбинаторной регуляции



Образование разных типов клеток и формирование тканей и органов определяет комбинация факторов транскрипции



STN – сеть, трансдуцирующая сигнал, SP – сигнальный путь

Для регуляции экспрессии генов необходимы:

- 1) Специфические белки – общие факторы транскрипции и транс-действующие факторы транскрипции -
У человека – 2600 генов ФТ (10% генома)

- 2) Регуляторные последовательности ДНК –
промоторы, энхансеры, сайленсеры
(*цис-действующие элементы*)

Типы транскрипционных факторов

- **Базальные** – обязательно необходимые, для связывания РНК-полимеразы с промотором.
- **Активаторы**- белки, связывающиеся с промотором и усиливающие транскрипцию
- **Репрессоры** - белки, связывающиеся с промотором и угнетающие транскрипцию
- В эукариотах последовательность на промоторе, узнаваемая активаторами называется **response element**
- **Коактиваторы**- факторы не связывающиеся с ДНК, но необходимые для связывания факторов с ДНК.

Response element

(Чувствительный элемент)

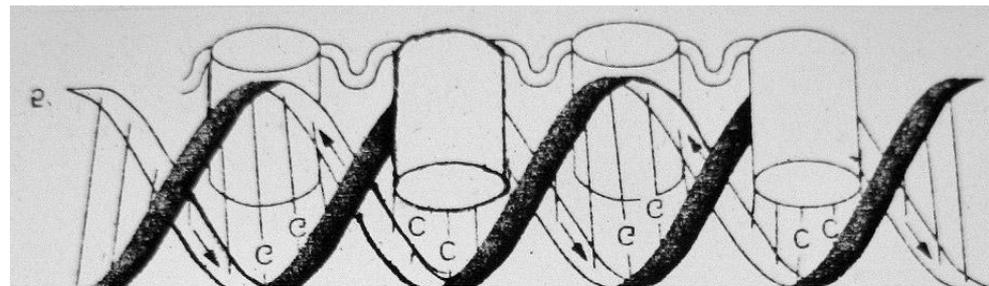
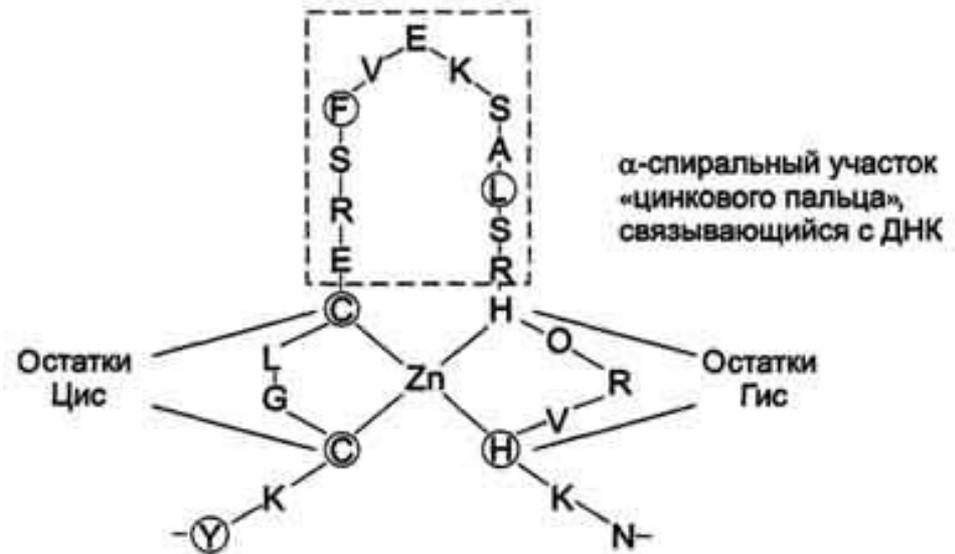
- Heat shock response element (HRE)
- Glucocorticoid response element (CRE)
- Estrogen response element (ERE)
- Serum response element (SRE)

Белки с цинковыми пальцами

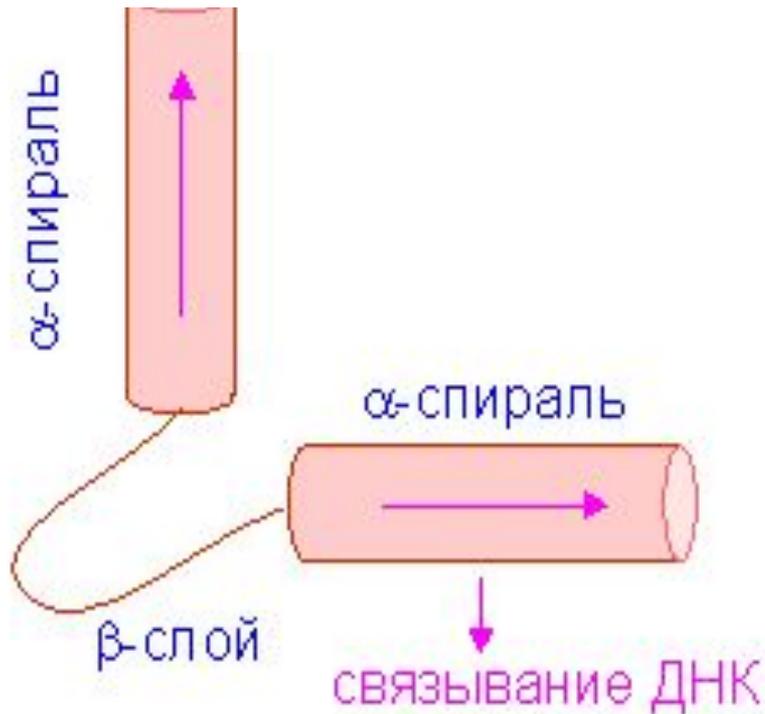
Цинковый палец включает около 20 аминокислот, ион цинка связывает 2 гистидина и 2 цистеина.

Крюппель-подобные ФТ,
ФТ 5S генов, GATA, Ikarus.

TZAP (11 цинковых
пальцев, специфически
связывается с
теломерами хромосом).

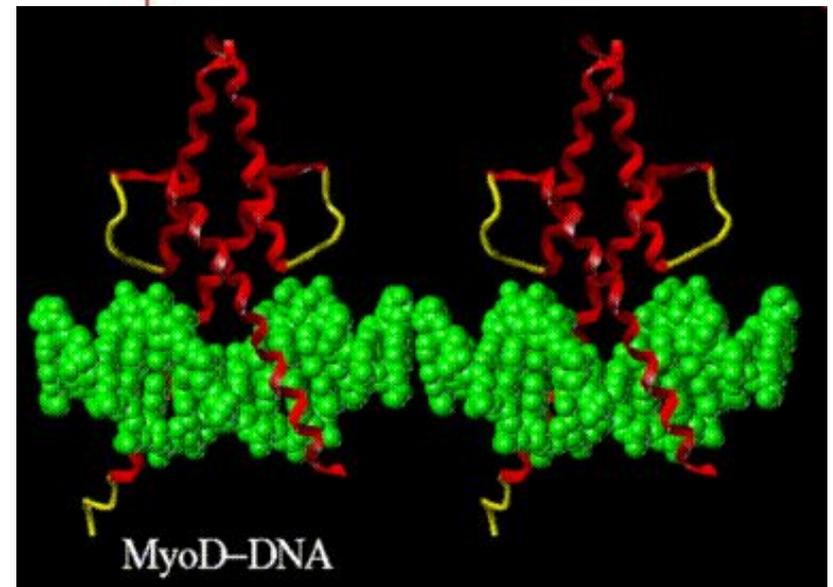


Спираль-поворот-спираль

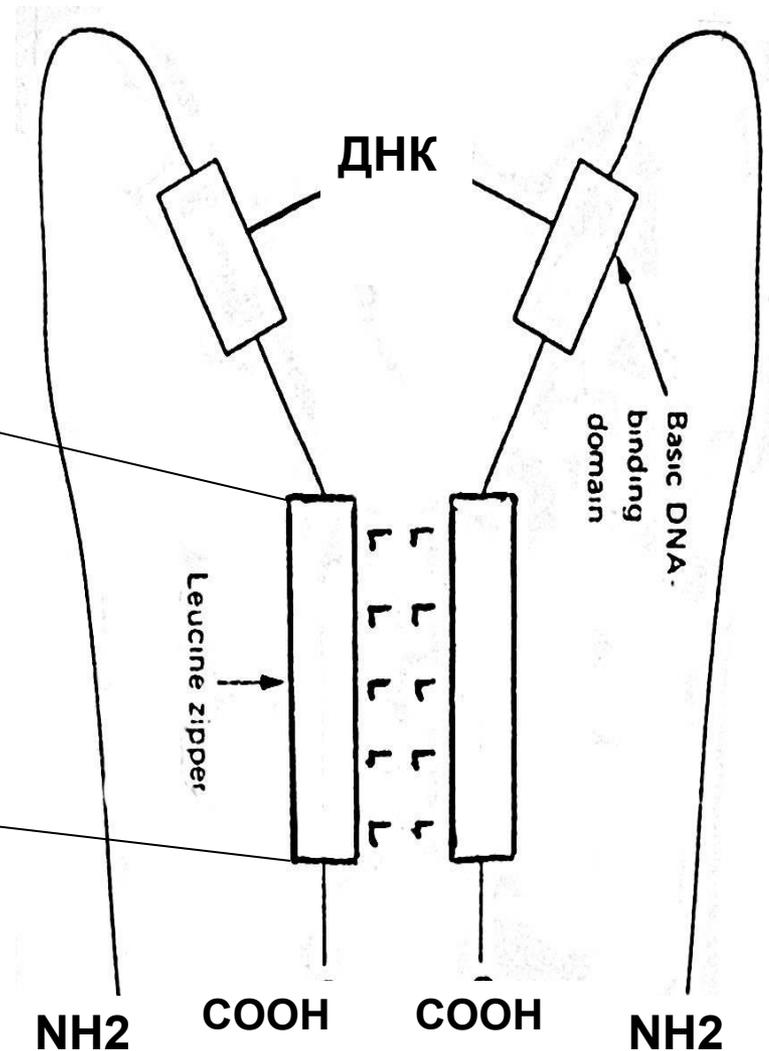
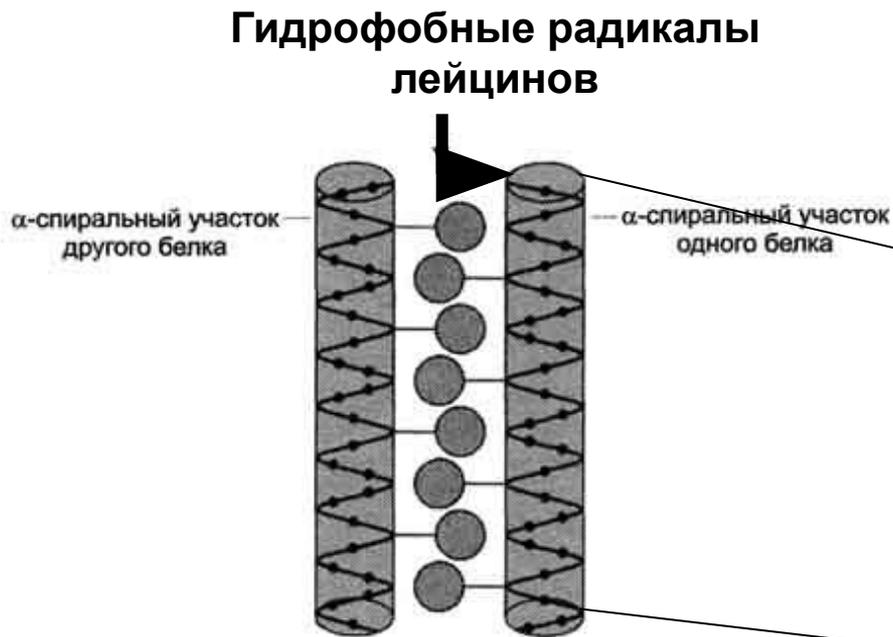


Примеры:

Oct-1, Oct-2,
Белки с гомеобоксом,
MyoD

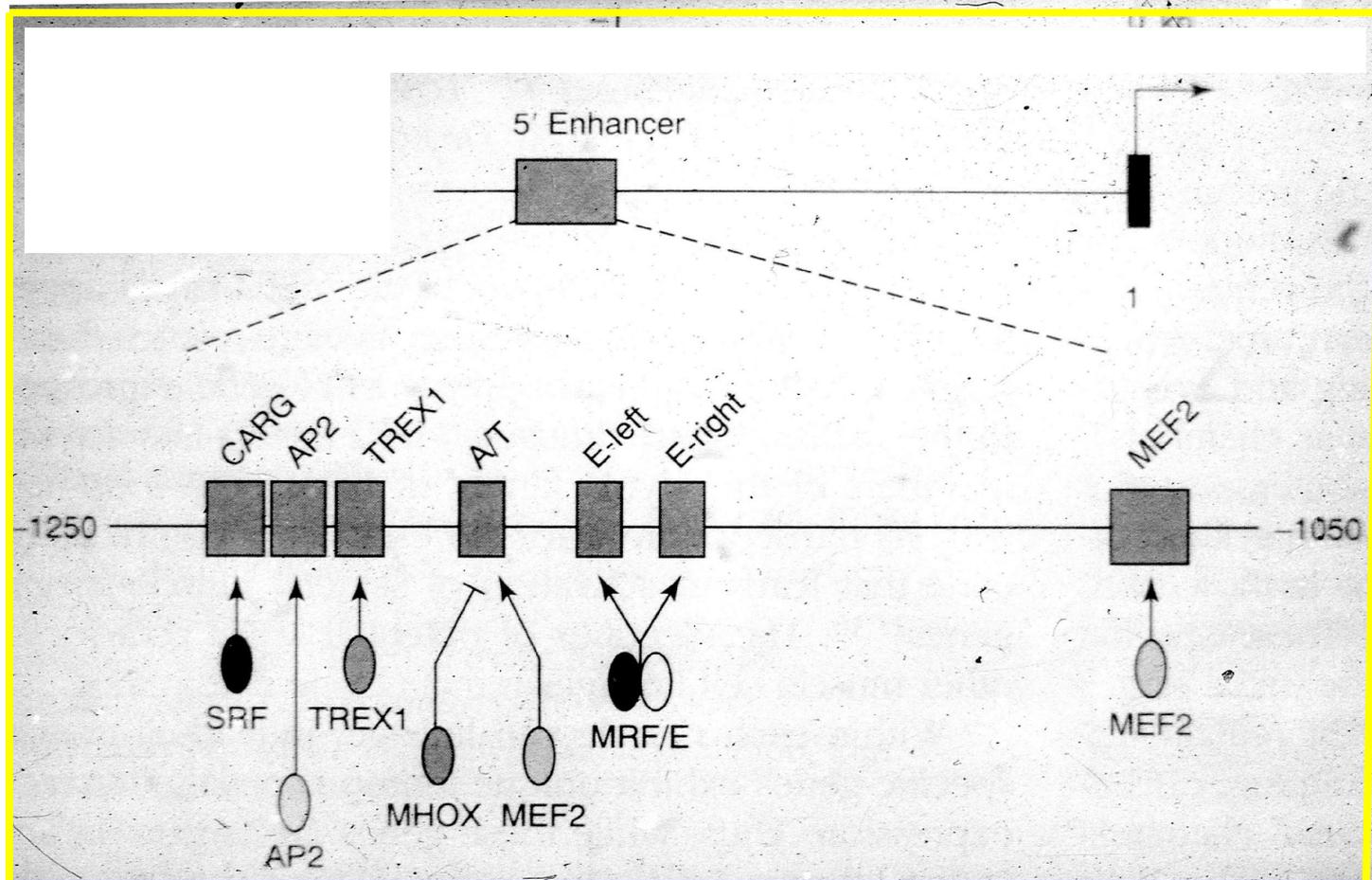


Лейциновая застежка



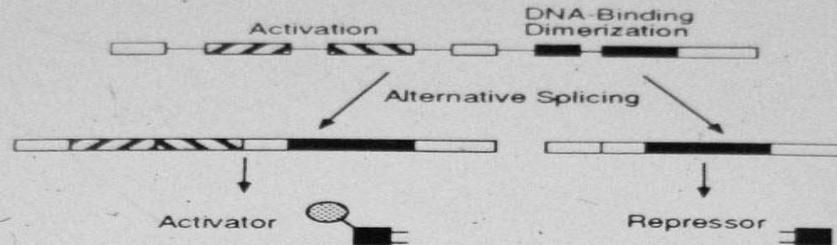
Примеры:
С/EBР, с-Мус, Fos

Транскрипционный комплекс (регуляторный модуль), формирующийся факторами транскрипции в промоторной области гена креатинкиназы

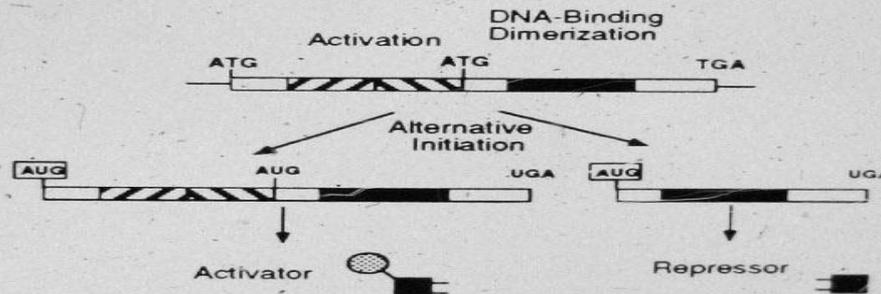


Альтернативные механизмы формирования факторов активаторов и репрессоров транскрипции

А. Альтернативный сплайсинг



В. Альтернативная инициация транскрипции



ТЕРМИНЫ

Трансдифференцировка (trans-differentiation)

— превращение взрослой региональной стволовой клетки в клетки другого органа и/или ткани, относящихся к другому зародышевому листку. Напр., *in vitro* под действием отдельных факторов мезенхимные клетки костного мозга способны к трансдифференцировке в Шванновские клетки, нейроны, мышечные клетки и др. типы клеток.

Репрограммирование (reprogramming) —

изменение генетической программы ядра специализированной соматической клетки при его переносе в гетерологичную цитоплазму, напр., в энуклеированную зиготу, или в результате воздействия на клетку набора специфических факторов (напр., получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток).

Репрограммирование и трансдифференцировка под действием факторов транскрипции

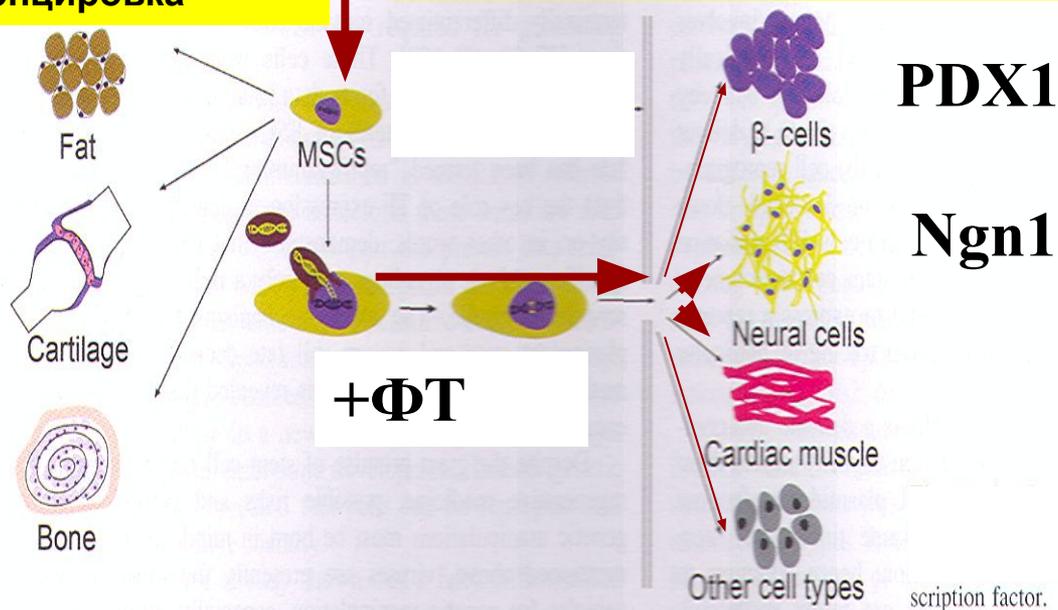
Зрелые соматические клетки $\xrightarrow{+\Phi T}$ iPS cells

Репрограммирование

Мезенхимные стволовые клетки

Нормальная дифференцировка

Трансдифференцировка



Факторы транскрипция, участвующие в репрограммировании

Oct3/4: содержит специфический POU-домен (спираль-поворот-спираль), регулирует экспрессию др. специфических генов: Nanog, Sox2, подавляет такие сигнальные пути как FGF-путь, Wnt -путь, BMP и ряд др.

Sox2: содержит HMG-box (спираль-поворот-спираль), ответственен за пролиферацию ЭСК и развитие глаза. Взаимодействует с Oct3/4 и кооперирует с Oct3/4 в промоторах свыше **300** различных генов.

c-Myc: содержит helix-loop-helix/leucine zipper domain **обладает онкогенным потенциалом**, ингибирует дифференцировку, стимулирует пролиферацию.

Klf4: Крюпель-подобный фактор 4 содержит цинковые пальцы. Моделирует ацетилирование гистонов, может выступать как активатор и как репрессор других генов. Обладает как онкогенным, так и антионкогенным действием (онкоген в раке груди, антионкоген в кишке).

Факторы транскрипции, участвующие в развитии мышц

Происхождение трех типов мышечных клеток из мезодермальных клеток-предшественников

Скелетные мышцы (симпласт) – из сомитов

Сердечные мышцы (функциональный синцитий) – из латеральной пластинки

Гладкие мышцы (миоциты) – из разных типов клеток мезенхимы

Факторы транскрипции в субпрограмме регуляции генов при развитии скелетных мышц

Первые: **MEF-2**, **Rax3** и **c-met**.

MyoD
Myf5

Формирование миобластов (двойной нокаут)

MyoG

Дифференцировка миобластов

Миогенин

Терминальная дифференцировка миотрубочек

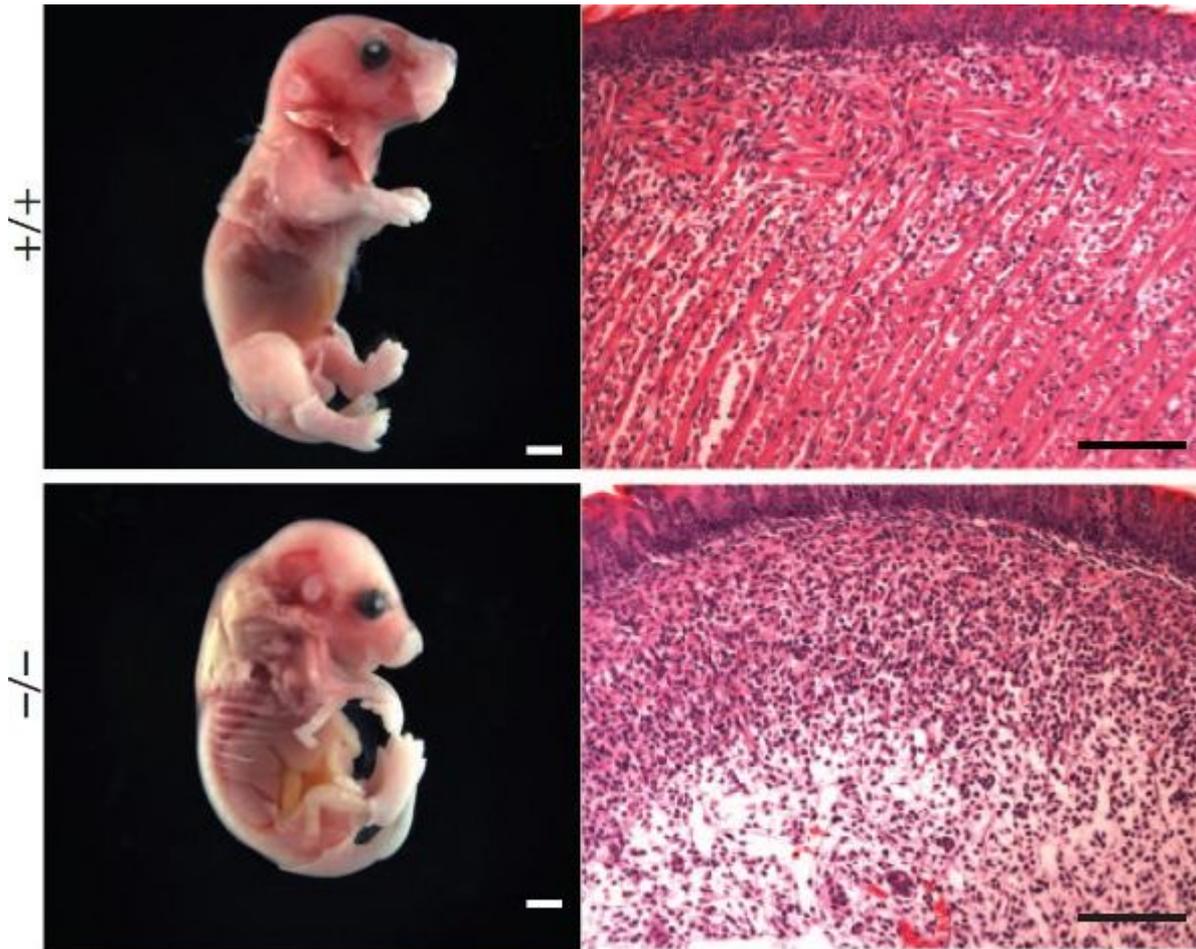
Myf-2c

Дезорганизация миофибрилл, перинатальная гибель (дезорганизация саркомеров)

Миомейкер

Слияние миобластов и образование мышечных волокон

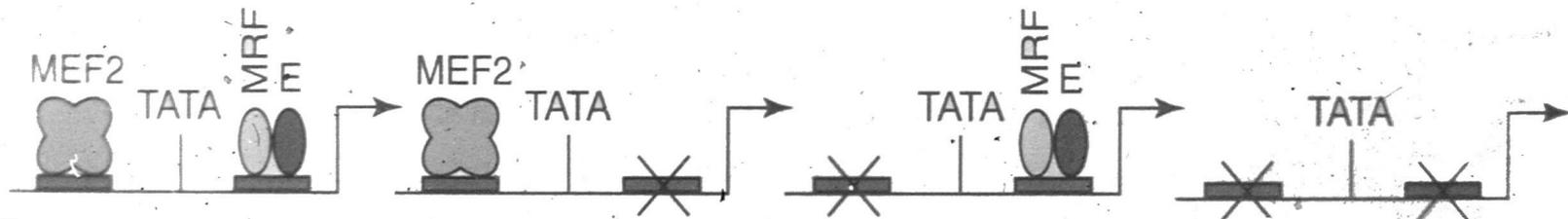
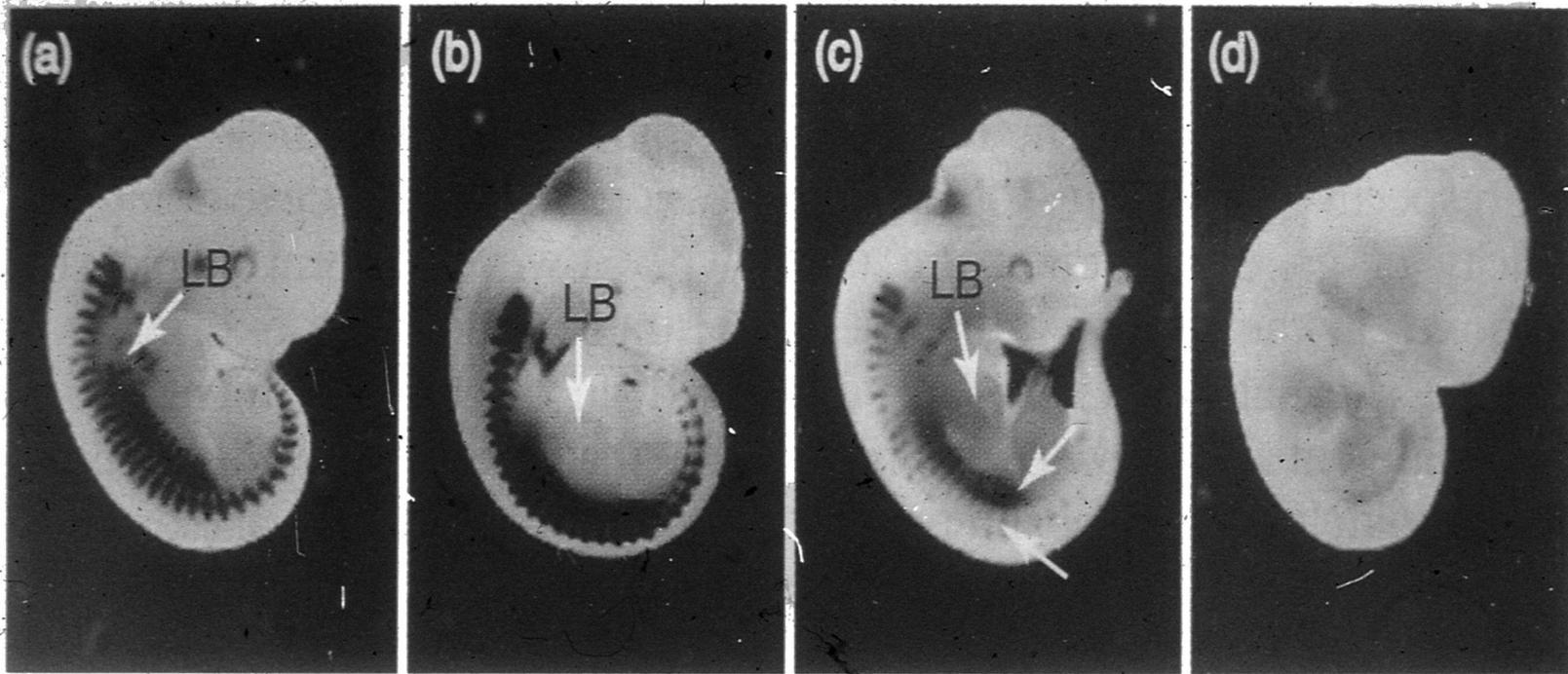
Влияние нокаута гена *миомейкера* (-/-) на формирование мышечных волокон



Зародыши на 17,5 день

Срез языка

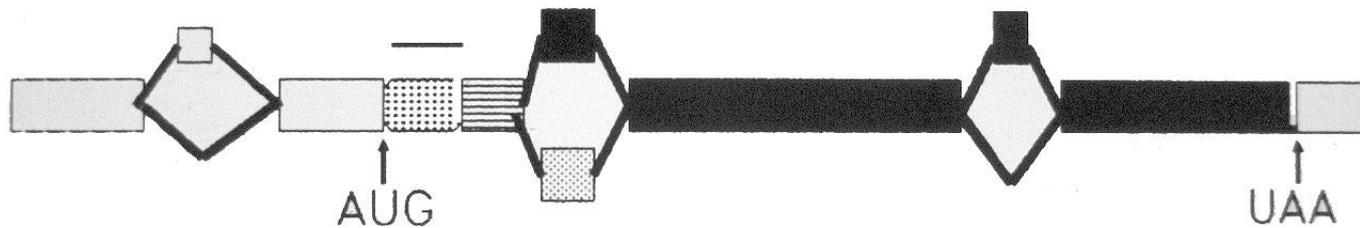
Экспрессия гена-репортера (*lacZ*) под контролем регуляторных элементов гена миогенина в сомитах и почке конечности (LB)



Регуляторные
элементы

MEF2 – фактор транскрипции, обеспечивающий экспрессию генов во всех скелетных и сердечных мышцах

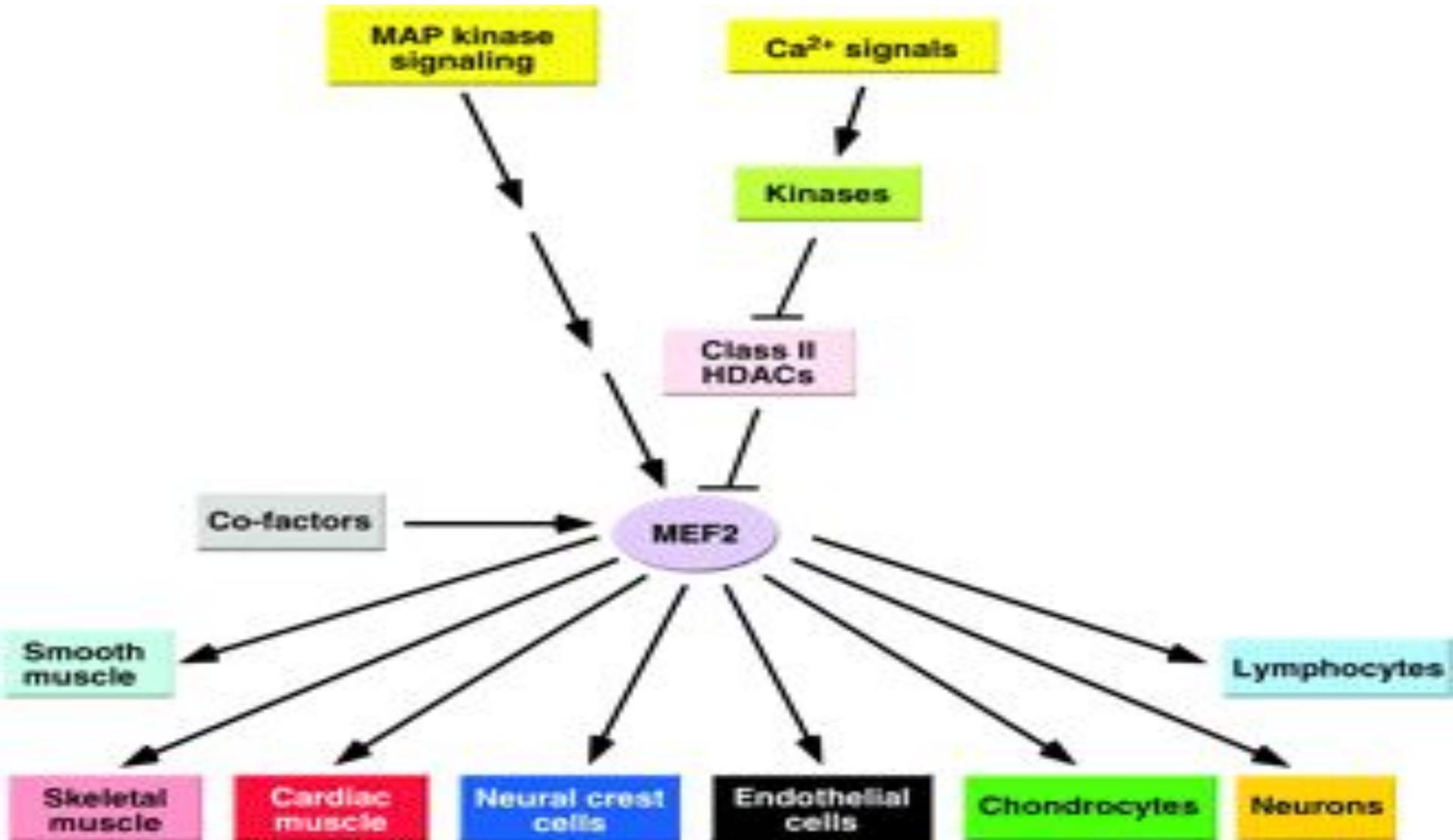
(MEF2 - myoocyte-specific enhancer-binding factor 2)



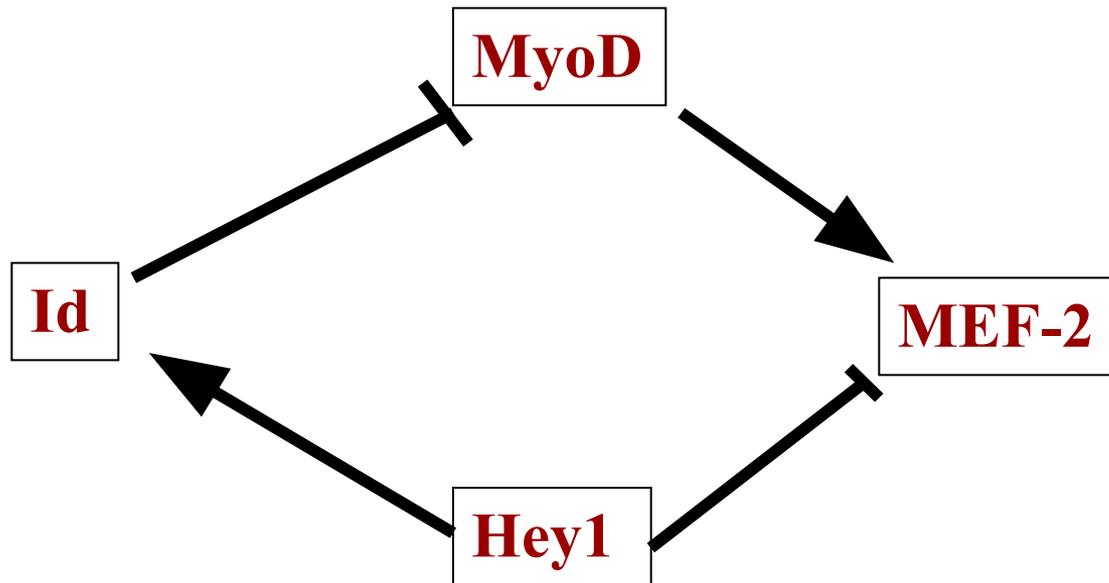
Альтернативный сплайсинг

У млекопитающих 4 гена MEF-2. Только нокаут гена MEF2C приводит к летали в результате дезорганизации саркомеров.

MEF2 as a central regulator of differentiation and signal responsiveness.



Взаимодействие между разными факторами транскрипции в скелетных мышцах



Субпрограмма регуляции генов в развивающихся сердечных мышцах

Nkx2.5 – фактор транскрипции, индуцирующий гены, ассоциированные с дифференцировкой кардиомиоцитов

Id – ингибирующий фактор (нокаут 2-х из 3-х - леталь)

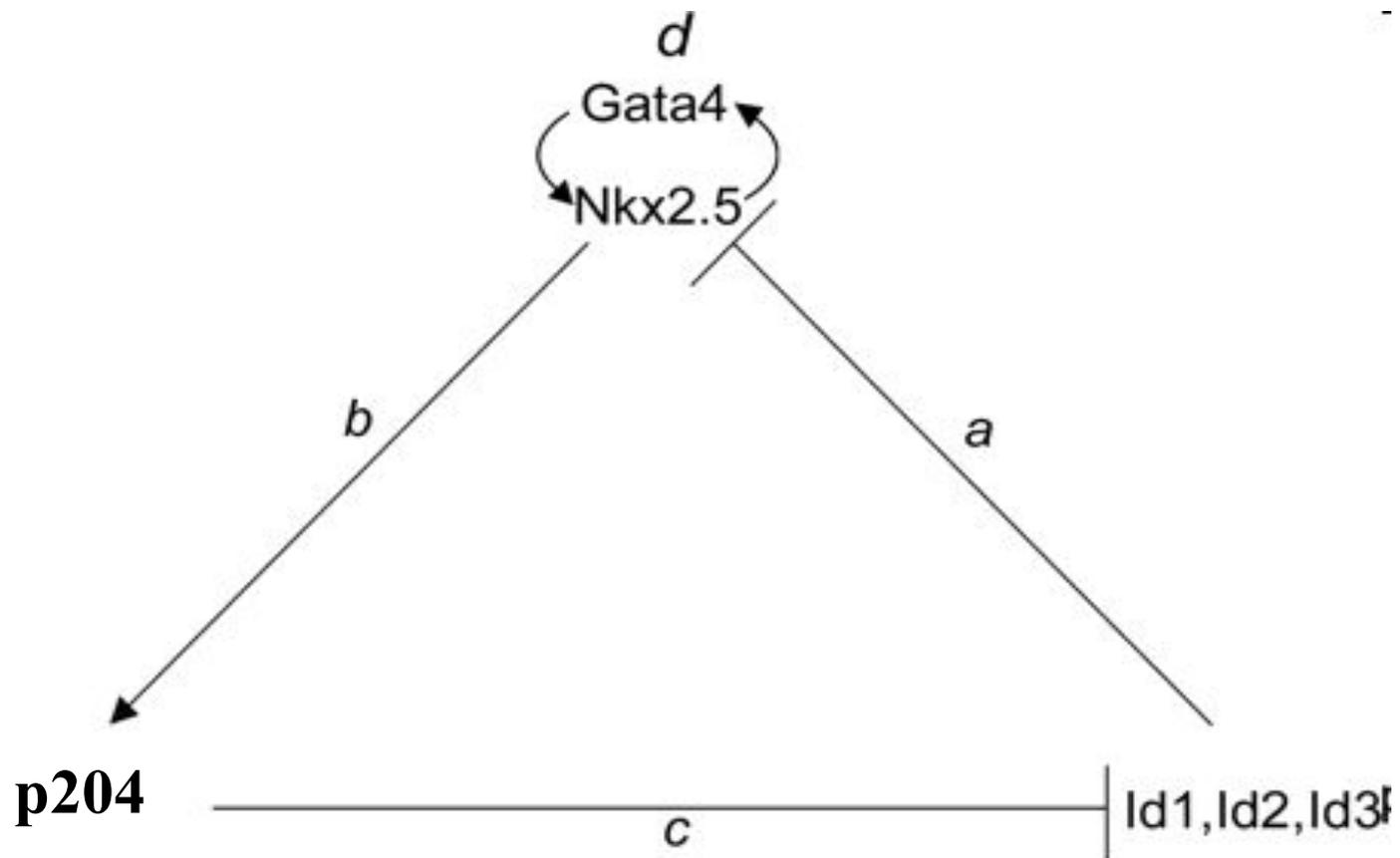
GATA-4 и 5 – факторы транскрипции, кооперативно регулируют пролиферацию кардиомиоцитов (нокаут обоих – леталь)

FOG-2 – фактор транскрипции, конкурирует с GATA-4 и ингибирует его действие (регулируется miRNA)

Foxm1 – фактор транскрипции, важен для пролиферации развивающихся кардиомиоцитов

Миомезин – участвует в упаковке миофибрилл (его образование регулирует MEF-2C)

Взаимосвязи между разными факторами транскрипции в сердечных мышцах



Субпрограмма регуляции генов в гладких мышцах

**SRF (serum response factor) – контролирует
большинство генов ГМ**

**Myocardin – корегулятор SRF, необходим для
поддержания структуры миоцитов**

**SM22alpha (трансгелин) - актин-связывающий
белок, маркер ГМ**

**TGF-beta – при нокауте - нарушение
дифференцировки ГМ**

NOX, microRNA и др.

Нейроспецифические факторы транскрипции

Инициаторы нейрогенеза (детерминирующие):

Neurogenin 1 и Neurogenin 2 – (при нокауте - нарушение развития дофаминэргических нейронов среднего мозга)

MASH-1 (при нокауте - нарушение развития симпатических и парасимпатических ганглиев)

Терминатор нейрогенеза (дифференцирующие):

NeuroD (при нокауте – нарушение развития сенсорных нейронов внутреннего уха и диабет!)

Fox P2 - управляет развитием нервных клеток, отвечающих за язык и речь.

Olig - управляет формированием мотонейронов и миелинизацией глии.

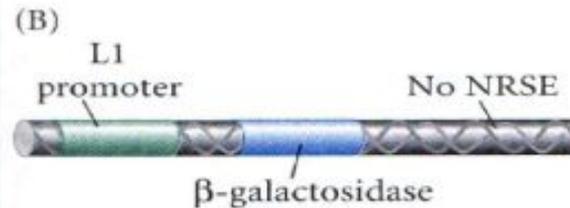
Негативные регуляторы, участвующие в нейрогенезе

HES - репрессирует нейроспецифичные факторы транскрипции при нейрогенезе, обеспечивает синаптические функции дифференцированных нейронов.

Id - ингибируют нейроспецифические факторы транскрипции

REST, NRSE – ингибирует экспрессию нейроспецифических генов в ненейрональных клетках

NRSE (neural restrictive silencer element)

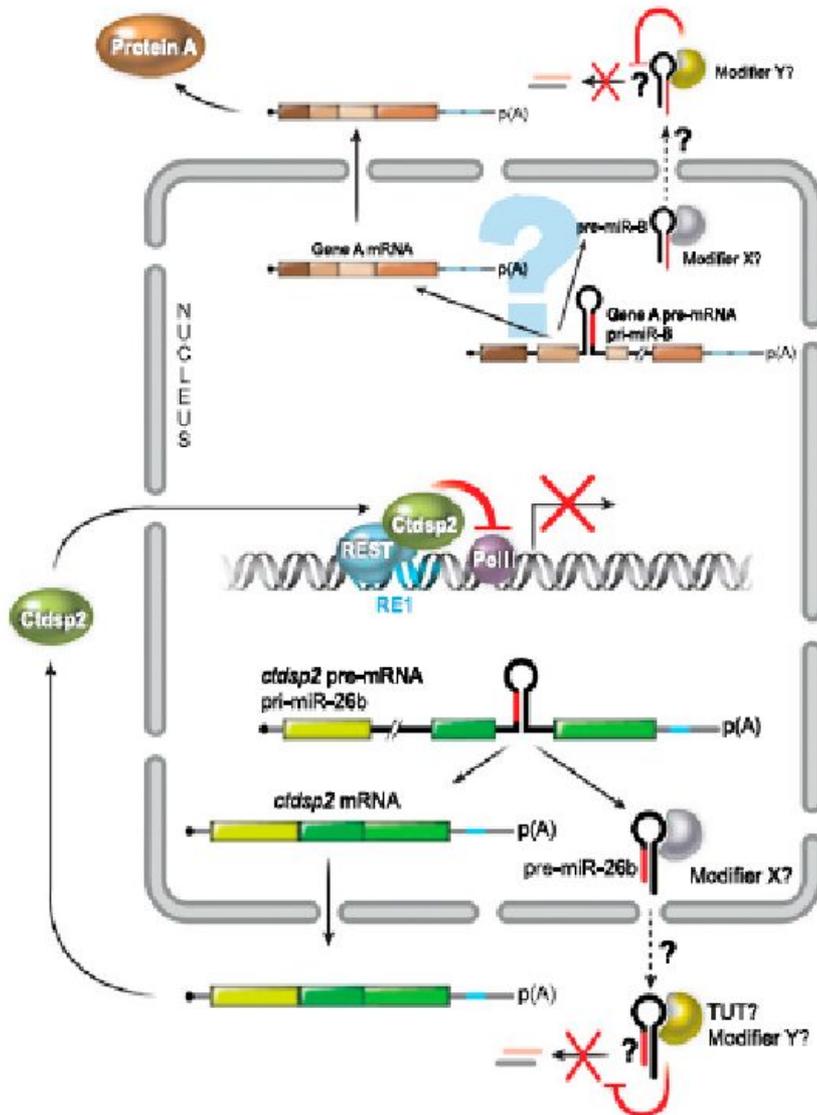


Analysis of β -galactosidase staining patterns in 11.5-day embryonic mice containing (A) a transgene composed of the *L1* promoter, a portion of the *L1* gene, and a bacterial *lacZ* gene fused to the second exon (which contains the NRSE region), or (B) a similar transgene, but lacking the NRSE sequence. The dark areas reveal the presence of β -galactosidase (the *lacZ* product). (From Kallunki et al. 1997.)

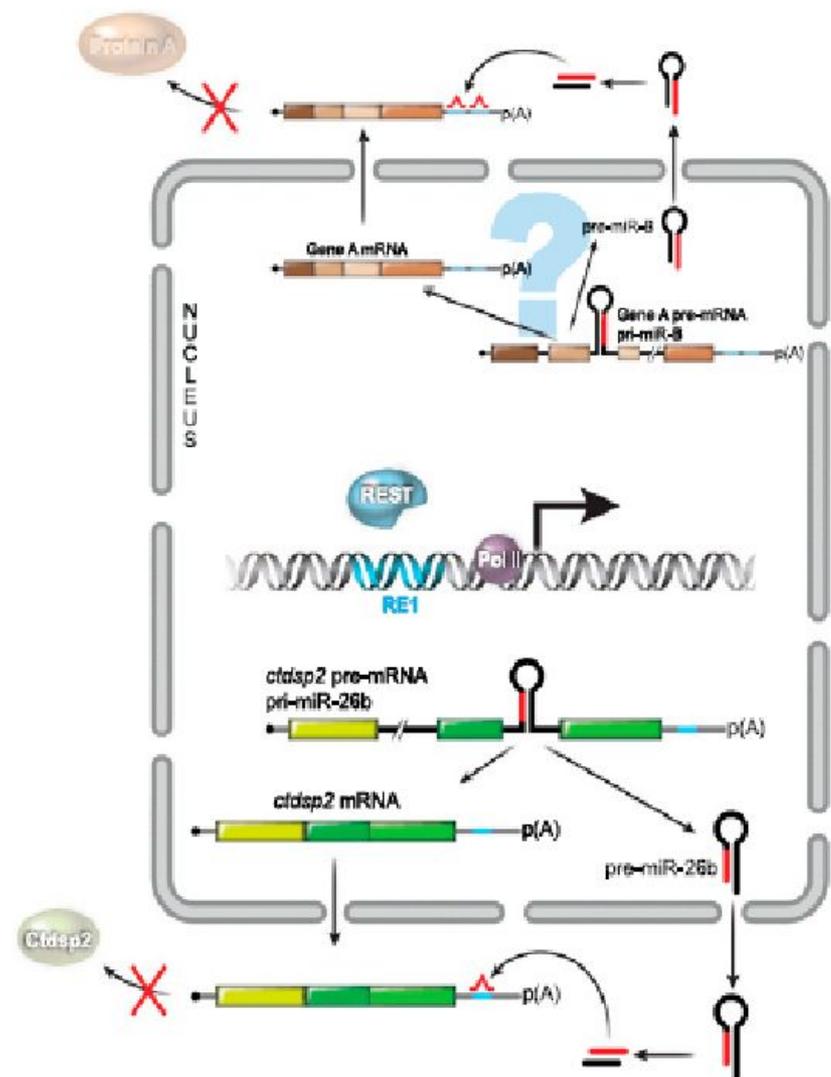
L1 – ген белка адгезии нервных клеток

Регуляция нейрональной дифференцировки с помощью негативного фактора транскрипции REST, гена *ctdsp2* и кодируемой им miR 26b

Ненейронные клетки



Нейронные клетки



Факторы семейства En, содержащие гомеодомены

En1 и En2 – 55% гомологии аминокислот

**En1 - экспрессируется на стадии 1-ого сомита
(нокаут - гибель)**

**En2 – на стадии 5-ти сомитов (нокаут - дефекты
среднего мозга).**

**Замена En1 на En2 – нормальное развитие –
важность временного фактора.**

Мишени для сигнала от фактора роста Wnt.

Факторы транскрипции в эритропоэзе

SCL — фактор транскрипции в стволовых кроветворных клетках, предшественниках эритроцитов, мегакариоцитов.

C-Myb - индуцирует коммитированность эмбриональных предшественников в направлении гемопоэза.

NF-E2 — активирует транскрипцию альфа- и бета-глобинов, ферментов синтеза гема (порфобилиноген дезаминаза и феррохелатаза).

GATA1 — поддерживает нормальный эмбриональный и постнатальный гемопоэз, экспрессируется в эритроидных клетках и мегакариоцитах.

GATA2 - экспрессируется кроветворными клетками, участвует в регуляции экспрессии гемопоэтических факторов, контролирующих эмбриональный гемопоэз в желточном мешке и печени.

EKLF - влияет на эритропоэз, стимулируя экспрессию гена бета-глобина; возможный переключатель эритропоэза на дефинитивный тип (переключение синтеза с гамма- на бета-глобин).

В регуляции дифференцировки эритропоэтических клеток на разных стадиях онтогенеза участвуют разные наборы факторов транскрипции

Нокаут GATA-2 - нарушение гематопоза в желточном мешке.

Нокаут c-myb – нарушение гематопоза в печени плода

Специфические факторы транскрипции в лимфоидной системе

Ikaros – регулирует спецификацию лимфоидных клеток

Helios – регулирует дифференцировку клеток в T-helper 2

Jak-3 – контролирует развитие В-клеток и функциональную компетентность Т-клеток.

c-Myb – контролирует начальные этапы созревания В-клеток

miR-150 – дегградация c-Myb

Клинические аспекты, связанные с ФТ

Rett syndrome. Мутации в гене ФТ MeCP2 ассоциированы с синдромом Ретта (нейродегенеративное заболевание)

Диабет. Редкая форма Maturity onset diabetes of the young обусловлена мутациями в генах некоторых ФТ.

Developmental verbal dyspraxia. (нарушение речевых функций). Мутации в гене ФТ FOXP2.

Аутоиммунные заболевания. Мутации в гене ФТ FOXP3 связаны с аутоиммунным заболеванием IPEX (immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome).

Рак. Многие ФТ являются онкогенами или онкосупрессорами, и их мутации или неправильная регуляция могут приводить к развитию рака. Например, синдром Li-Fraumeni обусловлен мутациями в гене онкосупрессора p53.

Факторы роста, участвующие в эмбриональном развитии

Факторы роста

Свыше 100

Широкая специфичность: NGF, PDGF, EGF, FGF, TGF-beta и др.

Узкая специфичность: эритропоэтин

Семейство опухолеродных факторов TGF-beta:

TGF-beta 1, активин A, ингибины A и B, BMP-2, 4 и др.

Мультифункциональны, обладают как

активирующим, так и ингибирующим действием:

BMP-4 (костный морфогенетический белок) :

1) определяет дорзально-вентральное

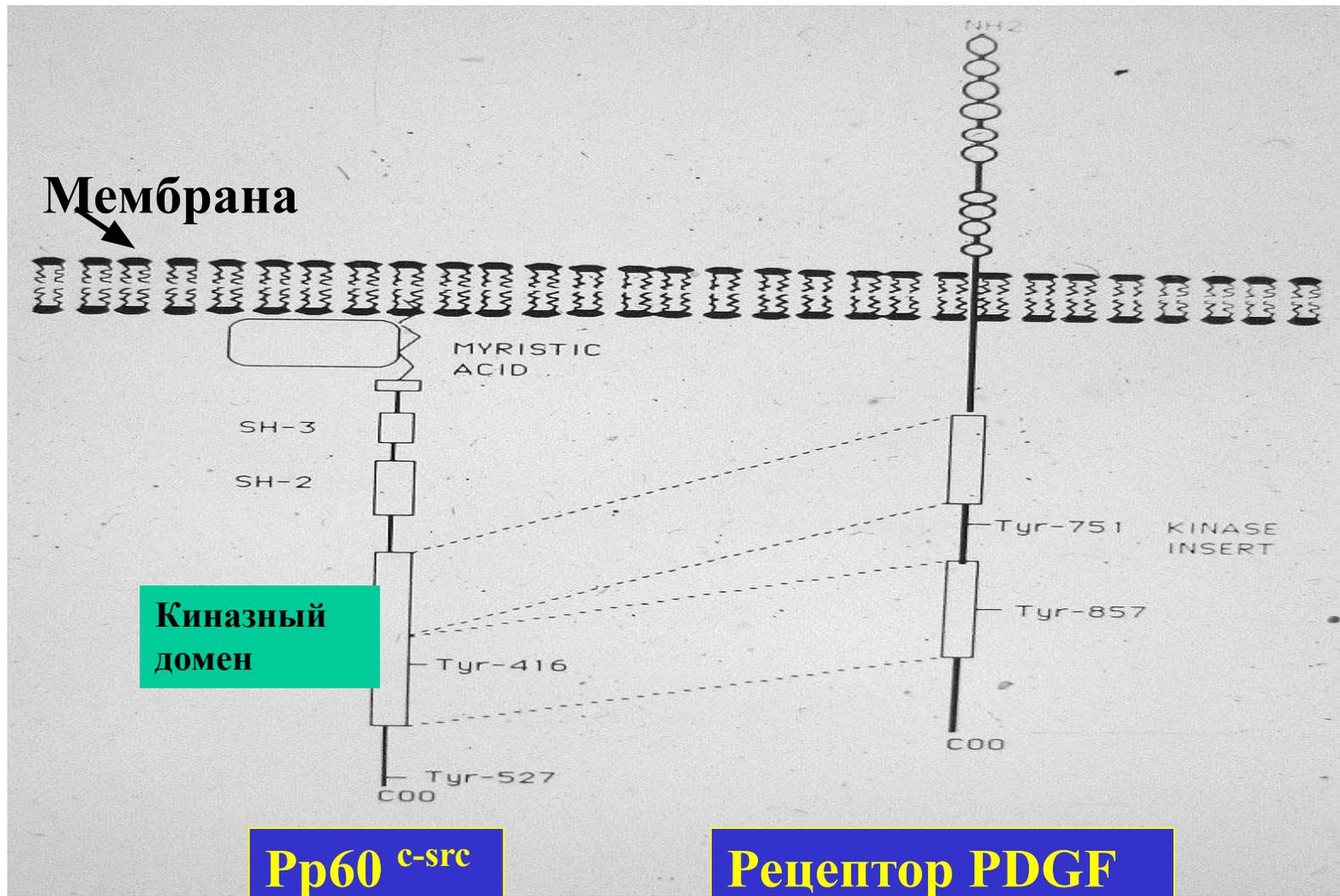
паттернирование при развитии

2) ингибитор перехода эктодермальных клеток к нейрональным

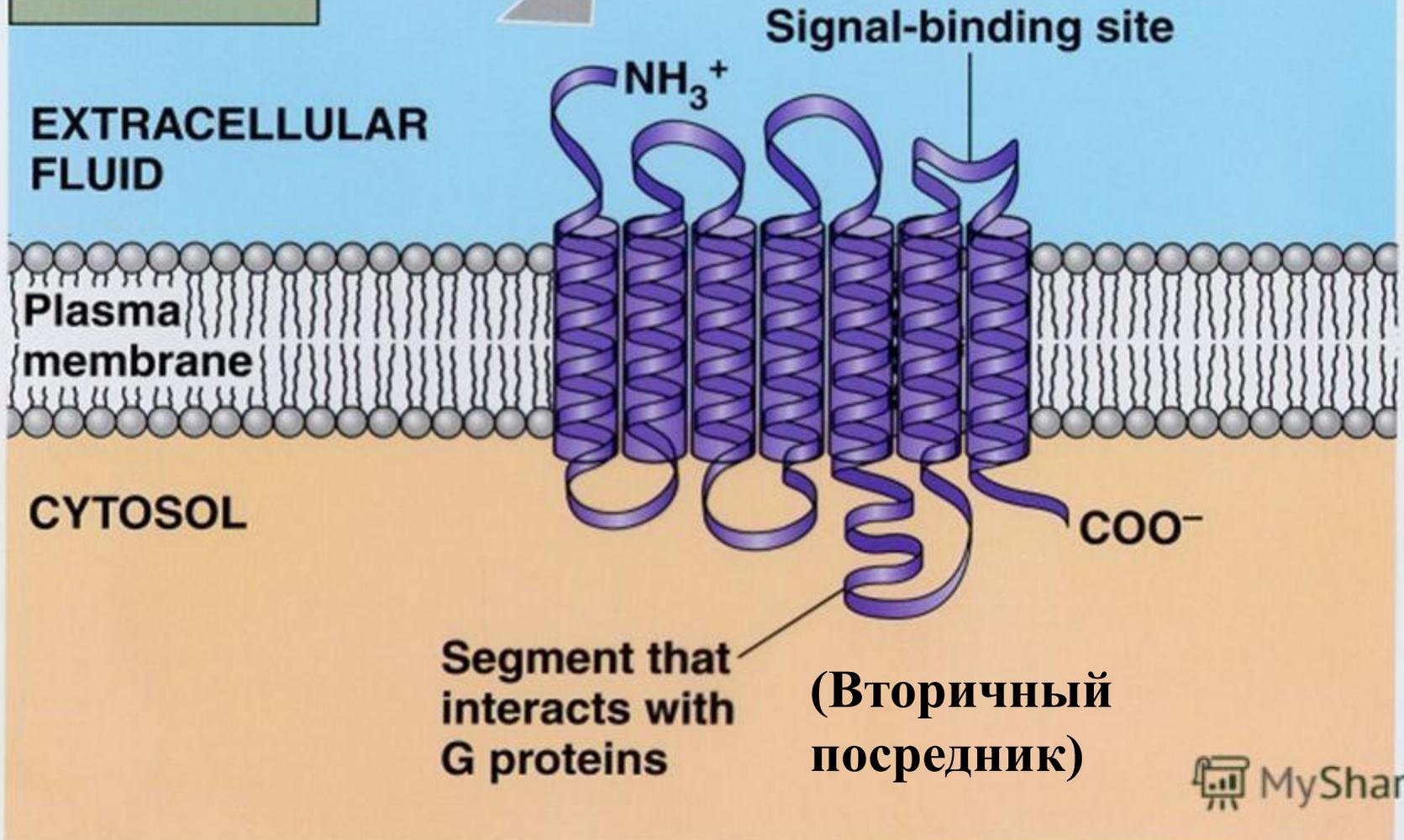
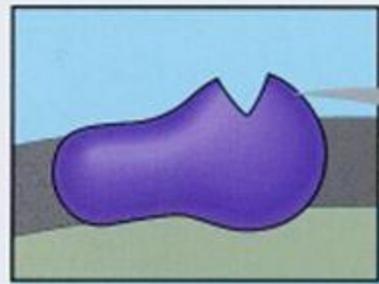
3) индуктор перехода эктодермальных клеток к эпидермальным.

Фактор роста	Рецепторы	Клетки мишени	Клетки продуценты
PDGF фактор роста тромбоцитов (v-sis)	Тирозинкиназы	Мезенхимальные клетки, глиальные гладкие мышцы, плацентные трофобласты	тромбоциты, плацента, эндотелий
EGF и TGF-альфа	Тирозинкиназа cErb протоонкоген	Эпителиальные, мезенхимальные и глиальные клетки	EGF: submaxillary gland, Brunner gland TGF: эмбриональные клетки
TGF-бета семейство	ТбетаRI, ТбетаRII Серин-треонин-киназы	Множество тканей	Множество типов клеток
FGF	Тирозинкиназа	Множество тканей	Множество типов клеток
IGF-1 и 2	IGF-1: тирозинкиназа	Множество тканей	Печень
NGF	тирозинкиназа	Нервные клетки	Поджелудочная железа
M-CSF	тирозинкиназа, продукт c-fms протоонкогена	Гематопозитические клетки	Фибробласты, моноциты, эндотелий
G-CSF		Гематопозитические клетки	Макрофаги, фибробласты, эндотелий
GM-CSF		Гематопозитические клетки	T-лимфоциты, Макрофаги фибробласты эндотелий

Типы строения рецепторов факторов роста



Связывающие сайты для лиганда и G-белка



EXTRACELLULAR
FLUID

Plasma
membrane

CYTOSOL

Signal-binding site

NH₃⁺

COO⁻

Segment that
interacts with
G proteins

(Вторичный
посредник)

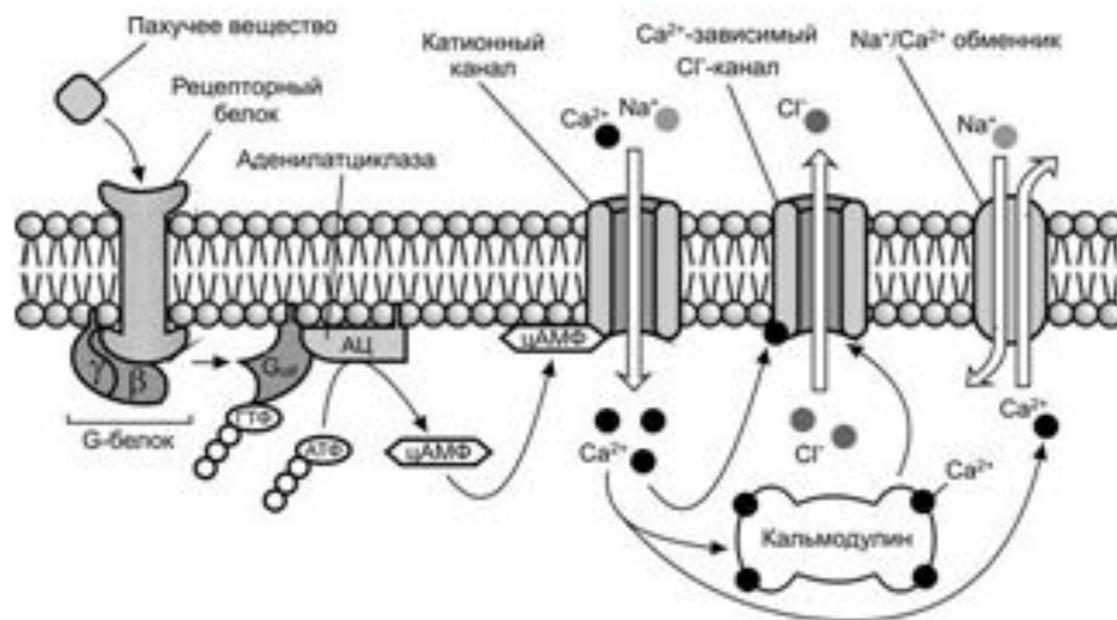
Пути передачи сигнала

- Активируемые преимущественно одним надсемейством рецепторов (например, аденилатциклазный путь и изменение уровня цАМФ)
- Активируемые через различные надсемейства рецепторов (MAP-киназный каскад, обмен фосфатидилинозитидов и фосфоинозитидов)

Основные механизмы передачи сигнала в клетке

- 1) Фосфорилирование-дефосфорилирование (киназы, фосфатазы).
- 2) Вторичные мессенжеры (цАТФ, цГТФ, инозитолтрифосфат и др.).
- 3) Внутриклеточные сигналы – ГТФазы.
- 4) Ca⁺-каналы.
- 5) Оксид азота (NO участвует в расслаблении эндотелия, в передаче сигнала между нейронами, в иммунном ответе; образуется в результате дезаминирования аргинина до цитруллина (NO-синтетаза).

Система цАМФ в ответ обонятельной рецепторной клетки на её адекватную стимуляцию



Метаболическая цепь: Взаимодействие пахучего вещества с белком-рецептором в плазмолемме обонятельных ресничек, активация G-белка, повышение активности аденилатциклазы, увеличение уровня цАМФ, активация цАМФ-зависимых воротных ионных каналов, деполяризация мембраны, взаимодействие цАМФ с кальмодулином, инактивация цАМФ, выведение Ca^{2+} из клетки в обмен на Na^+ .

Семейство факторов роста фибробластов (FGFs)

- **22 различных белков** (онкобелки int-2 (FGF-3) и hst (FGF-4), FGF-5, фактор роста кератиноцитов, фактор роста эндотелия сосудов и др.).
- 4 рецептора ФРФ.
- **Полифункциональны:** митогены для различных клеток, включая клетки нейроэктодермального и мезенхимального происхождения, стимуляторы ангиогенеза, поддерживают и стимулируют дифференцировку клеток различных нейрональных типов *in vivo* и *in vitro*.
- **в определенной мере взаимозаменяемы.**
- **участвуют в онкогенезе.**
- **используются в генной терапии и косметологии.**

Установление функций FGFs с помощью нокаута генов

Ген	Нарушения в развитии
FGF-1	Нет
FGF-2	Небольшие нарушения развития мозга и регуляции кровяного давления, в заживлении ран
FGF-3	Нет
FGF-4	Нарушение дорзально-вентрального паттернирования
FGF-5	Увеличение роста волос
FGF-6	Нарушения в формировании скелетных мышц

