

Лекция №3

Часть 1. Генные сети

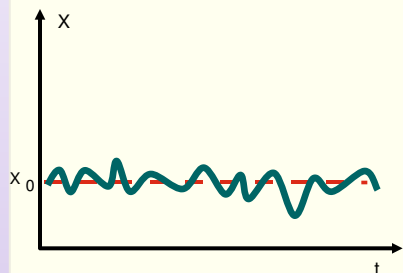
Часть 2. Генные сети в эпоху
высокопроизводительного секвенирования

к.б.н., с.н.с. лаб. эволюционной биоинформатики
и теоретической генетики Игнатьева Е.В.

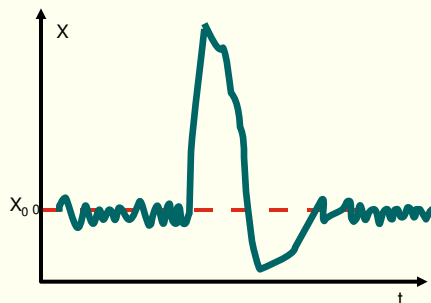
Базовые принципы организации генных сетей

1. Существование большого разнообразия молекулярных механизмов, обеспечивающих функционирование обратных связей, в том числе за счет изменения интенсивности процессов транскрипции, сплайсинга, трансляции, посттрансляционных модификаций белков, ферментативных реакций, транспорта и т. д.;
2. Наличие в каждой сети «центральных» генов и белков (ключевых регуляторов), обеспечивающих координацию функций остальных генов этой сети;
3. Кассетный механизм регуляции экспрессии генов либо активности белков;
4. Молекулярная бюрократия;
5. Авторегуляция генной сети, осуществляемая благодаря функционированию регуляторных контуров с положительными и отрицательными обратными связями и направленная на поддержание определенного, характерного для каждой генной сети **типа динамики**;
6. Иерархическая организация;
7. Компартиментализация ГС

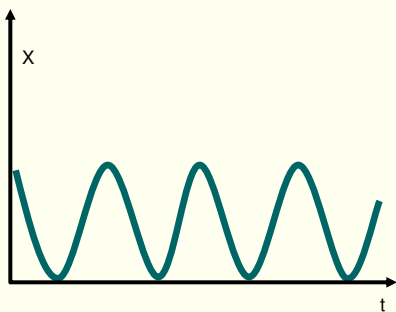
Четыре характерных типа динамики критических переменных



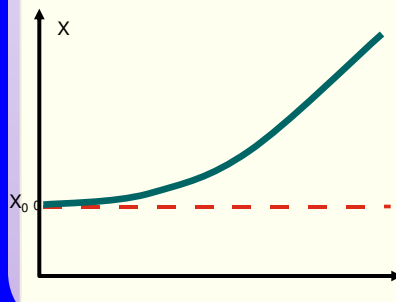
Генные сети
гомеостаза:
(постоянство
контролируемых
переменных)



Генные сети стрессового
ответа (выраженное
отклонение контролируемых
переменных с последующим
возвращением к норме)



Генные сети
циклических
процессов
(осциляция
контролируемых
переменных)



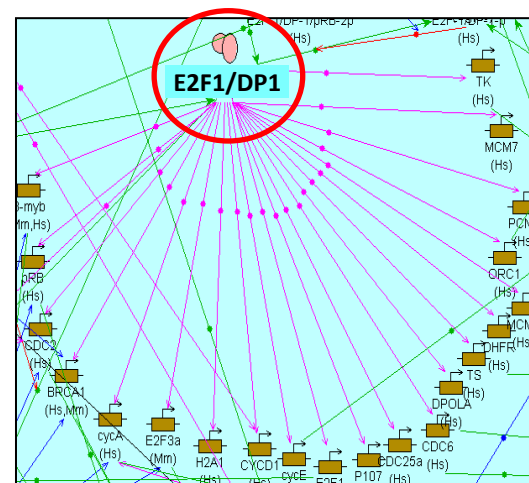
Генные сети
дифференцировки и
морфогенеза
(монотонное отклонение
переменных от текущего
состояния)

ПОВТОРЕНИЕ: Кассетный принцип регуляции: у эукариот каждый транскрипционный фактор может регулировать около 1000 генов

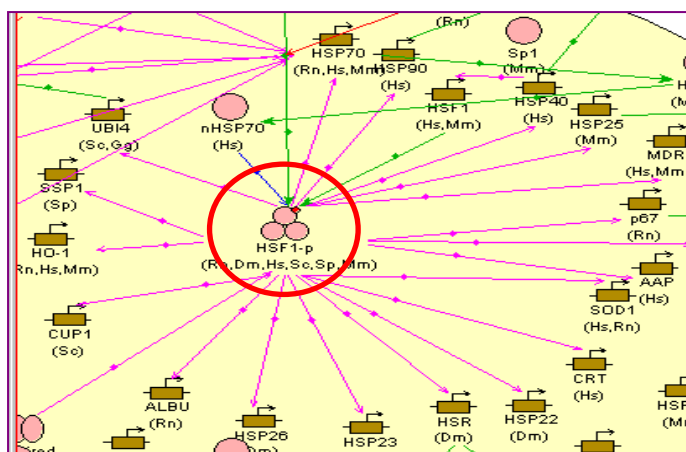
При этом определенная доля из множества регулируемых генов функционируют в составе сети, контролирующей важный биологический процесс .

Таким образом рассматриваемый транскрипционный фактор является ключевым регулятором биологического процесса.

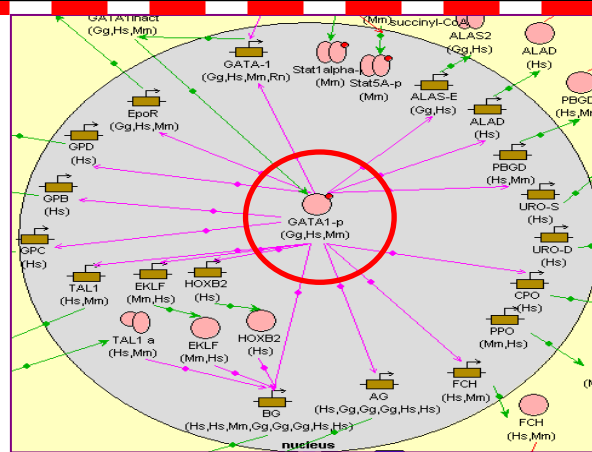
Рассмотрение темы «Генные сети дифференцировки и морфогенеза» будет осуществляться на примере процесса, регулируемого транскрипционным фактором GATA-1



Генная сеть клеточного цикла на стадии G1/S –
центральный регулятор – транскрипционный фактор
E2F1/DP1



Генная сеть теплового шока – центральный регулятор –
транскрипционный фактор HSF1 (Heat shock factor protein 1)

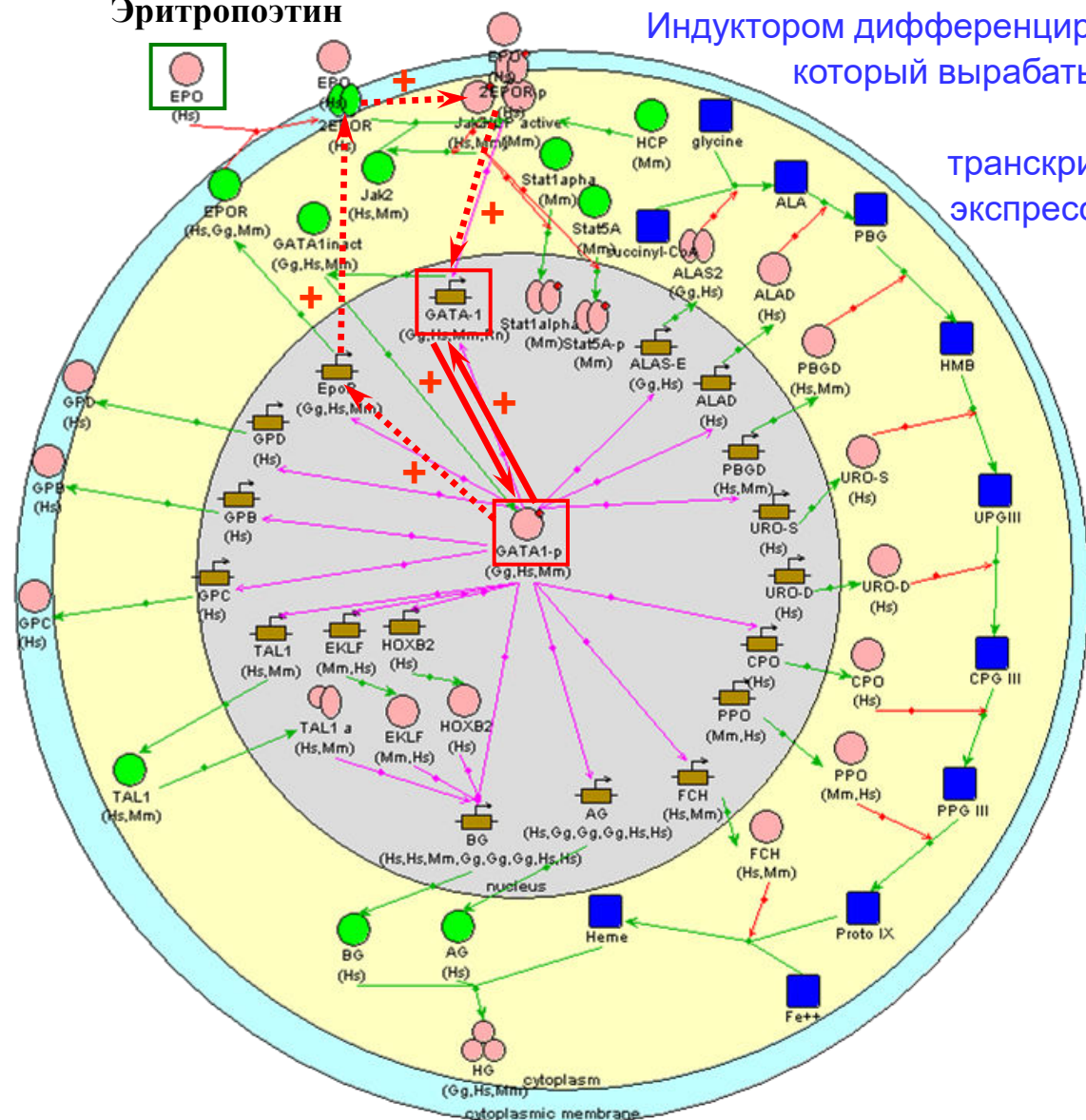


Генная сеть дифференцировки эритроцита –
центральный регулятор – транскрипционный фактор
GATA1 (GATA-binding factor 1)

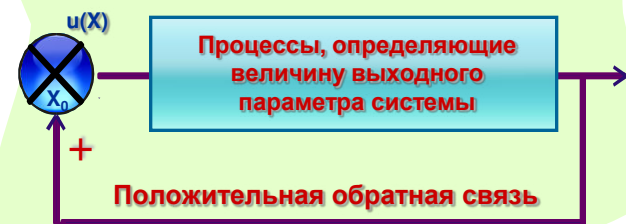
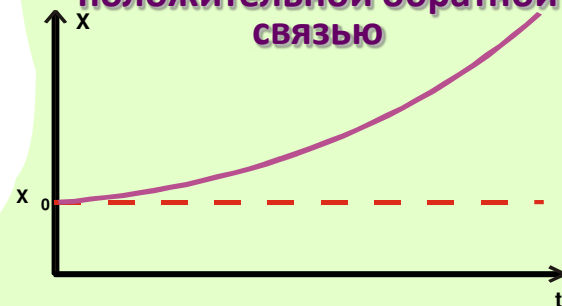
Генная сеть дифференцировки и созревания эритроцитов: контур с положительной обратной связью

Эритропоэтин

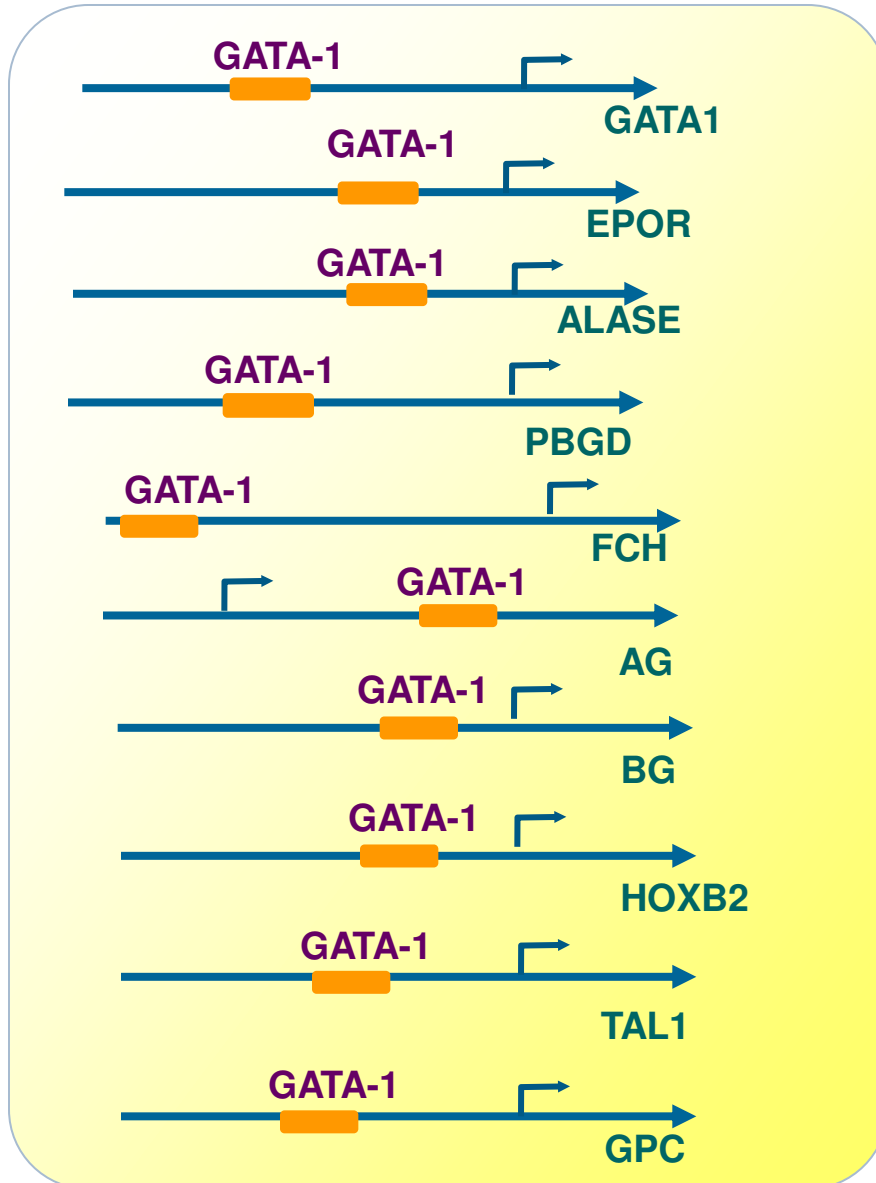
Индуктором дифференцировки является гормон эритропоэтин (ЕРО), который вырабатывается в почках. В ответ включается путь сигнальной трансдукции и активируется транскрипционный фактор GATA-1, активирующий экспрессию гена рецептора эритропоэтина (ЕроR), а также генов, кодирующих ферменты биосинтеза гема.



Принципиальная схема регуляторного контура с положительной обратной связью



Сайты связывания транскрипционного фактора GATA-1 в генах человека из геной сети дифференцировки и созревания эритроцитов



```
ctgttcgtcgaGATAAaagctgag
gcacacatgctGATAAcatccccg
gggtggccccAGATAActttttta
gaagggactgaGATACctttgggg
ggttgtaaacAGATAAacaaacct
ctggcagtgaAGATAAaacgtgtc
cgcccgccccCGATAAgcgcctcg
tgccgcccgaGATAAaggagccgc
tgggcctggaAGATAAcagctagt
tccttgctagAGATAAaacccaaa
agaggagaagGGATAAATgccagg
tgcaatgactAGATAGgcagtagc
tgctgctttgAGATAGgactttca
gtcttccatcAGATAGcatttgga
gcggggcgggAGATAAcaatccga
gcggggagtggAGATAAggctcagg
tctgcgtcagAGATAGgagggtctc
```

Базовые принципы организации генных сетей

1. Существование большого разнообразия молекулярных механизмов, обеспечивающих функционирование обратных связей, в том числе за счет изменения интенсивности процессов транскрипции, сплайсинга, трансляции, посттрансляционных модификаций белков, ферментативных реакций, транспорта и т. д.;
2. Наличие в каждой сети «центральных» генов и белков (ключевых регуляторов), обеспечивающих координацию функций остальных генов этой сети;
3. Кассетный механизм регуляции экспрессии генов либо активности белков;
4. Молекулярная бюрократия;
5. Авторегуляция генной сети, осуществляемая благодаря функционированию регуляторных контуров с положительными и отрицательными обратными связями и направленная на поддержание определенного, характерного для каждой генной сети типа динамики;
6. Иерархическая организация;
7. Компартиментализация ГС

Иерархическая организация ГС

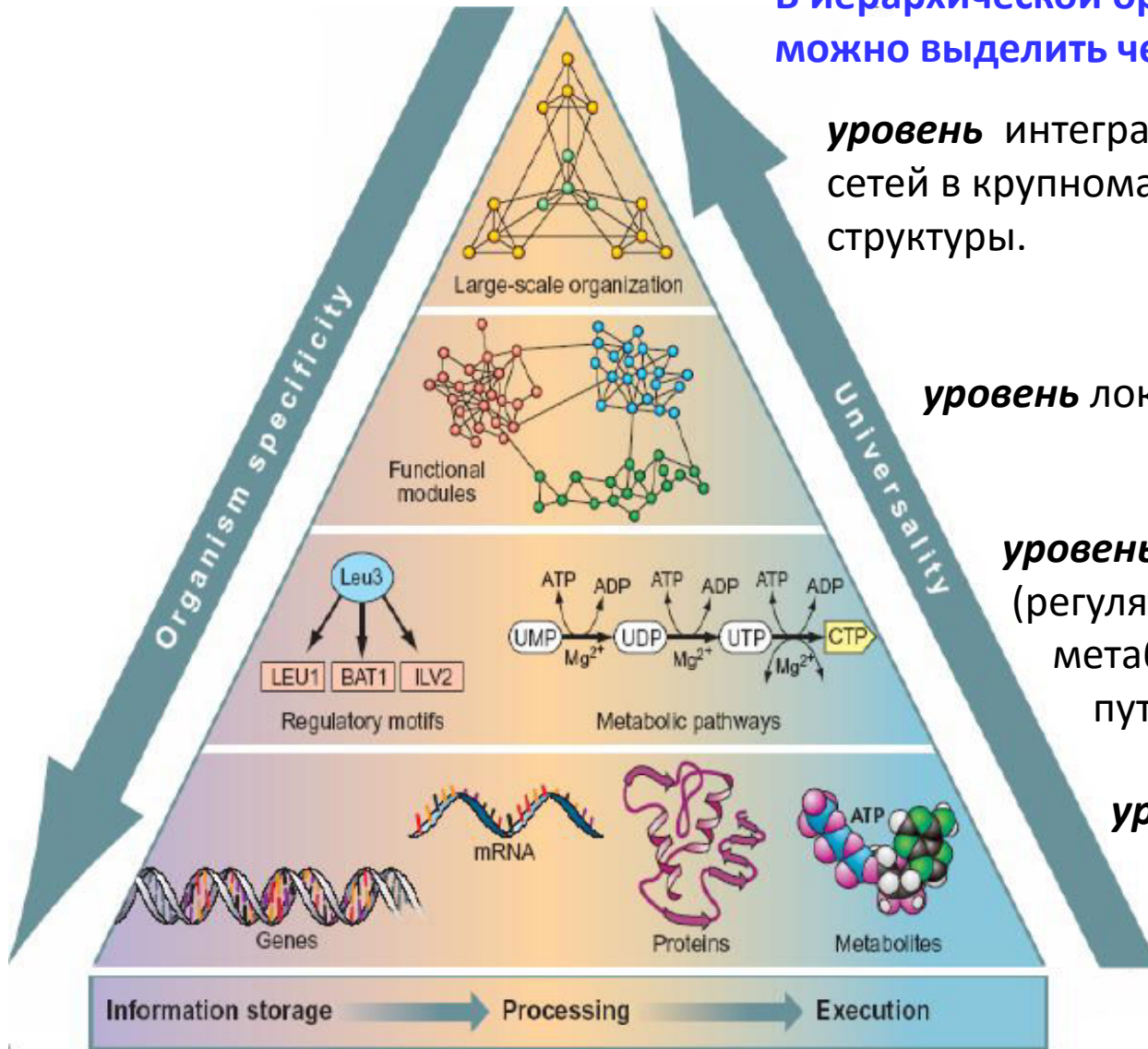
В иерархической организации генных сетей можно выделить четыре уровня:

уровень интеграции локальных генных сетей в крупномасштабные сетевые структуры.

уровень локальных генных сетей;

уровень операционных модулей (регуляторных мотивов, метаболических путей, путей передачи сигналов)

уровень базовых компонент - генов, РНК, белков и метаболитов;



Иерархическая организация ГС

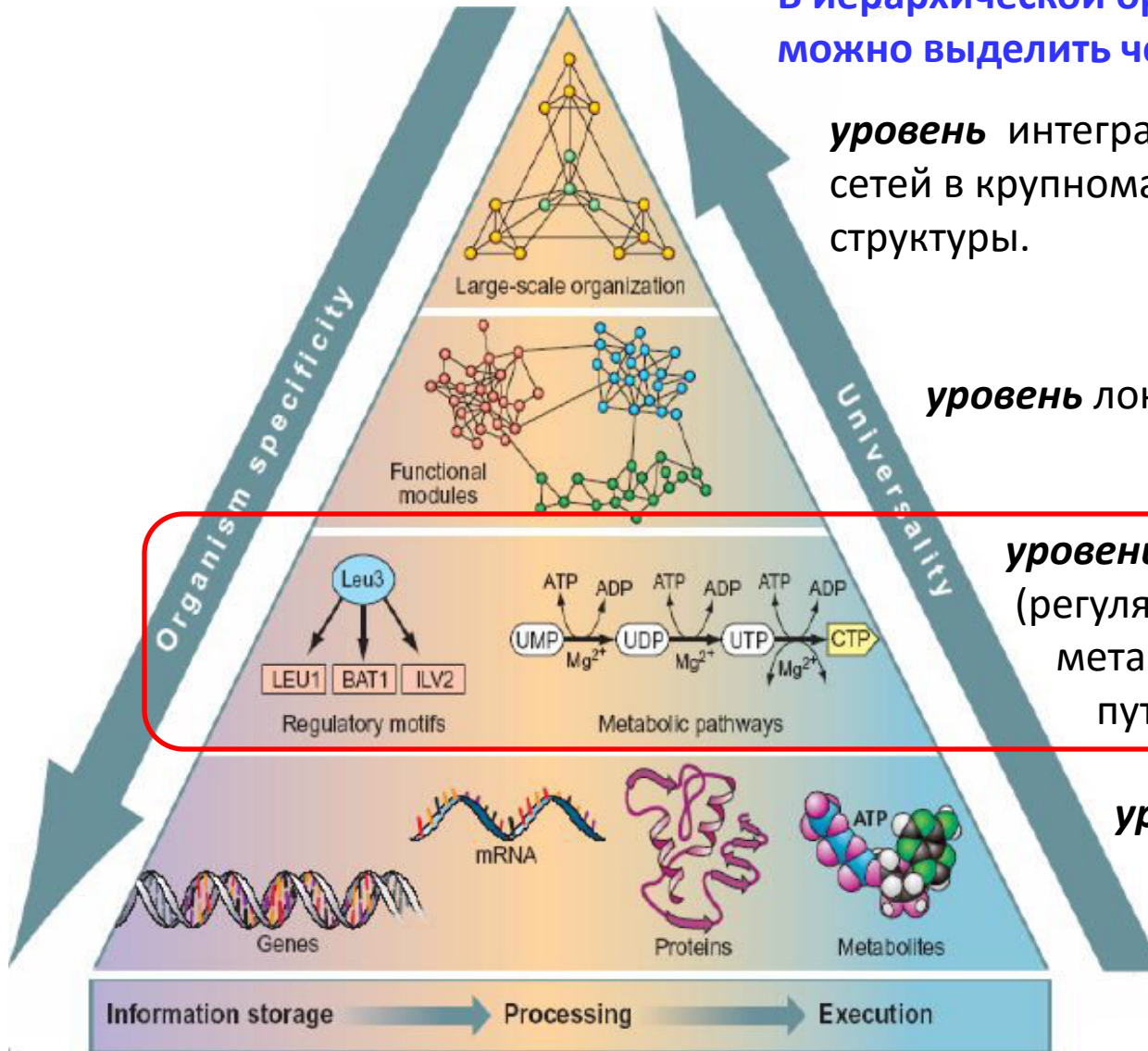
В иерархической организации генных сетей можно выделить четыре уровня:

уровень интеграции локальных генных сетей в крупномасштабные сетевые структуры.

уровень локальных генных сетей;

уровень операционных модулей (регуляторных мотивов, метаболических путей, путей передачи сигналов)

уровень базовых компонент - генов, РНК, белков и метаболитов;

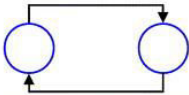
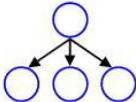
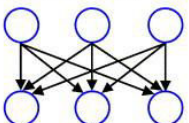
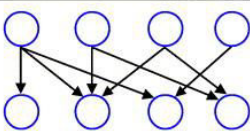
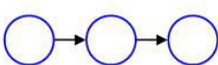
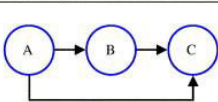


Элементарные структурные мотивы (регуляторные мотивы) - один из иерархических уровней организации ГС

Определение: связное подмножество генной сети малой размерности (обычно от 3 до 7), называется *элементарным структурным мотивом*, если частота наблюдения его в анализируемых генных сетях не менее некоторого минимального порога, обусловленного случайными причинами.

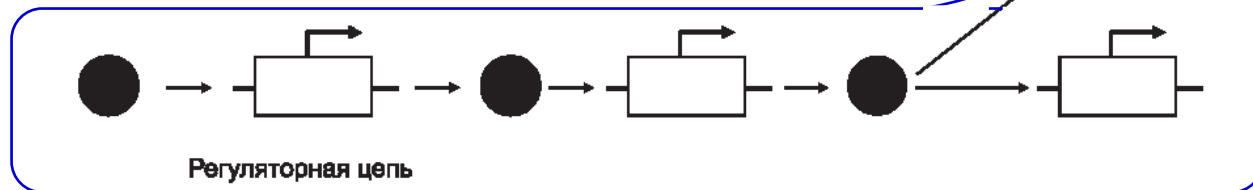
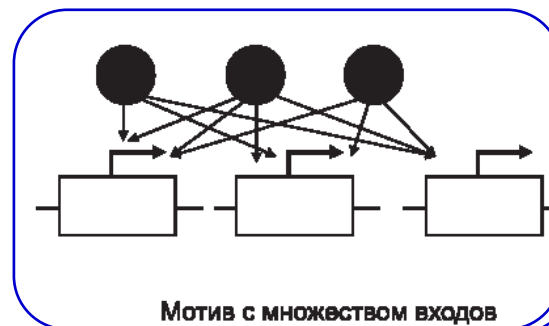
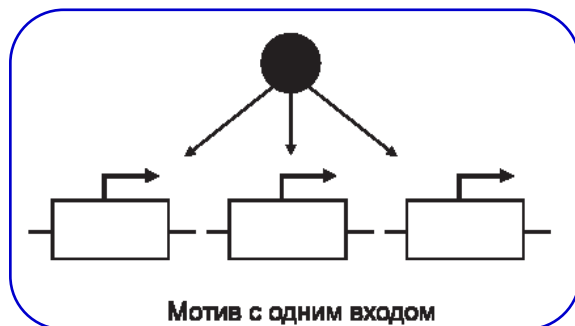
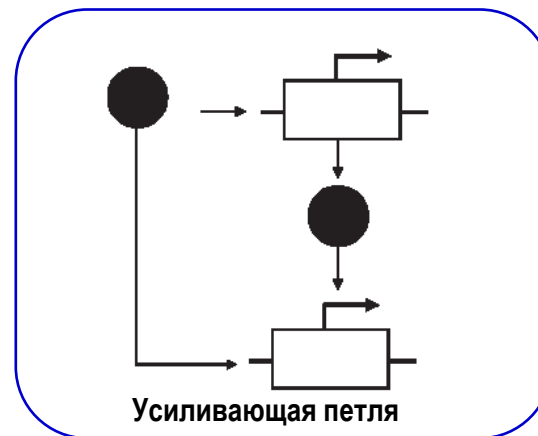
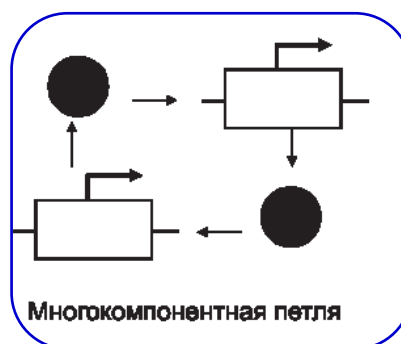
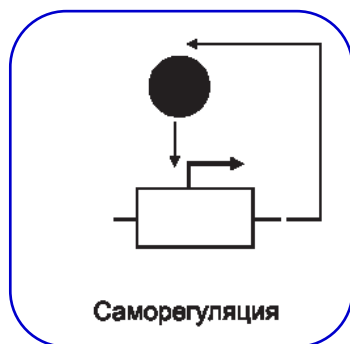
Введение в информационную биологию и биоинформатику. Том III. Учебное пособие под ред. Колчанова Н.А., Вишневого О.В., Фурман Д.П. Новосибирск, 2015, Стр.98-99.

Пример: регуляторные мотивы, выявленные в регуляторной сети дифференцировки эритроидных клеток

Network motif	Description
a 	Autoregulation: A factor binds and regulates its own expression. There are many examples in the blood network including Fli-1, GATA-2, c-myb, GATA-1 and PU.1.
b 	Multicomponent Loop: Two (or more) transcription factors regulate one another in a loop. No examples of this network motif have yet been identified in this network.
c 	Single-Input Motif (SIM): A single transcription factor regulates multiple target genes. No examples of this network motif have yet been identified in this network.
d 	Multi-Input Motif (MIM): A set of transcription factors all regulate a set of targets. This network motif is often a subset of the more frequently observed 'Dense Overlapping Region' (DOR). See Fig. 4A for examples including Fli-1, Elf-1, GATA-2, Hex and SCL.
e 	Dense Overlapping Region (DOR): A set of TFs that overlap to regulate a set of targets, each target being regulated by different combinations of regulators. See Fig. 4B for examples involving the SCL complex.
f 	Regulatory Chain: An ordered chain of three or more transcription factors in series. A chain ends if a gene has no target, or autoregulates. Examples include beta-catenin regulating HoxB4, which in turn regulates c-myc.
g 	Feed-Forward Motif: The first transcription factor (A) regulates an intermediate (B), with both required for target gene (C) regulation. There are 8 subtypes of feed-forward network motif dependent on the sign of the regulation (positive or negative) (Ma et al., 2004). See Fig. 5 for examples including GATA-1, EKLF, Fog-1, β -globin, GATA-2 and c-myb.

Элементарные структурные мотивы (регуляторные мотивы) - один из иерархических уровней организации ГС

Пример: шесть основных мотивов, выявленных при анализе генных сетей дрожжей



Иерархическая организация ГС

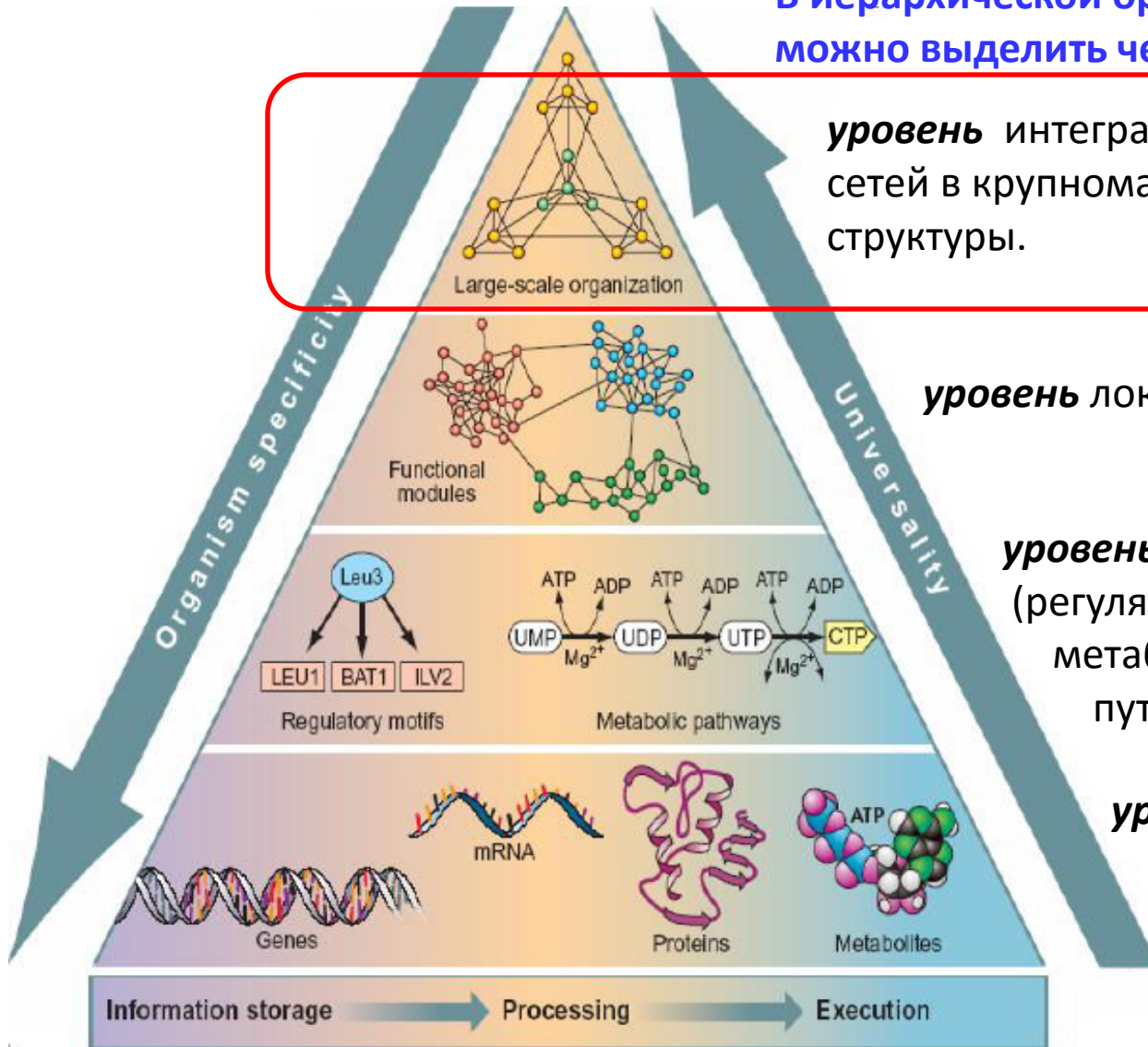
В иерархической организации генных сетей можно выделить четыре уровня:

уровень интеграции локальных генных сетей в крупномасштабные сетевые структуры.

уровень локальных генных сетей;

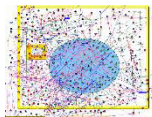
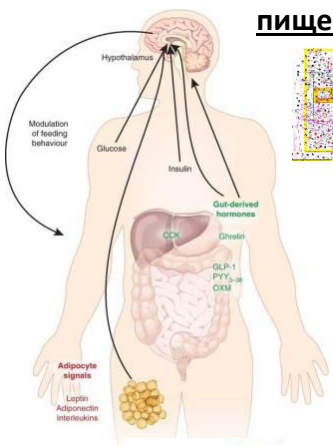
уровень операционных модулей (регуляторных мотивов, метаболических путей, путей передачи сигналов)

уровень базовых компонент - генов, РНК, белков и метаболитов;

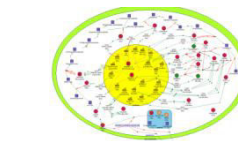


Генная сеть регуляции массы тела: уровень интеграции локальных генных сетей в крупномасштабные сетевые структуры.

Генная сеть регуляции пищевого поведения



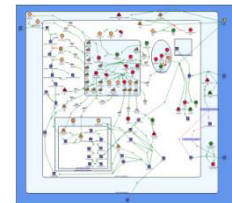
Центральная регуляция пищевого поведения



Генная сеть биосинтеза тиреоидных гормонов



Щитовидная железа



Генная сеть бета клеток подж. железы



Надпочечники



Поджелудочная железа

Регуляция метаболизма эндокринными железами

Поступление питательных веществ с пищей

Всасывание в кишечнике

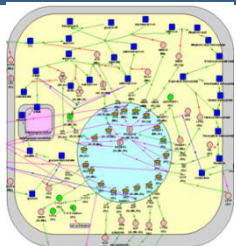
Транспорт по лимфо- и кровотоку

Метаболизм в печени

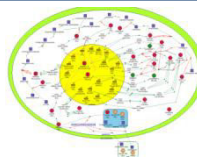
Метаболизм в периферических тканях и органах

Циркадный ритм

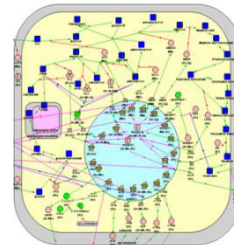
Накопление триглицеридов в жировой ткани



Генная сеть адипоцита



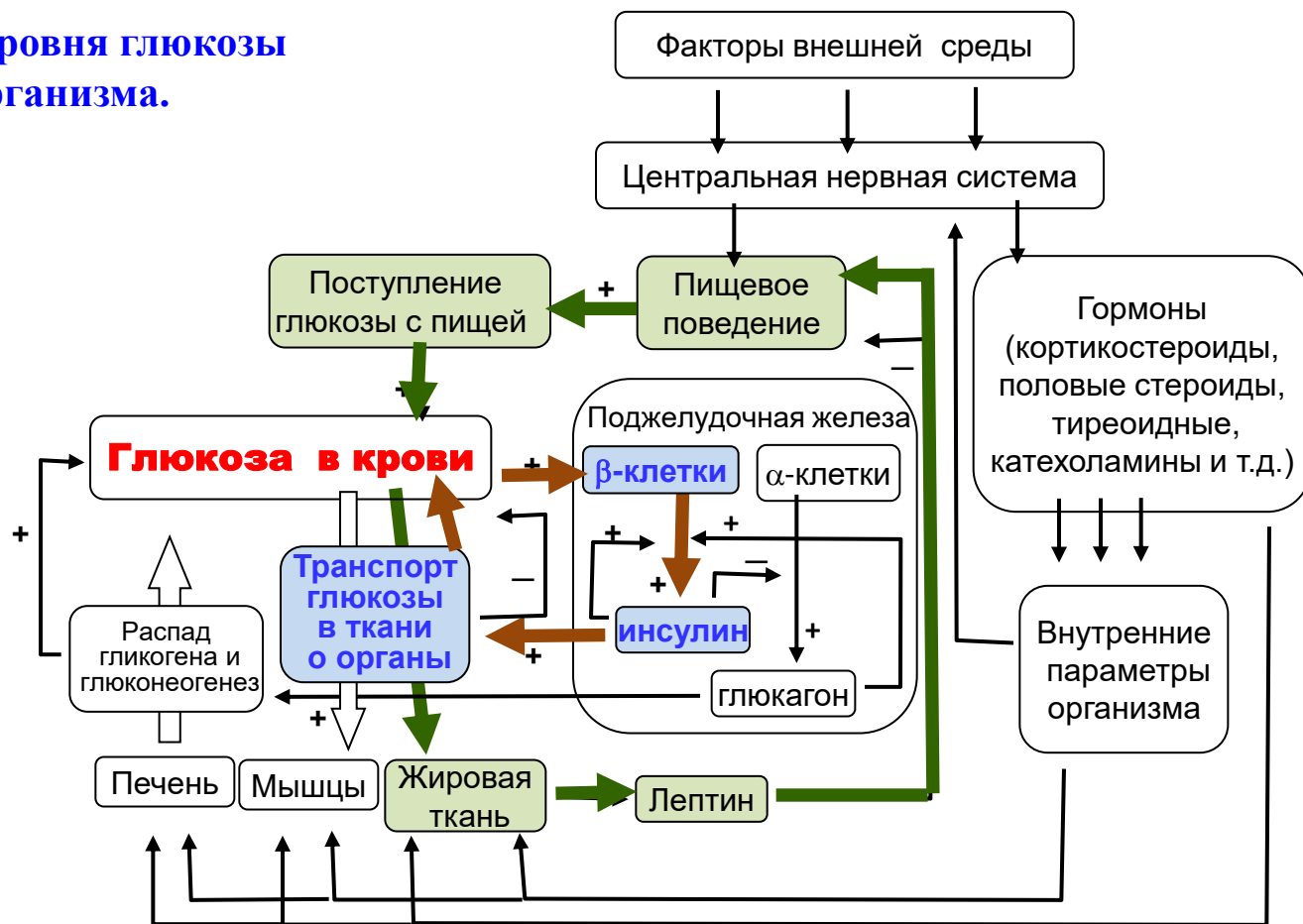
Генная сеть гепатоцита



Генная сеть макрофага

Высший иерархический уровень организации ГС - интеграция локальных генных сетей в крупномасштабные сетевые структуры.

Регуляция уровня глюкозы на уровне организма.



Регуляторные контуры, обеспечивающие поддержание нормального уровня глюкозы в крови, включают:

- а) регуляцию инсулином поступления глюкозы в периферические ткани;
- б) метаболические процессы в печени;
- в) паракринные взаимодействия α -и β -клеток островков Лангерганса;
- г) нервную и нейроэндокринную регуляцию метаболизма в периферических тканях; д) регуляцию пищевого поведения.

В качестве примера пунктиром выделены два регуляторных контура.

ПОВТОРЕНИЕ: Иерархическая организация ГС

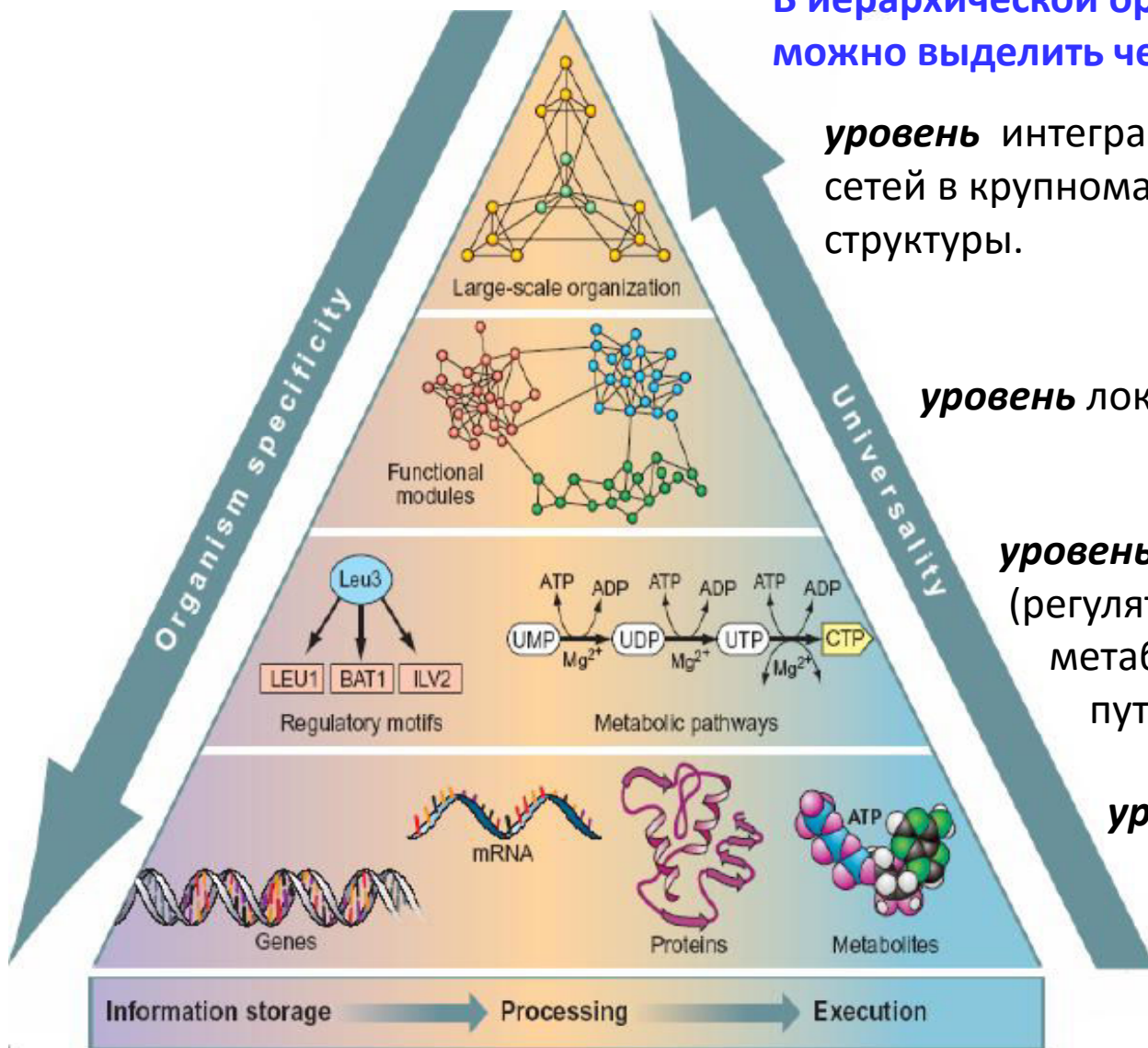
В иерархической организации генных сетей можно выделить четыре уровня:

уровень интеграции локальных генных сетей в крупномасштабные сетевые структуры.

уровень локальных генных сетей;

уровень операционных модулей (регуляторных мотивов, метаболических путей, путей передачи сигналов)

уровень базовых компонент - генов, РНК, белков и метаболитов;



Базовые принципы организации генных сетей

1. Существование большого разнообразия молекулярных механизмов, обеспечивающих функционирование обратных связей, в том числе за счет изменения интенсивности процессов транскрипции, сплайсинга, трансляции, посттрансляционных модификаций белков, ферментативных реакций, транспорта и т. д.;
2. Наличие в каждой сети «центральных» генов и белков (ключевых регуляторов), обеспечивающих координацию функций остальных генов этой сети;
3. Кассетный механизм регуляции экспрессии генов либо активности белков;
4. Молекулярная бюрократия;
5. Авторегуляция генной сети, осуществляемая благодаря функционированию регуляторных контуров с положительными и отрицательными обратными связями и направленная на поддержание определенного, характерного для каждой генной сети типа динамики;
6. Иерархическая организация;
7. Компартиментализация ГС

Компартментализация ГС

При изучении генных сетей необходимо учитывать, что их компоненты разнесены по различным **компартментам**.

Клетки. Генные сети компартментов этого типа функционируют на основе элементарных структур, локализованных в ядрах клеток, их цитоплазме, содержащей различные органеллы (митохондрии, хлоропласты, аппарат Гольджи и др.) и клеточных мембранах.

Ткани и органы. Генные сети этих компартментов функционируют на основе генных сетей клеточного уровня, управляемых (контролируемых) сигналами межклеточных, внутритканевых и внутриорганных коммуникаций, а также сигналами, генерируемыми на уровне организмов.

Организмы. Генные сети организмов функционируют на основе генных сетей клеточного, тканевого и органного уровней. Важнейшую роль в их функционировании играют управляющие сигналы, обеспечивающие интеграцию генных сетей нижеделачих уровней, а также сигналы, генерируемые рецепторными системами, оценивающими состояние жизненно-значимых параметров внешней среды.

Популяции и сообщества организмов. Этому особому типу биологических компартментов соответствуют так называемые гибридные (надорганизменные) генные сети, формируемые из взаимодействующих друг с другом генных сетями, принадлежащими различным организмам: (1) организмам одного и того же вида; в этом случае речь идет о гибридных генных сетях, обеспечивающих взаимодействия между особями в пределах популяции); (2) организмам различных видов (в данном случае - это гибридные генные сети, обеспечивающие взаимодействия типа «хищник – жертва», «паразит – хозяин» или симбиотические взаимодействия.

Компартментализация ГС

При изучении генных сетей необходимо учитывать, что их компоненты разнесены по различным **компартментам**.

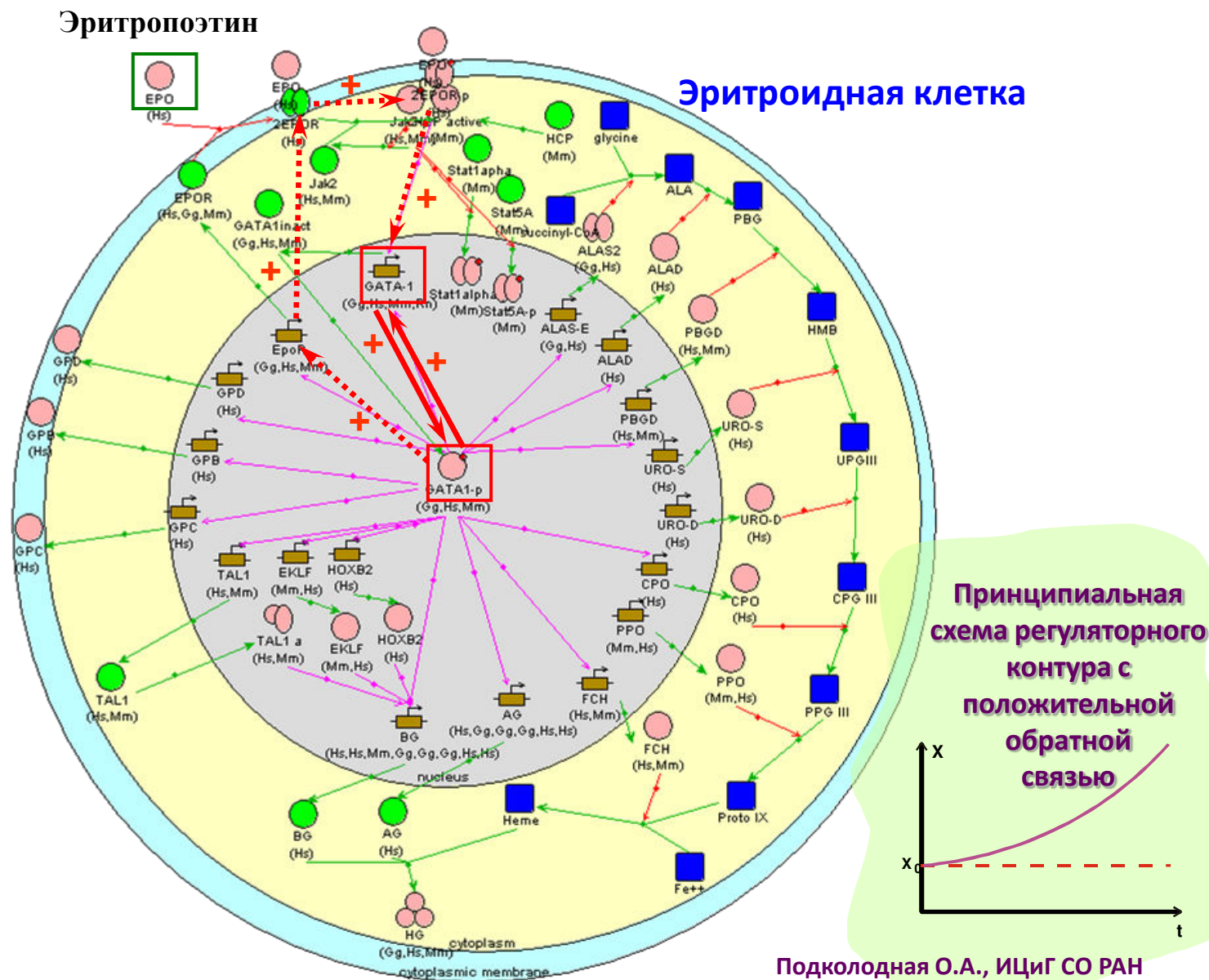
Клетки. Генные сети компартментов этого типа функционируют на основе элементарных структур, локализованных в ядрах клеток, их цитоплазме, содержащей различные органеллы (митохондрии, хлоропласты, аппарат Гольджи и др.) и клеточных мембранах.

Ткани и органы. Генные сети этих компартментов функционируют на основе генных сетей клеточного уровня, управляемых (контролируемых) сигналами межклеточных, внутритканевых и внутриорганных коммуникаций, а также сигналами, генерируемыми на уровне организмов.

Организмы. Генные сети организмов функционируют на основе генных сетей клеточного, тканевого и органного уровней. Важнейшую роль в их функционировании играют управляющие сигналы, обеспечивающие интеграцию генных сетей нижеделачих уровней, а также сигналы, генерируемые рецепторными системами, оценивающими состояние жизненно-значимых параметров внешней среды.

Популяции и сообщества организмов. Этому особому типу биологических компартментов соответствуют так называемые гибридные (надорганизменные) генные сети, формируемые из взаимодействующих друг с другом генных сетями, принадлежащими различным организмам: (1) организмам одного и того же вида; в этом случае речь идет о гибридных генных сетях, обеспечивающих взаимодействия между особями в пределах популяции); (2) организмам различных видов (в данном случае - это гибридные генные сети, обеспечивающие взаимодействия типа «хищник – жертва», «паразит – хозяин» или симбиотические взаимодействия.

Генная сеть регуляции эритропоэза в зависимости от содержания кислорода: два организменных компартмента



Эритропоэтин

Эритроидная клетка



Компартментализация ГС

При изучении генных сетей необходимо учитывать, что их компоненты разнесены по различным **компартментам**.

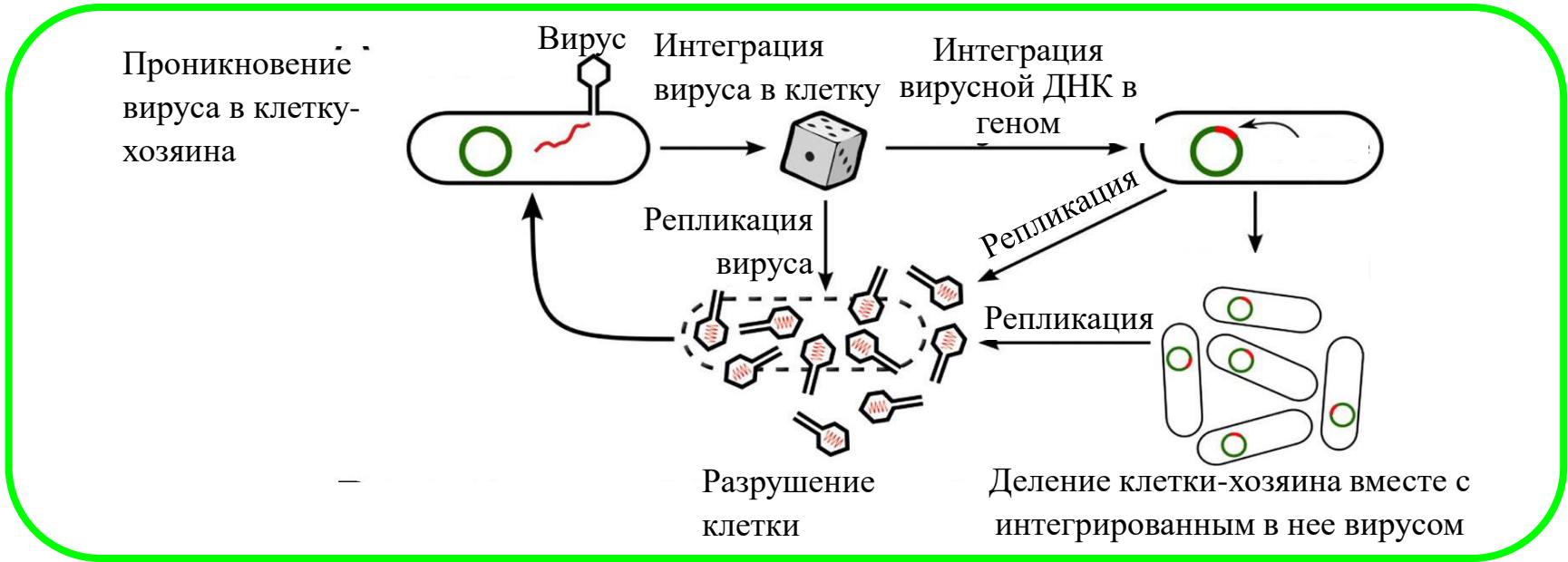
Клетки. Генные сети компартментов этого типа функционируют на основе элементарных структур, локализованных в ядрах клеток, их цитоплазме, содержащей различные органеллы (митохондрии, хлоропласты, аппарат Гольджи и др.) и клеточных мембранах.

Ткани и органы. Генные сети этих компартментов функционируют на основе генных сетей клеточного уровня, управляемых (контролируемых) сигналами межклеточных, внутритканевых и внутриорганных коммуникаций, а также сигналами, генерируемыми на уровне организмов.

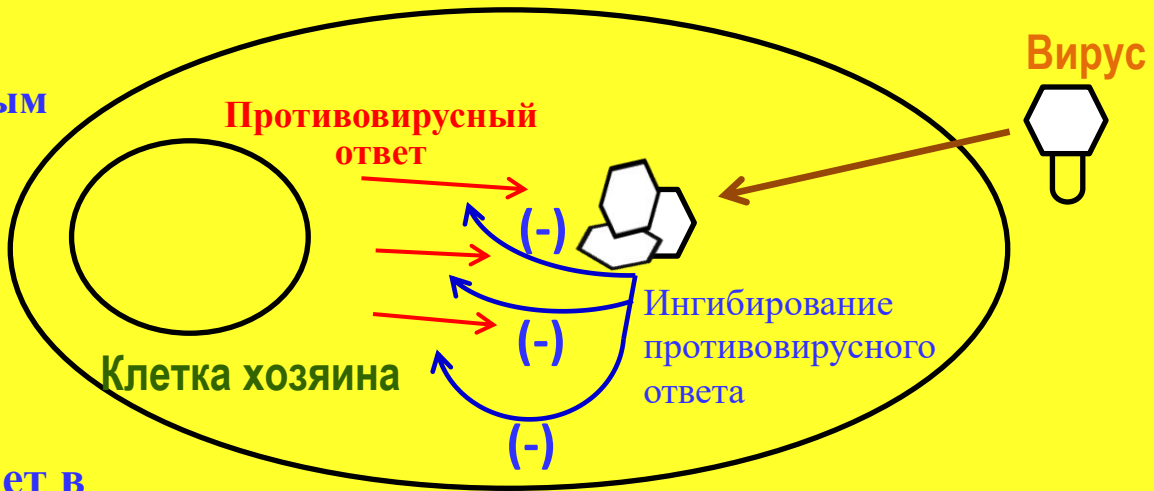
Организмы. Генные сети организмов функционируют на основе генных сетей клеточного, тканевого и органного уровней. Важнейшую роль в их функционировании играют управляющие сигналы, обеспечивающие интеграцию генных сетей нижеделающих уровней, а также сигналы, генерируемые рецепторными системами, оценивающими состояние жизненно-значимых параметров внешней среды.

Популяции и сообщества организмов. Этому особому типу биологических компартментов соответствуют так называемые гибридные (надорганизменные) генные сети, формируемые из взаимодействующих друг с другом генных сетями, принадлежащими различным организмам: (1) организмам одного и того же вида; в этом случае речь идет о гибридных генных сетях, обеспечивающих взаимодействия между особями в пределах популяции); (2) организмам различных видов (в данном случае - это гибридные генные сети, обеспечивающие взаимодействия типа «хищник – жертва», «паразит – хозяин» или симбиотические взаимодействия.

КОМПАРТМЕНТИЗАЦИЯ - сообщество организмов паразит-хозяин
ГС клетки, инфицированной вирусом

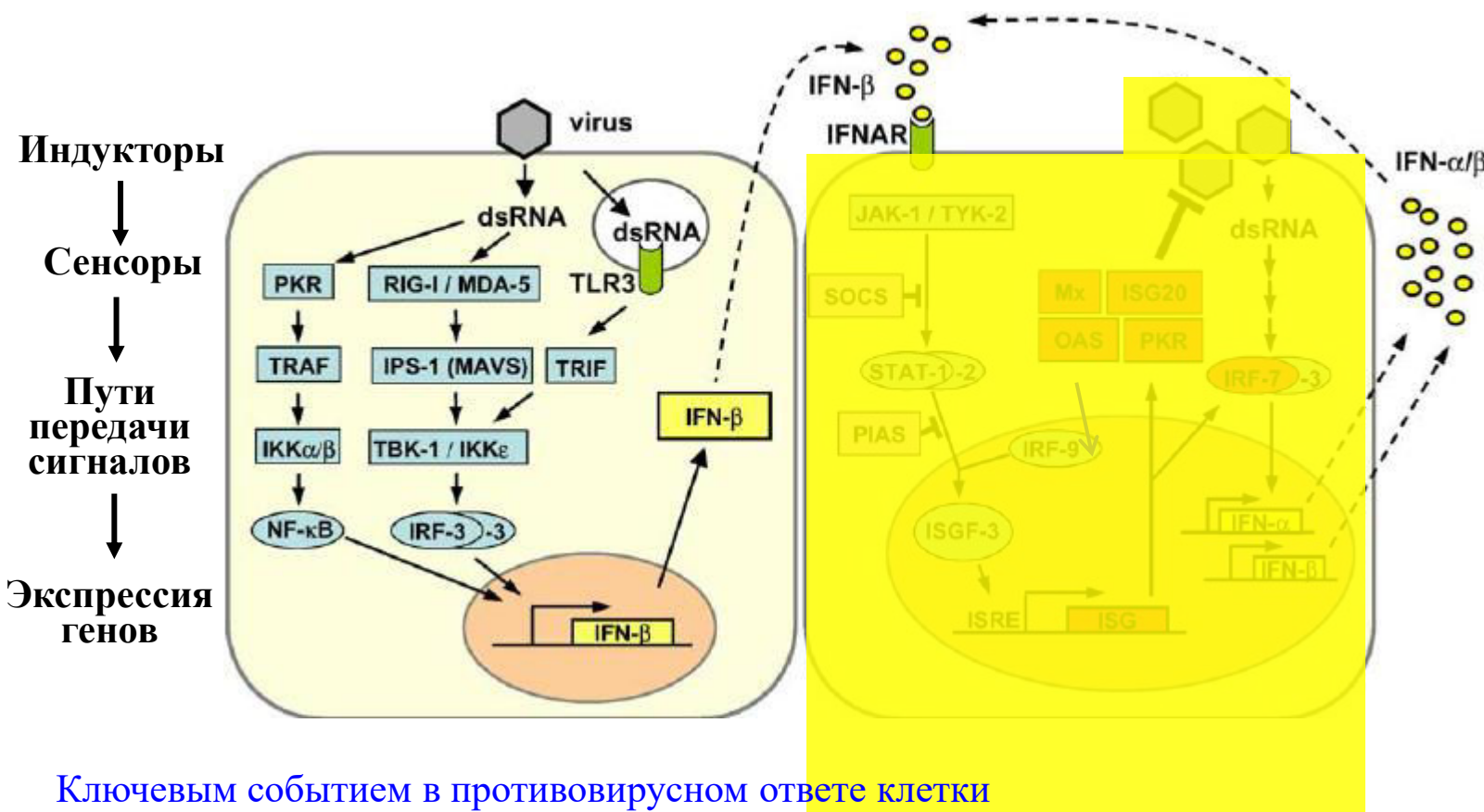


Взаимодействие генных сетей, принадлежащих двум различным организмам, обеспечивает их совместное существование .



Это существование протекает в непрерывной борьбе !!!

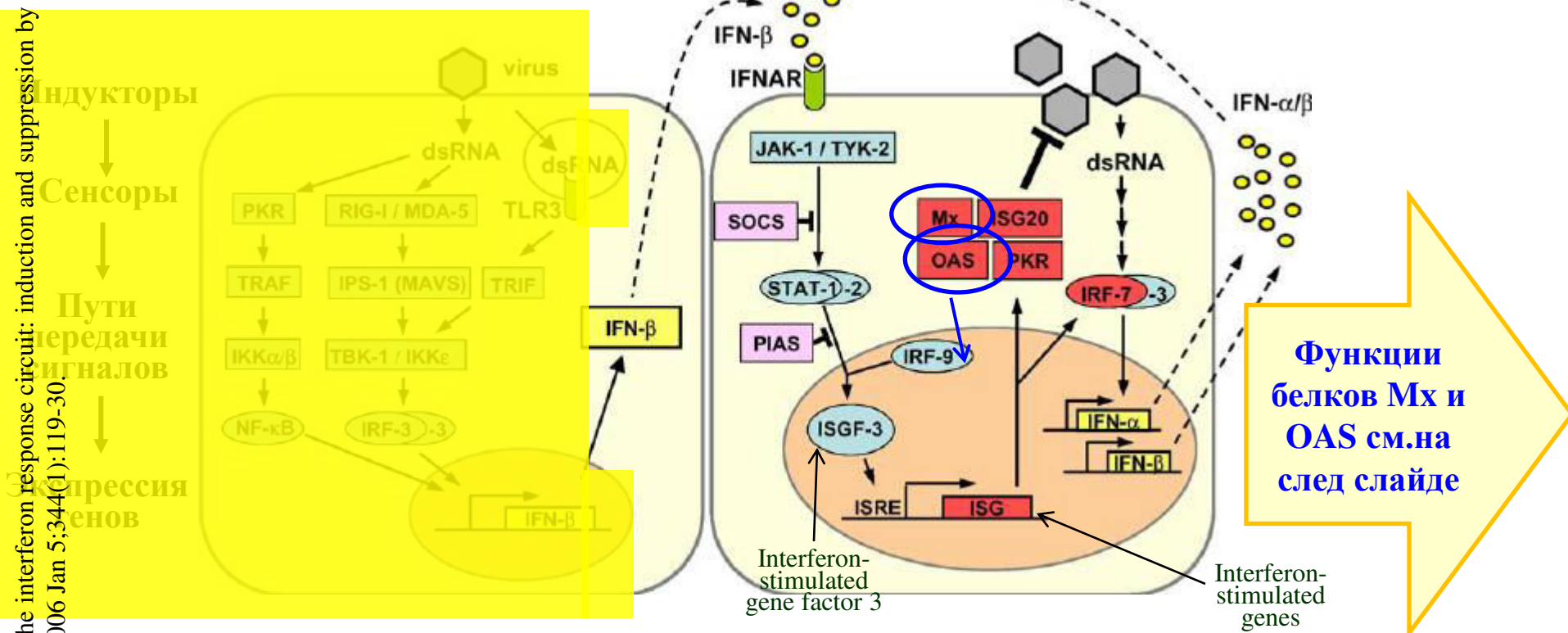
Упрощенная схема генной сети противовирусного ответа



Ключевым событием в противовирусном ответе клетки является продукция интерферонов. Активация экспрессии генов интерферонов запускается несколькими сигнальными путями. Сигнальными веществами, активирующими эти сигнальные пути, являются продукты жизнедеятельности вируса (двухцепочечные РНК и ДНК).

Упрощенная схема генной сети противовирусного ответа

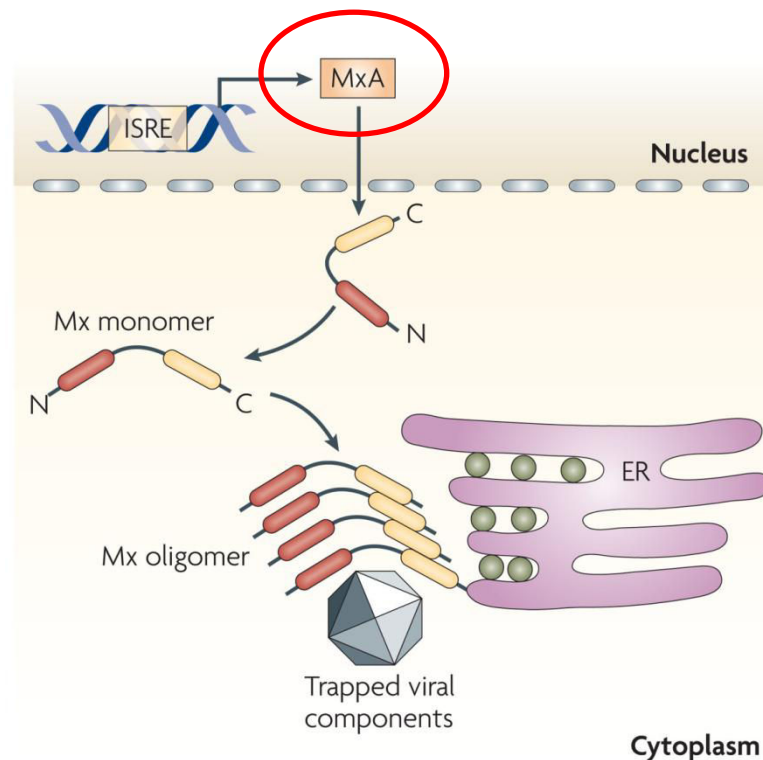
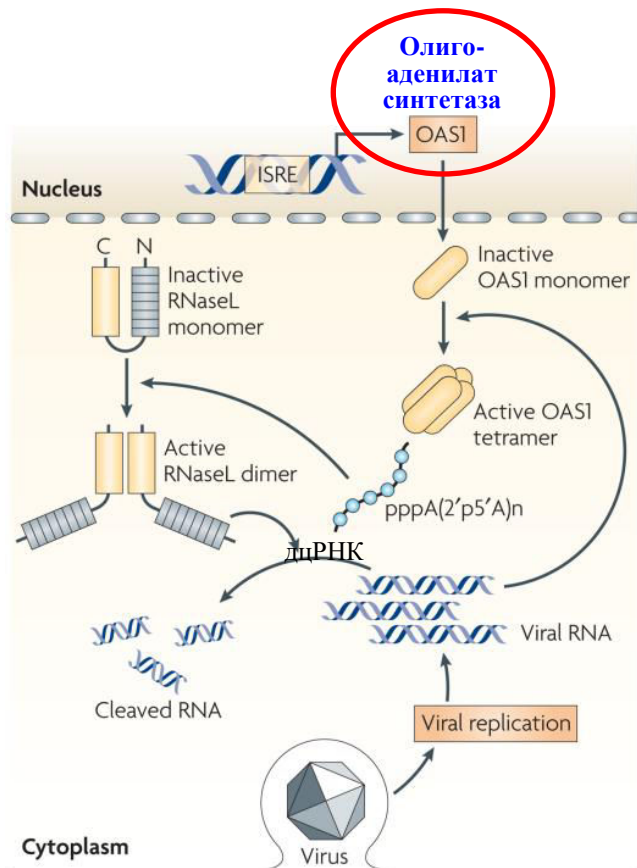
Haller O, Kochs G, Weber F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. Virology. 2006 Jan 5;344(1):119-30.



Интерферон (IFN- beta) является сигнальным веществом. Он взаимодействует с рецептором клеточной поверхности (IFNR) и активирует экспрессию многих генов через JAK/STAT-киназный путь сигнальной трансдукции. В числе активируемых генов есть транскрипционный фактор IRF-7 , который участвует в активации экспрессии того же гена интерферона бета, а также интерферона альфа. Таким образом ответ амплифицируется.

Кроме того, в числе интерферон-индуцируемых генов имеются такие как Mx, OAS, ISG20 PKR, которые контролируют процесс разрушения частиц вирусов

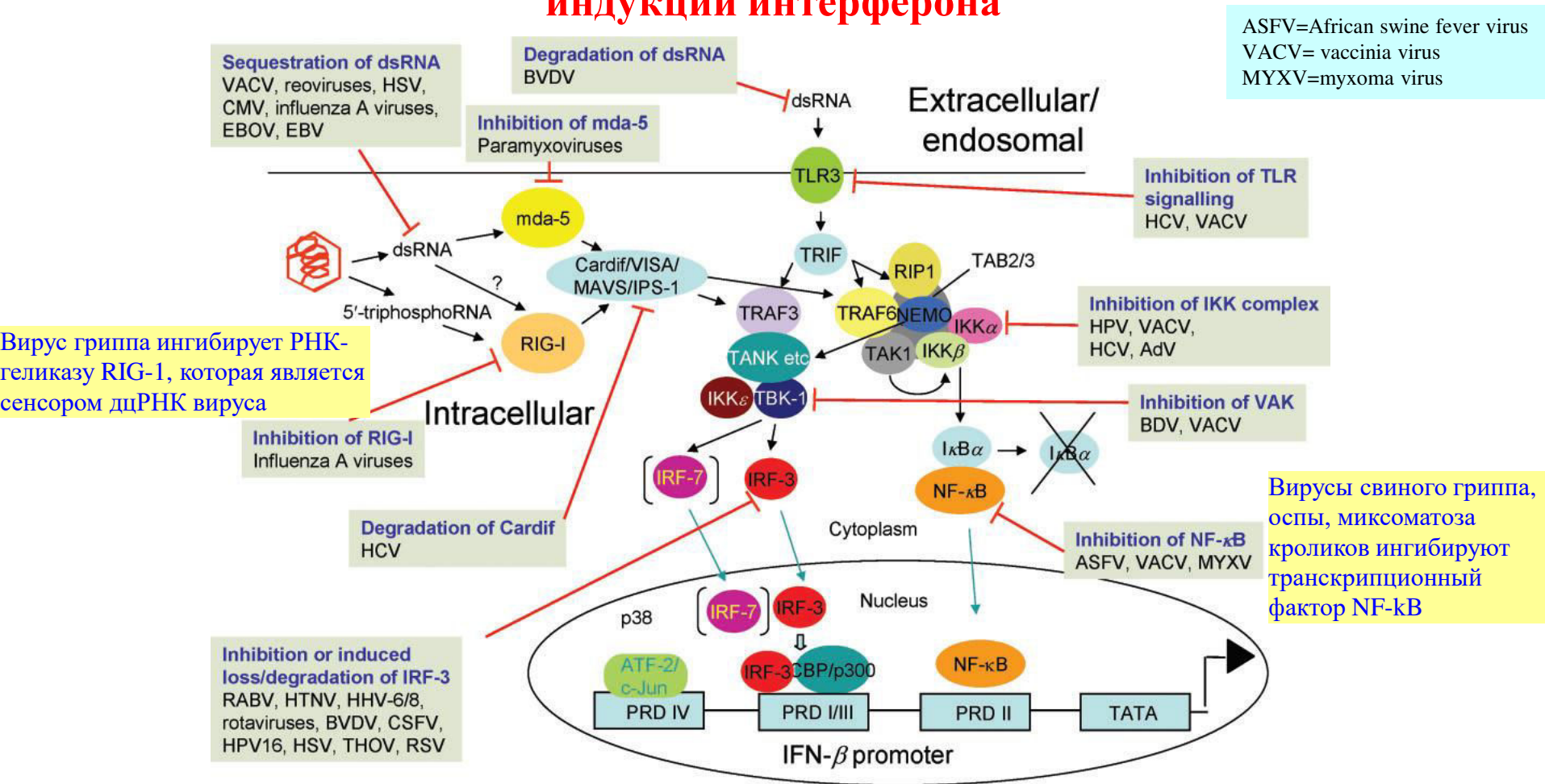
Роль белков Мх и ОАС в генной сети противовирусного ответа



Олигоаденилат синтетаза (OAS) осуществляет синтез олигоаденилатов с необычной 2',5'-фосфодиэфирной связью, которые активируют латентную эндорибонуклеазу L (RNaseL), катализирующую деградацию как вирусной, так и клеточной РНК, что приводит к ингибированию элонгации и снижению скорости синтеза белков

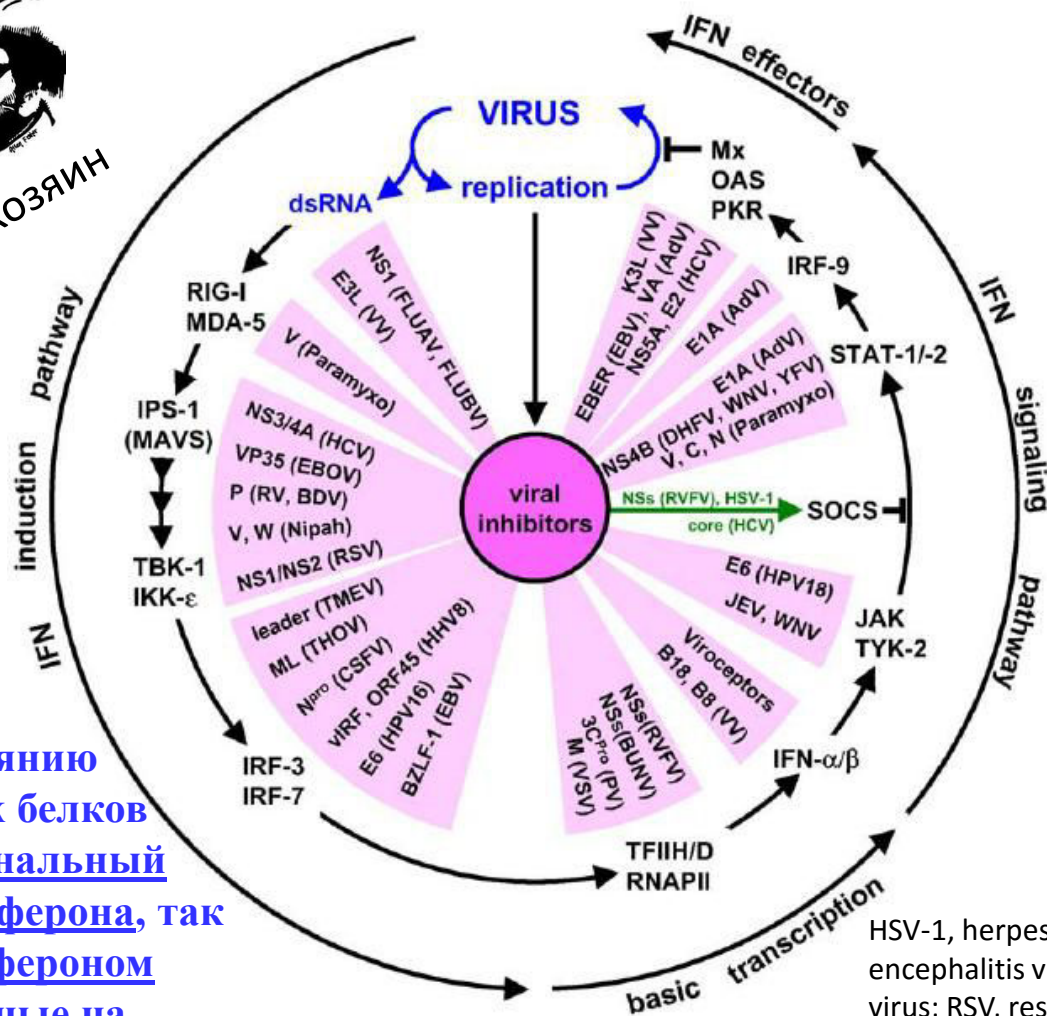
Белок Мх связывает нуклеокапсиды и другие компоненты вируса и транспортирует их к месту деградации в лизосомах

Ингибирующее влияние различных вирусов на сигнальный путь индукции интерферона



Сигнальные пути индукции интерферона бета активируются двухцепочечной РНК (dsRNA). Многие вирусы вырабатывают белки, ингибирующие противовирусный ответ клетки

Белки многих вирусов ингибируют противовирусный ответ клетки-хозяина



AdV, adenovirus; BDV, Borna disease virus; BUNV, Bunyamwera virus; CSFV, classical swine fever virus; DHFV, Dengue hemorrhagic fever virus; EBOV, Ebola virus; EBV, Epstein-Barr virus; [FLUAV](#), [influenza A virus](#); [FLUBV](#), [influenza B virus](#); [HCV](#), [Hepatitis C virus](#); HHV-8, human herpes virus 8; HIV, human immunodeficiency virus; HPV16, human papilloma virus 16; HPV18, human papilloma virus 18;

HSV-1, herpes simplex virus 1; JEV, Japanese encephalitis virus; PV, Polio virus; RV, Rabies virus; RSV, respiratory syncytial virus; RVFV, Rift valley fever virus; THOV, Thogoto virus; TMEV, Theiler's meningoencephalitis virus; VV, Vaccinia virus; VSV, vesicular stomatitis virus; WNV, West Nile virus; YFV, Yellow fever virus

Ингибирующему влиянию со стороны вирусных белков подвергается как сигнальный путь индукции интерферона, так и запускаемые интерфероном процессы, направленные на уничтожение вируса

ПОВТОРЕНИЕ: Базовые принципы организации генных сетей

- ✓ 1. Существование большого разнообразия молекулярных механизмов, обеспечивающих функционирование обратных связей, в том числе за счет изменения интенсивности процессов транскрипции, сплайсинга, трансляции, посттрансляционных модификаций белков, ферментативных реакций, транспорта и т. д.;
- ✓ 2. Наличие в каждой сети «центральных» генов и белков (ключевых регуляторов), обеспечивающих координацию функций остальных генов этой сети;
- ✓ 3. Кассетный механизм регуляции экспрессии генов либо активности белков;
- ✓ 4. Молекулярная бюрократия;
- ✓ 5. Авторегуляция генной сети, осуществляемая благодаря функционированию регуляторных контуров с положительными и отрицательными обратными связями и направленная на поддержание определенного, характерного для каждой генной сети типа динамики;
- ✓ 6. Иерархическая организация;
- ✓ 7. Компартиментализация ГС

Роль транскрипционных факторов в генных сетях

- Транскрипционные факторы функционируют в составе внутриклеточных сенсоров состояния клетки
- Транскрипционные факторы – элементарные компоненты генных сетей, определяющие сложность

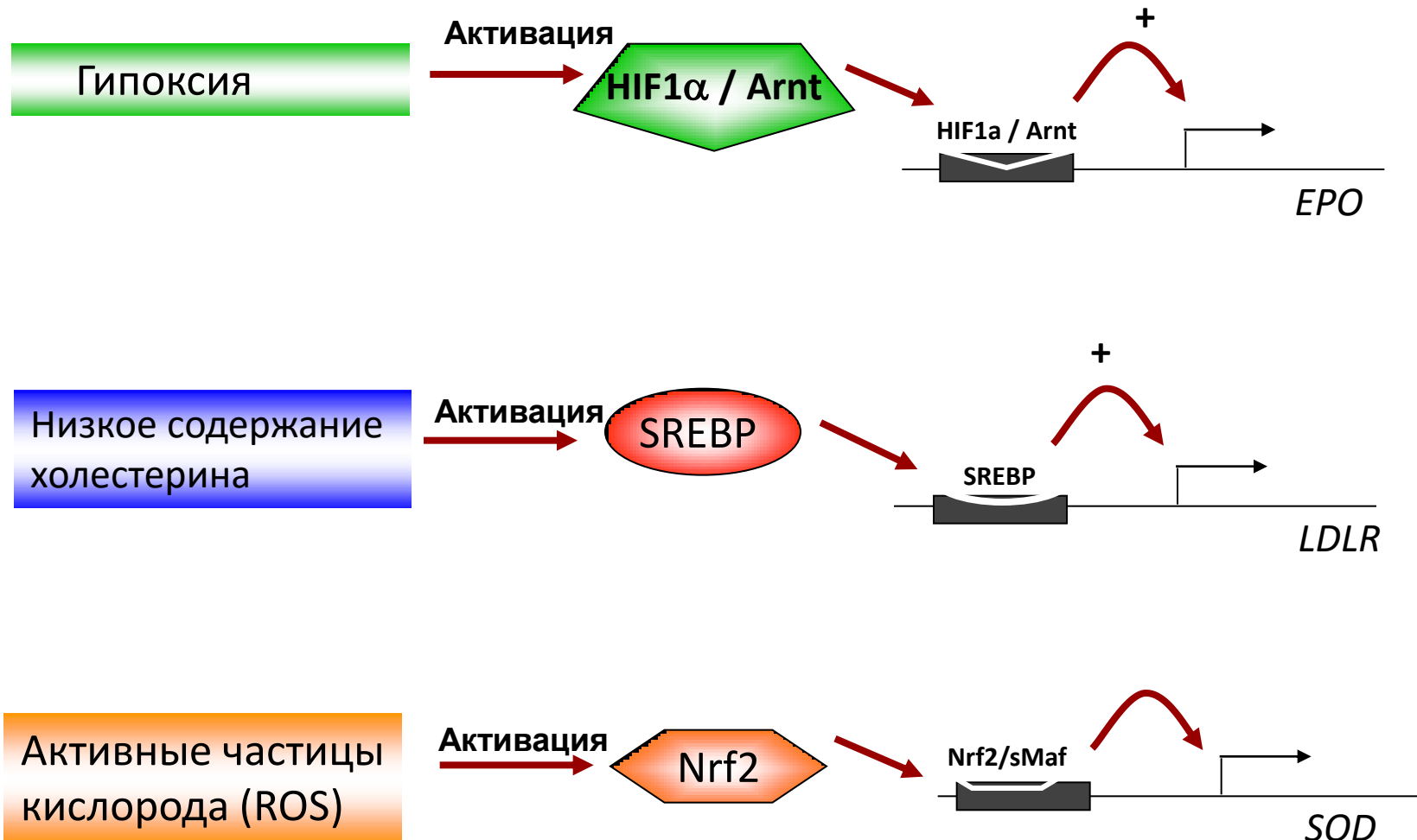
Роль транскрипционных факторов в генных сетях

➤ Транскрипционные факторы функционируют в составе внутриклеточных сенсоров состояния клетки

➤ Транскрипционные факторы – элементарные компоненты генных сетей, определяющие сложность сетей.

Транскрипционные факторы – внутриклеточные сенсоры

Транскрипционные факторы регулируют транскрипцию генов в ответ на различные сигналы



МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА

HIF-1 α В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ КИСЛОРОДА

HIF-1 α = hypoxia-inducible factor 1 = индуцируемый гипоксией фактор 1



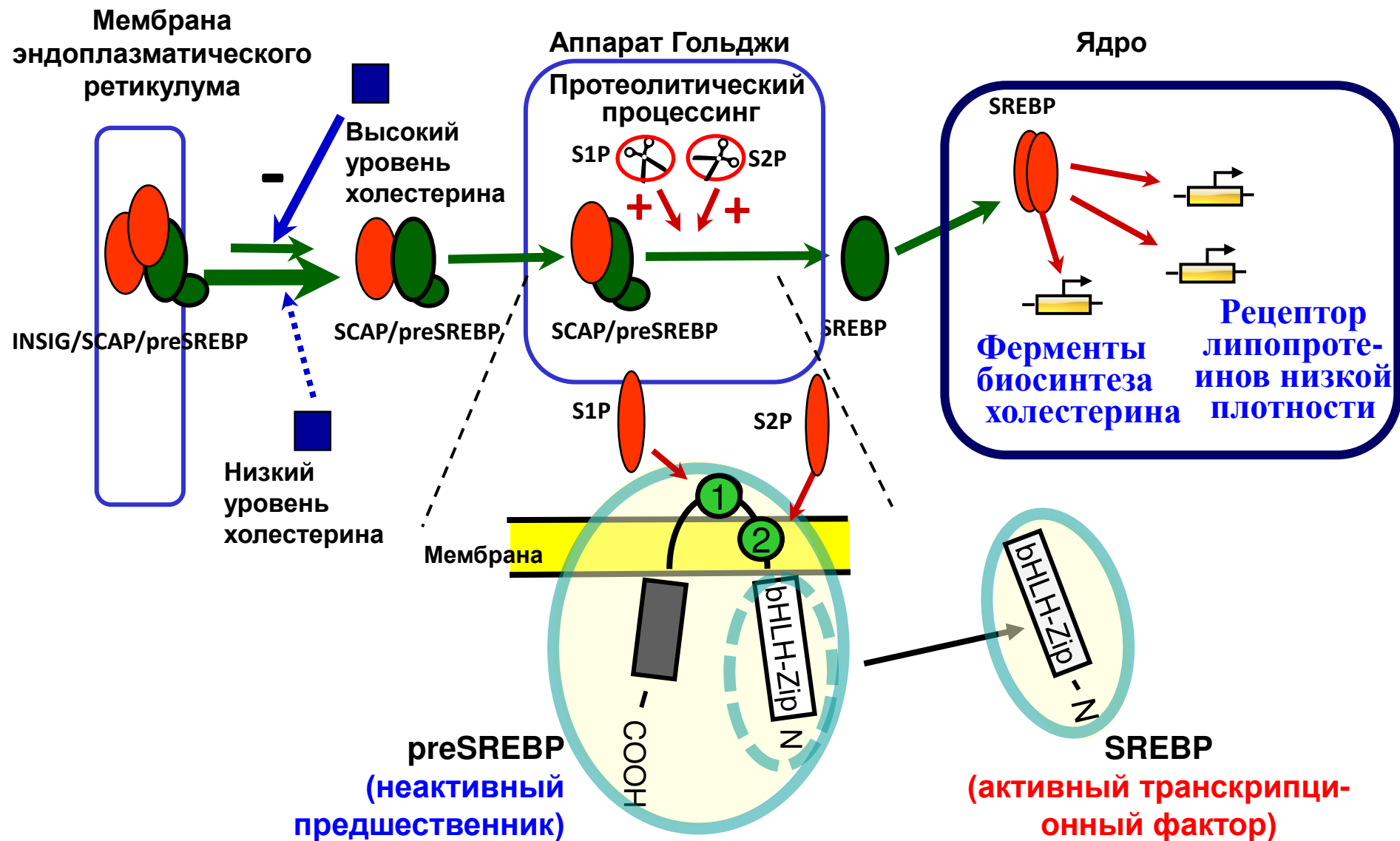
Деградация при нормоксии:

- 1) Гидроксилирование пролилгидроксилазами (PHD)
- 2) Присоединение белка *pVHL* (von Hippel-Lindeau protein)
- 3) Убиквитинирование и деградация с участием протеасомного комплекса 26S

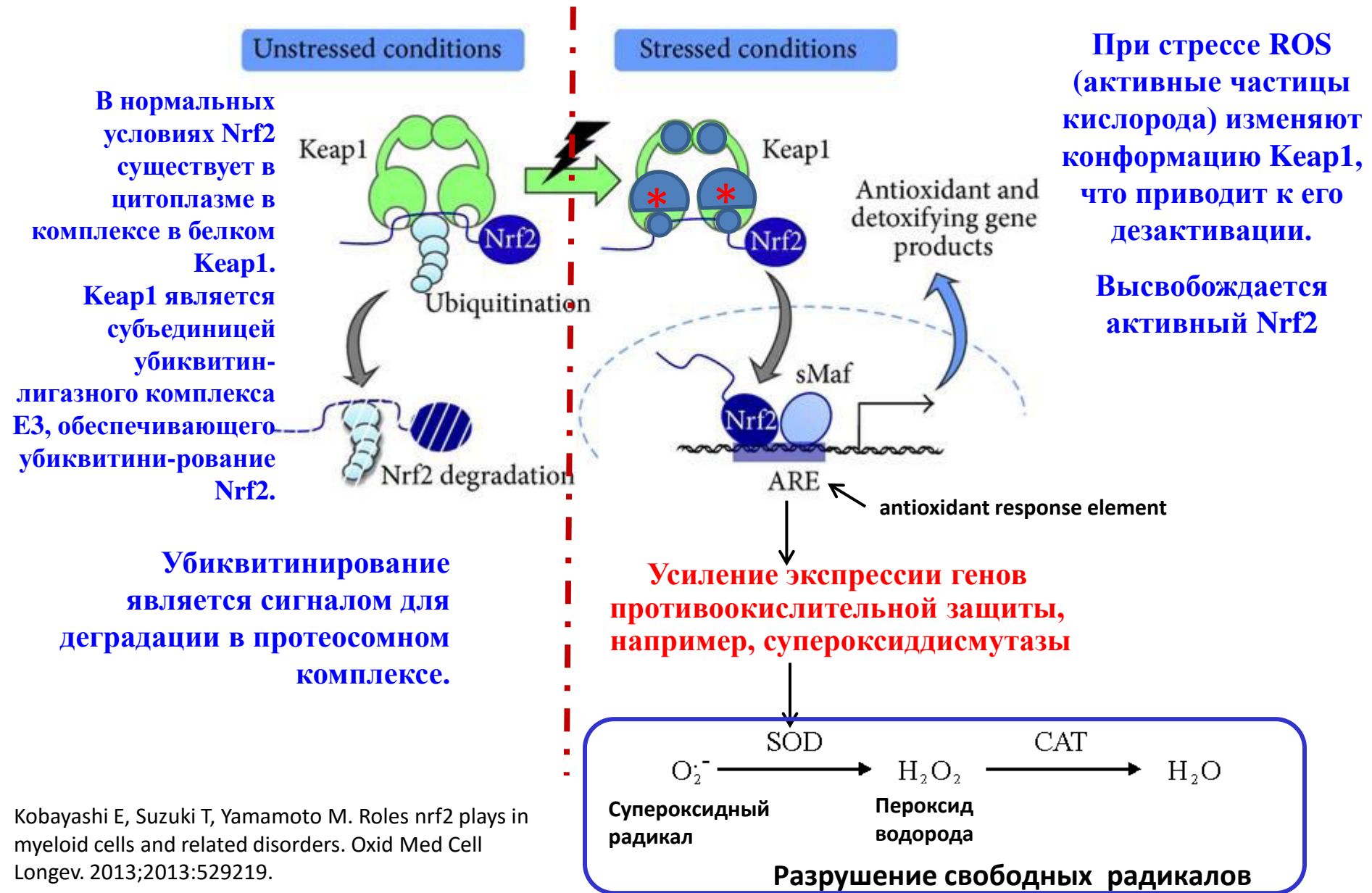
Активация при гипоксии:

- 1) При дефиците кислорода гидроксилирование замедляется
- 2) Образование комплекса с ядерным транслокатором (ARNT = HIF-1 β)
- 3) Транспорт в ядро
- 4) Связывание с сайтами на ДНК, которые называются HRE (hypoxia response element)
- 5) Активация транскрипции генов, содержащих HRE в регуляторных районах.

Механизм регуляции активности транскрипционного фактора **SREBP** (Sterol regulatory element-binding protein) в зависимости от уровня холестерина в клетке

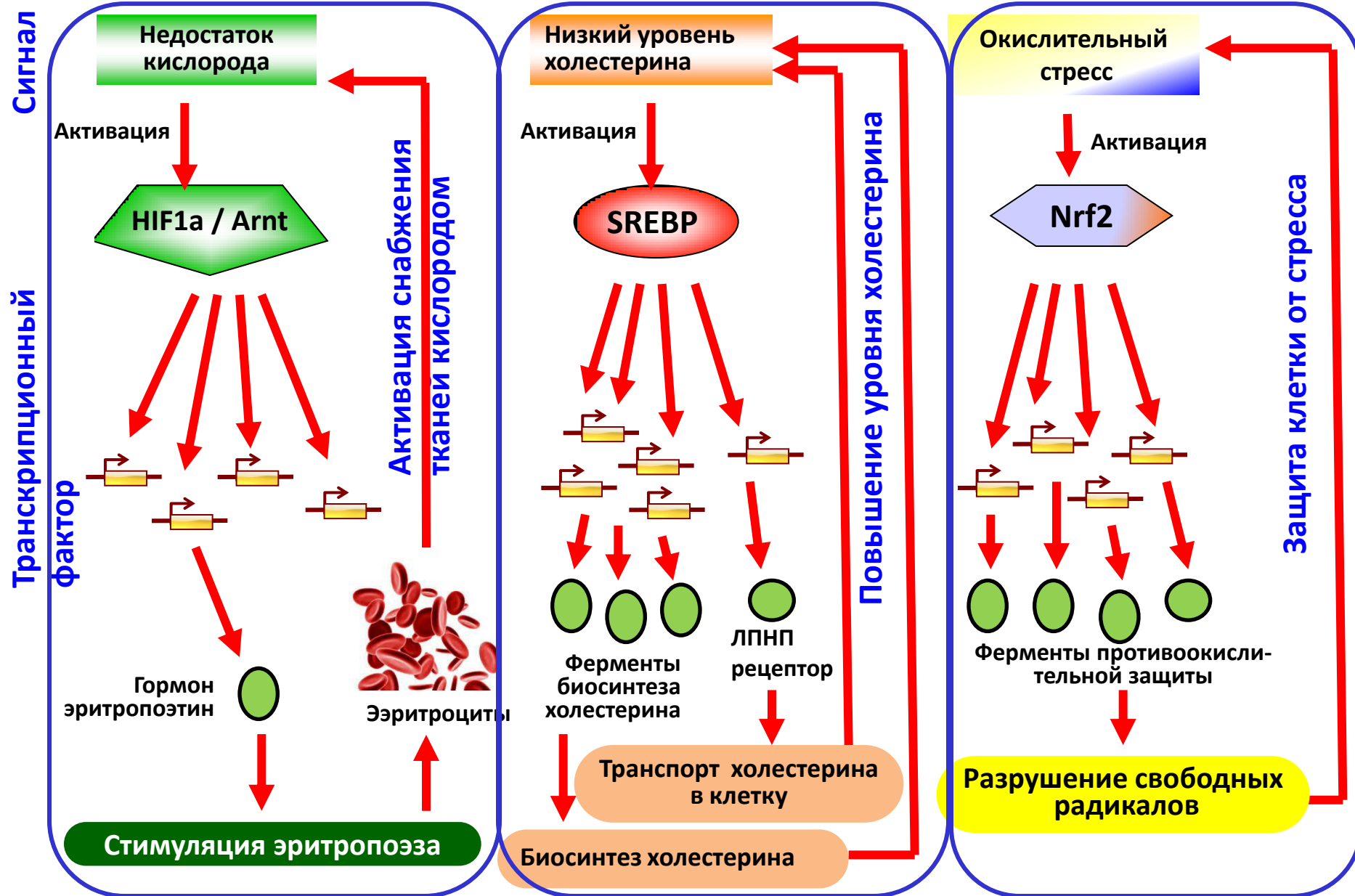


Механизм активации транскрипционного фактора **Nrf2** (NF-E2-related factor 2) при окислительном стрессе



Транскрипционные факторы – сенсоры клеточных сигналов.
Роль транскрипционных факторов в реализации обратных связей

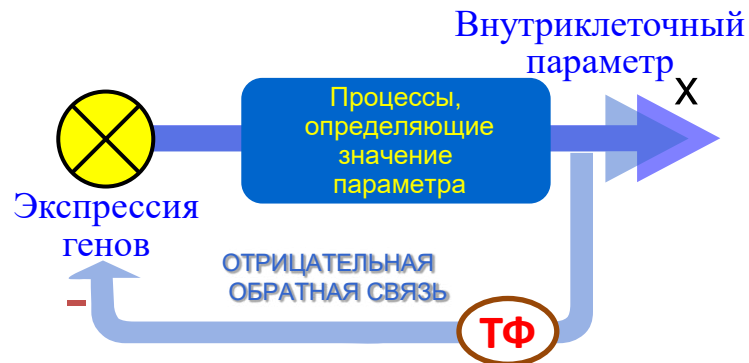
Транскрипционные факторы – молекулярные сенсоры клеточных сигналов, обеспечивают функционирование обратных связей



Выводы по предыдущему слайду

«Транскрипционные факторы – молекулярные сенсоры клеточных сигналов, обеспечивают функционирование обратных связей»

- Во всех рассмотренных случаях при активации транскрипционных факторов (HIF-1, SREBP, Nrf2) работает принцип «взведенного курка». Неактивный предшественник фактора находится в клетке в больших количествах. Внутриклеточный сигнал либо тормозит деградацию ТФ, за счет чего концентрация активного ТФ резко возрастает (HIF-1, Nrf2), либо предотвращает активацию неактивного предшественника (SREBP).
- Рассмотренные транскрипционные факторы функционируют в составе внутриклеточных сенсоров неблагоприятных факторов (гипоксия, низкий уровень холестерина, активные формы кислорода).
- Благодаря сенсорной функции транскрипционных факторов замыкается петля обратной связи, обеспечивающая внутриклеточный гомеостаз (постоянство внутриклеточных параметров).



Роль транскрипционных факторов в генных сетях

➤ Транскрипционные факторы функционируют в составе внутриклеточных сенсоров состояния клетки.

➤ Транскрипционные факторы – элементарные компоненты генных сетей, определяющие сложность сетей.

Транскрипционные факторы - компоненты генных сетей, определяющие их сложность.

**Транскрипционные факторы могут участвовать в реализации
нескольких регуляторных контуров с обратными связями**

**Транскрипционные факторы интегрируют различные сигналы о
состоянии клетки**

Транскрипционные факторы - компоненты генных сетей, определяющие их сложность.

**Транскрипционные факторы могут участвовать в реализации
нескольких регуляторных контуров с обратными связями**

**Транскрипционные факторы интегрируют различные сигналы о
состоянии клетки**

Транскрипционные факторы могут участвовать в реализации нескольких регуляторных контуров с обратными связями

Один и тот же транскрипционный фактор может участвовать в реализации нескольких регуляторных контуров с обратными связями.

Рассмотрим в качестве примера генную сеть регуляции уровня холестерина в клетке.

Центральным регулятором является транскрипционный фактор семейства SREBP.

Известно по крайней мере три регуляторных контура с отрицательными обратными связями, в которых задействован фактор SREBP.

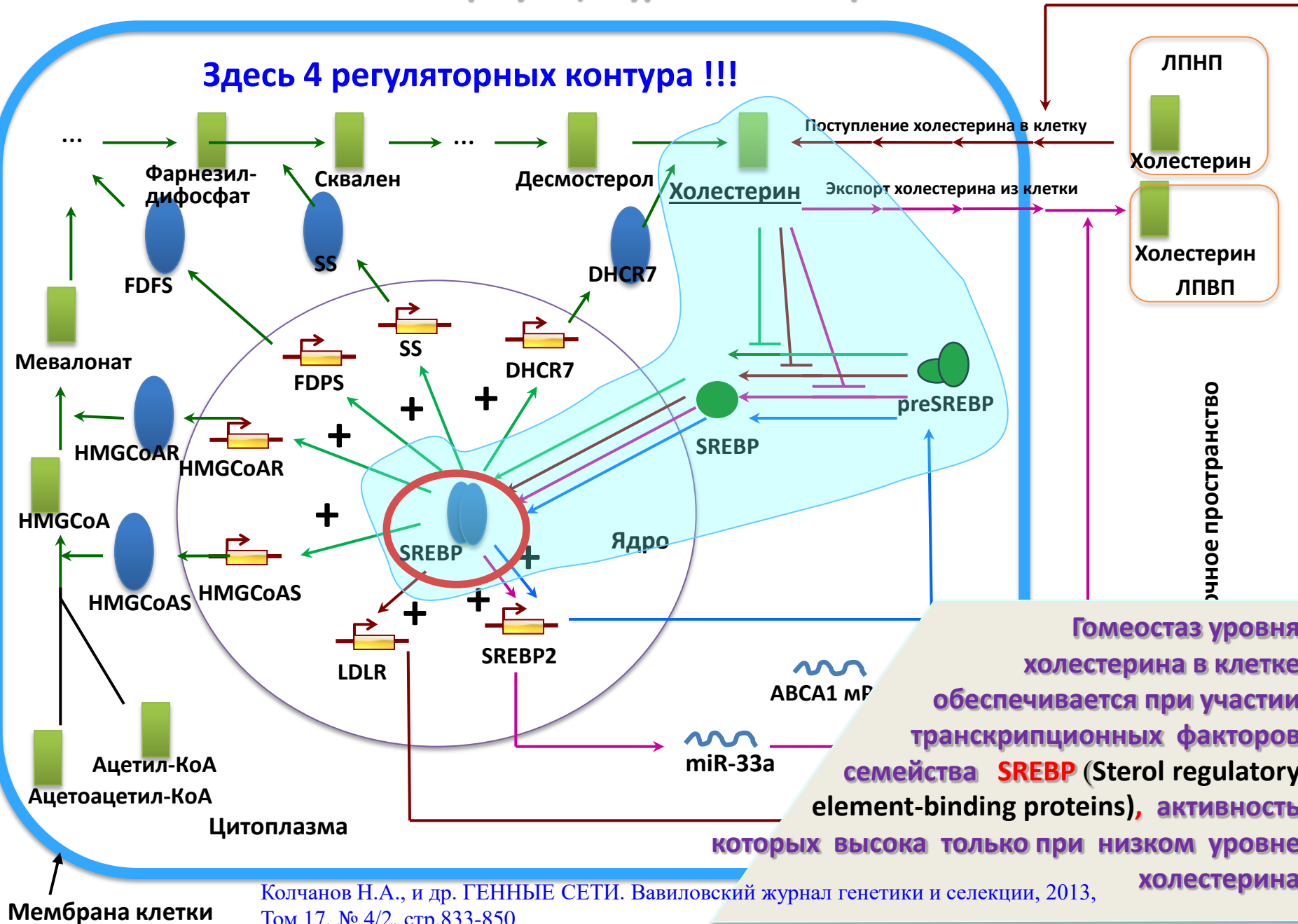
(см. следующие слайды).

Кроме того, функционирует также один контур с положительной обратной связью.

Известны также дополнительные механизмы регуляции активности факторов SREBP (помимо механизма, запускаемого холестерином)

Генная сеть регуляции уровня холестерина в клетке

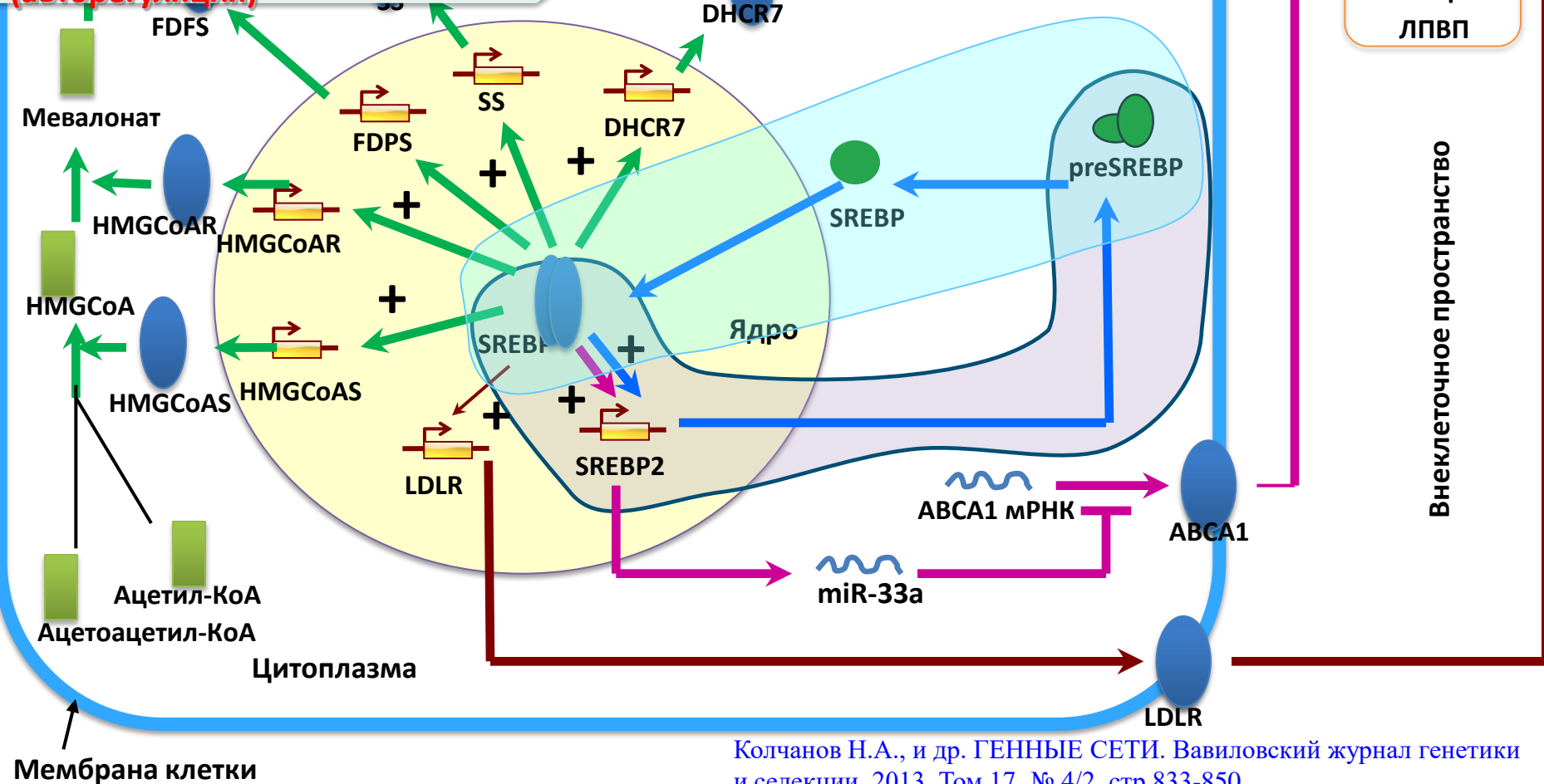
Здесь 4 регуляторных контура !!!



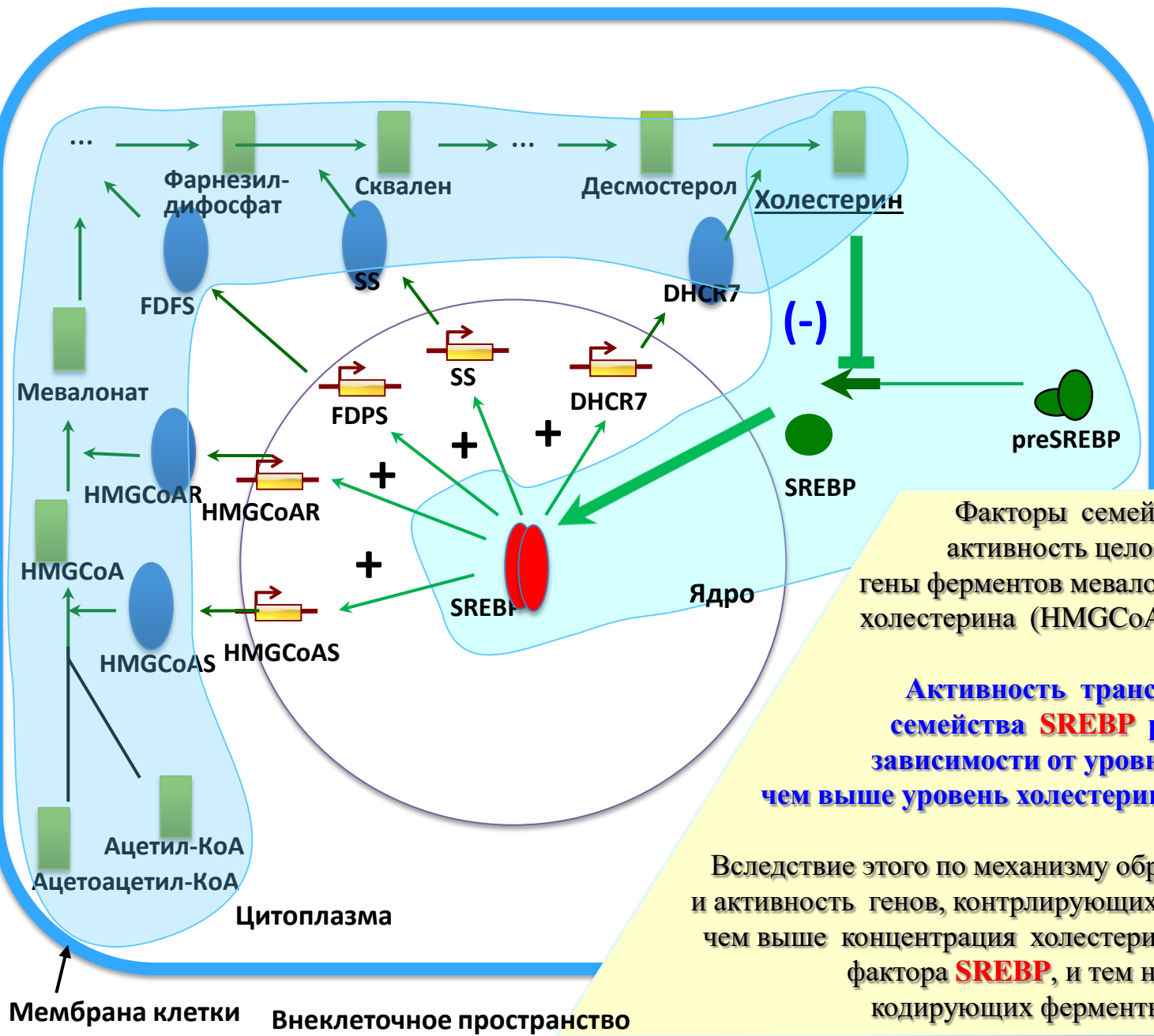
Транскрипционные факторы - компоненты генных сетей, определяющие их сложность.

Генная сеть регуляции уровня холестерина в клетке: контур с положительной обратной связью, регулирующий транскрипцию гена SREBP2

В пределах регуляторного контура с положительной обратной связью регулируется активность гена, кодирующего фактор SREBP2 (авторегуляция)



ПОВТОРЕНИЕ: Генная сеть регуляции уровня холестерина в клетке: схематическое представление первой отрицательной обратной связи.



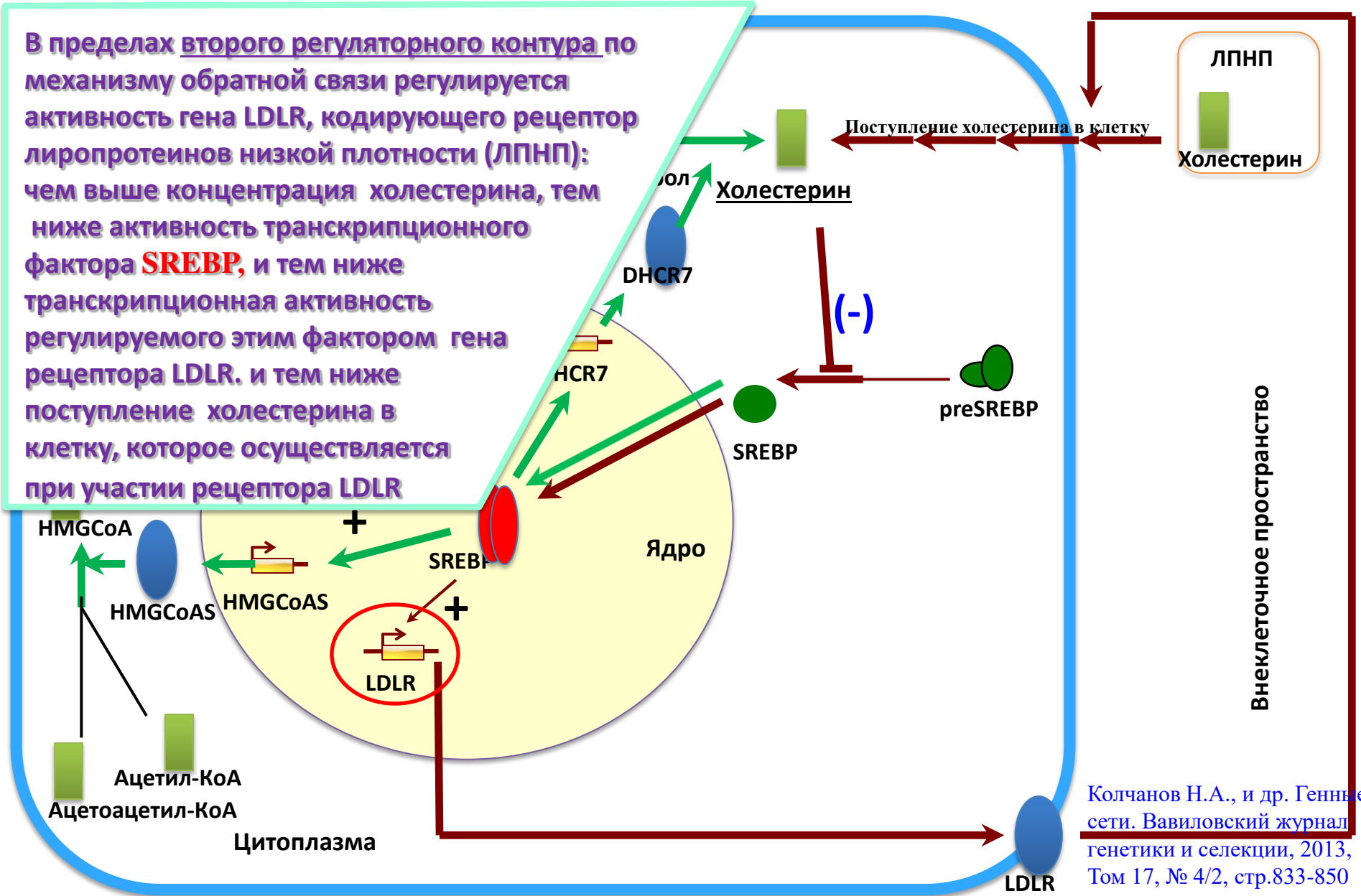
Факторы семейства **SREBP** регулируют активность целой кассеты генов, включая гены ферментов мевалонатного пути биосинтеза холестерина (HMGCоAS, HMGCоAR, FDFS, SS, DHCR7 и др.).

Активность транскрипционных факторов семейства SREBP регулируется в обратной зависимости от уровня холестерина в клетке: чем выше уровень холестерина, тем ниже активность факторов SREBP.

Вследствие этого по механизму обратной связи регулируется и активность генов, контролирующих биосинтеза холестерина: чем выше концентрация холестерина, тем ниже активность фактора **SREBP**, и тем ниже транскрипция генов, кодирующих ферменты биосинтеза холестерина

ПОВТОРЕНИЕ: Генная сеть регуляции уровня холестерина в клетке: схематическое представление второй отрицательной обратной связи (с участием рецептора LDL)

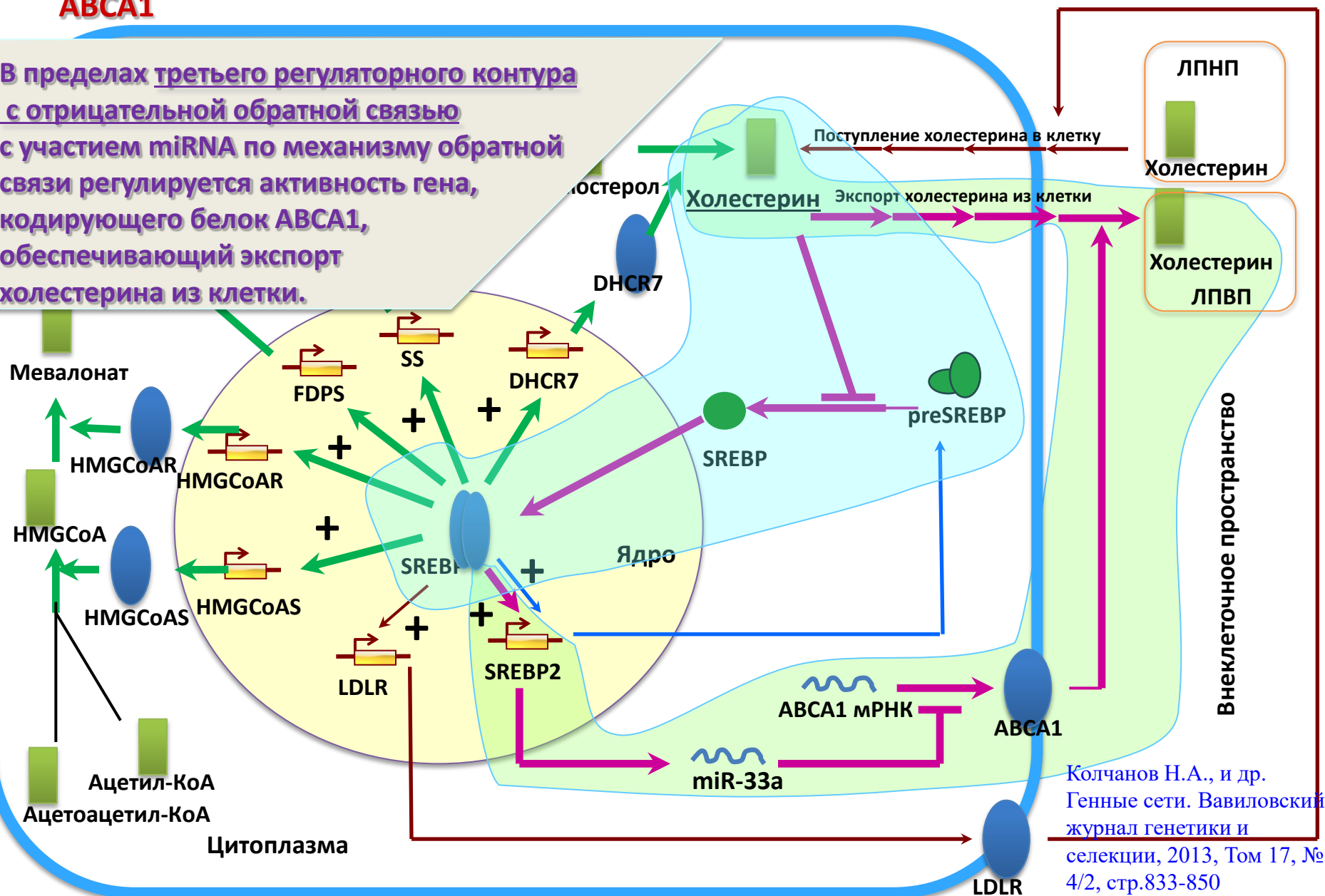
В пределах второго регуляторного контура по механизму обратной связи регулируется активность гена LDLR, кодирующего рецептор липопротеинов низкой плотности (ЛПНП): чем выше концентрация холестерина, тем ниже активность транскрипционного фактора **SREBP**, и тем ниже транскрипционная активность регулируемого этим фактором гена рецептора LDLR. и тем ниже поступление холестерина в клетку, которое осуществляется при участии рецептора LDLR



Транскрипционные факторы - компоненты генных сетей, определяющие их сложность.

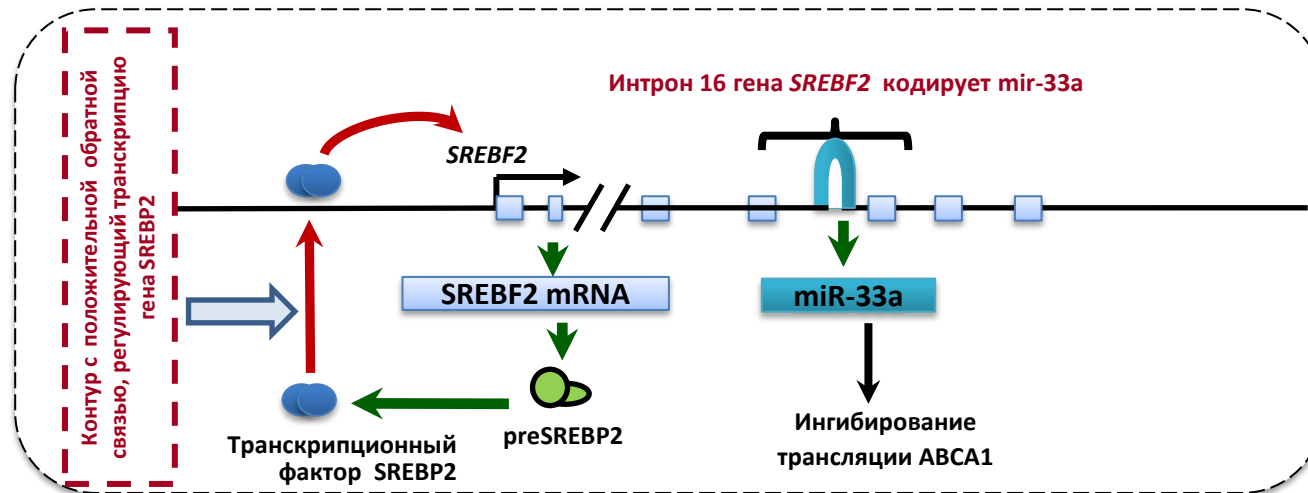
Генная сеть регуляции уровня холестерина в клетке: схематическое представление третьей отрицательной обратной связи (с участием miRNA и белка ABCA1)

В пределах третьего регуляторного контура с отрицательной обратной связью с участием miRNA по механизму обратной связи регулируется активность гена, кодирующего белок ABCA1, обеспечивающий экспорт холестерина из клетки.



Колчанов Н.А., и др.
Генные сети. Вавиловский
журнал генетики и
селекции, 2013, Том 17, №
4/2, стр.833-850

Экспрессия микроРНК в составе первичного транскрипта гена SREBF2

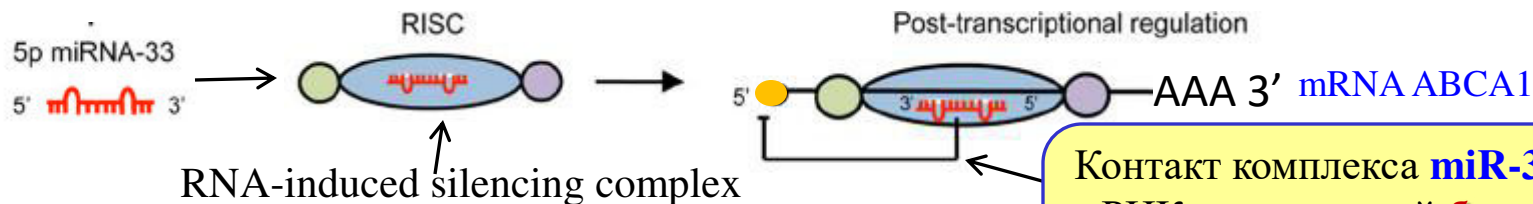


SREBP 2 - один из транскрипционных факторов семейства SREBP (Sterol regulatory element-binding protein). Этот фактор кодируется геном *SREBF2*. Как было описано ранее, имеется регуляторный контур с положительной обратной связью: транскрипционный фактор **SREBP 2** активирует экспрессию кодирующего его гена (*SREBF2*)

Район 16-го интрона гена *SREBF2* кодирует микроРНК. Эта микроРНК (**miR-33a**) экспрессируется в составе первичного транскрипта гена *SREBF2* и подавляет трансляцию мРНК, кодирующей белок **ABCA1**.

Схема ингибирования трансляции белка ABCA1

ABCA1 (ATP binding cassette subfamily A member 1) – мембранный транспортный белок, осуществляет экспорт холестерина из клетки.

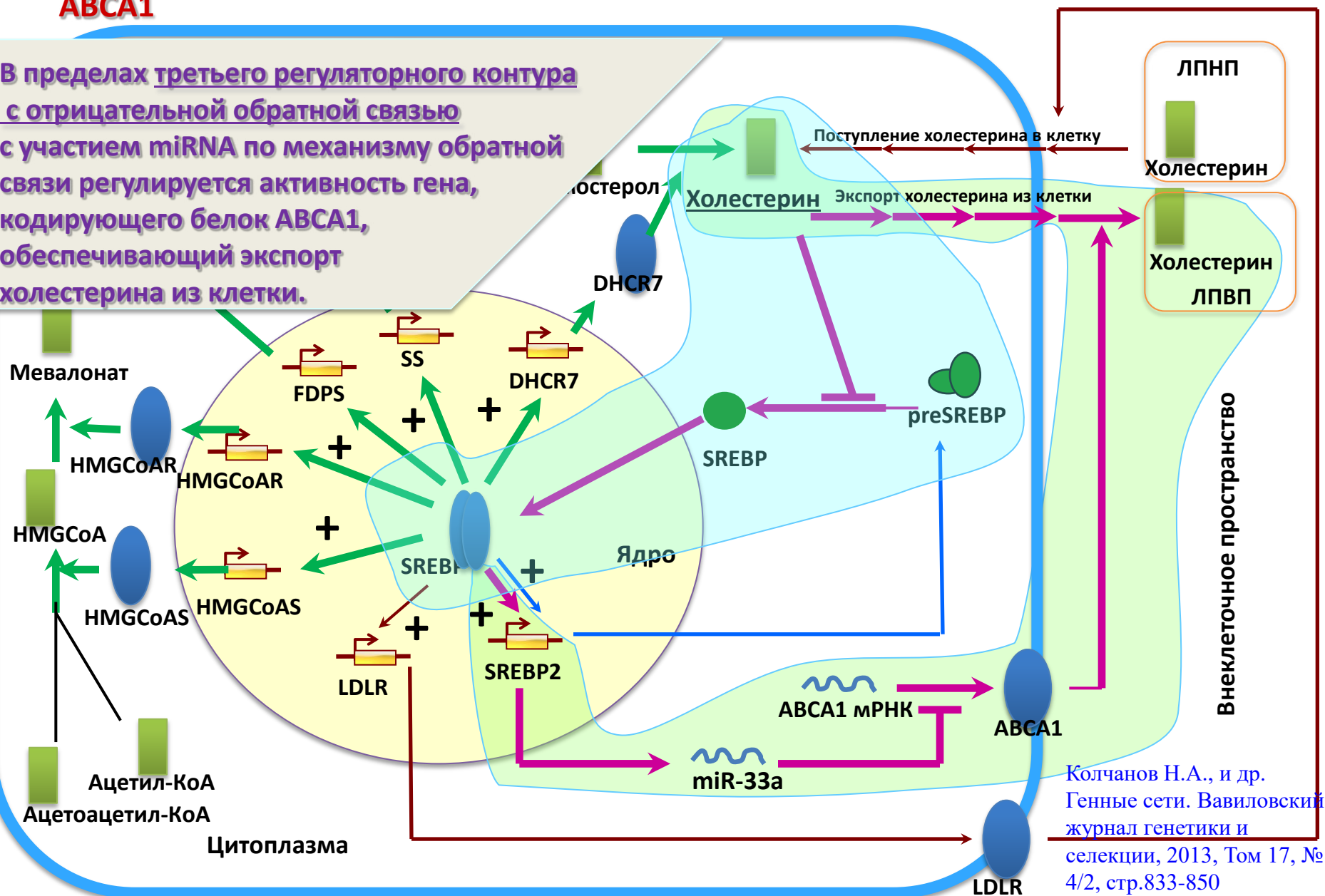


Контакт комплекса **miR-33a/RISC** с мРНК, кодирующей **белок ABCA1**, ингибирует инициацию трансляции, снижает стабильность мРНК

Транскрипционные факторы - компоненты генных сетей, определяющие их сложность.

Генная сеть регуляции уровня холестерина в клетке: схематическое представление третьей отрицательной обратной связи (с участием miRNA и белка ABCA1)

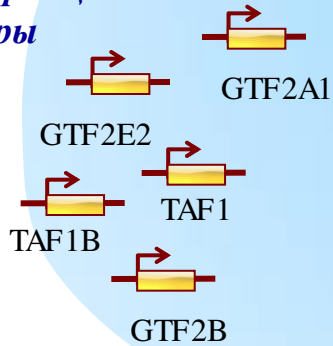
В пределах третьего регуляторного контура с отрицательной обратной связью с участием miRNA по механизму обратной связи регулируется активность гена, кодирующего белок ABCA1, обеспечивающий экспорт холестерина из клетки.



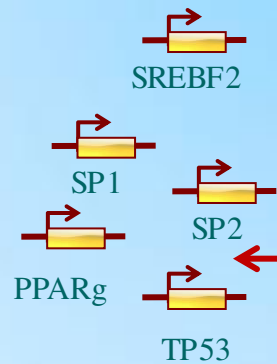
Сложность генных сетей: координация различных процессов (подсетей) ключевым регулятором SREBP

Транскрипционные регуляторы (104 гена)

Базальные транскрипционные факторы



Транскрипционные факторы

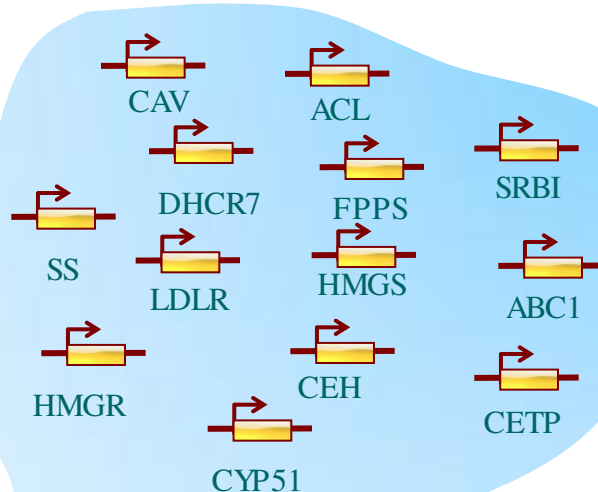


Более 1000 других генов-мишеней SREBP1

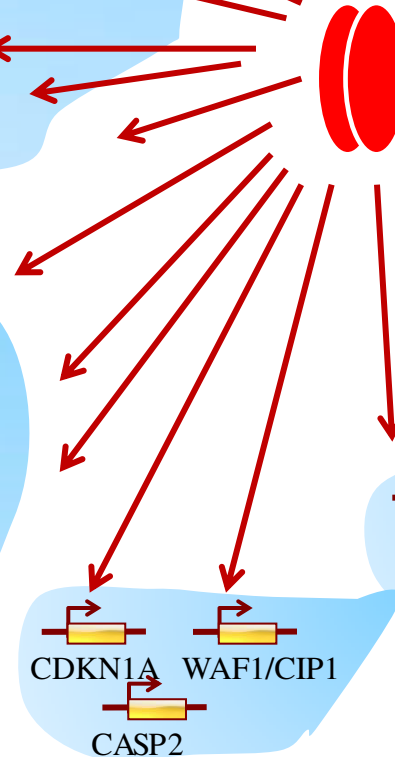
SREBP1

(Reed B.D., et al. PLoS Genet, 2008)

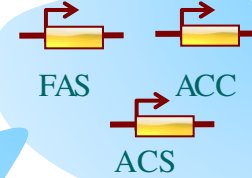
SREBP



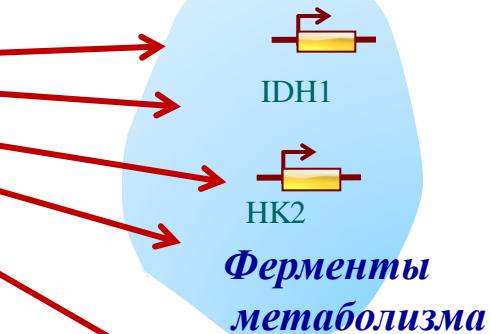
Гомеостаз холестерина в клетке



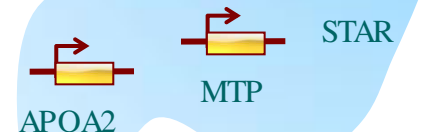
Клеточный цикл, апоптоз



Биосинтез жирных кислот



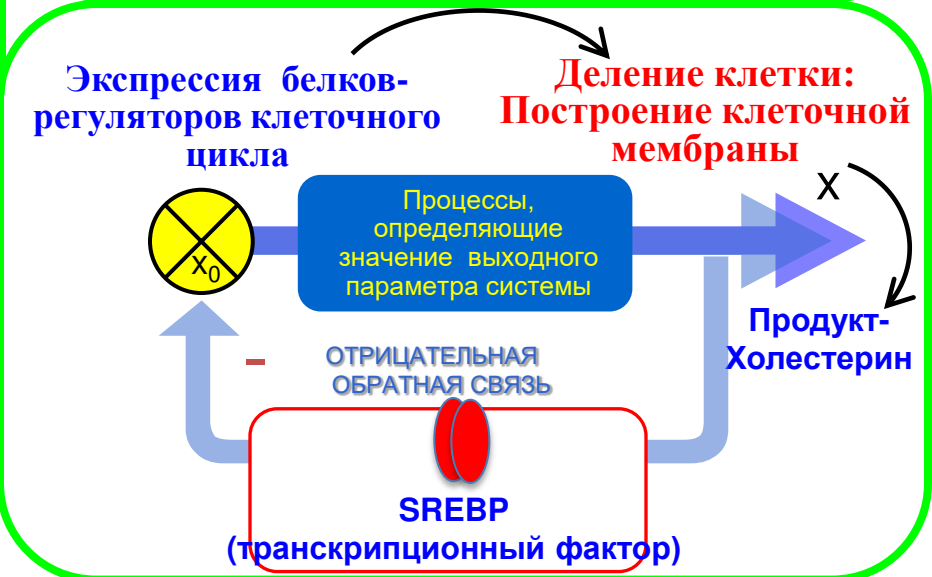
Ферменты метаболизма



Транспорт липидов

Вывод по предыдущим слайдам:

уровень холестерина регулирует интенсивность протекания различных биологических процессов (не только синтез холестерина!!)



Транскрипционные факторы - компоненты генных сетей, определяющие их сложность.

Транскрипционные факторы могут участвовать в реализации нескольких регуляторных контуров с обратными связями

Транскрипционные факторы интегрируют различные сигналы о состоянии клетки

Транскрипционные факторы являются интеграторами сигналов о состоянии клетки: регуляция активности факторов SREBP.

В качестве примера рассмотрим транскрипционные факторы семейства SREBP.

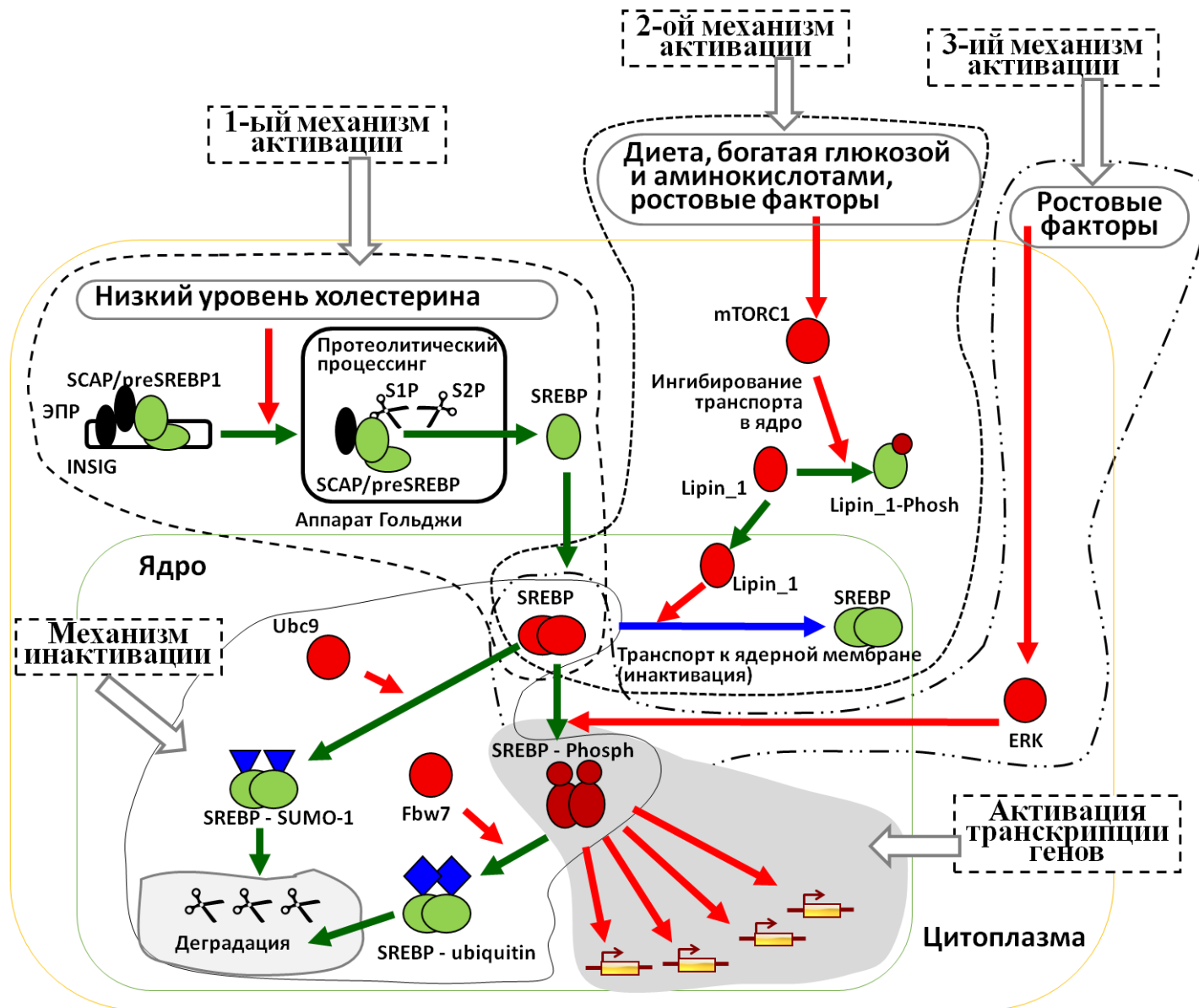
Ранее был описан механизм регуляции активности факторов SREBP в зависимости от уровня холестерина в клетке.

Однако, исследования последних лет показывают, что регуляция активности транскрипционных факторов SREBP представляет собой гораздо сложный процесс.

- ✓ Активация факторов SREBP осуществляется несколькими механизмами:
- (А) с участием протеаз S1P и S2P в клетке (см. 1-ый механизм активации на след. слайде);
 - (Б) через mTOR сигнальный путь (см. 2-ой механизм активации на след. слайде);
 - (В) через MAP-киназы семейства ERK (см. 3-ий механизм активации на след. слайде).

Ингибирование факторов SREBP осуществляется за счет постоянной деградации при участии SUMO-1-конъюгирующего фермента Ubc9 и убиквитин-лигазы Fbw7 (см. механизм инактивации на след. слайде)

Пути регуляции активности транскрипционного фактора SREBP внеклеточными и внутриклеточными сигналами



Близкое расположение сайтов пост-транскрипционной модификации определяет конкурентные взаимоотношения между активирующими и ингибирующими влияниями в генной сети

Молекулярный уровень

Транскрипционный фактор SREBP

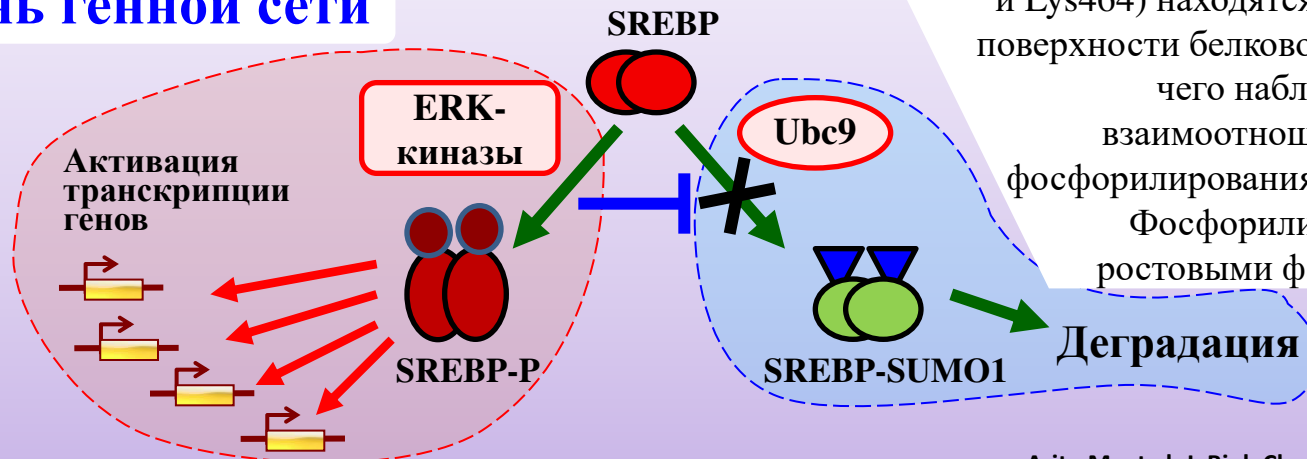
Трансактивационный домен

ДНК-связывающий домен

Димеризационный домен



Уровень генной сети

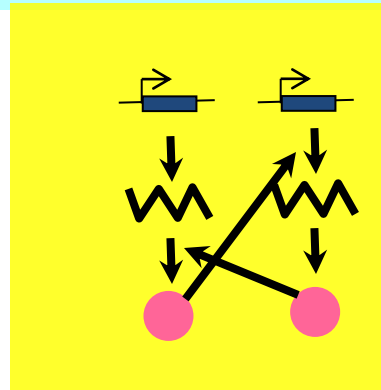
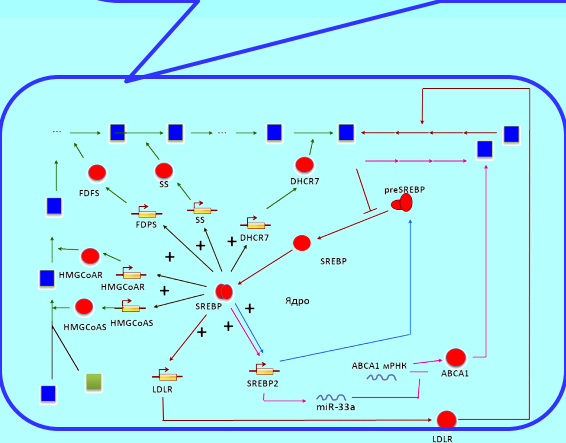


Сайты посттрансляционной модификации (Ser455 и Lys464) находятся чрезвычайно близко на поверхности белковой молекулы, вследствие чего наблюдаются конкурентные взаимоотношения между процессом фосфорилирования и убиквитинирования. Фосфорилирование, индуцируемое ростовыми факторами, препятствует сумоилированию

Генные сети в эпоху высокопроизводительного секвенирования

И снова определение понятия «Генные сети»

Генные сети – группы координированно функционирующих генов, взаимодействующих друг с другом как через свои первичные продукты (РНК и белки), так и через разнообразные метаболиты и другие вторичные продукты функционирования генных сетей.

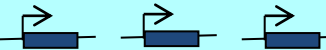
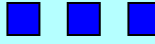
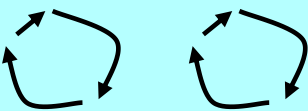


Английский эквивалент термина «генные сети»:

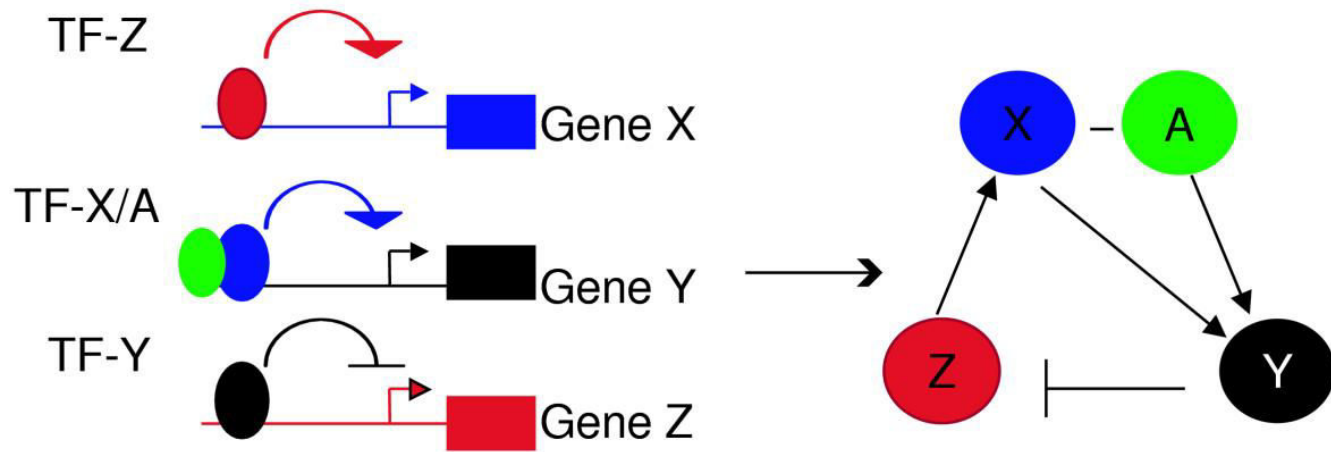
gene (or genetic) regulatory network (GRN) is a collection of molecular regulators that interact with each other and with other substances in the cell to govern the gene expression levels of mRNA and proteins. These play a central role in morphogenesis, the creation of body structures, which in turn is central to evolutionary developmental biology (evo-devo).

The regulator can be DNA, RNA, protein and complexes of these. The interaction can be direct or indirect (through transcribed RNA or translated protein). In general, each mRNA molecule goes on to make a specific protein (or set of proteins).

https://en.wikipedia.org/wiki/Gene_regulatory_network

- группа координировано экспрессирующихся генов, составляющая ядро сети; 
- РНК и белки, кодируемые этими генами; 
- низкомолекулярные компоненты (гормоны, и др. сигнальные молекулы, энергетические компоненты, метаболиты); 
- отрицательные и положительные обратные связи, стабилизирующие параметры генной сети на определенном уровне, или, напротив, отклоняющие их от исходного значения, обеспечивая переход к новому функциональному состоянию. 

Транскрипционные регуляторные сети (Transcription regulatory networks)



Транскрипционные регуляторные сети содержат узлы, обозначающие два вида объектов:

- 1) гены, относящиеся к рассматриваемой системе;
- 2) транскрипционные факторы, регулирующие экспрессию генов.

Типы связей (ребер) в транскрипционных регуляторных сетях:

- Стрелки отображают активацию (подавление) экспрессии гена
- | транскрипционным фактором,
- Линии отображают белок-белковые взаимодействия

**При отображении транскрипционных регуляторных сетей
не принято изображать отдельно ген и отдельно белок !!!**

Реконструкция транскрипционных регуляторных сетей в 41 типе клеток человека (Cell, 2012, 1, 1274–1286)



Ткане-специфичный профиль связывания белков на ДНК

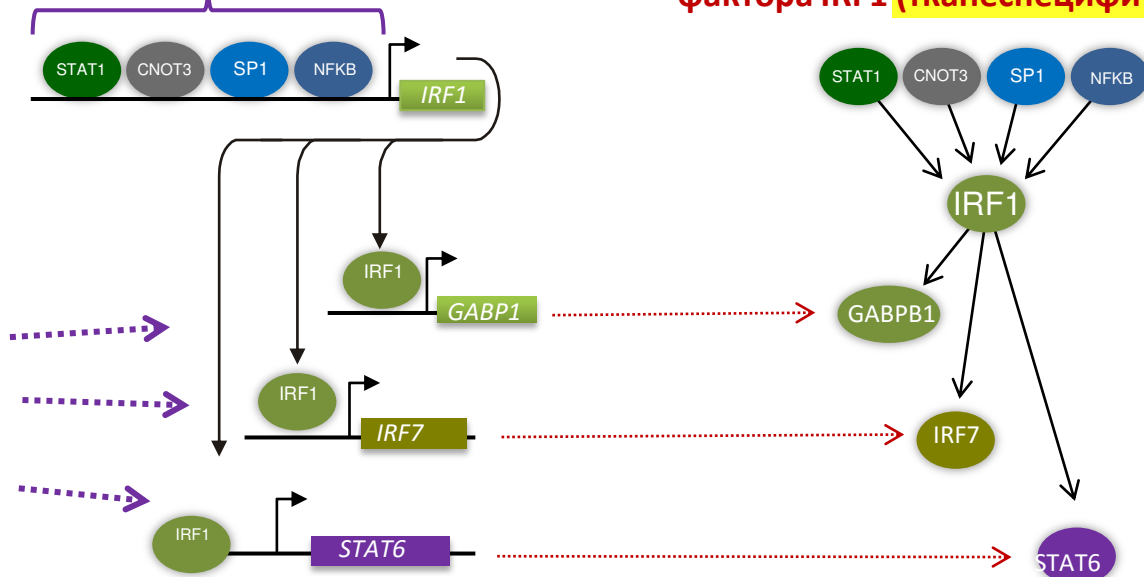
Пример профиля ДНК-аза I чувствительных футпринтов (SCIENCE vol 342, 2013)

В геномах 41 типа клеток человека экспериментально выявлено 45 096 726 ДНК-аза I чувствительных футпринтов, соответствующих регуляторным районам генов.
С помощью компьютерного анализа в футпринтах выявлены сайты связывания 475 транскрипционных факторов.

Локальная сеть транскрипционной регуляции фактора IRF1 (тканеспецифичная !!)

В промоторе гена, кодирующего транскрипционный фактор IRF1, выявлены сайты связывания 4-х транскрипционных факторов

Сайты связывания фактора IRF1, выявлены в промоторах 3-х генов, кодирующих другие транскрипционные факторы

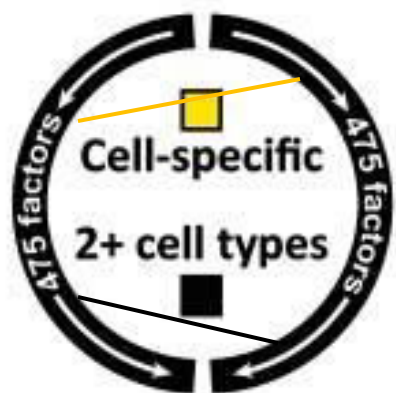


Сети регуляторных транскрипционных взаимодействий для 41 типов клеток человека

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА

Выявлены коды клеточной специфичности, записанные в графах сетей транскрипционной регуляции.

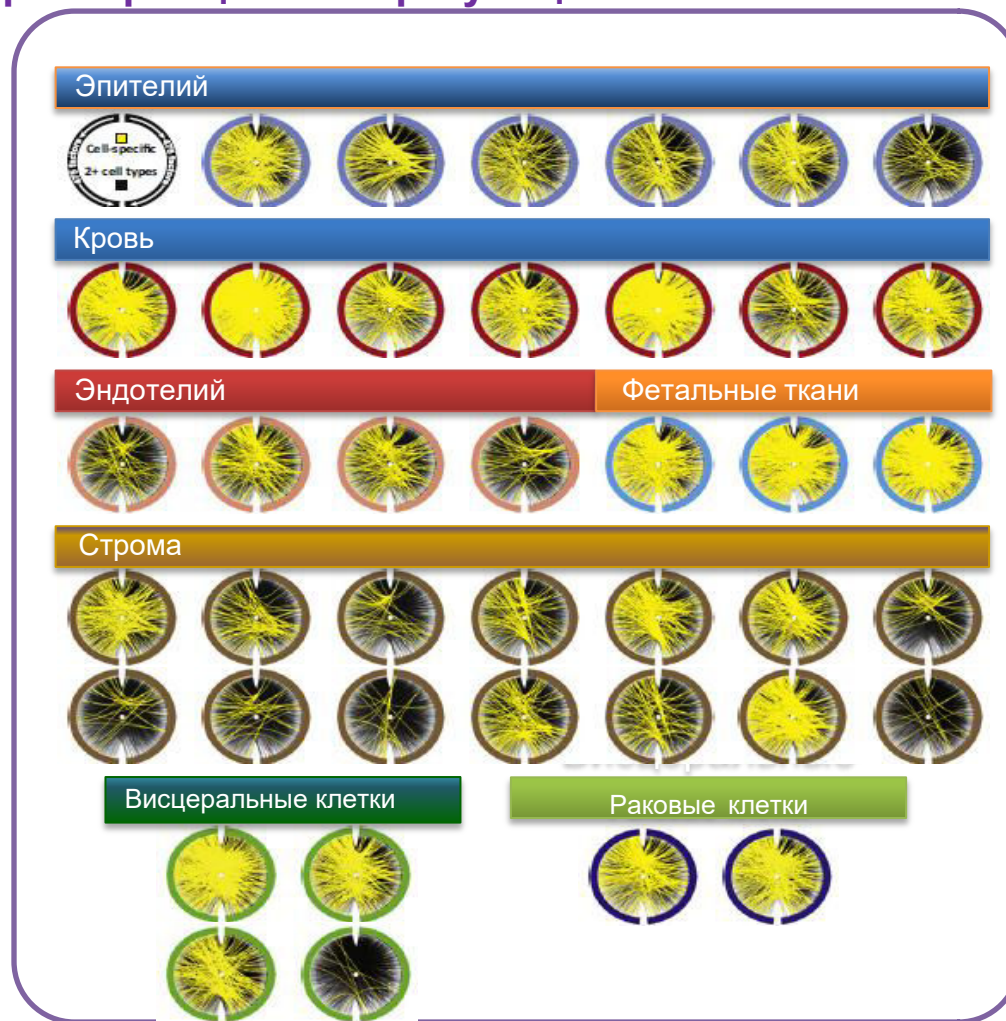
Условные обозначения:



Regulator → Regulated

Желтым цветом отображены взаимодействия между транскрипционными факторами, выявленные только в данном типе клеток

Черным цветом отмечены взаимодействия, выявленные в 2-х и более типах клеток

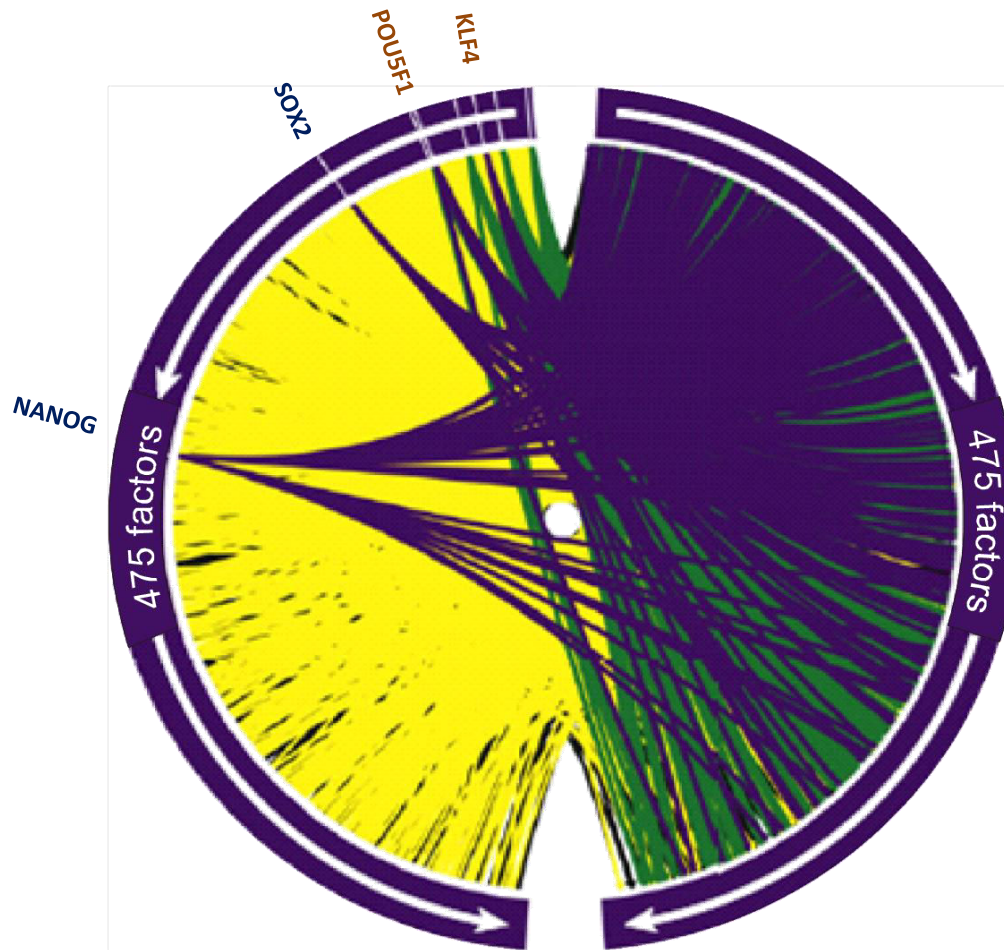


На диаграммах преобладают желтые линии, их паттерн индивидуален для каждого типа клеток

ВЫВОД: Сети регуляторных транскрипционных взаимодействий специфичны для каждого типа клеток

Сети регуляторных транскрипционных взаимодействий в эмбриональных стволовых клетках человека

Построена сеть регуляторных взаимодействий для эмбриональных стволовых клеток человека



Регулятор -> регулируемый

Типы взаимодействий

-  Клеточно-специфичные
-  Взаимодействия с участием факторов плюрипотентности
-  Взаимодействия конститутивных факторов

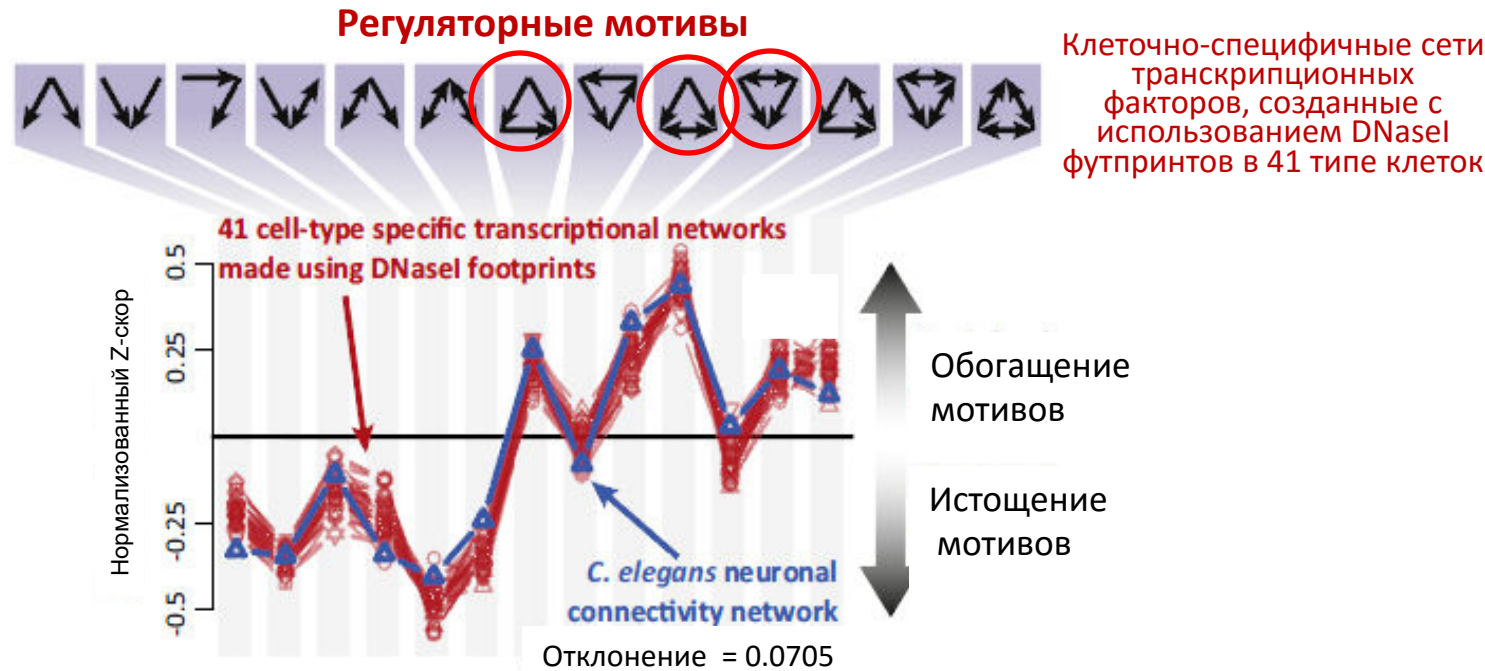
Фиолетовым цветом отображены взаимодействия с участием 4-х факторов (KLF4, NANOG, POU5F1, SOX2), играющих ключевую роль в поддержании плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток

Желтым цветом отображены взаимодействия, характерные для этого типа клеток (ESCs) и не встречающиеся в других типах клеток, .

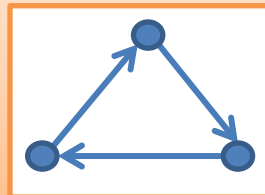
Зеленым цветом отмечены – взаимодействия 4-х конститутивных факторов (SP1, CTCF, NFYA, MAX)

Сети регуляторных транскрипционных взаимодействий для 41 типов клеток человека

Выявлена эволюционная консервативность частот встречаемости паттернов взаимной регуляции (репрессии и активации) транскрипционных факторов для *C. elegans* и 41 типа клеток человека



Пример регуляторного мотива



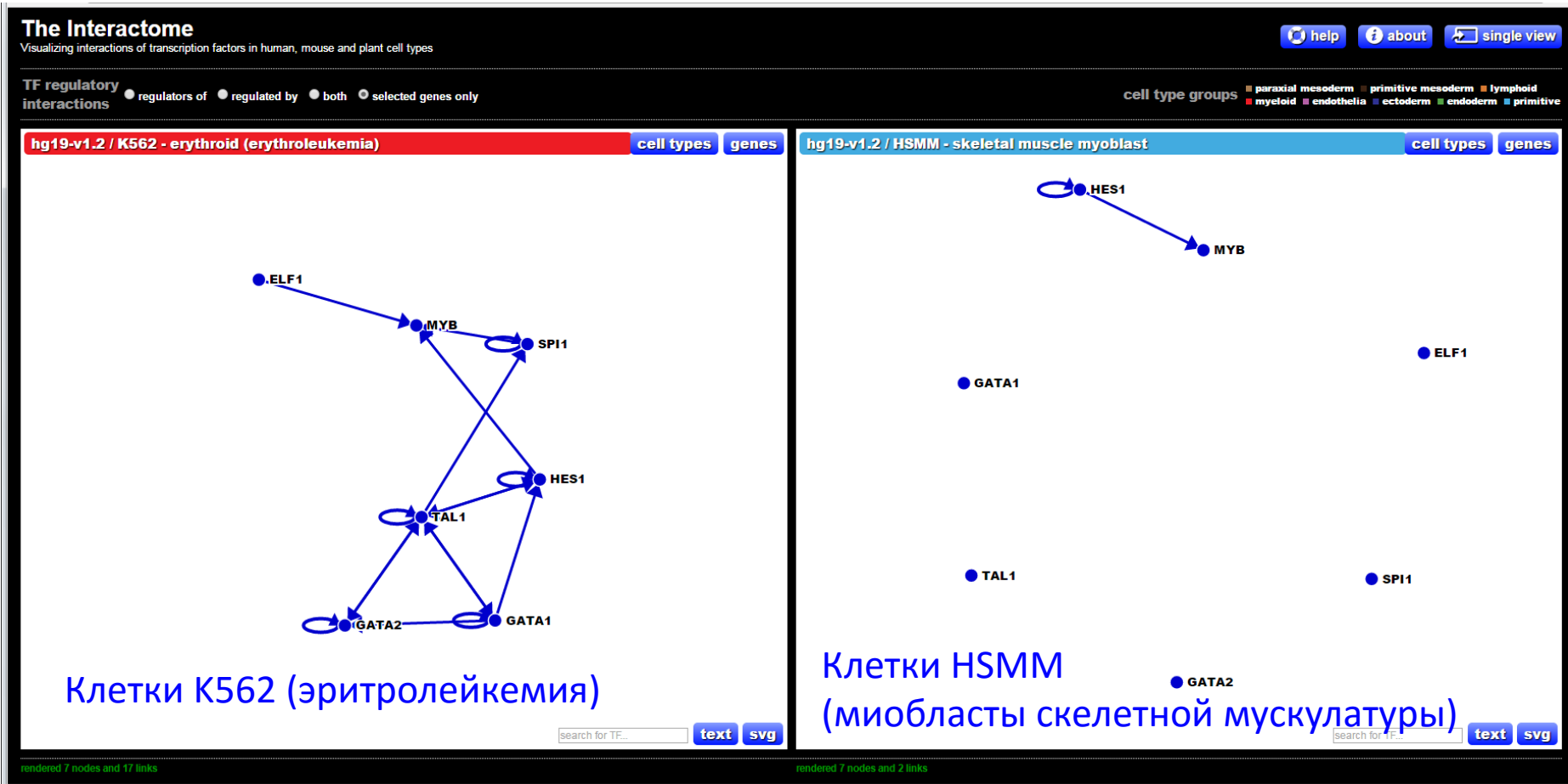
BЭБ-pecypc : The Interactome

Visualizing interactions of transcription factors in human, mouse and plant cell types

<http://www.regulatorynetworks.org/>

Представляет в графическом виде данные о тканеспецифичных регуляторных сетях.

Данные по сетям человека были получены в рамках исследования, о котором говорилось на предыдущих слайдах



Как опубликовать статью в журнале с достойным импакт-фактором ??



Во многих случаях научные публикации содержат экспериментальные данные, которые проанализированы глубоко, но не полностью. Эти экспериментальные данные можно анализировать повторно, используя другие методические подходы. Так было и со статьей (Neph S., et al., *Cell*, 2012, 1, 1274–1286), про которую был рассказ на предыдущих слайдах



**Дополнительный
анализ данных**

Zhang S., et al., *Nucleic Acids Res.*
2014;42(20):12380-7
IF = 9

12380–12387 *Nucleic Acids Research*, 2014, Vol. 42, No. 20
doi: 10.1093/nar/gku923

Published online 09 October 2014

Profiling the transcription factor regulatory networks of human cell types

Shihua Zhang^{1,†}, Dechao Tian^{2,†}, Ngoc Hieu Tran³, Kwok Pui Choi^{2,4,*} and Louxin Zhang^{4,5,*}

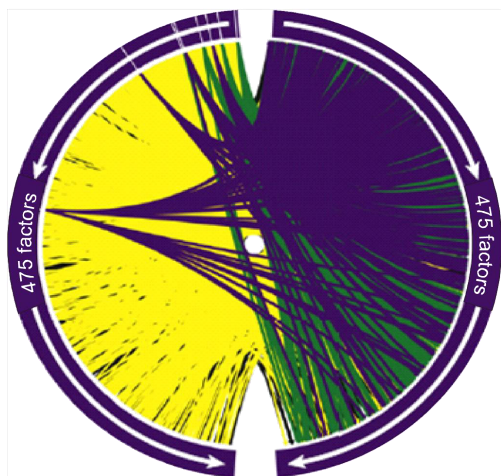
¹National Center for Mathematics and Interdisciplinary Sciences, Academy of Mathematics and Systems Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China, ²Department of Statistics and Applied Probability, National University of Singapore, Singapore 117546, Singapore, ³Division of Mathematical Sciences, Nanyang Technological University, Singapore 637371, Singapore, ⁴Department of Mathematics, National University of Singapore, Singapore 119076, Singapore and ⁵National University of Singapore Graduate School for Integrative Sciences and Engineering, Singapore 117456, Singapore

Received July 24, 2014; Revised September 01, 2014; Accepted September 22, 2014

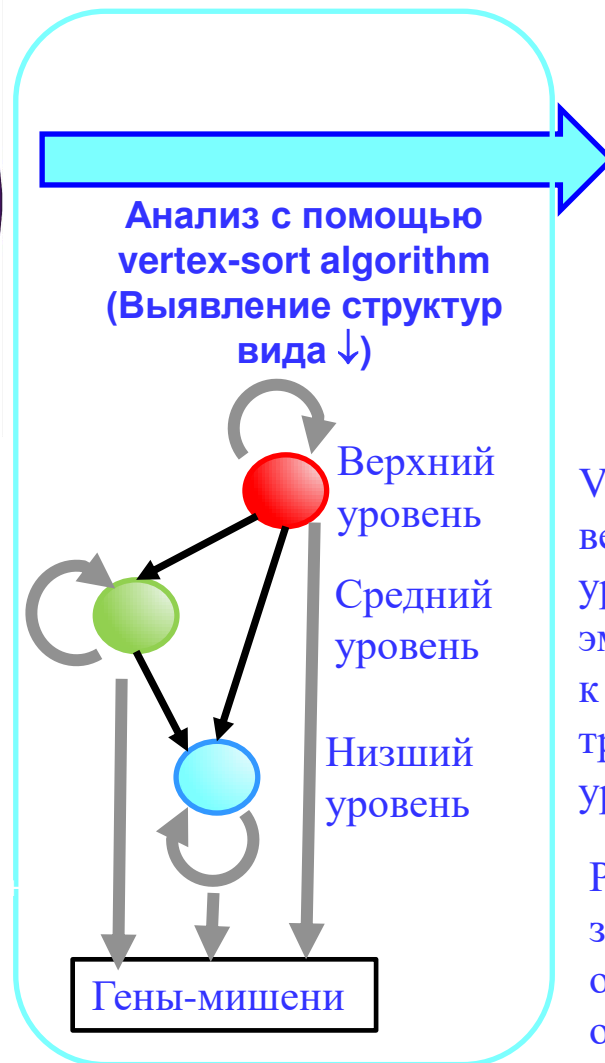
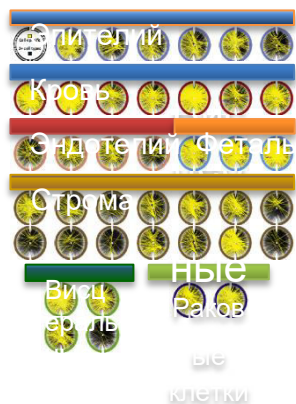
ABSTRACT

respond to extracellular stimuli. Hence, the mutual inter-

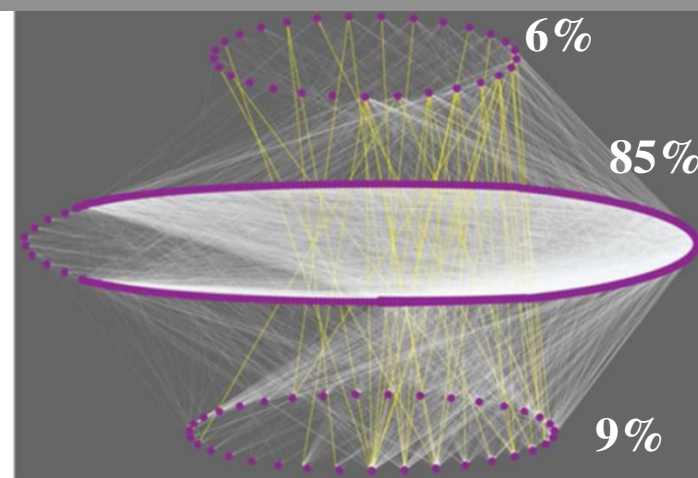
Иерархическая структура сети регуляторных взаимодействий эмбриональных стволовых клеток человека



Сеть регуляторных взаимодействий для эмбриональных стволовых клеток человека (Neph S., et al., Cell, 2012, 1, 1274–1286)

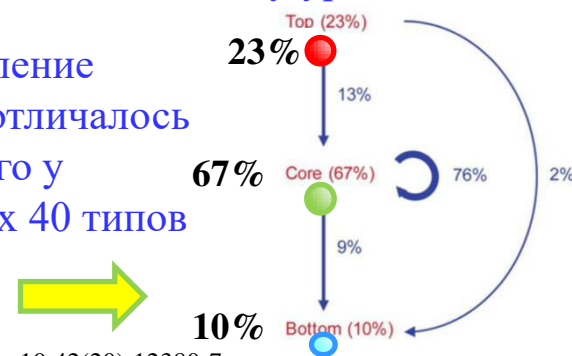


Регуляторная сеть эмбриональных стволовых клеток человека



Vertex-sort algorithm выявляет в сети вершины верхнего, среднего и низшего уровня. Выявлено, что в регуляторной сети эмбриональных стволовых клеток человека к верхнему уровню относятся 6% транскрипционных факторов, к среднему уровню 85%, и к низшему уровню 9%.

Распределение значительно отличалось от такового у остальных 40 типов клеток.



Итоги: возможные экспериментально-теоритические подходы для получения данных для реконструкции транскрипционных регуляторных сетей (TRN)



Выявление сайтов чувствительности к DNaseI в геноме и предсказание сайтов связывания транскрипционных факторов в районах ДНК, соответствующих сайтам чувствительности к DNaseI

Оценка эффекта выключения активности транскрипционных факторов различными способами (siRNA и т.д.).

• • • • •

• • • • •

Конец 3-ей лекции
Спасибо за внимание !!!!