

Лекция 7

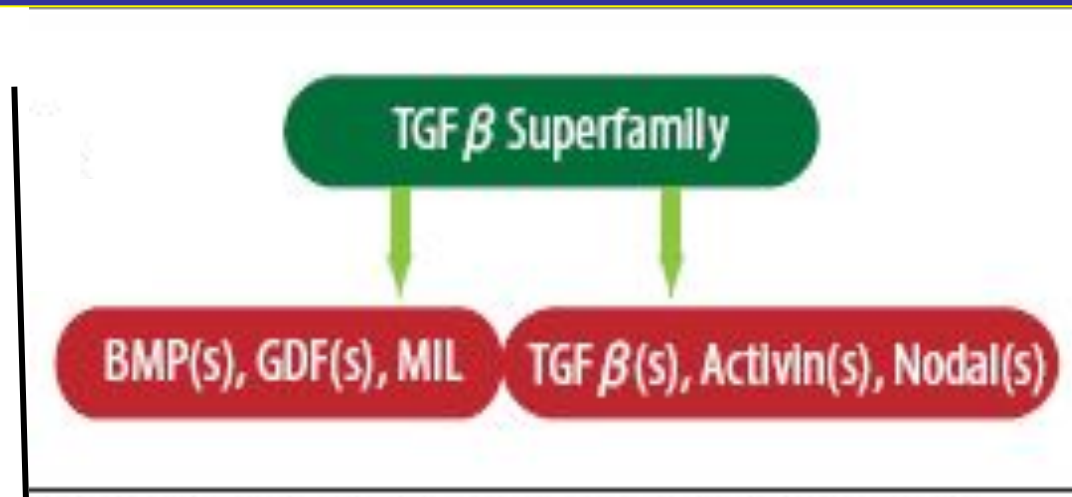
Классификация семейств нейротрофических факторов

НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ



Суперсемейство факторов роста опухолей бета

(40 членов)



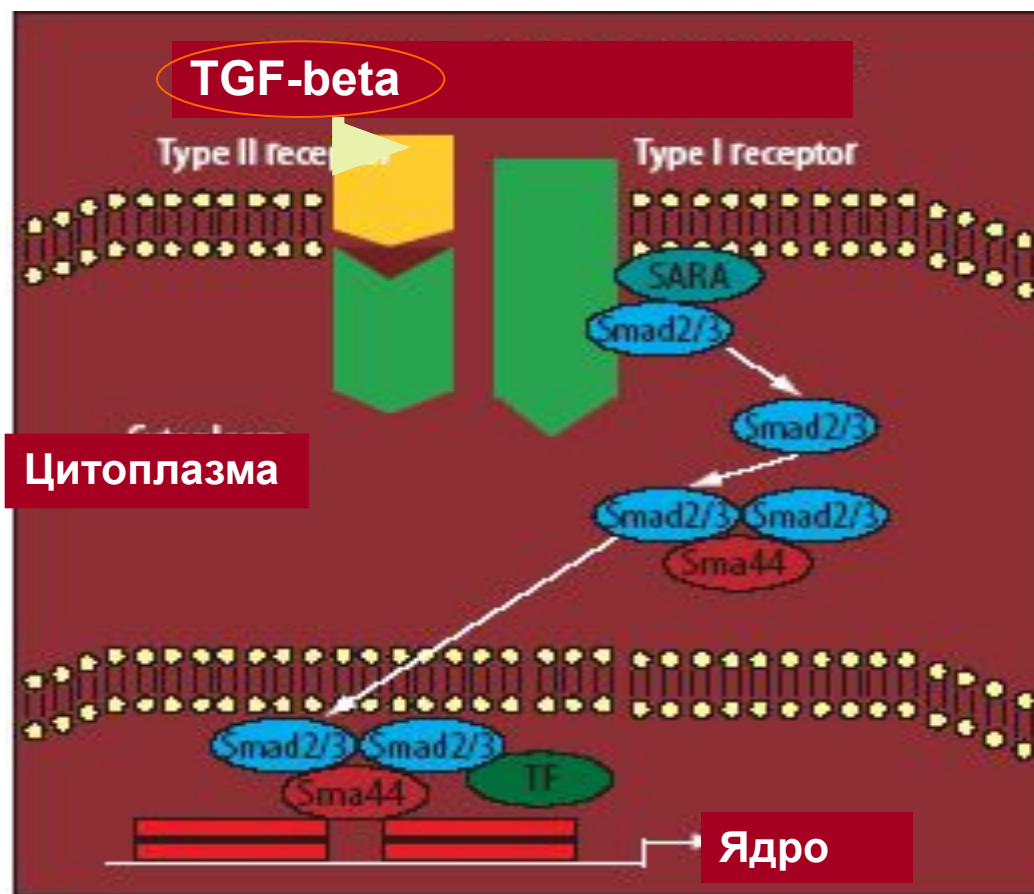
2 субсемейства: Факторы, продуцируемые костным мозгом (BMP), активины, факторы роста и дифференцировки (GDF) и др.

Основная изоформа: секретируемый клетками иммунной системы **TGF-β1**.

Рецепторы для TGF-beta – широко распространены в разных типах клеток.

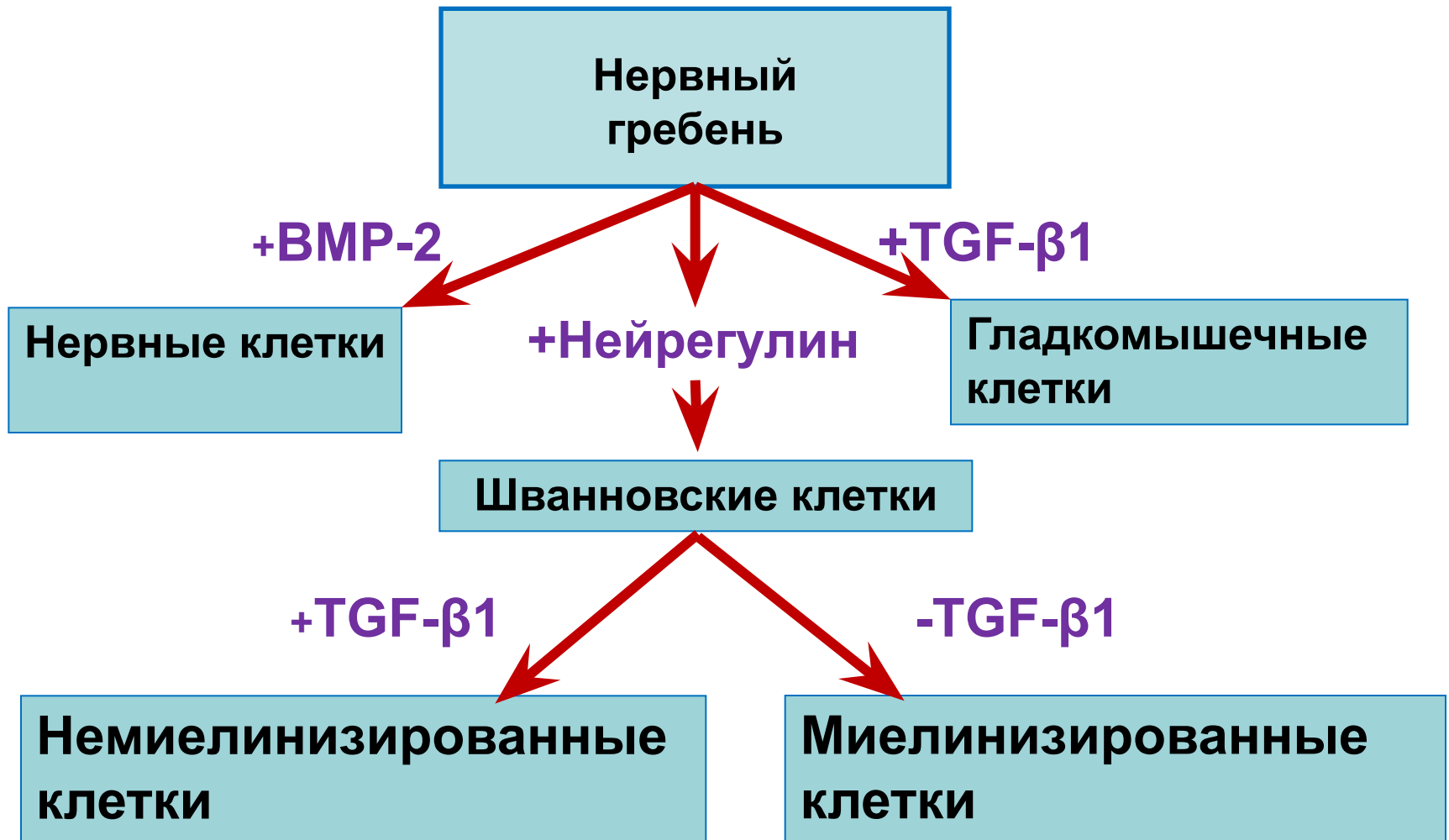
Плейотропный цитокин: ингибирует и стимулирует пролиферацию и клеточную дифференцировку, участвует в эмбриональном развитии, апоптозе, регуляции клеточного цикла, развитии гуморального ответа, подавлении гемопоэза, усилении синтеза белков межклеточного матрикса, оказывает анаболическое действие.

Сигнальный путь факторов семейства TGF-beta



Передача сигнала от TGF- β : к рецепторам типа II, их олигомеризация с рецепторами типа I и фосфорилирование Smad

Молекулярные механизмы дифференцировки клеток нервного гребня под действием различных факторов роста семейства TGF- β



Консерватизм факторов роста семейства TGF- β

Мутация в гене *dpp* дрозофилы – нарушение дорзально-вентрального паттернирования.

Ингибирование экспрессии гена *BMP-4* человека - нарушение дорзально-вентрального паттернирования.

Введение дрозофилам гомолога *dpp* - нормального гена человека *BMP4* – исправление дефекта.

Таким образом, метаболический путь DPP-BMP сохранен функциональным на протяжении по крайней мере последних 600 млн лет.

Ингибиторы факторов роста семейства TGF-beta

1) **Фоллистатин** (связывается с Vmp-4, активином и TGF-beta)

Нокаут – нарушение ранних стадий развития гладких мышц дыхательных путей легких.

2) **Ноггин** (связывается с Vmp-2 и Vmp-4)

Нокаут:

- нарушение размеров нейрональной трубки, отсутствие каудальных ребер, нарушение скелета конечностей.

Основной механизм при нокауте ноггина:

Прекращение ингибирования BMP-4->преждевременный синтез BMP-4 □ ингибирование FGF8 - > нарушение морфогенеза.

3) **Хордин** (связывается с Vmp-4)

Нокаут - прекращение роста нижней челюсти.

4) **Церберус** (связывается с Vmp-4, активином и TGF-beta).

Нокаут - дефекты в формировании структуры головы

5) **Лефти** (связывается с TGF-beta и Wnt).

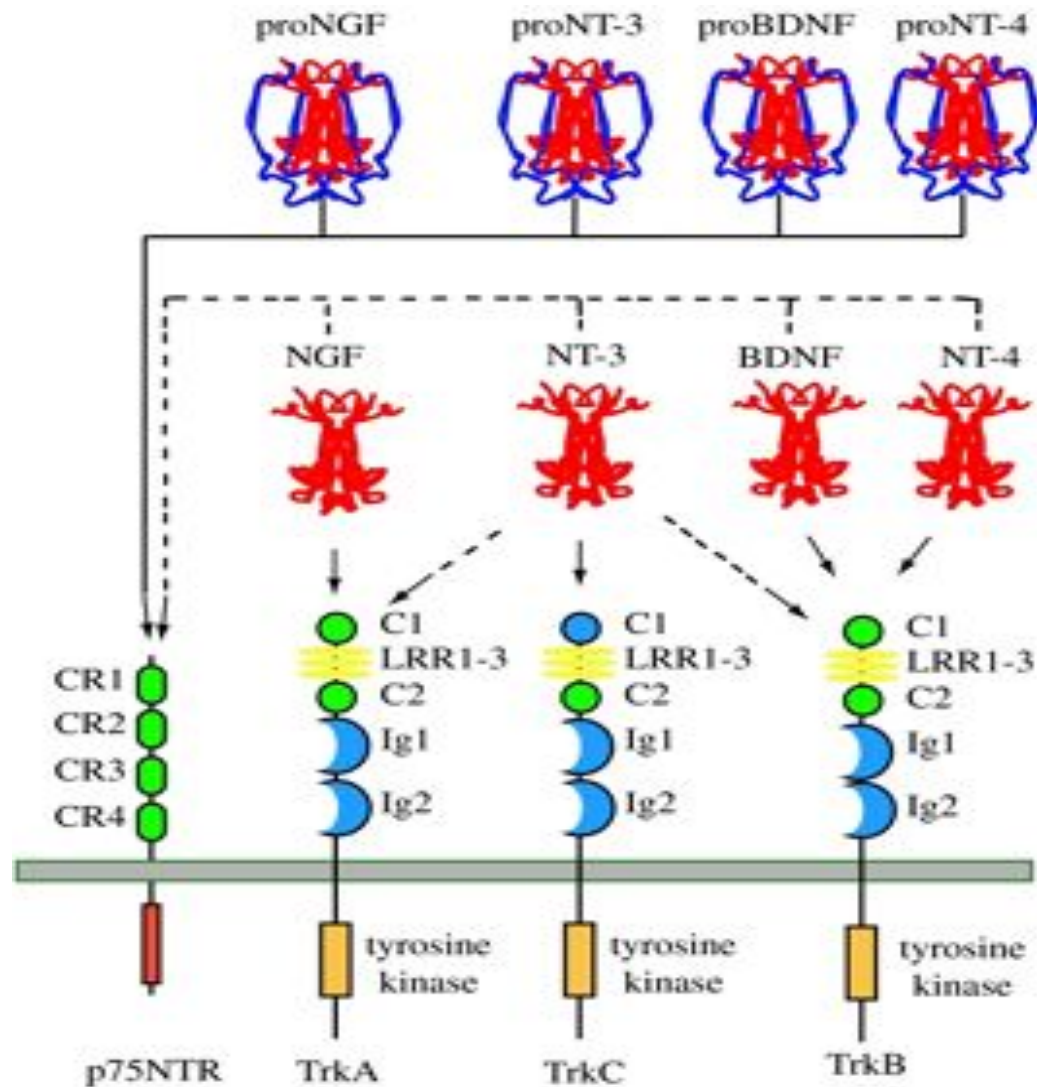
Нокаут – нарушение лево-правосторонней асимметрии.

Нейроспецифические факторы роста в онтогенезе

Регулируют дифференцировку нейронов, рост и ремоделирование аксонов и дендритов, формирование синапсов и др.

- **FGF8** – самый ранний сигнал
- Затем индукция **BMP**, **Sox3**, **ERN1**
- Активация пронейрональных **факторов транскрипции**
- **Нейротрофины** – паракринные факторы роста, поддерживающие жизнеспособность нейронов, стимулирующие их развитие и активность.

Нейротрофины и их рецепторы



Белки, управляющие нейрональной миграцией и ростом аксонов

- **Нетрины** - хемоаттрактивные белки, аксональное наведение (рецептор: DCC)
- **Семафорины** – хемореппеленты, отталкивающее действие на конус роста аксона, отклоняя его от прорастания в неподходящие области (рецепторы: плексин и нейропилин)
- **Эфрины** - нейротрофические факторы, определяют топографию связей в развивающейся нервной системе (рецепторы: eph)

Факторы формирования нервных связей (семейство факторов эфринов (Eph) и их рецепторов)

Имеется 8 генов семейства факторов Eph и 16 eph- рецепторов .
Они экспрессируются в клетках нервной системы при раннем эмбриогенезе в специфической пространственно-временной манере.

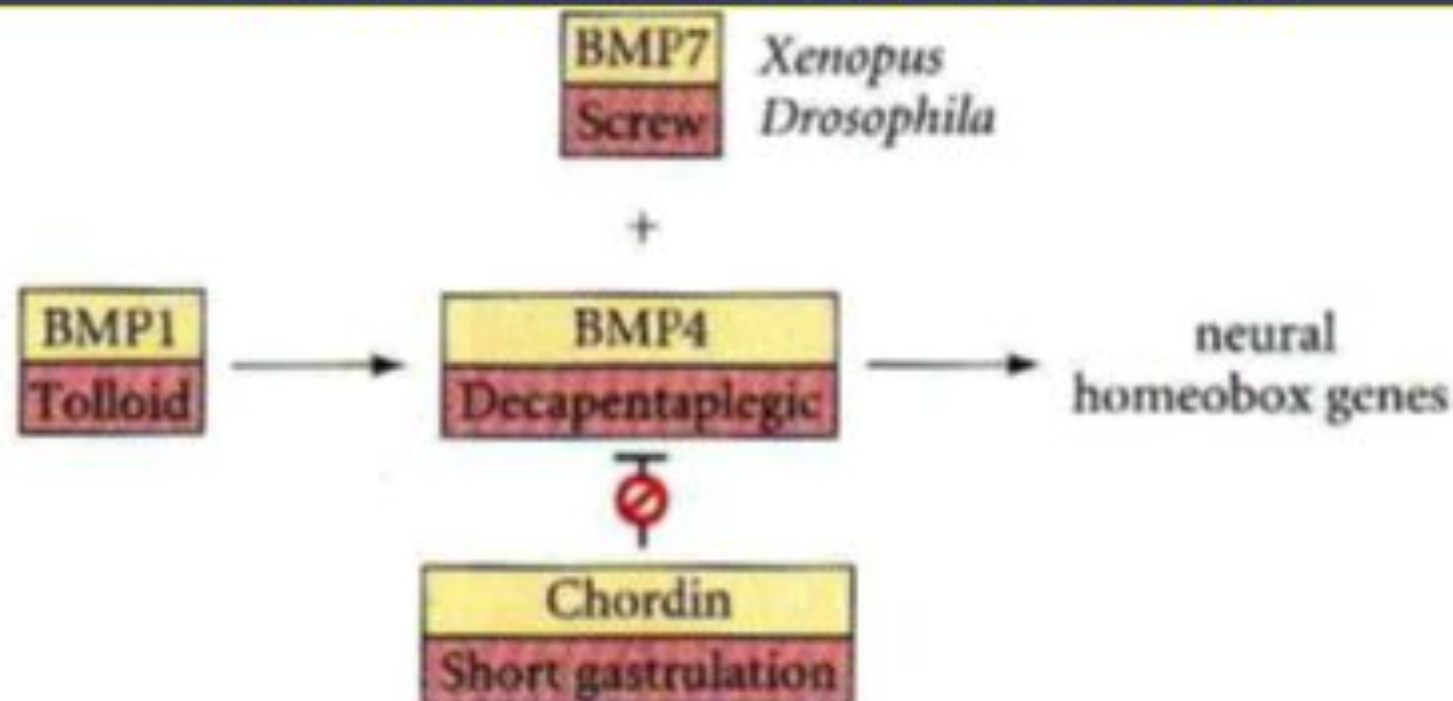
У кур аксоны антериорных нейронов ретины (сетчатки глаза) проецируются на постериорную область зрительного **тектума (мишень в среднем мозге)**, а постериорные нейроны - на антериорную область тектума.

Нокаут генов Eph-рецепторов нарушал формирования нервных связей.

Градиенты лиганда (Eph) в tectum и его рецептора в ретине совпадают.

Всё это соответствует теории химического сродства Сперри (1943): запрограммированная топографическая карта соединения нейронов возникает в результате взаимодействия "ярлычков" на пресинаптических нейронах с **комплементарными "ярлычками"** на постсинаптических. При этом им предполагалось, что **позиционная информация имеет форму градиента.**

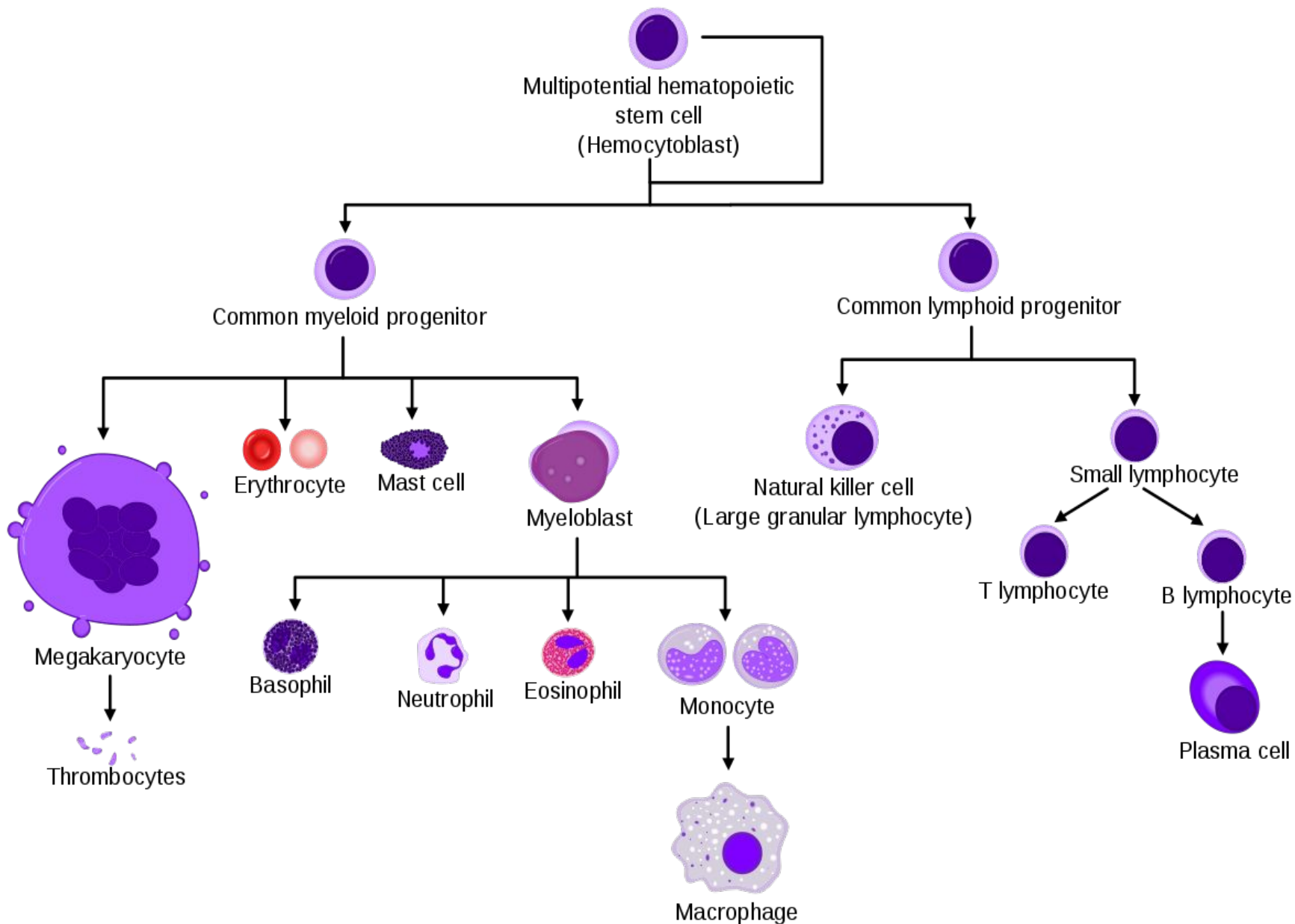
Консерватизм факторов роста (спецификации нейральной эктодермы у дрозофилы и позвоночных)



Желтым и коричневым цветом попарно отмечены ортологичные факторы роста у ксенопуса и дрозофилы.

Гемопоэтические факторы роста в онтогенезе

Схема гематопозеза



Регуляция гемопоэза

Гемопоэз инициируется ростовыми факторами, цитокинами и непрерывно поддерживается благодаря пулу СКК.

Стволовые кроветворные клетки стромозависимы и воспринимают короткодистантные стимулы, получаемые ими при межклеточном контакте с клетками стромального микроокружения.

По мере дифференцировки клетка начинает реагировать на дальнедействующие гуморальные факторы.

Эндогенная регуляция всех этапов гемопоэза осуществляется цитокинами через рецепторы на клеточной мембране, посредством которых проводится сигнал в ядро клетки, где происходит активация соответствующих генов.

Основными продуцентами цитокинов являются моноциты, макрофаги, активированные Т-лимфоциты, стромальные элементы - фибробласты, эндотелиальные клетки и др.

Факторы регуляции гемопоэза

Факторы регуляции гемопоэза подразделяются на **короткодистантные** (для СКК) и **дальнодействующие** для коммитированных предшественников и созревающих клеток.

В зависимости от уровня дифференцировки клетки факторы регуляции делят на 3 основных класса:

1. Факторы, влияющие на ранние СКК:

- фактор стволовых клеток (ФСК),
- гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г - КСФ),
 - интерлейкины (ИЛ-6, ИЛ-11, ИЛ-12),
- ингибиторы, которые тормозят выход СКК в клеточный цикл из состояния покоя (MIP-1 , TGF- , ФНО- , кислые изоферритины и др.).

Эта фаза регуляции СКК не зависит от запросов организма.

Факторы регуляции гемопоэза

2. Линейно-неспецифические факторы:

- ИЛ-3,
- ИЛ-4,
- ГМ-КСФ (для гранулоцитомонопоэза).

3. Позднедействующие линейно-специфические факторы, которые поддерживают пролиферацию и созревание коммитированных предшественников и их потомков:

- эритропоэтин,
- тромбопоэтин,
- колониестимулирующие факторы (Г-КСФ, М-КСФ, ГМ-КСФ),
- ИЛ-5.

Один и тот же ростовой фактор может действовать на разнообразные клетки-мишени на различных этапах дифференцировки, что обеспечивает взаимозаменяемость молекул, регулирующих гемопоэз.

Гемопоэтические факторы роста

Плюрипотентная
клетка

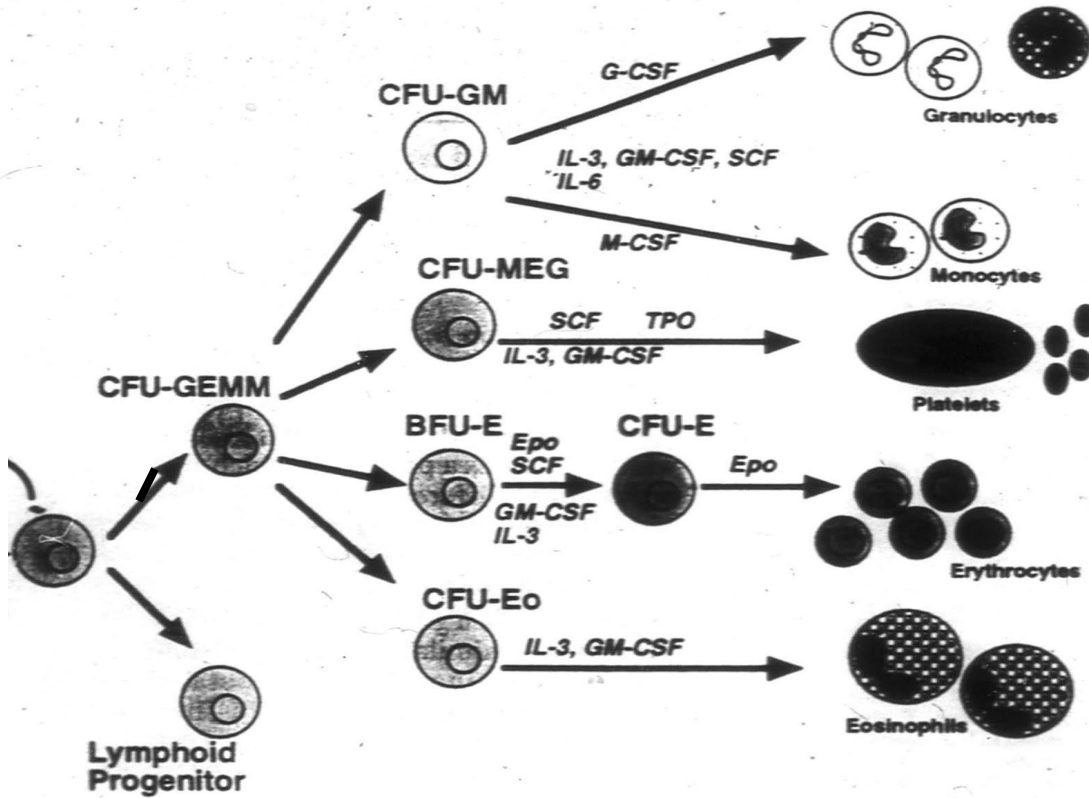


FIG. 1. Structure of the hematopoietic compartment. Bone marrow pluripotent stem cells may either self-renew or give rise to eight different hematopoietic lineages through a gradual process of commitment and differentiation. Some of the cytokines involved in supporting this process are illustrated. M-CSF, Macrophage colony stimulating factor; SCF, stem cell factor; Epo, erythropoietin; Tpo, thrombopoietin; CFU-GEMM, CFU granulocyte-erythroid-megakaryocyte; CFU-GM, CFU granulocyte-monocyte; CFU-meg, CFU megakaryocyte; CFU-E, CFU erythroid; CFU-Eo, CFU eosinophil; BFU-E, burst-forming unit erythroid.

ИНТЕРЛЕЙКИНЫ

- **ИЛ-2** выделяется Т-хелперами (преимущественно *T_H1*) и стимулирует пролиферацию и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов, ЕКК, моноцитов
- **ИЛ-3** основной гемопоэтический фактор, стимулирует пролиферацию и дифференцировку ранних предшественников гемопоэза
- **ИЛ-4** – фактор роста В-лимфоцитов, стимулирует их пролиферацию на раннем этапе дифференцировки, выделяется Т-хелперами 2-го типа

КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИЕ ФАКТОРЫ

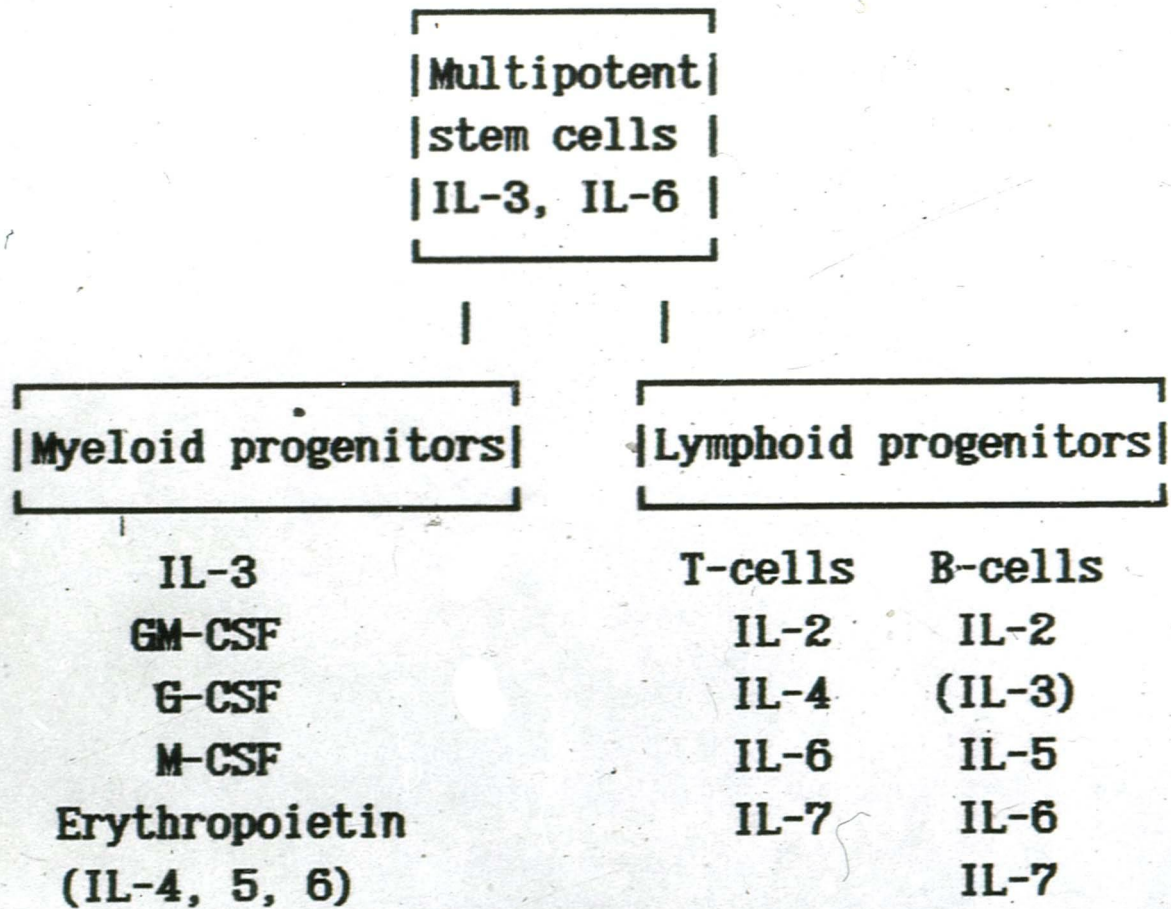
- **ДИФЕРОНЫ КРОВЕТВОРЕНИЯ** – стимулируют дифференциацию плюрипотентной стволовой клетки в унипотентную и пролиферацию

G-CSF – стимулируют дифференциацию и пролиферацию гранулоцитов

GM-CSF - стимулируют дифференциацию и пролиферацию гранулоцитов и макрофагов

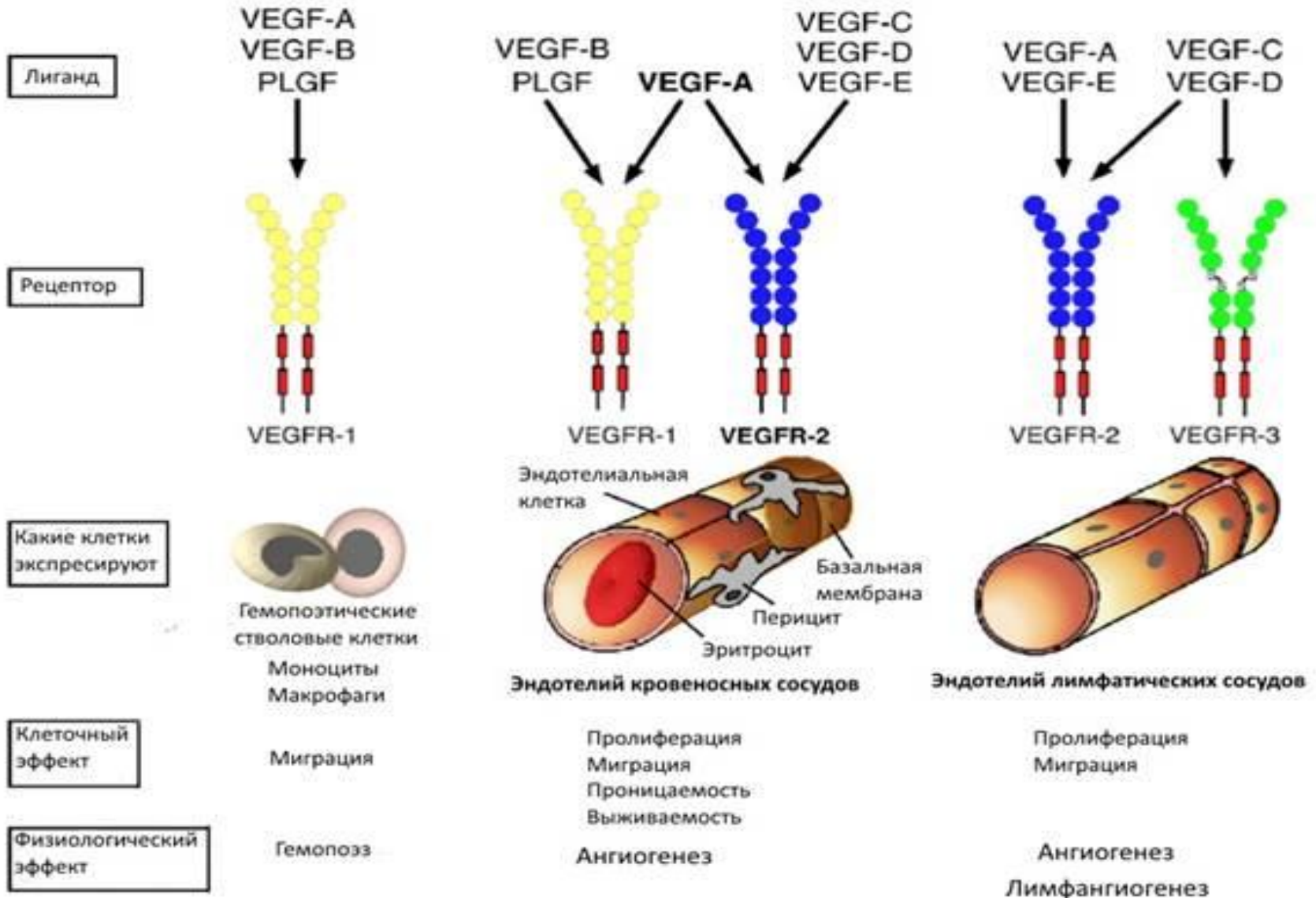
M-CSF - стимулируют дифференциацию и пролиферацию моноцитов

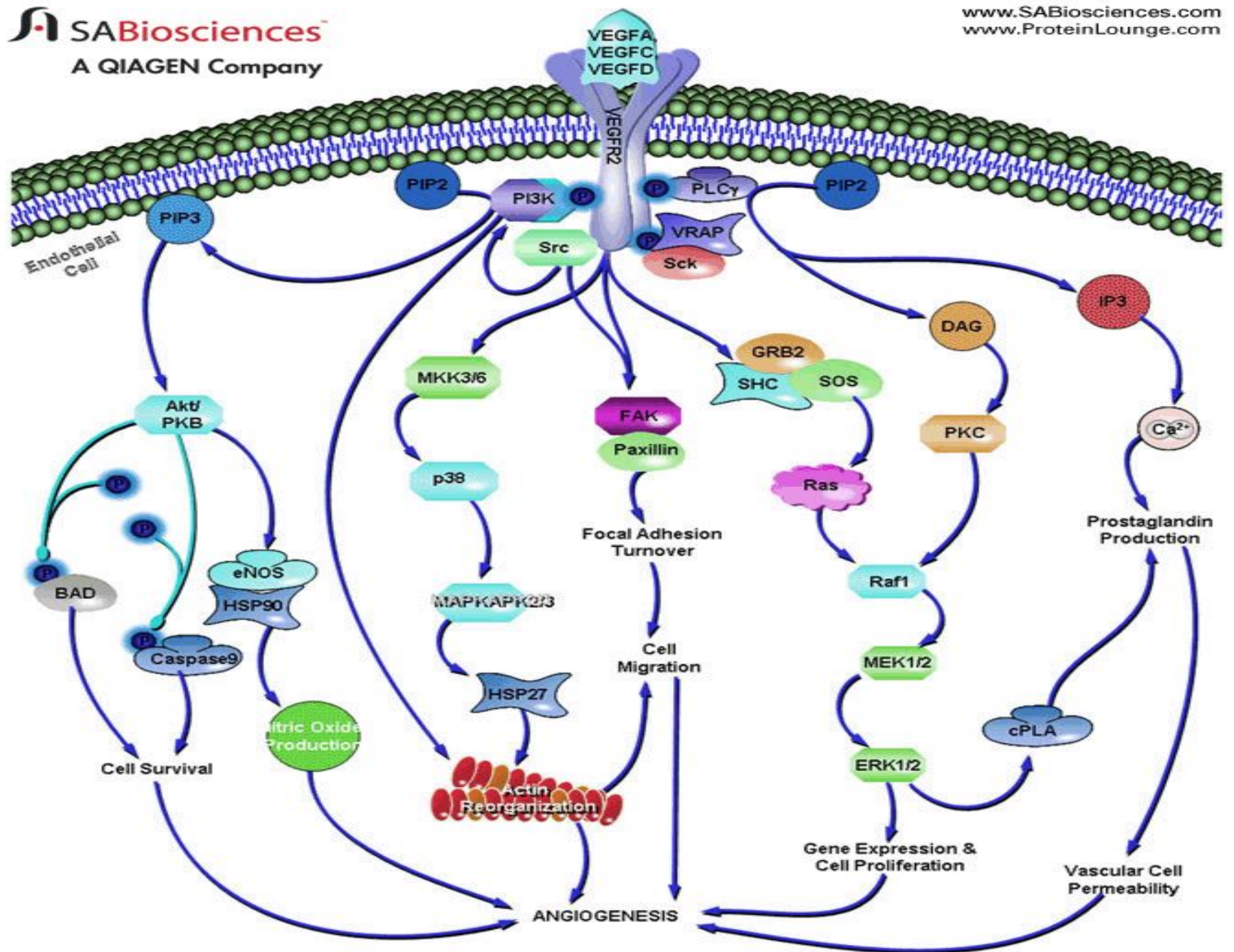
Клетки-мишени для гемопоэтических факторов роста



Факторы роста эндотелиальных клеток

(плацентарный ФР - PLGF, васкулярно-эндотелиальные ФР - VEGF)





Ингибиторы факторов роста эндотелиальных клеток

Эндостатин:

фрагмент коллагена XVIII, подавляет миграционную активность эндотелиоцитов и стимулирует апоптоз посредством ингибирования циклина D1 и остановки клеточного цикла эндотелиоцитов в фазе G1. Он блокирует опосредованные VEGF сигнальные пути, непосредственно взаимодействуя с рецептором VEGF.

Ангиостатин:

образуется при расщеплении белка плазмина, ингибирует пролиферативную активность и миграцию эндотелиоцитов, запускает процессы их апоптоза, предотвращая образование новых кровеносных сосудов; используется в качестве противоракового препарата.

Влияние на развитие организмов трансгенов, кодирующих факторы роста и их рецепторы

Ген	Промотор	Эффекты
KGF	ген кератина	Экспрессия в кератиноцитах (аутокринная) Хрупкий и утолщенный эпидермис, морщинистая кожа Нарушение дифференцировки слюнных желез
Мутант. rFGF	ген кератина	Экспрессия в кератиноцитах (особенно в хвосте) Нарушение организации эпидермальных кератиноцитов
TGFβ	MMTV	Ингибирование альвеолярного развития молочной ж. и лактации

Вывод: KGF интерферирует с процессами взаимодействия мезенхимы и эпителия

Вывод: FGF – важный фактор морфогенеза супрабазальных кератиноцитов

Вывод: TGF β – негативный фактор развития молочной железы

ЭСК как модель изучения функций факторов роста

Активин А + NGF-beta

тормозят прогрессию клонов в эндо- и эктодерму, но сильно стимулирует образование клонов мезодермального происхождения.

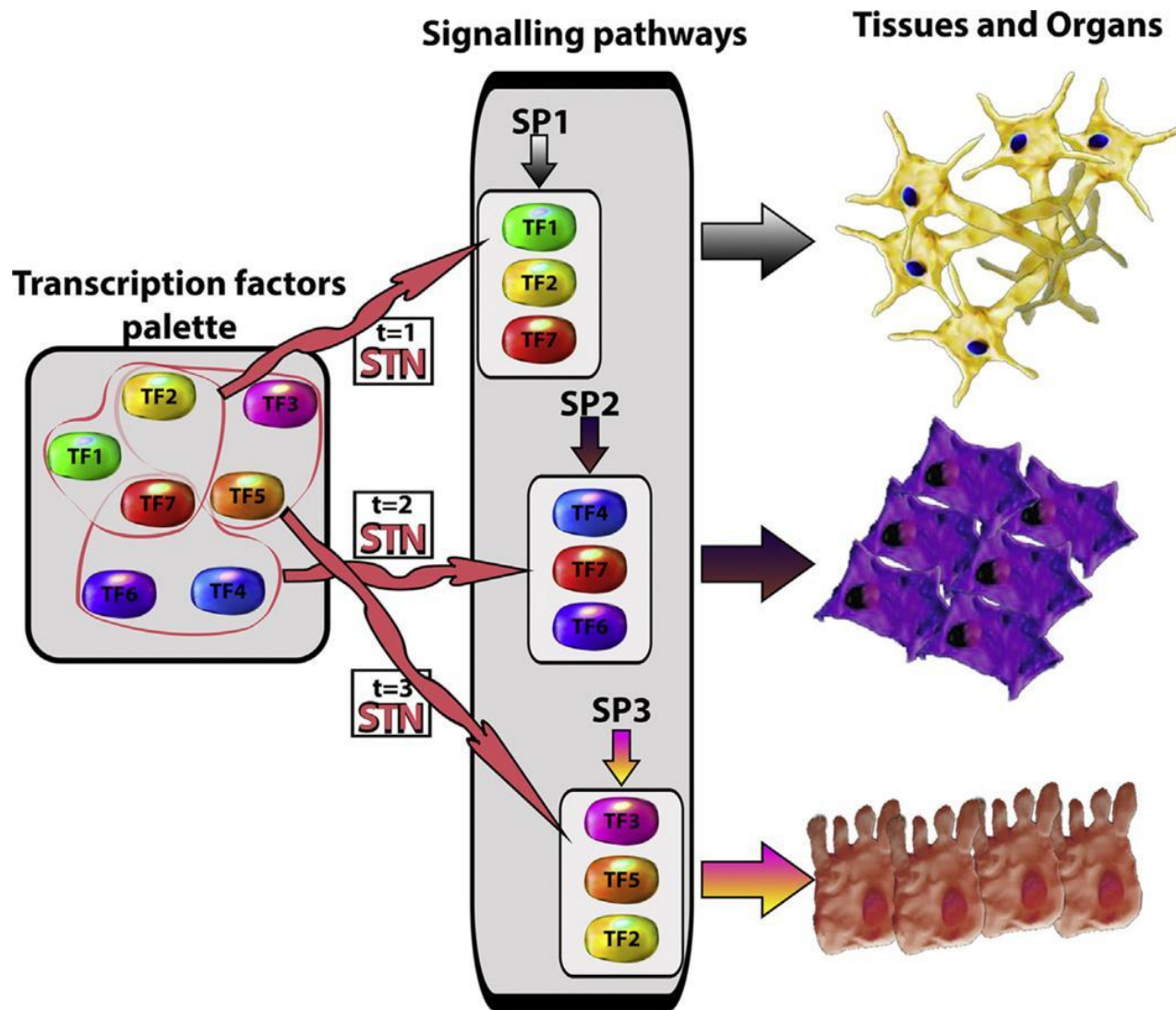
bFGF или BMP-4 с EGF

стимулируют селективную прогрессию клонов экто- и мезодермы, блокируя развитие клонов энтодермы.

HGF + NGF

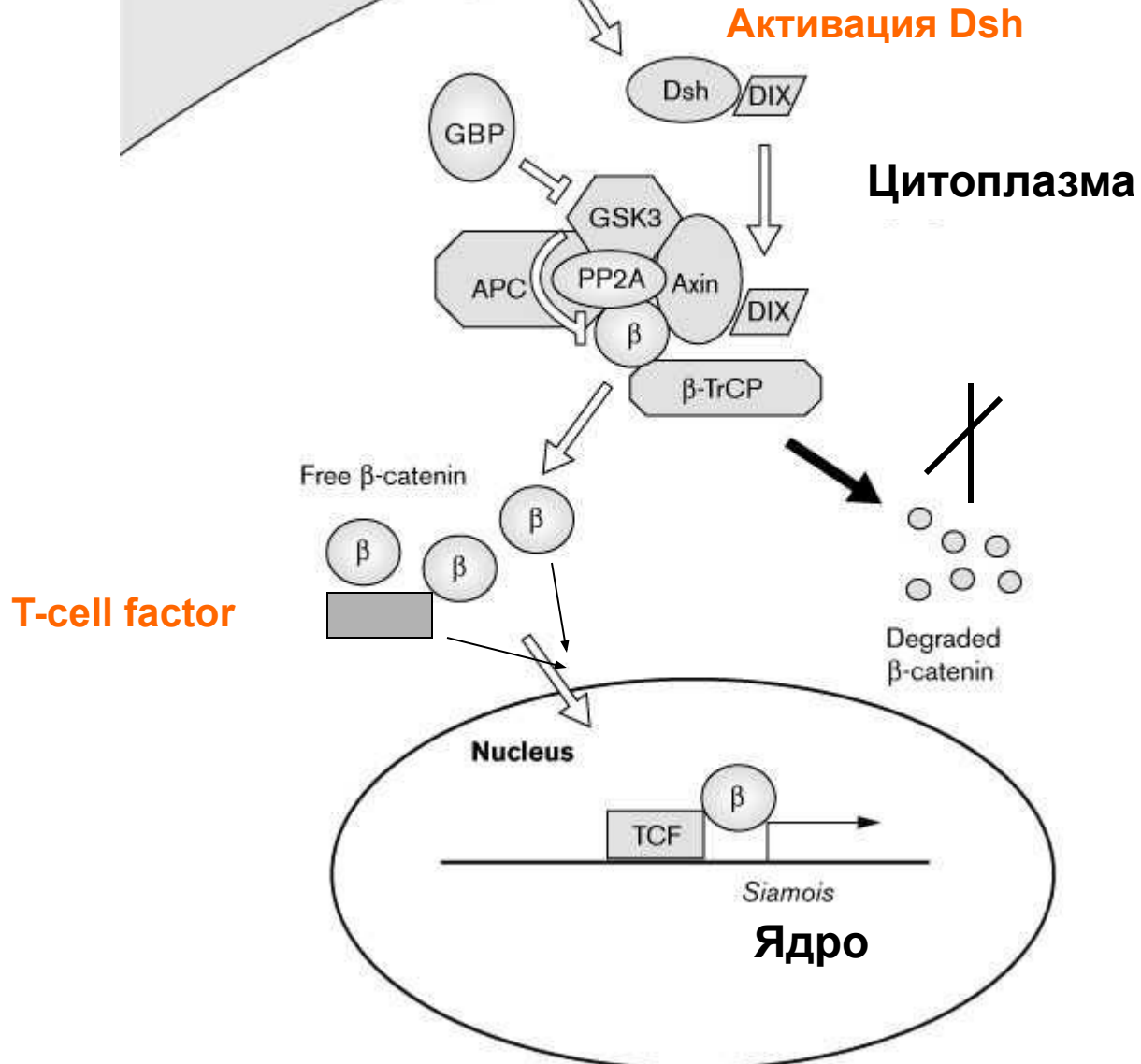
Активируют рост клонов всех зародышевых листков

Сигнальные пути в онтогенезе



Основные СП: Wnt, Hedgehog, Notch, Nodal.

Wnt-путь



Белки семейства Wnt (19-ть) – секретируемые гликопротеиды. 15 рецепторов Frizzled

У дрозофилы они необходимы для организации ЦНС, детерминации области крылового и глазного примордиев, ограничения размера глазной области в диске, инициации границы между глазными и прилежащими структурами головы, специализации клеток глаза и кутикулы головы.

Паттерн экспрессии Wnt у мышей

Ген	Embryonic expression	Adult expression
Wnt-1	Средний мозг, спинной мозг	семенники
Wnt-2	ventral-lateral mesoderm, heart, allantois	lung, brain, heart
Wnt-3	brain, spinal cord, limbs	thalamus, Purkinje cells
Wnt-3a	мозг, первичная полоска	lung
Wnt-4	not determined	brain, lung
Wnt-5a	ventral brain, spinal cord	heart, lung
Wnt-5b	not restricted	heart, brain, liver, lung
Wnt-6	not determined	testes
Wnt-7a	not determined	brain, lung
Wnt-8	not determined	brain

Секреция всех Wnt-белков осуществляется с участием шаперона Porcupine

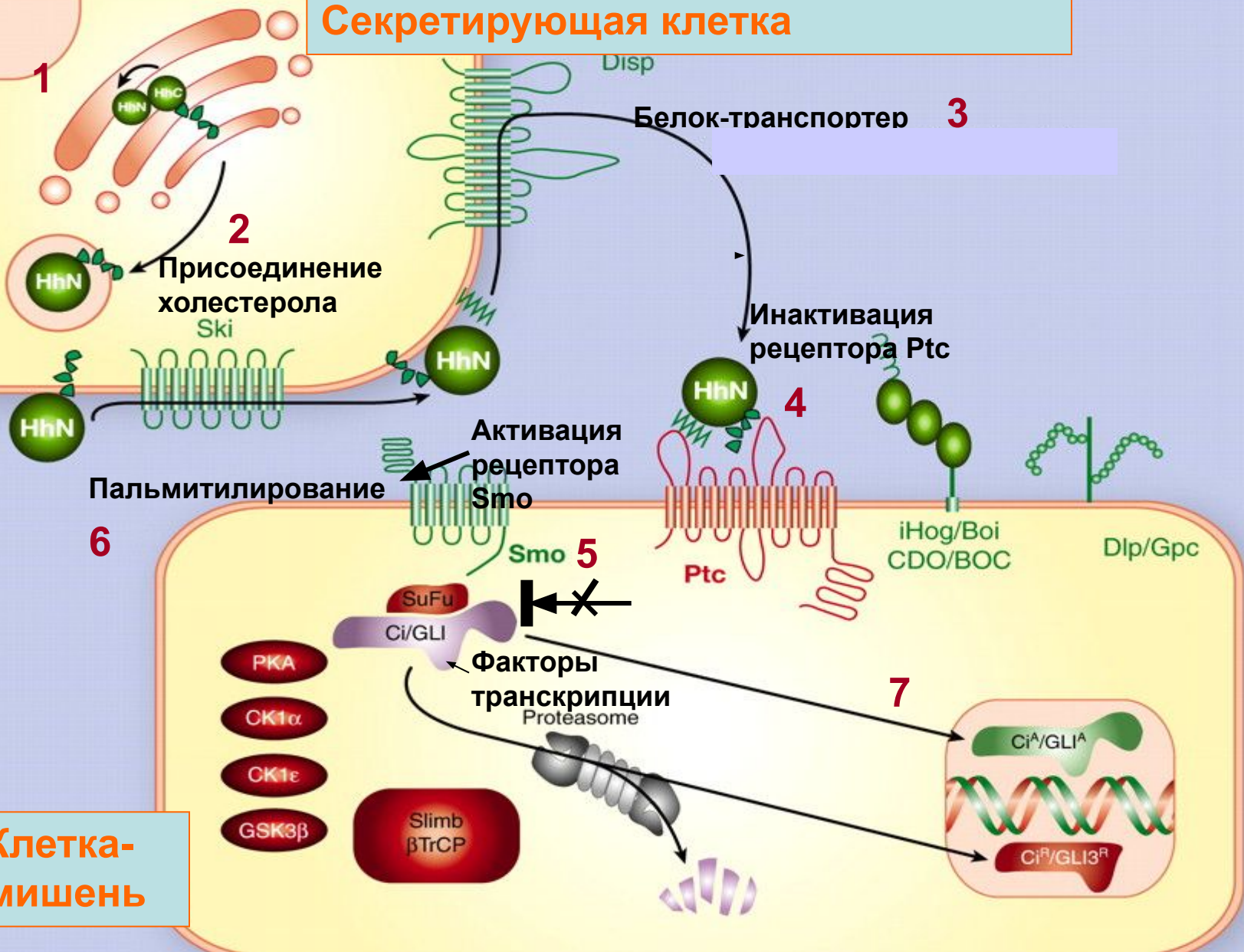
Примеры установления функций различных членов семейства *Wnt* с помощью нокаута генов

- Нокаут *wnt-1* - недоразвитие среднего мозга, в котором в норме наблюдали экспрессию этого гена. Дефект проявлялся на 9,5 день развития.
- Нокаут *wnt-7a* - нарушение как дорзально-вентральной, так и антерио-постериорной полярности при развитии конечностей.
- Нокаут *wnt5a* – предотвращение старения стволовых клеток.
- Нокаут *wnt5a* – нарушение лимфангиогенеза.
- Нокаут *wnt6* – удлинение длительность клеточного цикла в результате уменьшения экспрессии циклина B1.
- Нокаут *wnt9b* – снижение эффективности экспрессии фактора роста фибробластов.

Hedgehog Signaling

(Морфоген нервной системы)

Секретирующая клетка



Клетка-мишень

Онкогены и антионкогены как факторы развития

Онкогены – поврежденные протоонкогены

Процесс повреждения протоонкогена и трансформация его в онкоген называется *активация онкогена*.

Механизмы активации онкогена.

- ***Включение (вставка) промотора:***

а) промотор - ДНК-копия онкорнавирусов;

б) «прыгающие гены» - участки ДНК, способные перемещаться и встраиваться в разные участки генома .

- ***Амплификация*** – увеличение числа протоонкогенов или появление копий протоонкогенов.

- ***Транслокация протоонкогенов.*** Перемещение протоонкогена в локус с функционирующим промотором.

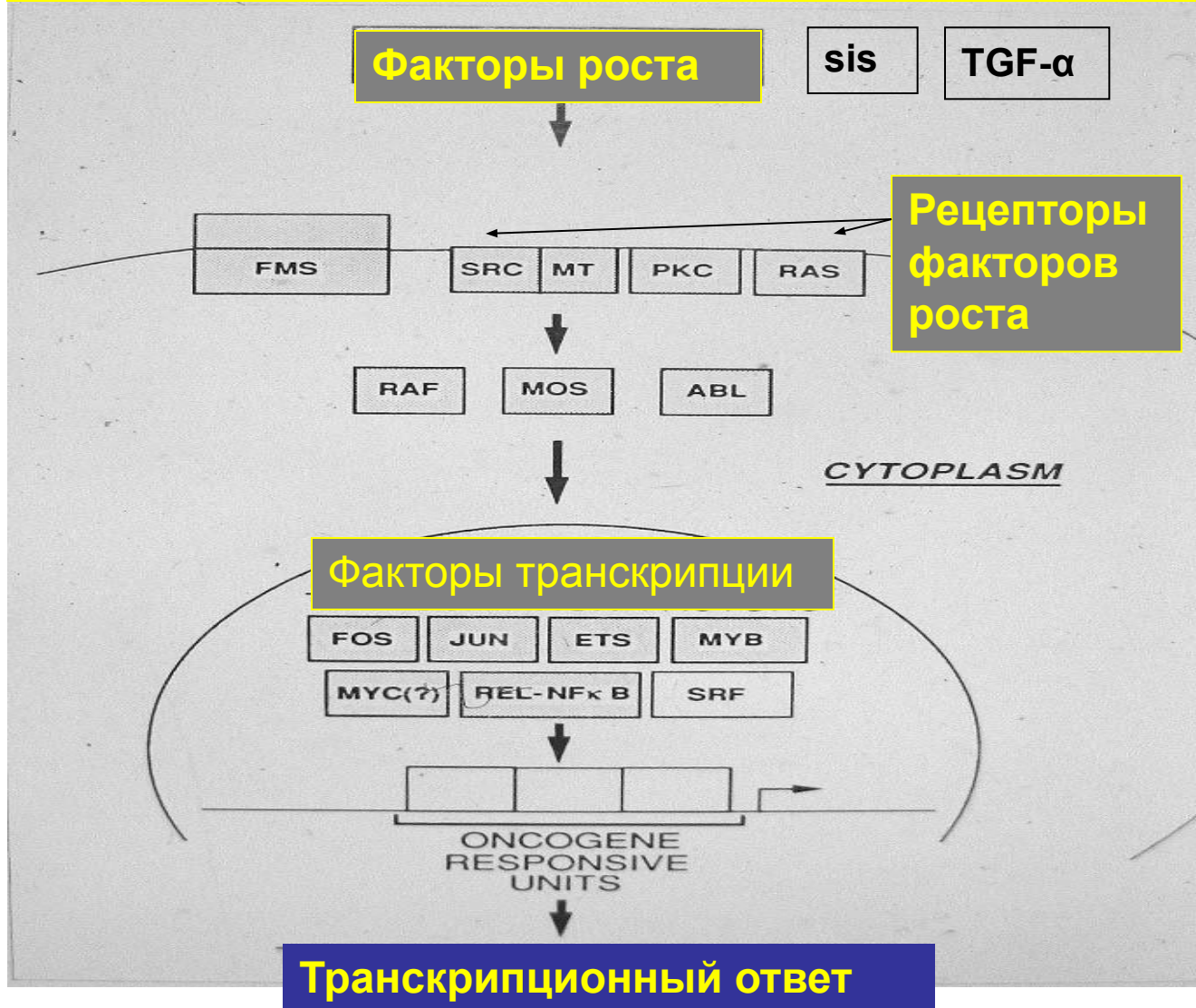
- ***Мутации протоонкогенов.***

- ***Гипометилирование протоонкогена***

Протоонкогены, их изменения и опухоли человека

Proto-Oncogene*	Neoplasm(s)	Lesion
ABL	Chronic myelogenous leukemia	Translocation
ERBB-1	Squamous cell carcinoma; astrocytoma	Amplification
ERBB-2 (NEU)	Adenocarcinoma of breast, ovary and stomach	Amplification
GIP	Carcinoma of ovary and adrenal gland	Point mutations
GSP	Adenoma of pituitary gland; carcinoma of thyroid	Point mutations
MYC	Burkitt's lymphoma Carcinoma of lung, breast and cervix	Translocation Amplification
L-MYC	Carcinoma of lung	Amplification
N-MYC	Neuroblastoma; small cell carcinoma of lung	Amplification
H-RAS	Carcinoma of colon, lung and pancreas; melanoma	Point mutations
K-RAS	Acute myelogenous and lymphoblastic leukemia; carcinoma of thyroid; melanoma	Point mutations
N-RAS	Carcinoma of genitourinary tract and thyroid; melanoma	Point mutations
RET	Carcinoma of thyroid	Rearrangement
ROS	Astrocytoma	?
K-SAM	Carcinoma of stomach	Amplification
SIS	Astrocytoma	?
SRC	Carcinoma of colon	?
TRK	Carcinoma of thyroid	Rearrangement

Функции онкобелков



Нокаут протоонкогенов и процессы индивидуального развития

Онкоген	Дефекты развития
c-jun	Гибель от дефектов в гепатогенеза
c-myc	Дефекты ангиогенеза и эритропоэза, нарушение развития мозга
N-myc	Нарушение пролиферации нейрональных клеток-предшественников
Ras	Кардиоваскулярные и гемапотоэтические дефекты, нарушение морфогенеза легких

Гены-супрессоры опухолей у человека (антионокогены)

Ген	Функция	Тип опухоли
WT1	фактор транскрипции	опухоль Вильмса
NF1	белок семейства GAP	нейрофиброматоз
BRCA2	фактор транскрипции	опухоли молочной железы
MSH2, MLH1	факторы репарации ДНК	рак толстой кишки
PMS1, PMS2	факторы репарации ДНК	рак толстой кишки
TbR-II	белок-рецептор	рак толстой кишки
p53	фактор транскрипции опухолей	много форм спорадических
Rb	регулятор активности фактора транскрипции	ретинобластомы, остеосаркома

Нокаут антионкогенов и процессы индивидуального развития

Ген	Патологии
Rb	Ранняя гибель, нарушение развития кровеносной системы и костей
Wox стероидогенеза	Нарушение развития костей и
Lkb-1 системы	Нарушения развития васкулярной
Fbw-7	Нарушение гематопоза
Wt-1	Нарушение гематопоза

Механизм действия антионкогена Rb на дифференцировку эритроидных клеток

Rb → ингибирует фактора транскрипции E2F



Стимулирование
фактора
транскрипции
PGC



Активация
митохондриальных
генов



Активация генов
клеточного цикла

Гормоны и развитие

- 1) **Пептидные гормоны: водорастворимые, действуют через мембранные рецепторы клеток-мишеней. Активация – вторичные посредники (цАМФ, инозитолтрифосфат, диацилглицерин).**
- 2) **Стероидные гормоны: жирорастворимые, действуют через цитоплазматические рецепторы. Активация – прямое взаимодействие с генами.**

Принципы передачи гормонального сигнала в клетках-мишенях

Липофильные гормоны (стероидные гормоны)



Гидрофильные гормоны (пептидные гормоны)



Механизм действия эритропоэтина

ЕРО связывается с рецептором эритропоэтина (ЕроR) на поверхности предшественников красных кровяных клеток



Гормоны и развитие

Экдизон – стероидный гормон; у дрозофилы после инъекции экдизона в политенных хромосомах возникают новые пуфы. Вновь синтезируемые белки индуцируют экспрессию десятков и даже более других последовательностей ДНК, в результате чего действие гормона многократно усиливается.

Тироксин – гормон щитовидной железы; в онтогенезе амфибий обеспечивает превращение головастика в лягушку (исчезновение хвоста и жаберных щелей, перестройка черепа, позвоночника и всего пищеварительного тракта, формированию конечностей и др.).

Эритропоэтин – у взрослого организма секретруется тубулярными и перитубулярными клетками почек, у плода – печенью, гуморальный регулятор эритропоэза.

.

Гормоны и развитие

Тестостерон - секретируется клетками Лейдига, способствует стабилизации Вольфовых каналов и образованию из них выносящих канальцев, семенных пузырьков и предстательной железы, участвует в формировании широкого спектра свойств и признаков мужского пола.

Антимюллеровый гормон - образуется в клетках Сертоли, инициирует регрессию Мюллеровых структур у самцов, влияет на рост и дифференцировку клеток семенников.

Фолликуло-стимулирующий гормон (ФСГ) – образуется в гипофизе, стимулирует сперматогенез.

Гормон роста – образуется в гипофизе, вызывает выраженное ускорение линейного (в длину) роста, в основном за счет роста длинных трубчатых костей конечностей