

DOI: 10.31793/1680-1466.2023.28-3.237

Основні транскрипційні фактори, які беруть участь у функціонуванні стовбурових клітин. Особливості їх активації та експресії в β -клітинах підшлункової залози (частина 2)

М.Д. Тронько,
В.М. Пушкарьов,
О.І. Ковзун,
Л.К. Соколова,
В.В. Пушкарьов

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Резюме. Трансплантація клітин є найбільш перспективним і фізіологічним підходом до лікування дисфункції ендокринних залоз. Отримані дані свідчать про ефективність застосування стовбурових клітин (stem cells, SC) для лікування низки ендокринних захворювань і, у першу чергу, цукрового діабету (ЦД) 1-го типу. SC – це клітини з клонотенним потенціалом, які можуть самостійно відновлюватися та диференціюватися в різні типи клітин. Вони відповідають за регенерацію та розвиток органів і тканин. SC надають багато можливостей для регенеративної медицини та слугують перспективною модельною системою для вивчення ранніх стадій розвитку ембріона людини. З'ясовано багато молекулярних механізмів, що лежать в основі самовідновлення та диференціації SC. Основні сигнальні шляхи, залучені в SC, є JAK/STAT, Notch, MAPK/ERK, PI3K/Akt, NF- κ B, Wnt, Hedgehog (Hh), TGF- β та Hippo, які реалізують свою дію через численні, специфічні для кожного шляху транскрипційні фактори. Аналіз їх статусу та послідовності активації, пригнічення і взаємодії надзвичайно важливий в контексті функціонування SC.

Прорив у генерації плюрипотентних клітин із соматичних було досягнуто внаслідок надекспресії специфічних факторів транскрипції. І ембріональні SC (embryonic stem cells, ESC), і індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (induced pluripotent stem cells, iPSC) відрізняються здатністю розмножуватися в недиференційованому стані та диференціюватися в будь-який тип клітин в організмі людини, що відображає їх величезний терапевтичний потенціал.

Розробка протоколів для диференціації плюрипотентних клітин до β -клітин, що виробляють інсулін, вимагає чіткого розуміння участі та перехресної взаємодії цілої низки сигнальних систем клітини та залежних від них транскрипційних

Огляди

факторів. У протоколах розвитку β -клітин із плюрипотентних клітин було встановлено шість стадій із використанням специфічних індукуючих факторів. Для оцінки прогресу та ефективності процесу диференціації використовуються специфічні маркери.

Ключові слова: стовбурові клітини, сигнальні шляхи, транскрипційні фактори.

Трансплантація клітин є найбільш перспективним і фізіологічним підходом до лікування дисфункції ендокринних залоз. Отримані дані свідчать про ефективність застосування стовбурових клітин (stem cells, SC) для лікування низки ендокринних захворювань і, у першу чергу, ЦД 1-го типу. Основні сигнальні шляхи, залучені в SC реалізують свою дію через численні специфічні для кожного шляху транскрипційні фактори. Аналіз їх статусу та послідовності активації, пригнічення і взаємодії – надзвичайно важливий для розуміння функціонування SC.

c-Myc

Фактор транскрипції *c-Myc* належить до сімейства регуляторів та протоонкогенів, що кодують основні фактори транскрипції. Головним чином він регулює ріст клітин, проліферацію, диференціювання, клітинний цикл, метаболізм, виживання та апоптоз, а також пухлиноутворення [1-3] (рис. 1). Більш того, він контролює долю пухлинних клітин, індукуючи стовбуровість, блокуючи старіння та диференціювання клітин, а також організовуючи зміни в мікросередовищі пухлини [4, 5].

Myc зазвичай експресується в β -клітинах на дуже низькому рівні та може бути індукований глюкозою – мітогеном β -клітин [6]. Ці спостереження поставили два запитання: чи є *Myc* ключовим регулятором смерті β -клітин при хронічній гіперглікемії та чи здатний *Myc* стимулювати терапевтичну проліферацію β -клітин? Для відповіді на ці запитання генерували трансгенних мишей із конститутивною або індукбельною гіперекспресією *Myc* у β -клітинах. Трансгенні миші, що експресують дуже високі рівні *Myc* у β -клітинах (у 20–50-кратному діапазоні), демонструють посилення проліферації та апоптозу β -клітин, знижену регуляцію експресії генів інсуліну та розвиток ЦД.

Таким чином, *Myc*, ймовірно, сприяє токсичності глюкози, коли його експресія в β -клітинах

підтримується на дуже високих рівнях. Ці дослідження засвідчили, що підвищена регуляція *Myc* – негативна подія для β -клітин, яка може призвести до руйнування клітин та ЦД, і відкидає ідею використання експресії *Myc* для збільшення маси β -клітин при ЦД. Дослідження, проведені в останнє десятиліття, показали, що «м'яка» індукція експресії *Myc* у β -клітин гризунів та людини посилює реплікацію β -клітин без індукції загибелі клітин або втрати секреції інсуліну, а це свідчить що належний рівень *Myc* може мати терапевтичний потенціал для регенерації β -клітин [7, 8].

c-Myc був спочатку виявлений наприкінці 1970-х років після того, як дослідники виявили гомологію між онкогеном, що передається вірусом мієлоцитоматозу птахів, та людським геном, що надекспресований при різних видах раку. Пізніше відкриття тісно гомологічних генів у людей призвело до додавання *p-Myc* і *l-Myc* до цієї родини регуляторних генів та протоонкогенів, які кодують фактори транскрипції [9].

Більшість дослідників була зосереджена на здатності *Myc* стимулювати ріст і проліферацію клітин шляхом стимуляції прогресування клітинного циклу [10]. Відповідно, *Myc* посилює експресію циклінів, циклін-залежних кіназ (cyclin-dependent kinases, CDK) та факторів транскрипції E2F, зменшуючи при цьому експресію інгібіторів клітинного циклу [11, 12]. Тому *Myc* є важливим прогностичним фактором у багатьох типах агресивних видів раку [8, 13, 14]. Проте з роками стало ясно, що цей білок контролює кілька різних функцій всередині клітини (рис. 1). Так, *Myc* послаблює диференціацію численних типів клітин під час розвитку, таким чином зберігаючи стовбуровість цих клітин. Більш того, хоча *Myc* і пов'язаний із поділом клітин, його експресія, за умов обмеження факторів росту, сприяє апоптозу [15]. Також *Myc* впливає на клітинний метаболізм. Експресія *Myc* стимулює шляхи гліколізу та глутамінолізу, які сприяють проліферації клітин, збільшуючи синтез АТФ, нуклеотидів та жирних кислот, які слугують будівельними матеріалами

для поділу клітин [16, 17]. Мус індукує біогенез мітохондрій і посилює мітохондріальну функцію шляхом активації коактиваторів гамма-рецептора, що активується проліфератором пероксисом 1-альфа (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, PGC-1), факторів транскрипції мітохондрій, мітохондріальних рецепторів та протеїнкіназ. Він бере участь у стимуляції загального синтезу білка, необхідного для мітозу, шляхом активації РНК-полімераз I, II, III та генів, які беруть участь у біосинтезі

рибосом, формуванні структури рибосом та синтезі тРНК і рРНК [3]. У цілому, Мус здійснює багато біологічних дій, необхідних для експансії, виживання та нормального функціонування клітини. Отже, зміни в експресії, послідовності або структурі Мус можуть призвести до зміни поведінки клітин, що призводить до патологій, починаючи від легкої дисфункції до загибелі клітини або утворення пухлини.

Внаслідок такої кількості різних функцій всередині клітини, структура білка Мус дуже

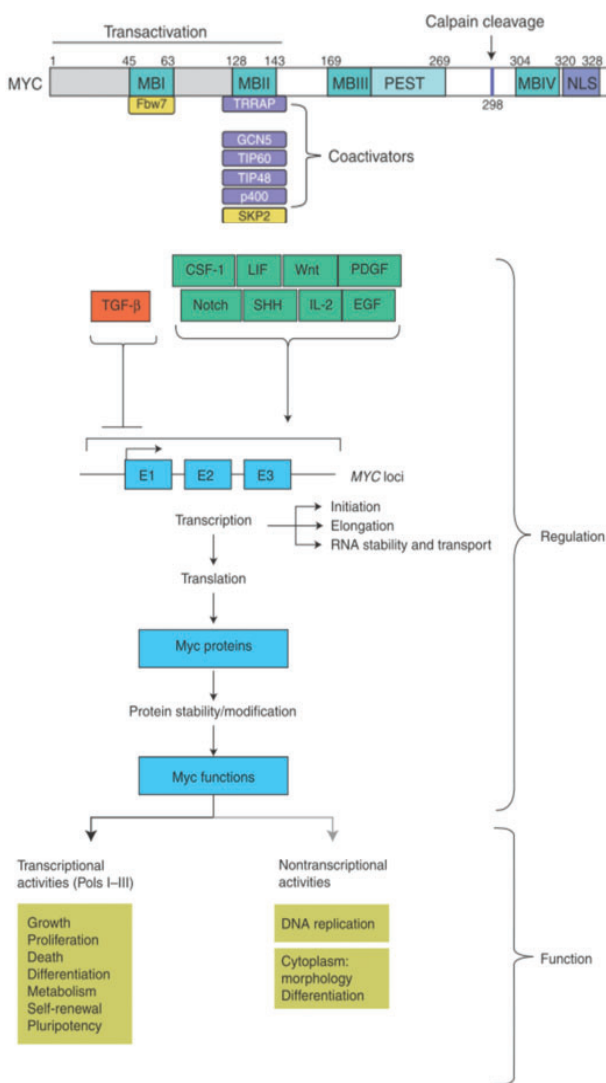


Рис. 1. Організація і сигнальний шлях білка Мус [1].

Примітки. Зверху – схематичне зображення білка Мус людини з його основними доменами (МВІ та ін.) і взаємодіючими партнерами: зображені основні функціонально охарактеризовані транскрипційно-зв'язувальні партнери Мус, а також основні ліганди ЕЗ (SKP2, Fbw7), які беруть участь в обороті Мус (деталі в тексті). Внизу – сигнальний шлях Мус: наведено частковий список сигналів навколишнього середовища, які призводять до змін в експресії Мус; показано кілька рівнів, на яких регулюється ген Мус, мРНК і білок Мус; перелічені ефекти Мус, пов'язані з транскрипційною та нетранскрипційною активністю (деталі в тексті). МВІ (МВІІ, МВІІІ і МВІV) – Мус бокс, PEST – послідовність білків, багата на пролін, глутамінову кислоту, серин та треонін, NLS – сигнал ядерної локалізації, BHLH – мотив базова спіраль-петля-спіраль, LZ – лейцинова застібка, TRRAP – білок, асоційований із доменом трансформації/транскрипції, GCN5 – гістонова ацетилтрансфераза KAT2A, TIP60/48 – Tat-інтерактивний білок, 60 кДа/48 кДа, SKP2 – білок, асоційований з кіназою S-фази 2, MAX – мус-асоційований фактор X, MIZ-1 – білок із доменом цинкового пальця, що взаємодіє з Мус, TGF-β – трансформуючий фактор росту-β, CSF1 – колонієстимулюючий фактор-1, Wnt – сайт інтеграції, пов'язаний із wingless, LIF – фактор інгібування лейкемії, PDGF – тромбоцитарний фактор росту, SHH – білок sonic hedgehog, IL-2 – інтерлейкін-2, EGF – епідермальний фактор росту.

Fig. 1. Myc protein organization [1].

Notes. Above – schematic representation of the human Myc protein with its main domains (MBI, etc.) and interacting partners: depicted are the main functionally characterized transcriptional binding partners of Myc, as well as the main E3 ligases (SKP2, Fbw7) involved in Myc turnover (details in text). Below – Myc signaling pathway: the diagram shows a partial list of environmental signals that lead to changes in Myc expression; several levels at which the Myc gene, mRNA, and Myc protein are regulated are shown; the effects of Myc

related to transcriptional and non-transcriptional activity are listed (details in text). MBI (MBII, MBIII i MBIV) – Myc Box, PEST – peptide sequence rich in proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T), NLS – nuclear localization signal, BHLH – basic helix-loop-helix motif, LZ – leucine zipper, TRRAP – transformation/transcription domain-associated protein, GCN5 – general control nonderepressible 5 protein, TIP60/48 – Tat-interactive protein, 60 kDa/48 kDa, SKP2 – S-phase kinase-associated protein 2, MAX – myc-associated factor X, MIZ-1 – «Myc-interacting zinc finger» protein, TGF-β – transforming growth factor-β, CSF1 – colony stimulating factor 1, Wnt – wingless-related integration site, LIF – leukemia inhibitory factor, PDGF – platelet-derived growth factor, SHH – Sonic hedgehog protein, IL-2 – interleukin-2, EGF – epidermal growth factor.

Огляди

складна. Встановлені кілька доменів, які необхідні для його активності [2, 9] (рис. 1). У N-кінцевій області Мус містить транскрипційний домен активації (trans-activating domain, TAD), який разом із боксами Мус, МВІ та МВІІ, необхідний для транскрипційної та трансформаційної активності Мус. Крім того, Мус містить область МВІІІ, яка відповідає за репресійну активність транскрипції цього фактора. Центральна область містить сигнал ядерної локалізації (nuclear localization signal, NLS) і бокс МВІV, необхідний як для транскрипційної активності Мус, так і для апоптотичного сигналіngu. С-кінцева область Мус складається з базового домену, який забезпечує зв'язування Мус із ДНК, і домену лейцинової застіжки, необхідного для зв'язування Мус зі своїм облігатним гетеродимерним партнером, Мах. Після того, як утворюється комплекс Мус-Мах, Мус зв'язується з послідовностями енансер-боксу (enhancer box, Е-бокс) (САС(С/А)ТG), і відбувається стимуляція транскрипції на промотор-проксимальному Е-боксі [9]. Оскільки Е-бокс містить лише 6 bp, це відбувається в геномі з високою випадковою частотою. Відповідно, існує багато тисяч сайтів зв'язування для Мус, а оскільки існує безліч інших факторів транскрипції, які розпізнають Е-бокси, існує постійна конкуренція з Мус за зв'язування з ДНК. У β -клітинах одним із таких факторів транскрипції, регуляція якого підвищується у відповідь на глюкозу і який може зв'язуватися з деякими Е-бокс-елементами, є зв'язуючий білок елементів відповіді вуглеводів (carbohydrate response element binding protein, ChREBP) [18]. У відповідь на посилений метаболізм глюкози ChREBP зв'язується з елементами відповіді вуглеводів (carbohydrate response elements, ChoRE), які складаються з 2 Е-боксів (або послідовностей, дуже схожих на Е-бокси), розділених 5 bp. Таким чином, можна передбачити, що в контексті подвійних Е-боксів, розділених 5 bp, можуть виникнути обставини, коли Мус та ChREBP конкурують за зв'язування з тим самим сайтом, і лише один фактор транскрипції залишається прив'язаним до конкретного регуляторного локусу. Однак у β -клітинах і Мус, і ChREBP одночасно рекрутуються на глюкозо-респонсивні гени-мішені [19]. Це пояснюється тим, що Мус може взаємодіяти з такими компонентами механізму транскрипції, як домен-асоційований білок

трансформації/транскрипції (transformation/transcription domain-associated protein, TRAAP) та позитивний фактор елонгації транскрипції b (positive transcription elongation factor b, p-TEFb), які регулюють ініціацію транскрипції та елонгації відповідно, і без обов'язкового зв'язування з ДНК [20]. Насправді в клітинах раку надекспресія Мус діє як підсилювач практично всіх генів, які активні в цій клітині на момент його надекспресії, і Мус зберігає трансформаційну активність навіть після видалення свого ДНК-зв'язуючого домену. У більш фізіологічному контексті, у β -клітинах кількість Мус збільшується приблизно в 1,5-3 рази після підвищення рівня глюкози [6, 7]. Використовуючи декілька праймерів для промотора та сайту початку транскрипції (transcription start site, TSS) прототипу глюкозо-респонсивного гена, Pklr, показано, що ChREBP специфічно рекрутується до ChoRE, близько 200 bp вище TSS. Водночас Мус рекрутується в той же регіон геному, починаючи вище від ChoRE і поширюючись майже на 1000 bp вниз від TSS [19]. Важливо, що в цій області ДНК немає консенсусного Е-боксу, а це свідчить про те, що в цьому випадку Мус не взаємодіє з ДНК безпосередньо. Крім того, активність Мус необхідна для рекрутування ChREBP до ДНК, так що нокдаун Мус із застосування siRNA або хімічного інгібітора блокує здатність ChREBP зв'язуватися з його спорідненим респонсивним елементом [19]. Таким чином, Мус та ChREBP кооперуються в опосередкуванні експресії гена, що реагує в β -клітинах на глюкозу.

Оскільки зміни в експресії Мус можуть призвести до важливих функціональних наслідків для клітини, рівні Мус жорстко контролюються розвиненою регуляторною мережею. На рівні транскрипції експресія Мус контролюється чотирма різними промоторами та понад 30 факторами транскрипції з багатьох регуляторних шляхів. На рівні трансляції 5' регіон мРНК Мус, що не транслюється, високо структурований і містить ділянку внутрішній сайт зв'язування рибосоми (internal ribosomal entry site, IRES), що дозволяє регулювати трансляцію Мус під час процесів розвитку та у відповідь на генотоксичний стрес [21]. На рівні білка стабільність Мус контролюється кількома убіквітинуваними лігазами, що визначає надзвичайно короткий період напівжиття – приблизно 20-30 хвилин [22]. Щобільше, посттранскрипційні модифікації, такі

як фосфорилювання, убіквітинуювання та ацетилювання, регулюють стабільність і функцію Мус, а транскрипційна активність Мус під час різних стресів негативно контролюється коротким варіантом Мус – «Мус-пік». Важливо, що хоча Мус не димеризується з іншими білками, що містять мотиви базова спіраль – петля – спіраль – лейцинова застібка (basic helix-loop-helix zipper, bHLHZ), відмінними від Max, останній димеризується з іншими білками bHLHZ, такими як сімейство білків Mxd та Mga [7].

Множинні взаємодії Max та білків bHLHZ утворюють розширену мережу, за допомогою якої Мус опосередковує широку транскрипційну відповідь на мітогенні, метаболічні сигнали та зупинку росту. Мус також кооперується з прилеглою lncRNA – транслокація варіанта плазмацитоми 1 (plasmacytoma variant translocation 1, PVT1), яка стабілізує білок Мус і потенціює його активність [23]. З іншого боку, було показано, що PVT1 також може діяти як супресор пухлини [24], а отже, PVT1 може або стимулювати, або інгібувати активність Мус залежно від клітинного контексту. Таким чином, регуляторні механізми на багатьох рівнях контролюють експресію Мус через його високу значущість для життя клітини [2, 3, 9, 11, 15, 16, 21, 22].

Промотор Мус пов'язує численні фактори транскрипції, які діють як перемикачі великої кількості шляхів передачі сигналу, інтегруючи клітинні сигнали й опосередковуючи транскрипційну відповідь, яка стимулює ріст і проліферацію клітин, впливає на диференціацію, виживання та плюрипотентність. Шляхи передачі сигналу можуть бути ініційовані гормонами, факторами росту, змінами в обміні речовин або будь-якими змінами в навколишньому середовищі [25]. Індукція Мус потім стимулює експресію інших факторів транскрипції, які потім можуть зв'язуватися з промотором Мус, прискорюючи чи пригнічуючи його активність. Таким чином, промотор Мус поєднаний, регулює та регулюється багатьма мережами зворотного зв'язку. Контроль транскрипції гена Мус і його подальша регуляція на рівні мРНК і білка за допомогою сигналів навколишнього середовища є важливим клітинним датчиком, який надає клітині інформацію, необхідну для виконання критичних функціональних рішень, таких як клітинний ріст, поділ, або загибель клітин. Через їх важливу роль у патофізіології, зусилля

дослідників були зосереджені на з'ясуванні регуляції Мус під час клітинного стресу. Щодо ЦД, оскільки постійна гіперглікемія призводить до початкового компенсаторного зростання β -клітин із подальшою функціональною декомпенсацією та загибеллю, регуляція Мус у цих процесах повинна бути ретельно вивчена [7].

FOXA2

Білки Forkhead боксу (Forkhead box, FOX) складаються з великої родини факторів транскрипції, члени якої проявляють функціональне різноманіття і беруть участь у клітинних процесах, починаючи від розвитку до імунітету та обміну речовин [26]. Понад 170 представників сімейства FOX були ідентифіковані з різних видів та класифіковані в 19 підродин (від FOXA до FOXS). FOXA, також відомий як ядерний фактор 3 гепатоцитів (the hepatocyte nuclear factor 3, HNF3), спочатку був відкритий як ключовий регулятор транскрипції в печінці та багатьох тканинах, що походять з ентодерми. Члени підродини FOXA можуть ремоделювати нуклеосоми та, як фактори-піонери, сприяти зв'язуванню з ДНК інших факторів транскрипції [27]. У ссавців підродина FOXA складається з FOXA1 (HNF3 α), FOXA2 (HNF3 β) та FOXA3 (HNF3 γ). FOXA2 є головним регулятором експресії генів у печінці, бере участь у транскрипції специфічних для печінки генів та пов'язаних із ними фізіологічних процесах. Отримані дані свідчать про те, що FOXA2 може впливати на проліферацію та інвазивність ракових клітин підшлункової залози (ПШЗ) та діяти як супресор пухлини при раку ПШЗ [28].

Білки сімейства FOX містять відносно консервативний домен, що зв'язує ДНК (DNA-binding domain, DBD), відомий як winged-helix або forkhead домен. DBD з FOX зазвичай складається з трьох частин: трьох α -спіралей на N-кінці, триланцюгового мотива β -sheet та двох менш консервативних крилатих петель на C-кінці (крила 1 і 2). Основна область розпізнавання ДНК розташована на третій спіралі (Helix 3, H3), яка зв'язує ДНК, вставляючись у головну канавку ДНК. Послідовність амінокислот H3 демонструє високу гомологію серед усіх членів сімейства FOX. Більшість паралогічних білків FOX зв'язуються з канонічним респонсивним елементом ДНК 5'-RYAAAYA-3' (R = A

Огляди

або G, Y = C або T) [29]. Розбіжність послідовностей у ділянках крила сприяє відмінностям у зв'язуванні ДНК. Области крила містять основні амінокислоти, які розпізнають структури ДНК у флангових регіонах сайту зв'язування FOX, як це показано і для інших сімейств факторів транскрипції [30]. Щодо forkhead білків, нещодавній аналіз даних HT-SELEX продемонстрував, що специфічність зв'язування може покращуватися для моделей, які збільшують нуклеотидну послідовність з особливостями форми ДНК [31]. У мікроерей експериментах щодо зв'язування білків, показано, що forkhead білки мають здатність специфічно зв'язуватись із різними мотивами ДНК.

Повнорозмірний білок FOXA2 людини містить два домени активації транскрипції та forkhead домен. Його DBD характеризується високою гомологією послідовності (95%) з FOXA1 та FOXA3 22. Повногеномний аналіз сайтів, що зв'язують FOXA2 в тканинах печінки людини та миші показав, що FOXA2 зв'язується з консенсусною послідовністю (5'-GТAААСА-3') сімейства FOX [32]. Було визначено ко-кристалічну структуру FOXA2-DBD, зв'язану з 16-bp ДНК, що містить консенсусний сайт (5'-GТAААСА-3') [27].

SOX17

Y-бокс області, що визначає статть 17 (sex-determining region Y-box 17, SOX17) є фактором транскрипції, що керує специфікою та розвитком примітивної ентодерми, примітивних статевих клітин, дефінітивної ентодерми і згодом бере участь у функціонуванні серцево-судинної системи та органів, що походять з ентодерми. SOX17 належить до підродино SOXF поряд із SOX7 та SOX18. SOX17 не може замінити SOX2 при перепрограмуванні плюрипотентності, але одна міссенс-мутація може перетворити SOX17 у фактор, що індукує плюрипотентність значно перевершуючи ефекти SOX2 [33]. Тому міссенс-мутації можуть змінити дію SOX17 щодо споріднених елементів ДНК, що, своєю чергою, змінює виконання програми експресії генів разом з активацією стану перепрограмування клітин.

SOX17 був спочатку клонований із бібліотек кДНК тканини сім'яників миші та припустили, що він виконує специфічну для певних стадій функцію в сперматогенезі. Ключову роль

SOX17 у розвитку ентодерми було виявлено в Xenopus та в Данію, під час досліджень делецій генів мишей та його надекспресії в ембріональних стовбурових клітинах. Подальші дослідження встановили, що SOX17 є важливим фактором у серцево-судинній системі, підтримці фетальних гемопоетичних стовбурових клітин (haemopoietic stem cells, HSC) [32] та визначенні артеріальної ідентичності [34]. У ембріонах ссавців SOX17 керує розвитком примітивної ентодерми – одним із найперших рішень долі клітин в ембріональному розвитку. У мишей SOX17 спільно експресується з октамер-зв'язуючим транскрипційним фактором 4 (octamer-binding transcription factor 4, OCT4) на 32-клітинній стадії передімплантаційного ембріона й обмежується шаром примітивної ентодерми на стадії пізньої бластоцисти [35]. OCT4 виконує подвійну функцію як активатор розвитку примітивної ентодерми та репресор трофектодермального напрямку. З використанням моделі *in vitro*, було показано, що ДНК-залежні гетеродимери SOX17/OCT4 спрямовують програми транскрипції, які призводять до специфікації примітивних ентодерм у передімплантаційному розвитку ссавців. Партнерські перемикання OCT4 з SOX2 (епібласт) на SOX17 (екстраембріональна примітивна ентодерма) дозволяють гетеродимерам SOX2/OCT4 vs SOX17/OCT4 зв'язувати альтернативні набори генів-мішеней. SOX17 також може безпосередньо взаємодіяти з OCT4, для визначення зародкової лінії в людей, але не мишей [36]. SOX17 містить консервативний домен високомобільної групи (high mobility group box, HMG-box), що складається з трьох альфаспіралей і подовжених кінцевих хвостів, які приймають L-подібну структуру. HMG-box зв'язує приблизно гептамерну САТТГТС-подібну послідовність розпізнавання, через малу канавку ДНК, використовуючи ультраконсервативний набір амінокислот, що виходять зі спіралей 1 і 2, а також N і C-кінці [37]. Спіраль 3 і C-кінець діють як платформи взаємодії з такими партнерами, як OCT4. Зв'язування з ДНК призводить до серйозної деформації кривини ДНК. З огляду на цей своєрідний спосіб зв'язування, припускають, що SOX-фактори можуть регулювати архітектуру хроматину та петель енхансерів. Також вважають, що HMG-box слугують для підтримки зв'язування ДНК у контексті гістонових октамерів [34]. Крім незалежної укладки

HMG-бокс, деякі фактори SOX містять додаткові функціональні домени, які опосередковують конститутивну або ДНК-залежну димеризацію, трансактивацію та репресію [38]. У випадку SOX17, ділянки поза HMG-боксами слабо консервативні та складаються з областей малої складності з високою схильністю до внутрішньої дезорганізації, що ускладнює їх вивчення. Домен трансактивації, який є частково консервативним у групі SOXF, був картований на С-кінці SOX17. Немає структурної інформації щодо доменів або мотивів послідовностей поза HMG-бокс будь-яких білків SOX [34].

Отримані дані, що свідчать про антагонізм сигналіну SOX17 та сайт в інтеграції, пов'язаним з wingless (wingless-related integration site, WNT) у кількох типах тканин. Було виявлено, що білок Xenopus SOX17 зв'язується з областю ARM β-катеніну і його ектопічне утворення порушує дорсовентральний патерн ембріонів жаб. Взаємодія опосередковується коротким еволюційно консервативним, EFDQYL-подібним пептидом, у межах С-кінцевого домену трансактивації SOX17 [39]. Вважають, що β-катенін діє як кофактор SOX17, що нагадує транскрипційний фактор сімейства Т клітинний фактор/лімфоїдний енхансерний фактор (T cell factor/lymphoid enhancer factor, TCF/LEF). Цілком можливо, що SOX17 конкурує з TCF і перенаправляє β-катенін на інші гени-мішені. Цей перерозподіл β-катеніну антагонізує з канонічним сигналіном WNT і може інактивувати гени, зв'язані з факторами TCF/LEF. Така модель додатково підтверджується існуванням ділянок зв'язування TCF та SOX17 у домені ARM β-катеніну, які перекриваються. Механізм, за допомогою якого β-катенін діє як «викрадений» ко-активатор SOX17, також міг би пояснити посилену активність перепрограмування плюрипотентності змінених факторів SOX17 (eSOX17), таких як SOX17EK, SOX17FNV [40] та SOX2-C17. Мішенями транскрипційного фактора eSOX17 є гени плюрипотентності, які потенційно можуть залучати β-катенін до ектопічних сайтів і прив'язують його до енхансерів плюрипотентності, що призводить до більш ефективної трансактивації та більш ефективного перепрограмування. Видалення або мутація в мотиві, що забезпечує взаємодію β-катеніну з SOX17EK порушує його активність як високоєфективного індуктора плюрипотентності.

Аналогічно, у клітинах-сателітах миші показано, фактори SOXF (SOX7, SOX17 та SOX18), які антагонізують передачу сигналів WNT, сприяють самовідновленню та переходу в стан спокою [41]. Видалення мотиву взаємодії β-катеніну в SOX17 руйнує цю активність. Також було виявлено, що β-катенін стимулює трансактивацію генів-репортерів SOX, тоді як SOX17 репресує репортери β-катеніну/TCF відповідно до моделі, де SOX17 та TCF/LEF конкурують за β-катенін та спрямовують його на різні енхансери [40]. Нарешті, виявлено, що міссенс-мутація р.У259N на С-кінці SOX17, пов'язана з посиленням функції, є рекурентним генетичним драйвером вроджених аномалій нирок та сечовивідних шляхів. Відомо, що ця мутація спричиняє невідповідне накопичення білка SOX17 та подальше підвищення його ефективності, що інгібує сигналінг WNT, як потенційний механізм захворювання.

Отже, SOX17 антагонізує з канонічним сигналіном WNT у кількох типах клітин і тканин, безпосередньо взаємодіючи з β-катеніном на рівні білка, що призводить до перемикання транскрипційних програм [34].

NKX6.1

Розуміння біологічних процесів, що лежать в основі механізмів та шляхів регулювання розвитку β-клітин ПШЗ, необхідне для з'ясування патології ЦД, яка характеризується поступовим зменшенням маси β-клітин, що виробляють інсулін. Плюрипотентні стовбурові клітини (pluripotent stem cells, PSC) потенційно можуть забезпечити необмежений запас функціональних β-клітин для клітинної терапії та моделювання хвороб ЦД. Білок NK6 гомеобокс 1 (NK6 homeobox 1, NKX6.1) є фактором транскрипції, який відіграє найважливішу роль у функціонуванні та проліферації β-клітин ПШЗ. У острівцях ПШЗ людини експресія NKX6.1 є ексклюзивною для β-клітин і не виявляється в інших клітинах острівців. Показано, що активація NKX6.1 у мультипотентних клітинах попередників ПШЗ, отриманих із PSC (multipotent progenitor cells, MPC), що експресують гомеобокс ПШЗ та дванадцятипалої кишки 1 (pancreatic and duodenal homeobox 1, PDX1) (PDX1+/NKX6.1+), гарантує їх майбутнє перетворення на моногормональні β-клітини. Тоді як подальша диференціація MPC, у яких

Огляди

відсутня експресія NKX6.1 (PDX1+/NKX6.1-), призводить до генерації нефункціональних полігормональних β -клітин [41] (рис. 2). Важливість NKX6.1, як вирішального регулятора для специфікації MPC у функціональні β -клітини, заслуговує на подальше дослідження пов'язаних із ним механізмів та вивчення можливості посилення експресії NKX6.1 як засобу для збільшення функції та маси β -клітин. PDX1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) та NKX6.1 є двома основними факторами транскрипції, які інтенсивно експресуються як у MPC ПШЗ, так і у функціональних β -клітинах. MPC, отримані з hPSC (hPSC-MPC), спільно експресують PDX1 та NKX6.1 (PDX1+/NKX6.1+), дозрівають у функціональні β -клітини при трансплантації їх в імунodefіцитних мишей і успішно знижують високий рівень глюкози в крові. З іншого

боку, MPC, у яких відсутня експресія NKX6.1, перетворюються на полігормональні клітини та не функціонують належним чином *in vivo*. Це вказує на те, що експресія NKX6.1 відіграє вирішальну роль у керуванні розвитком MPC у β -клітини [42]. Більш того, специфікація MPC у не- β ендокринну лінію може потребувати пригнічення NKX6.1.

Таким чином, NKX6.1 відіграє незамінну роль у специфікації MPC у зрілі функціональні β -клітини. Крім того, він відіграє важливу роль у підтримці функції дорослих β -клітин ПШЗ. Усі дорослі клітини ПШЗ походять від тих самих MPC, які експресують групу факторів транскрипції, включаючи PDX1, SOX9, FOXA2, NKX6.1, HNF6 та транскрипційний фактор ПШЗ 1 субодинаця альфа (pancreas transcription factor 1 subunit alpha, PTF1A) [41]. Організована

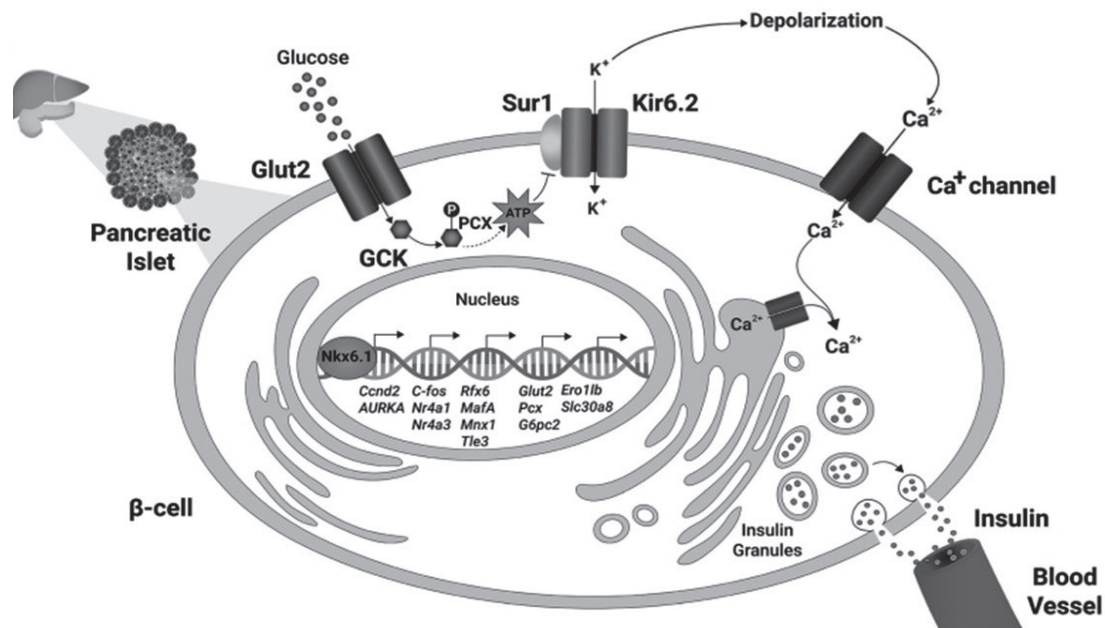


Рис. 2. Схема, що демонструє функцію NKX6.1 у β -клітинах ПШЗ [41].

Примітки: Sur1 – рецептор сульфонілсечовини 1, Kir6.2 – калієвий канал внутрішнього випрямлення 6.2, Glut2 – транспортер глюкози 2, GCK – глюकोкіназа, PCX – білок піруваткарбоксилази, Nkx6.1 – NK6 гомеобокс 1, Cnd2 – циклін D2, Aurka – Aurora кіназа A, Nr4a1/3 – ядерний рецептор 4A1/3, Rfx6 – регуляторний фактор X, 6, MafA – MAF транскрипційний фактор A, Mnx1 – гомеобокс мотонейронів та ПШЗ 1, Tle3 – трансдуцин-подібний енансерний білок 3, G6pc2 – глюкоза-6-фосфатаза каталітична субодинаця 2, Ero1b – оксидредуктаза ендоплазматичного ретикулуму 1 бета, Slc30a8 – член 8 сімейства транспортерів розчинених речовин 30.

Fig. 2. Schematic showing the function of NKX6.1 in pancreatic β -cells [41].

Notes: Sur1 – sulfonylurea receptor 1, Kir6.2 – potassium inner-rectifying channel 6.2, Glut2 – Glucose transporter 2, GCK – glucokinase, PCX – pyruvate carboxylase protein, Nkx6.1 – NK6 homeobox 1, Cnd2 – cyclin D2, Aurka – Aurora Kinase A, Nr4a1/3 – nuclear receptor 4A1/3, Rfx6 – regulatory factor X, 6, MafA – MAF transcription factor A, Mnx1 – motor neuron and pancreas homeobox 1, Tle3 – transducin-like enhancer protein 3, G6pc2 – glucose-6-phosphatase catalytic subunit 2, Ero1b – endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 beta, Slc30a8 – solute carrier family 30 member 8.

експресія ключових факторів транскрипції є обов'язковою для розвитку функціональної ПШЗ ссавців. PDX1, NKX6.1, NKX2.2, білок парного боксу 6 (paired box gene 6, PAX6), нейрогенін 3 (neurogenin 3, NEUROG3), білок-енхансер гену інсуліну 1 (insulin gene enhancer protein 1, ISL1) та нейронна диференціація 1 (neuronal differentiation 1, NEUROD1) є одними з основних факторів транскрипції, що контролюють хронологічний розвиток окремих типів ендокринних клітин, що включають острівці Лангерганса. PDX1 та NKX6.1, два фактора транскрипції, експресовані на стадії MPC, визначають генерацію функціональних β -клітин ПШЗ [43].

Ген NKX6.1 – фактора транскрипції, що містить homeobox, був ідентифікований на 4 хромосомі. NKX6.1 уперше виділений із ліній клітин острівців та інсуліноми. Він експресується на ранніх стадіях розвитку ПШЗ, а також у дорослих β -клітинах, де він бере участь у кількох функціях під час розвитку залози. Під час розвитку ПШЗ існують три різні популяції клітин NKX6.1+: клітини-попередники ПШЗ (PDX1+/NKX6.1+), ендокринні клітини-попередники (NGN3+/NKX6.1+) та β -клітини (інсулін+/PDX1+/NKX6.1+). Протягом усього розвитку ПШЗ експресія NKX6.1 зростає в зоні епітелію стовбура ПШЗ, що згодом дає початок ендокринній лінії [43]. Експресія Nkx6.1 починається на 9.5 день ембріона миші (E9.5) в епітелії ПШЗ і триває до E13, де його експресія обмежується β -клітинами. У мишей на E10.5 Nkx6.1 та Ptf1a ко-експресуються у великому відсотку MPC. До E12.5 Nkx6.1 та Ptf1a функціонують за окремими шляхами, оскільки Nkx6.1 міститься виключно у стовбуровій області ПШЗ, що розвивається, яка породжує ендокринну лінію, тоді як Ptf1a повністю причетний до розвитку екзокринних клітин, що походять від тієї ж залози [41].

ДНК-зв'язуючі та трансактиваційні властивості NKX6.1. Існує кілька стратегій за якими Nkx6.1 розпізнає свої конкретні мішені. Аналізи вибору сайтів зв'язування показали, що Nkx6.1 контактує з високоспецифічною послідовністю ДНК, що складається з восьми пар основ. Ця послідовність містить класичне для більшості факторів із гомеодоменом ядро зв'язування 5'ТААТ'3. Крім того, консервативність пар основ, що оточують ядро зв'язування, має важливе

значення для належної ідентифікації його гомеодоменом Nkx6.1. Зміна навіть в одній парі основ, має великий вплив, зменшуючи спорідненість зв'язування. Специфіка флангових послідовностей може бути причиною звуження потенційних цілей Nkx6.1. Іншою стратегією NKX6.1 для знаходження своєї мішені є домен, що перешкоджає зв'язуванню (binding interference domain, BID). BID міститься на СООН-кінцевій ділянці гомеодомену NKX6.1. BID може безпосередньо взаємодіяти з ДНК-зв'язуючим доменом. Негативно заряджений СООН може переривати взаємодію між позитивними зарядами в ДНК-зв'язуючому домені та фосфатними групами ДНК. BID може забезпечувати дві важливі властивості Nkx6.1: специфічність та регулювання. NKX6.1 рідше зв'язується з ДНК *in vitro*, коли функціонує BID і для належного функціонування NKX6.1 необхідна модифікація BID. Взаємодія між NKX6.1 та іншими білками, які зв'язуються поблизу сайту або є частиною комплексу регуляції транскрипції, може забезпечити послаблення гальмування. Щодо модифікації BID, то певні ферменти, такі як кінази, фосфатази або протеази, можуть регулювати його активність. Загалом, NKX6.1 вважається репресором транскрипції. N-кінець NKX6.1 був позначений як домен репресії транскрипції, тоді як С-кінець (BID) відповідає за позитивний зворотний зв'язок або транскрипційну активацію промотора NKX6.1. Промотор NKX6.1 містить послідовність подібну до ТААТ-боксу, з якою він зв'язується позитивно саморегулюючи свою експресію [41].

Висхідні та низхідні мішені NKX6.1 пов'язані з розвитком β -клітин. Показано, що в β -клітинах є кілька мішеней NKX6.1, пов'язаних із багатьма функціями. Так, ядерний рецептор 4A1 (nuclear receptor 4A1, Nr4a1, Nur77, TR3) та Nr4a3 є однією з основних мішеней, пов'язаних із проліферацією β -клітин, опосередкованою NKX6.1 [44]. Аналогічно, c-Fos – це фактор транскрипції, який регулюється експресією Nkx6.1 у клітинах інсуліноми щурів. Цікаво, що Nr4a1 та Nr4a3 є низхідними мішенями c-Fos. Це означає, що проліферація β -клітин, індукована Nr4a1 та Nr4a3, стимулюється за допомогою Nkx6.1-опосередкованої up-регуляції c-Fos [45]. Крім того, показано, що Nkx6.1 безпосередньо контролює експресію важливих для β -клітин генів процесингу інсуліну, включаючи Glut2, G6pc2, Pcx, Ero11b та Slc30a8. Він також контролює

Огляди

експресію факторів транскрипції, що беруть участь у розвитку β -клітин, включаючи Rfx6, MafA, Mnx1 та трансдуцин-подібний енхансерний білок 3 (transducin-like enhancer protein 3, Tle3). Є дані, що Nkx6.1 контролює регулятори клітинного циклу, цикліни та циклінзалежні кінази; однак нещодавнє дослідження показало, що гени цикліну не регулюються Nkx6.1 [46]. Іншою мішенню, яка асоціюється з опосередкованою NKX6.1 проліферацією β -клітин, є Aurora кіназа A (Aurora Kinase A, AURKA). NKX6.1 зв'язується з промотором AURKA, яка безпосередньо індукується за надекспресії Nkx6.1 у первинних острівцях щурів, що призводить до деградації регулятора клітинного циклу p53. Крім того, було виявлено, що NKX6.1 регулює експресію HNF1 α , який експресується як у гепатоцитах, так і під час розвитку ПШЗ. HNF1 α є ключовим чинником специфікації ПШЗ [43]. Транскрипція регулюється через ТАТА-подібний бокс та проксимальний α -зв'язуючий сайт фактора гепатоцитів. У β -клітинах NKX6.1 є важливим регулятором HNF1 α завдяки його зв'язуванню з промотором HNF1 α . Аналіз мутацій сайту зв'язування показав, що 5'-ТААТ-3' є справжнім сайтом зв'язування NKX6.1, який бере участь в ініціації транскрипції HNF1 α . NKX6.1 активує HNF1 α залежно від концентрації. Надекспресія NKX6.1 у β -клітинах NIT1 призводить до помітного збільшення експресії ендogenous HNF1 α в 3 рази порівняно з контролем, а нокдаун NKX6.1 за допомогою специфічної siРНК зменшує експресію HNF1 α на 80% порівняно з контролем [47].

Мало що відомо про шляхи контролю експресії NKX6.1 під час розвитку β -клітин, особливо в людей. Припускають, що під час розвитку β -клітин ПШЗ NKX6.1 є мішенню PDX1. У PDX1-нульових мишей експресія Nkx6.1 в AURKA епітелії ПШЗ зупиняється. Однак клітини, що експресують Gcg (Glucagon) у дорсальній брунці ПШЗ на ранніх стадіях, все ще демонструють незначну експресію Nkx6.1. Це означає, що продукція Nkx6.1 у цих подвійних позитивних клітинах Gcg+/Nkx6.1+ не залежить від PDX1. На hPSC досліджували сайти зв'язування PDX1 під час розвитку ПШЗ людини, переважно його роль на ранній стадії MPC, яка не експресує NKX6.1 [48]. Однак на первинних дорослих β -клітинах людини показано, що NKX6.1 є одним із сайтів зв'язування PDX1,

що вказує на те, що PDX1 контролює NKX6.1 у β -клітинах людини. Крім того, було показано, що NGN3 опосередковано індукує експресію NKX6.1 шляхом активації PAX4. Було виявлено, що NGN3 зв'язується з регуляторною областю PAX4 для опосередкування його експресії в ендокринних попередниках (EP) [49]. Надекспресія або нокдаун SOX9 у фетальних острівцях людини суттєво впливала на експресію NKX6.1, а згодом і на рівні мРНК інсуліну, що свідчить про важливість SOX9 для експресії NKX6.1 [41].

Nkx2.2

Транскрипційний фактор із сімейства NK2, Nkx2.2, необхідний для розвитку та диференціації ендокринних клітин ПШЗ. Виходячи з ієрархії факторів транскрипції, що спрямовують розвиток ПШЗ, Nkx6.1 є низхідним фактором щодо Nkx2.2 [43] оскільки мутація в Nkx6.1 не призводила до повного блокування диференціації β -клітин, на відміну від ембріонів із мутаціями в Nkx2.2. Це, головним чином, пов'язано з тим, що навіть якщо функція Nkx6.1 порушена, експресія Nkx2.2 зберігається в ПШЗ із мутацією в Nkx6.1 [41]. В іншій роботі показано, що Nkx6.1 безпосередньо регулюється Nkx2.2. Варто відзначити, що в гризунів експресія Nkx2.2 була виявлена в MPC до розвитку ендокринних попередників, тоді як у людей Nkx2.2 не виявлено в MPC фетальної ПШЗ і фактор починає експресуватися після ендокринної індукції [43]. У сукупності ці результати свідчать про видову різницю в експресії та функції NKX6.1 під час розвитку ПШЗ [50].

Nkx2.2 експресується як в α -, так і в β -клітинах. Nkx2.2 регулює експресію aristaless-пов'язаного гомеобоксу (aristaless-related homeobox, ARX) як репресора транскрипції в ендокринних клітинах. Дефіцит Nkx2.2 призводить до серйозної втрати β -клітин і зменшення α - і δ -клітин, а також збільшення ϵ -клітин в ембріоні миші. У β -клітинах Nkx2.2 переважно зв'язується з промотором ARX, стан метилювання якого може впливати на специфічність зв'язування за допомогою модифікацій, індукованих ДНК (цитозин-5)-метилтрансферазою 3A (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A, DNMT3A), що експресується як в α -, так і в β -клітинах. Ідентичність β -клітин підтримується шляхом опосередкованої ДНК-метилюванням репресії

ARX. Nkx2.2 зв'язується з гіперметильованим промотором ARX у комплексі з DNMT3A і рекрутує транскрипційний ко-репресор Tle3 та HDAC1, пригнічуючи ARX у диференційованих β-клітинах. Під час проліферації та регенерації β-клітин регуляторна область ARX підтримується в статусі метилювання, індукованого DNMT1. Метильована область локусу ARX у β-клітинах зв'язується метил-зв'язуючим білком 2 (methyl CpG binding protein 2, MeCP2), який рекрутує гістонову метилтрансферазу (histone methyltransferase, HMT) білкову аргінін метилтрансферазу 6 (protein arginine methyltransferase 6, PRMT6), яка опосередковує метилювання H3R2, що призводить до репресії ARX [50].

Це вказує на те, що переважне рекрутування DNMT3A на промотор ARX залежить від специфічного фактора β-клітин – NKX6.1, що підтверджується зв'язуванням останнього з промотором ARX під час специфікації β-клітин. Nkx6.1 та Isl1 регулюють ARX антагоністично, що необхідно для визначення долі α- та β-клітин, у яких Nkx6.1 зв'язується з консервативним контрольним доменом Re та пригнічує ARX [51].

Pax4

Фактор транскрипції Pax4 – (Paired box 4) – білок, який кодується однойменним геном, розташованим у людей на короткому плечі 7-ї хромосоми. Довжина поліпептидного ланцюга білка становить 350 амінокислот, а молекулярна маса – 37 833. Кодований геном білок за функціями належить до репресорів, білків розвитку. Залучений до таких біологічних процесів, як транскрипція, регуляція транскрипції, диференціація клітин, альтернативний сплайсинг. Білок має сайт для зв'язування з ДНК. Локалізований у ядрі [50].

Це гомеопротейн, який функціонує на початку розвитку клітин острівців, сприяючи диференціації β- та δ-клітин. Pax4 є незамінним фактором транскрипції для генерації, диференціювання, розвитку та виживання β-подібних клітин ПШЗ (pancreatic β-like cells, pβCs). Про це свідчить спостереження, що в мишей із нокаутом Pax4 відсутня ПШЗ і вони гинуть через 1–2 дні після народження. Останні дослідження підкреслюють важливу роль гена Pax4 в стимулюванні формування pβCs з інших типів клітин, включаючи δ- та α-клітини ПШЗ. На основі цих

результатів можна припустити, що ген Pax4 синергетично діє з транскрипційними факторами PDX1, NGN3 і MafA, щоб сприяти розвитку pβCs [52].

ARX і Pax4 – це пара факторів транскрипції, що взаємно репресують один одного. Pax4 сприяє утворенню β- і δ-клітин, тоді як ARX визначає долю α-клітин. Обидва вони діють як транскрипційні репресори, які контролюють рівень експресії іншого, щоб опосередкувати правильний розподіл ендокринних клітин залози. Варто зауважити, що ARX зберігає свою роль у диференціації α-клітин від риб до ссавців, а Pax4 набув своєї суттєвої ролі в диференціації β-клітин досить пізно в еволюції хребетних [53].

ISL1 та Ldb1

ISL1 був виявлений у кількох тканинах і є першим відомим активатором транскрипції ARX в α-клітинах [54]. Результати експериментів показують, що ген ISL1 необхідний для розвитку дорсальної мезенхіми ПШЗ і для утворення та проліферації ендокринних клітин.

LIM домен-зв'язуючий білок 1 (LIM domain-binding protein 1, LDB1) має важливе значення для біологічної активності ISL1 як кофактора [55], що поширюється в ранньому епітелії ПШЗ та навколишній мезенхімі й, нарешті, експресується в зрілих ендокринних та протокових клітинах. Видалення LDB1 в ембріональних ендокринних клітинах призводить до зниженої регуляції експресії ARX [50].

FoxO1

Клітини, що виробляють інсулін (insulin-producing cells, IPC), отримані з ембріональних SC людини (human embryonic stem cells, hESC), мають великий потенціал для клітинної трансплантаційної терапії при ЦД. Було досягнуто величезного прогресу в індукції диференціації hESC в IPC *in vitro*, для чого широко використовується протокол дефінітивної ентодерми, що імітує розвиток ПШЗ плода. Однак незрілість отриманих IPC обмежує їх подальше застосування в лікуванні ЦД. FoxO1 (Forkhead box O1) бере участь у диференціації та функціональній підтримці β-клітин ПШЗ мишей, але його роль у диференціації β-клітин людини ще з'ясовується. Отримані дані засвідчили

Огляди

багатообіцяючий вплив інгібування FoxO1 на профіль експресії генів під час диференціації та, своєю чергою, на дозрівання IPC за допомогою модуляції субклітинної локалізації FoxO1 та PDX1. Визначено нову роль інгібування FoxO1 у сприянні диференціації IPC із hESCs, що може дати ключ для індукції зрілих β -клітин із hESC та клінічного застосування в регенеративній медицині [56]. Водночас, MSC, трансплантовані трансгенним мишам із 50% панкреатектомією, індукували експресію епідермального фактора росту (epidermal growth factor, EGF) і пригнічували прозапальні цитокіни (IFN- γ і TNF- α). FOXA2 і PDX-1 у клітинах-попередниках ПШЗ були активовані через сигнальний шлях Akt/PDX-1/FoxO1 [57].

Родина FoxO еволюційно висококонсервативна і складається в ссавців із чотирьох основних факторів, включаючи FoxO1, FoxO3, FoxO4 та FoxO6. FoxO1 інтенсивно експресується в інсулін-респонсивних тканинах, таких як печінка та ПШЗ, і бере участь у регуляції метаболізму. Нокаут FoxO1 збільшував кількість β -клітин, отриманих із клітин-попередників ПШЗ миші, і сприяв генерації IPC із кишкових ендокринних клітин-попередників [58]. Більш того, інгібування FoxO1 посилювало диференціацію індукованих плюрипотентних SC людини, отриманих з органоїдної культури кишківника, до функціональних IPC та посилювало експресію маркерів β -клітин в IPC, генерованих із зародкових клітин-попередників ПШЗ людини [59] *in vitro*. Крім того, надмірна експресія FoxO1 у клітинах-попередниках ПШЗ миші призводила до гіпоплазії ПШЗ *in vivo*. Крім того, FoxO1 є негативним регулятором PDX1 у дорослих β -клітинах, а PDX1 відіграє ключову регуляторну роль у генерації та дозріванні β -клітин в ембріональному періоді. Виходячи з цих спостережень, висловлено припущення, що FoxO1 може брати участь у негативній регуляції при диференціації hESC на функціональні IPC [56].

SOX2

Ген SOX2, розташований на хромосомі 3p26.3-q27 і кодує білок із 317 амінокислот, що складається з трьох основних доменів: домену HMG на N-кінці, домен димеризації (dimerization domain, DIM) в центрі та домен трансактивації TAD на C-кінці. SOX2 відіграє

ключову роль у підтримці фенотипу ембріональних стовбурових клітин ESC під час ембріогенезу. Першою подією лінеажної специфікації в ембріоні ссавців є диференціація бластоцист на внутрішню клітинну масу (inner cell mass, ICM) та трофектодерму (trophoblast, TE). SOX2 розглядається як найраннійший маркер формування ICM і має вирішальне значення для самовідновлення та диференціації ESC. Подальші дослідження показали, що SOX2 кооперується з іншими дозая-чутливими факторами транскрипції, такими як OCT4 та NANOG, для підтримки стану самовідновлення та пригнічення диференціації ESC шляхом ефективного зв'язування з промотор/енхансерними ділянками та впливу на активацію генів-мішеней [60]. Крім того, SOX2 відіграє важливу роль у розвитку трьох зародкових шарів: ентодерми, ектодерми та мезодерми.

SOX2 регулюється на багатьох рівнях. Ген SOX2 ссавців транскрипційно регулюється кількома різними дистальними енхансерами на різних стадіях розвитку зародка. Два ранніх ідентифікованих енхансери SOX2, регуляторні області SOX (SOX regulatory regions, SRR) 1 і 2, впливають на активність промотора SOX2 і виконують специфічні функції, коли клітини знаходяться в недиференційованому стані. SRR1 демонструє активність у промоторних конструкціях, експресованих в ESC, але делеція SRR1 має мінімальний вплив на плюрипотентність SOX2. SRR2 є ще одним енхансером, розташованим на ~2,5 kb нижче області кодування SOX2. Активуючи експресію SOX2, SRR2 не тільки активний в ESC миші, але й служить біомаркером для виділення iPSC людини. Крім того, інші області SRR, розташовані в нижніх дистальних енхансерах, такі як SRR18, SRR107 і SRR111, напевно, взаємодіють із проксимальними енхансерами, утворюючи велику петлю хроматину для посилення транскрипції SOX2 в ESC [61]. Цікаво, що ектопічна надекспресія SOX2 в ESC інгібує ендогенну експресію SOX2 і є тригером диференціювання клітин, а це свідчить про те, що SOX2 може контролювати свою власну експресію за допомогою петлі негативного зворотного зв'язку. Деякі інші члени сімейства SOX також, ймовірно, позитивно регулюють експресію SOX2. Наприклад, SOX4 в кооперації з OCT4 утворює комплекс з енхансером SOX2 і посилює його експресію, таким чином зберігаючи стовбуровість

клітин. Активація рецептора епідермального фактора росту (epidermal growth factor receptor, EGFR) посилює транслокацію STAT3 в ядро і зв'язування з промотором SOX2, що призводить до збільшення експресії SOX2 і сприяє виживанню клітин та їх самовідновленню [62]. У нейронних стовбурових клітинах дві ізоформи регулятора клітинного циклу транскрипційного фактора E2F3, E2F3a та E2F3b позитивно чи негативно контролюють транскрипцію SOX2 [63].

Експресія SOX2 також негативно регулюється на рівні транскрипції. Наприклад, метилювання промотора SOX2 ДНК-метилтрансферазою DNMT інгібує транскрипцію SOX2, і це гіперметилювання, напевно, є критичною епігенетичною подією, що призводить до мовчання гена SOX2. Крім того, DNMT бере участь у динамічному ДНК-метилюванні SOX2 в регіоні суперенхансерів, що важливо для транскрипційної та клітинної гетерогенності ESC [64]. Експресія псевдокінази Tribble 3 сприяє стовбуровості та прогресуванню раку шляхом активації осі AKT1/FoxO1/SOX2 [65]. Інгібітор циклін-залежних кіназ p21 здатний контролювати експансію соматичних нервових SC шляхом прямого зв'язування з енансером SOX2 і негативною регуляції транскрипції SOX2 [66]. Нещодавно було виявлено, що фактор транскрипції, що містить гомеобокс-2 м'язового сегмента (muscle segment homeobox-2, MSX2) дестабілізує схему плюрипотентності, діючи як репресор транскрипції, який прямо зв'язується з промотором SOX2 та інгібує транскрипцію SOX2, що є важливим для диференціації мезентодерми [67]. Показано також, що SCF FBXW2 є новою E3-лігазою, мішенню якої є MSX2, що веде до його убіквітинування та деградації, активуючи таким чином транскрипцію SOX2 шляхом усунення репресії з боку MSX2 та індукуючи властивості стовбурових клітин.

Зростає список мікроРНК (miR), які регулюють експресію SOX2 на посттранскрипційному рівні. Ендогенна miR-145 пригнічує експресію SOX2, безпосередньо зв'язуючись із некодуючою ділянкою 3'-UTR мРНК SOX2, що погіршує здатність ESC до самовідновлення. Аналогічно, miR-200c інгібує експресію SOX2, безпосередньо контактуючи з консервативним сайтом зв'язування мРНК SOX2 на 3'-UTR-кінці, що призводить до порушення регуляції клітинного циклу та диференціації нейронів.

Було показано, що MiR-625 інгібує трансляцію SOX2, зв'язуючись із 3'-UTR-сайтом, суттєво пригнічуючи ріст і міграцію клітин. Крім того, miR-9, miR-30a, miR-140, miR-145 і miR-126 діють як супресори пухлини та негативно регулюють експресію SOX2 [60, 68].

На додаток до перехресних взаємодій SOX2 з мікроРНК, існує також перехресна регуляція між SOX2 та довгими некодуючими РНК (lncRNA), класом РНК, що не кодують білки, із послідовністю більш ніж 200 нуклеотидів. Структурно, SOX2 безпосередньо взаємодіє з lncRNAs із високою афінністю через свій HMG ДНК-зв'язуючий домен [69]. Цікаво, що функціональний ген SOX2 вбудований у третій інтрон довгого мульти-екзонного некодуючого РНК гена, який відомий як транскрипт, що перекриває SOX2 (SOX2OT). SOX2 та SOX2OT коекспресуються в ESC і обидва транскрибуються в однаковій орієнтації. Tc11 нейрон-асоційована lncRNA (TUNA), важлива для плюрипотенції, активує експресію SOX2 шляхом рекрутування трьох РНК-зв'язуючих білків, PTBP1, hnRNP-K та NCL до промотора SOX2, що є критичним для диференціації нейронних ESC та стовбуровості клітин [70].

Посттрансляційна модифікація SOX2 шляхом фосфорилювання, SUMOїлювання, метилювання, ацетилювання, полі(АДФ)-рибозилування (PARPіляція), О-глікозилування та убіквітинування – це ще один тип регуляторних механізмів, який, головним чином, впливає на активність SOX2. Фосфорилювання – найпоширеніший тип посттрансляційної модифікації SOX2. Відомо, що кілька залишків серину та треоніну SOX2 фосфорилюються в культивованих клітинах. Зокрема, CDK1, напевно, фосфорилює SOX2 по S249-S250-S251, що потрібно для ядерної локалізації SOX2 та його транскрипційної активності та сприяння виживанню клітин [71]. CDK2 безпосередньо фосфорилює SOX2 по S39 та S253, що підсилює опосередковану SOX2 плюрипотентність під час депрограмування. АКТ фосфорилює SOX2 по T116, що захищає SOX2 від деградації, опосередкованої убіквітином [72]. Фосфорилювання SOX2 по залишку T118 протеїнкіназою С (PKC-β) пов'язано з його транскрипційною активністю. Про це свідчить спостереження, що транскрипційна активність виявляється або в клітинах дикого типу, або у фосфо-мімічних (phospho-mimic) мутантах

Огляди

SOX2 (SOX2-T118D), але не у фосфо-мертвих (phospho-dead) мутантах SOX2 (T118A). Можливо фосфорилування SOX2 по сериновому триплету S249-S250-S251 пригнічує активність SOX2 шляхом регулювання SUMOїлювання – іншого типу посттрансляційної модифікації [60].

Відомо, що SOX2 людини та миші SUMOїлюються відповідно по K245 або K247, що призводить до зниження активності SOX2 і викликає диференціацію ESC. Зокрема, SUMOїлювання SOX2 по K245 може бути скасовано в триплетному мутанті SOX2 (S249A-S250A-S251A). Можна припустити, що фосфорилування триплету служить початковим етапом для наступного SUMOїлювання SOX2. Пізніше було підтверджено, що фосфорилування сайту S251 SOX2 ERK1/2 може сприяти SUMOїлюванню SOX2 [60].

SOX2 також контролюється ацетилюванням. Так, ацетилтрансфераза p300/CBP, яка ацетилює SOX2 на залишку K75, може змінити його ядерну локалізацію. Ацетилювання SOX2 не тільки важливо для функцій ESC, але й сприяє перепрограмуванню соматичних клітин до iPSC, коли підтримується на низькому рівні деацетилазою Sirtuin 1 [73].

Крім того, SOX2 піддається модифікації полі(АДФ-рибоза)-полімеразою-1 (poly(ADP-ribose)-polymerase 1, PARP1). PARPїлювання SOX2 є важливим для дисоціації надмірного SOX2 від енхансера FGF4, що є важливим для регулювання диференціації ESC [74].

Було також показано, що SOX2 глікозилюється O-GlcNAc трансферазою (O-GlcNAc transferase, OGT) по залишках Ser246/248. O-глікозилювання SOX2 інгібує взаємодію SOX2-PARP1 і зменшує ефективність перепрограмування в мишачих ESC та iPSC. Крім того, O-глікозилювання SOX2 за допомогою OGT стабілізує SOX2, сприяючи, таким чином, самовідновленню ракових клітин ПШЗ [75].

Нарешті, посттрансляційна модифікація, яка контролює точний рівень білка SOX2, відбувається через убіквітінування та подальшу деградацію в протеасомах або шляхом автофагії [76].

Список використаної літератури

- Conacci-Sorrell M, McFerrin L, Eisenman RN. An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Jan 1;4(1):a014357. doi: 10.1101/cshperspect.a014357.
- Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell.* 2012 Mar 30;149(1):22-35. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.003.
- Dang CV. MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Aug 1;3(8):a014217. doi: 10.1101/cshperspect.a014217.
- Balzano F, Garroni G, Cruciani S, Bellu E, Dei Giudici S, Oggiano A, et al. Behavioral Changes in Stem-Cell Potency by HepG2-Exhausted Medium. *Cells.* 2020 Aug 12;9(8):1890. doi: 10.3390/cells9081890.
- Korc M. Beyond Kras: MYC Rules in Pancreatic Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2018 May 26;6(2):223-224. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.04.009.
- Puri S, Roy N, Russ HA, Leonhardt L, French EK, Roy R, et al. Replication confers β cell immaturity. *Nat Commun.* 2018 Feb 2;9(1):485. doi: 10.1038/s41467-018-02939-0.
- Rosselot C, Baumel-Alterzon S, Li Y, Brill G, Lambertini L, Katz LS, et al. The many lives of Myc in the pancreatic β -cell. *J Biol Chem.* 2021 Jan-Jun;296:100122. doi: 10.1074/jbc.REV120.011149.
- Rosselot C, Kumar A, Lakshminpathi J, Zhang P, Lu G, Katz LS, et al. Myc Is Required for Adaptive β -Cell Replication in Young Mice but Is Not Sufficient in One-Year-Old Mice Fed With a High-Fat Diet. *Diabetes.* 2019 Oct;68(10):1934-1949. doi: 10.2337/db18-1368.
- Wolf E, Eilers M. Targeting MYC proteins for tumor therapy. *Annu Rev Cancer Biol.* 2020 Mar;4:61-75. doi: 10.1146/annurev-cancerbio-030518-055826.
- Melnik S, Werth N, Boeuf S, Hahn EM, Gotterbarm T, Anton M, et al. Impact of c-MYC expression on proliferation, differentiation, and risk of neoplastic transformation of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Mar 5;10(1):73. doi: 10.1186/s13287-019-1187-z.
- García-Gutiérrez L, Delgado MD, León J. MYC Oncogene Contributions to Release of Cell Cycle Brakes. *Genes (Basel).* 2019 Mar 22;10(3):244. doi: 10.3390/genes10030244.
- Fagnocchi L, Cherubini A, Hatsuda H, Fasciani A, Mazzoleni S, Poli V, et al. A Myc-driven self-reinforcing regulatory network maintains mouse embryonic stem cell identity. *Nat Commun.* 2016 Jun 15;7:11903. doi: 10.1038/ncomms11903.
- Klauber-DeMore N, Schulte BA, Wang GY. Targeting MYC for triple-negative breast cancer treatment. *Oncoscience.* 2018 Jun 23;5(5-6):120-121. doi: 10.18632/oncoscience.414.
- Ohanian M, Rozovski U, Kanagal-Shamanna R, Abruzzo LV, Loghavi S, Kadia T, et al. MYC protein expression is an important prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2019 Jan;60(1):37-48. doi: 10.1080/10428194.2018.1464158.
- McMahon SB. MYC and the control of apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Jul 1;4(7):a014407. doi: 10.1101/cshperspect.a014407.
- Goetzman ES, Prochownik EV. The Role for Myc in Coordinating Glycolysis, Oxidative Phosphorylation, Glutaminolysis, and Fatty Acid Metabolism in Normal and Neoplastic Tissues. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Apr 12;9:129. doi: 10.3389/fendo.2018.00129.
- Marengo B, Garbarino O, Speciale A, Monteleone L, Traverso N, Domenicotti C. MYC Expression and Metabolic Redox Changes in Cancer Cells: A Synergy Able to Induce Chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Jun 25;2019:7346492. doi: 10.1155/2019/7346492.
- Zhang P, Kumar A, Katz LS, Li L, Paulynice M, Herman MA, et al. Induction of the ChREBP β Isoform Is Essential for Glucose-Stimulated β -Cell Proliferation. *Diabetes.* 2015 Dec;64(12):4158-70. doi: 10.2337/db15-0239.
- Zhang P, Metukuri MR, Bindom SM, Prochownik EV, O'Doherty RM, Scott DK. c-Myc is required for the ChREBP-dependent activation of glucose-responsive genes. *Mol Endocrinol.* 2010 Jun;24(6):1274-86. doi: 10.1210/me.2009-0437.
- Kalkat M, Resetca D, Lourenco C, Chan PK, Wei Y, Shiah YJ, et al. MYC Protein Interactome Profiling Reveals Functionally Distinct Regions that Cooperate to Drive Tumorigenesis. *Mol Cell.* 2018 Dec 6;72(5):836-848.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2018.09.031.
- Leppek K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Mar;19(3):158-174. doi: 10.1038/nrm.2017.103.

22. Carabet LA, Rennie PS, Cherkasov A. Therapeutic Inhibition of Myc in Cancer. Structural Bases and Computer-Aided Drug Discovery Approaches. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 29;20(1):120. doi: 10.3390/ijms20010120.
23. Tseng YY, Bagchi A. The PVT1-MYC duet in cancer. *Mol Cell Oncol*. 2015 Feb 11;2(2):e974467. doi: 10.4161/23723556.2014.974467.
24. Cho SW, Xu J, Sun R, Mumbach MR, Carter AC, Chen YG, et al. Promoter of lncRNA Gene PVT1 Is a Tumor-Suppressor DNA Boundary Element. *Cell*. 2018 May 31;173(6):1398-1412.e22. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.068.
25. Zarrabi AJ, Kao D, Nguyen DT, Loscalzo J, Handy DE. Hypoxia-induced suppression of c-Myc by HIF-2 α in human pulmonary endothelial cells attenuates TFAM expression. *Cell Signal*. 2017 Oct;38:230-237. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.07.008.
26. Lam EW, Brosens JJ, Gomes AR, Koo CY. Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nat Rev Cancer*. 2013 Jul;13(7):482-95. doi: 10.1038/nrc3539.
27. Li J, Dantas Machado AC, Guo M, Sagendorf JM, Zhou Z, Jiang L, et al. Structure of the Forkhead Domain of FOXA2 Bound to a Complete DNA Consensus Site. *Biochemistry*. 2017 Jul 25;56(29):3745-3753. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00211.
28. Vorvis C, Hatzia Apostolou M, Mahurkar-Joshi S, Koutsoumpa M, Williams J, Donahue TR, et al. Transcriptomic and CRISPR/Cas9 technologies reveal FOXA2 as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016 Jun 1;310(11):G1124-37. doi: 10.1152/ajpgi.00035.2016.
29. Chen X, Ji Z, Webber A, Sharrocks AD. Genome-wide binding studies reveal DNA binding specificity mechanisms and functional interplay amongst Forkhead transcription factors. *Nucleic Acids Res*. 2016 Feb 29;44(4):1566-78. doi: 10.1093/nar/gkv1120.
30. Schöne S, Jurk M, Helabad MB, Dror I, Lebars I, Kieffer B, et al. Sequences flanking the core-binding site modulate glucocorticoid receptor structure and activity. *Nat Commun*. 2016 Sep 1;7:12621. doi: 10.1038/ncomms12621.
31. Yang L, Orenstein Y, Jolma A, Yin Y, Taipale J, Shamir R, et al. Transcription factor family-specific DNA shape readout revealed by quantitative specificity models. *Mol Syst Biol*. 2017 Feb 6;13(2):910. doi: 10.15252/msb.20167238.
32. Levitsky VG, Kulakovskiy IV, Ershov NI, Oshchepkov DY, Makeev VJ, Hodgman TC, et al. Application of experimentally verified transcription factor binding sites models for computational analysis of ChIP-Seq data. *BMC Genomics*. 2014 Jan 29;15(1):80. doi: 10.1186/1471-2164-15-80.
33. Veerapandian V, Ackermann JO, Srivastava Y, Malik V, Weng M, Yang X, Jauch R. Directed Evolution of Reprogramming Factors by Cell Selection and Sequencing. *Stem Cell Reports*. 2018 Aug 14;11(2):593-606. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.07.002.
34. Tan DS, Holzner M, Weng M, Srivastava Y, Jauch R. SOX17 in cellular reprogramming and cancer. *Semin Cancer Biol*. 2020 Dec;67(Pt 1):65-73. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.08.008.
35. Niskan KK, JiH, Maehr R, Vokes SA, Rodolfa KT, Sherwood RI, et al. Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. *Genes Dev*. 2010 Feb 1;24(3):312-26. doi: 10.1101/gad.1833510.
36. Sybirna A, Wong FCK, Surani MA. Genetic basis for primordial germ cells specification in mouse and human: Conserved and divergent roles of PRDM and SOX transcription factors. *Curr Top Dev Biol*. 2019;135:35-89. doi: 10.1016/bs.ctdb.2019.04.004.
37. Klaus M, Prokoph N, Girbig M, Wang X, Huang YH, Srivastava Y, et al. Structure and decoy-mediated inhibition of the SOX18/Prox1-DNA interaction. *Nucleic Acids Res*. 2016 May 5;44(8):3922-35. doi: 10.1093/nar/gkw130.
38. Hou L, Srivastava Y, Jauch R. Molecular basis for the genome engagement by Sox proteins. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Mar;63:2-12. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.08.005.
39. Haseeb A, Lefebvre V. The SOXE transcription factors-SOX8, SOX9 and SOX10-share a bi-partite transactivation mechanism. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 26;47(13):6917-6931. doi: 10.1093/nar/gkz523.
40. Alonso-Martin S, Auradé F, Mademtoglou D, Rochat A, Zambit PS, Relaix F. SOXF factors regulate murine satellite cell self-renewal and function through inhibition of β -catenin activity. *Elife*. 2018 Jun 8;7:e26039. doi: 10.7554/eLife.26039.
41. Aigha II, Abdelalim EM. NKX6.1 transcription factor: a crucial regulator of pancreatic β cell development, identity, and proliferation. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):459. doi: 10.1186/s13287-020-01977-0.
42. Memon B, Abdelalim EM. Stem Cell Therapy for Diabetes: Beta Cells versus Pancreatic Progenitors. *Cells*. 2020 Jan 23;9(2):283. doi: 10.3390/cells9020283.
43. Al-Khawaga S, Memon B, Butler AE, Taheri S, Abou-Samra AB, Abdelalim EM. Pathways governing development of stem cell-derived pancreatic β cells: lessons from embryogenesis. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2018 Feb;93(1):364-389. doi: 10.1111/brv.12349.
44. Tessem JS, Moss LG, Chao LC, Arlotto M, Lu D, Jensen MV, et al. Nkx6.1 regulates islet β -cell proliferation via Nr4a1 and Nr4a3 nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 8;111(14):5242-7. doi: 10.1073/pnas.1320953111.
45. Ray JD, Kener KB, Bitner BF, Wright BJ, Ballard MS, Barrett EJ, et al. Nkx6.1-mediated insulin secretion and β -cell proliferation is dependent on upregulation of c-Fos. *FEBS Lett*. 2016 Jun;590(12):1791-803. doi: 10.1002/1873-3468.12208.
46. Taylor BL, Liu FF, Sander M. Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells. *Cell Rep*. 2013 Sep 26;4(6):1262-75. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.010.
47. Donelan W, Koya V, Li SW, Yang LJ. Distinct regulation of hepatic nuclear factor 1alpha by NKX6.1 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*. 2010 Apr 16;285(16):12181-9. doi: 10.1074/jbc.M109.064238.
48. Wang X, Sterr M, Burtscher I, Chen S, Hieronimus A, Machicao F, et al. Genome-wide analysis of PDX1 target genes in human pancreatic progenitors. *Mol Metab*. 2018 Mar;9:57-68. doi: 10.1016/j.molmet.2018.01.011.
49. Petersen MBK, Azad A, Ingvorsen C, Hess K, Hansson M, Grapin-Botton A, et al. Single-Cell Gene Expression Analysis of a Human ESC Model of Pancreatic Endocrine Development Reveals Different Paths to β -Cell Differentiation. *Stem Cell Reports*. 2017 Oct 10;9(4):1246-1261. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.08.009.
50. Xu S, Xu JP. Present status and expectation of aristaless-related homeobox (ARX) in endocrine pancreas. *Int J Dev Biol*. 2019;63(11-12):579-587. doi: 10.1387/ijdb.190242sx.
51. Schaffer AE, Taylor BL, Benthuyzen JR, Liu J, Thorel F, Yuan W, et al. Nkx6.1 controls a gene regulatory network required for establishing and maintaining pancreatic Beta cell identity. *PLoS Genet*. 2013;9(1):e1003274. doi: 10.1371/journal.pgen.1003274.
52. Zhang T, Wang H, Wang T, Wei C, Jiang H, Jiang S, et al. Pax4 synergistically acts with Pdx1, Ngn3 and MafA to induce HuMSCs to differentiate into functional pancreatic β -cells. *Exp Ther Med*. 2019 Oct;18(4):2592-2598. doi: 10.3892/etm.2019.7854.
53. Djiotsa J, Verbruggen V, Giacomotto J, Ishibashi M, Manning E, Rinkwitz S, et al. Pax4 is not essential for beta-cell differentiation in zebrafish embryos but modulates alpha-cell generation by repressing arx gene expression. *BMC Dev Biol*. 2012 Dec 17;12:37. doi: 10.1186/1471-213X-12-37.
54. Zhuang S, Zhang Q, Zhuang T, Evans SM, Liang X, Sun Y. Expression of Isl1 during mouse development. *Gene Expr Patterns*. 2013 Dec;13(8):407-12. doi: 10.1016/j.gep.2013.07.001.
55. Makarev E, Gorivodsky M. Islet1 and its co-factor Ldb1 are expressed in quiescent cells of mouse intestinal epithelium. *PLoS One*. 2014 Apr 22;9(4):e95256. doi: 10.1371/journal.pone.0095256.
56. Yu F, Wei R, Yang J, Liu J, Yang K, Wang H, et al. FoxO1 inhibition promotes differentiation of human embryonic stem cells into insulin producing cells. *Exp Cell Res*. 2018 Jan 1;362(1):227-234. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.11.022.
57. Khatri R, Mazurek S, Petry SF, Linn T. Mesenchymal stem cells promote pancreatic β -cell regeneration through downregulation of FoxO1 pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Nov 25;11(1):497. doi: 10.1186/s13287-020-02007-9.
58. Talchai SC, Accili D. Legacy Effect of Foxo1 in Pancreatic Endocrine Progenitors on Adult β -Cell Mass and Function. *Diabetes*. 2015 Aug;64(8):2868-79. doi: 10.2337/db14-1696.

Огляди

59. Jiang Z, Tian J, Zhang W, Yan H, Liu L, Huang Z, Lou J, Ma X. Forkhead Protein FoxO1 Acts as a Repressor to Inhibit Cell Differentiation in Human Fetal Pancreatic Progenitor Cells. *J Diabetes Res.* 2017;2017:6726901. doi: 10.1155/2017/6726901.
60. Zhang S, Xiong X, Sun Y. Functional characterization of SOX2 as an anticancer target. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Jul 29;5(1):135. doi: 10.1038/s41392-020-00242-3.
61. Zhou HY, Katsman Y, Dhaliwal NK, Davidson S, Macpherson NN, Sakthidevi M, et al. A Sox2 distal enhancer cluster regulates embryonic stem cell differentiation potential. *Genes Dev.* 2014 Dec 15;28(24):2699-711. doi: 10.1101/gad.248526.114.
62. Pietrobono S, Morandi A, Gagliardi S, Gerlini G, Borgognoni L, Chiarugi P, et al. Down-Regulation of SOX2 Underlies the Inhibitory Effects of the Triphenylmethane Gentian Violet on Melanoma Cell Self-Renewal and Survival. *J Invest Dermatol.* 2016 Oct;136(10):2059-2069. doi: 10.1016/j.jid.2016.06.610.
63. Julian LM, Vandenbosch R, Pakenham CA, Andrusiak MG, Nguyen AP, McClellan KA, et al. Opposing regulation of Sox2 by cell-cycle effectors E2f3a and E2f3b in neural stem cells. *Cell Stem Cell.* 2013 Apr 4;12(4):440-52. doi: 10.1016/j.stem.2013.02.001.
64. Song Y, van den Berg PR, Markoulaki S, Soldner F, Dall'Agnese A, Henninger JE, et al. Dynamic Enhancer DNA Methylation as Basis for Transcriptional and Cellular Heterogeneity of ESCs. *Mol Cell.* 2019 Sep 5;75(5):905-920.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.045.
65. Yu JM, Sun W, Wang ZH, Liang X, Hua F, Li K, et al. TRIB3 supports breast cancer stemness by suppressing FOXO1 degradation and enhancing SOX2 transcription. *Nat Commun.* 2019 Dec 16;10(1):5720. doi: 10.1038/s41467-019-13700-6.
66. Marqués-Torrejón MÁ, Porlan E, Banito A, Gómez-Ibarlucea E, Lopez-Contreras AJ, Fernández-Capetillo O, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression. *Cell Stem Cell.* 2013 Jan 3;12(1):88-100. doi: 10.1016/j.stem.2012.12.001.
67. Wu Q, Zhang L, Su P, Lei X, Liu X, Wang H, et al. MSX2 mediates entry of human pluripotent stem cells into mesoderm by simultaneously suppressing SOX2 and activating NODAL signaling. *Cell Res.* 2015 Dec;25(12):1314-32. doi: 10.1038/cr.2015.118.
68. Luo W, Yan D, Song Z, Zhu X, Liu X, Li X, et al. miR-126-3p sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by inactivating Wnt/ β -catenin signaling via targeting SOX2. *Life Sci.* 2019 Jun 1;226:98-106. doi: 10.1016/j.lfs.2019.04.023.
69. Holmes ZE, Hamilton DJ, Hwang T, Parsonnet NV, Rinn JL, Wuttke DS, et al. The Sox2 transcription factor binds RNA. *Nat Commun.* 2020 Apr 14;11(1):1805. doi: 10.1038/s41467-020-15571-8.
70. Lin N, Chang KY, Li Z, Gates K, Rana ZA, Dang J, et al. An evolutionarily conserved long noncoding RNA TUNA controls pluripotency and neural lineage commitment. *Mol Cell.* 2014 Mar 20;53(6):1005-19. doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.021.
71. Ravindran Menon D, Luo Y, Arcaroli JJ, Liu S, KrishnanKutty LN, Osborne DG, et al. CDK1 Interacts with Sox2 and Promotes Tumor Initiation in Human Melanoma. *Cancer Res.* 2018 Dec 1;78(23):6561-6574. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0330.
72. Wang Z, Kang L, Zhang H, Huang Y, Fang L, Li M, et al. AKT drives SOX2 overexpression and cancer cell stemness in esophageal cancer by protecting SOX2 from UBR5-mediated degradation. *Oncogene.* 2019 Jun;38(26):5250-5264. doi: 10.1038/s41388-019-0790-x.
73. Mu WL, Wang YJ, Xu P, Hao DL, Liu XZ, Wang TT, et al. Sox2 Deacetylation by Sirt1 Is Involved in Mouse Somatic Reprogramming. *Stem Cells.* 2015 Jul;33(7):2135-47. doi: 10.1002/stem.2012.
74. Gao F, Kwon SW, Zhao Y, Jin Y. PARP1 poly(ADP-ribosyl)ates Sox2 to control Sox2 protein levels and FGF4 expression during embryonic stem cell differentiation. *J Biol Chem.* 2009 Aug 14;284(33):22263-22273. doi: 10.1074/jbc.M109.033118.
75. Sharma NS, Gupta VK, Dauer P, Kesh K, Hadad R, Giri B, et al. O-GlcNAc modification of Sox2 regulates self-renewal in pancreatic cancer by promoting its stability. *Theranostics.* 2019 May 24;9(12):3410-3424. doi: 10.7150/thno.32615.
76. Cho YH, Han KM, Kim D, Lee J, Lee SH, Choi KW, et al. Autophagy regulates homeostasis of pluripotency-associated proteins in hESCs. *Stem Cells.* 2014 Feb;32(2):424-35. doi: 10.1002/stem.1589.

Список скорочень

Е-бокс – енансер-бокс (enhancer box)
ПШЗ – підшлункова залоза
ЦД – цукровий діабет
ARX – aristaless-related homeobox (aristaless-пов'язаний гомеобокс)
VID – binding interference domain (домен, що перешкоджає зв'язуванню)
ChREBP – carbohydrate response element binding protein (зв'язуючий білок елементів відповіді вуглеводів)
ESC – embryonic stem cells (ембріональні стовбурові клітини)
FOX – Forehead box (Forkhead бокс)
HMG-box – high mobility group box (високомобільної групи)
HNF – hepatocyte nuclear factor (ядерний фактор гепатоцитів)
ІРС – insulin-producing cells (клітини, що виробляють інсулін)
iPSC – induced pluripotent stem cells (індуковані плюрипотентні стовбурові клітини)
ISL1 – insulin gene enhancer protein 1 (білок-енхансер гену інсуліну 1)
МРС – multipotent progenitor cells (мультипотентні клітини-попередники)
NEUROG3 – neurogenin 3 (нейрогенін 3)
NKX6.1 – NK6 homeobox 1 (NK6 гомеобокс 1)
Nr4a1 – ядерний рецептор 4A1 (nuclear receptor 4A1)
ОСТ – octamer-binding transcription factor (октамер-зв'язуючий транскрипційний фактор)
PAX – paired box gene (білок парного боксу)
PDX1 – pancreatic and duodenal homeobox 1 (гомеобокс підшлункової залози та дванадцятипалої кишки 1)
PSC – pluripotent stem cells (плюрипотентні стовбурові клітини)
SC – stem cells (стовбурові клітини)
SOX – sex-determining region Y-box (Y-бокс області, що визначає стать)
SRR – SOX regulatory regions (регуляторні області SOX)
TCF – T cell factor (Т-клітинний фактор)
WNT – wingless-related integration site (сайт інтеграції, пов'язаний з wingless)

Main transcription factors involved in the functioning of stem cells. Characteristics of their activation and expression in the pancreatic β -cells (part 2)

M.D. Tronko, V.M. Pushkarev, O.I. Kovzun, L.K. Sokolova, V.V. Pushkarev

State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

Abstract. Cell transplantation is the most promising and physiological approach to the treatment of endocrine gland dysfunction. The obtained data indicate the effectiveness of the use of stem cells (SCs) for the treatment of a number of endocrine diseases and, first of all, type 1 diabetes. SCs are cells with clonogenic potential that can self-repair and differentiate into various cell types. They are responsible for the regeneration and development of organs and tissues. SCs offer many opportunities for regenerative medicine and serve as a promising

model system for studying the early stages of human embryonic development. Numerous molecular mechanisms underlying SC self-repair and differentiation have been elucidated. The main signaling pathways involved in SCs are JAK/STAT, Notch, MAPK/ERK, PI3K/Akt, NF- κ B, Wnt, Hedgehog, TGF- β , and Hippo, which exert their effects through numerous, specific for each pathway transcription factors. Analysis of their status and sequence of activation, suppression and interaction is extremely important in the context of SC functioning. A breakthrough in the generation of pluripotent cells from somatic cells was achieved due to the overexpression of specific transcription factors. Both embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells are distinguished by their ability to proliferate in an undifferentiated state and differentiate into any cell type in the human body, which reflects their enormous therapeutic potential. The development of protocols for differentiating pluripotent cells to insulin-producing β -cells requires a clear understanding of the involvement and cross- interaction of a number of cell signaling systems and their transcription factors dependent on them. In the protocols for the development of β -cells from pluripotent cells, six stages were established using specific inducing factors. To assess the progress and effectiveness of differentiation, specific markers are used.

Keywords: stem cells, signaling pathways, transcription factors.

Для цитування: Тронько МД, Пушкар'єв ВМ, Ковзун ОІ, Соколова ЛК, Пушкар'єв ВВ. Основні транскрипційні фактори, які беруть участь у функціонуванні стовбурових клітин. Особливості їх активації та експресії в β -клітинах підшлункової залози (частина 2). *Ендокринологія*. 2023;28(3):237-253. DOI: 10.31793/1680-1466.2023.28-3.237.

Адреса для листування: Пушкар'єв Володимир Михайлович; pushkarev.vm@gmail.com; ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, Київ 04114, Україна.

Відомості про авторів: Тронько Микола Дмитрович, д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН України, акад. НАМН України, завідувач відділу фундаментальних і прикладних проблем ендокринології, директор Інституту, ORCID: 0000-0001-7421-0981; Пушкар'єв Володимир Михайлович, д-р біол. наук, старш. наук. співроб., головний науковий співробітник відділу фундаментальних і прикладних проблем ендокринології, ORCID: 0000-0003-0347-7771; Ковзун Олена Ігорівна, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАМН України, заступник директора Інституту з наукових питань, ORCID: 0000-0001-8164-7671; Соколова Любов Костянтинівна, д-р мед. наук, старший науковий співробітник, завідувачка відділу діабетології, ORCID: 0000-0003-0011-0106; Пушкар'єв Віктор Володимирович, канд. біол. наук, старший науковий співробітник

відділу фундаментальних і прикладних проблем ендокринології, ORCID: 0000-0001-5940-5510.

Особистий внесок: Тронько М.Д. – ідея роботи й консультації під час редагування статті; Пушкар'єв В.М., Ковзун О.І. і Соколова Л.К. – аналіз літератури та редагування тексту; Пушкар'єв В.В. – оформлення статті та переклад.

Фінансування: стаття підготовлена в рамках бюджетного фінансування Національної академії медичних наук України.

Декларація з етики: автори задекларували відсутність конфлікту інтересів і фінансових зобов'язань.

Стаття: надійшла до редакції 30.03.2023 р.; перероблена 03.08.2023 р.; прийнята до друку 15.09.2023 р.; надрукована 30.09.2023 р.

For citation: Tronko MD, Pushkarev VM, Kovzun OI, Sokolova LK, Pushkarev VV. Main transcription factors involved in the functioning of stem cells. Characteristics of their activation and expression in the pancreatic β -cells (part 2). *Endokrynologia*. 2023;28(3):237-253. DOI: 10.31793/1680-1466.2023.28-3.237.

Address for correspondence: Pushkarev Volodymyr Mykhaylovych; pushkarev.vm@gmail.com; State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the NAMS of Ukraine», 69, Vyshgorodska Str., Kyiv 04114, Ukraine.

Information about the authors: Tronko Mykola Dmytrovych, Dr. Sci. (Medicine), Cor. Member of the NAS of Ukraine, Acad. of the NAMS of Ukraine, Head of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology, Director of the Institute, ORCID: 0000-0001-7421-0981; Pushkarev Volodymyr Mykhaylovych, Dr. Sci. (Biology), Senior Research Fellow, Chief Researcher of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology, ORCID: 0000-0003-0347-7771; Kovzun Olena Ihorivna, Dr. Sci. (Biology), Prof., Cor. Member of the NAMS of Ukraine, Deputy Director of the Institute for Scientific Affairs, ORCID: 0000-0001-8164-7671; Sokolova Lyubov Kostyantynivna, Doctor of Medical Sciences, Senior Research Fellow, Head of Diabetology Department, ORCID: 0000-0003-0011-0106; Pushkarev Viktor Volodymyrovych, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology, ORCID: 0000-0001-5940-5510.

Personal contribution: Tronko M.D. – the idea of work and advice when editing an article; Kovzun O.I., Sokolova L.K. and Pushkarev V.M. – analysis of literature sources and text writing, and editing; Pushkarev V.V. – article design and translation.

Funding: the article was prepared within the budget funding of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine.

Declaration of ethics: the authors declared the absence of a conflict of interest and financial obligations.

Article: received March 30, 2023; revised August 03, 2023; accepted September 15, 2023; published September 30, 2023.