

#8

Klíčové molekulární komponenty  
vývoje

# Buňka ve vyvíjejícím se embryu musí umět a vědět nejrůznější věci:

- vědět kdo je, kde je, kým bude a co bude dalším krokem v jejím buněčném životě
- buňka činí rozhodnutí na otázky typu jako: Dělit se? Diferencovat? A v co diferencovat? Migrovat? A kam? Zemřít?

nature06211-s2.mov

# Co poskytuje buňce tyto informace?

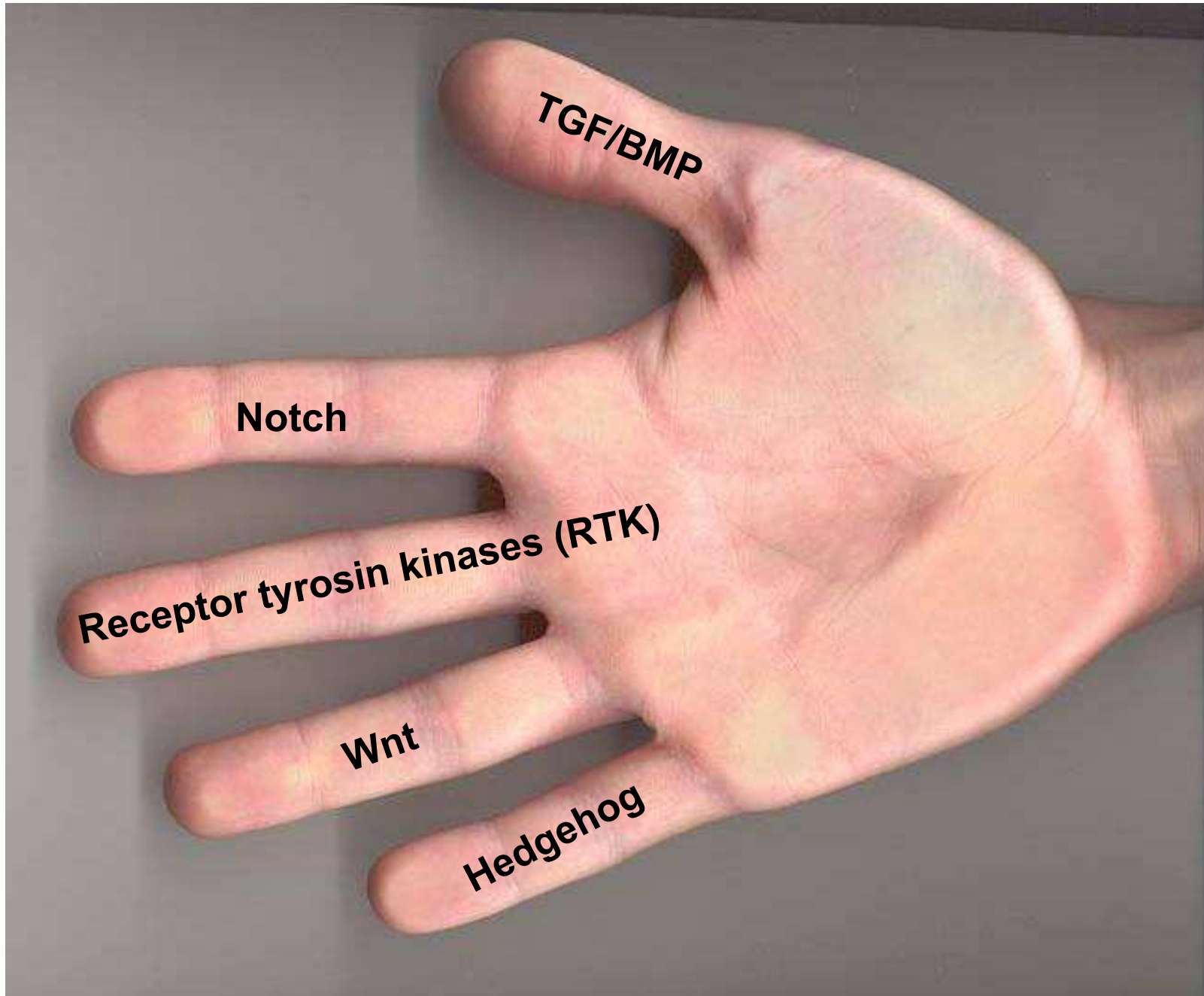
a) signály z okolního prostředí

jednotlivé  
signální dráhy  
modulují  
transkripci a  
strukturu  
chromatinu

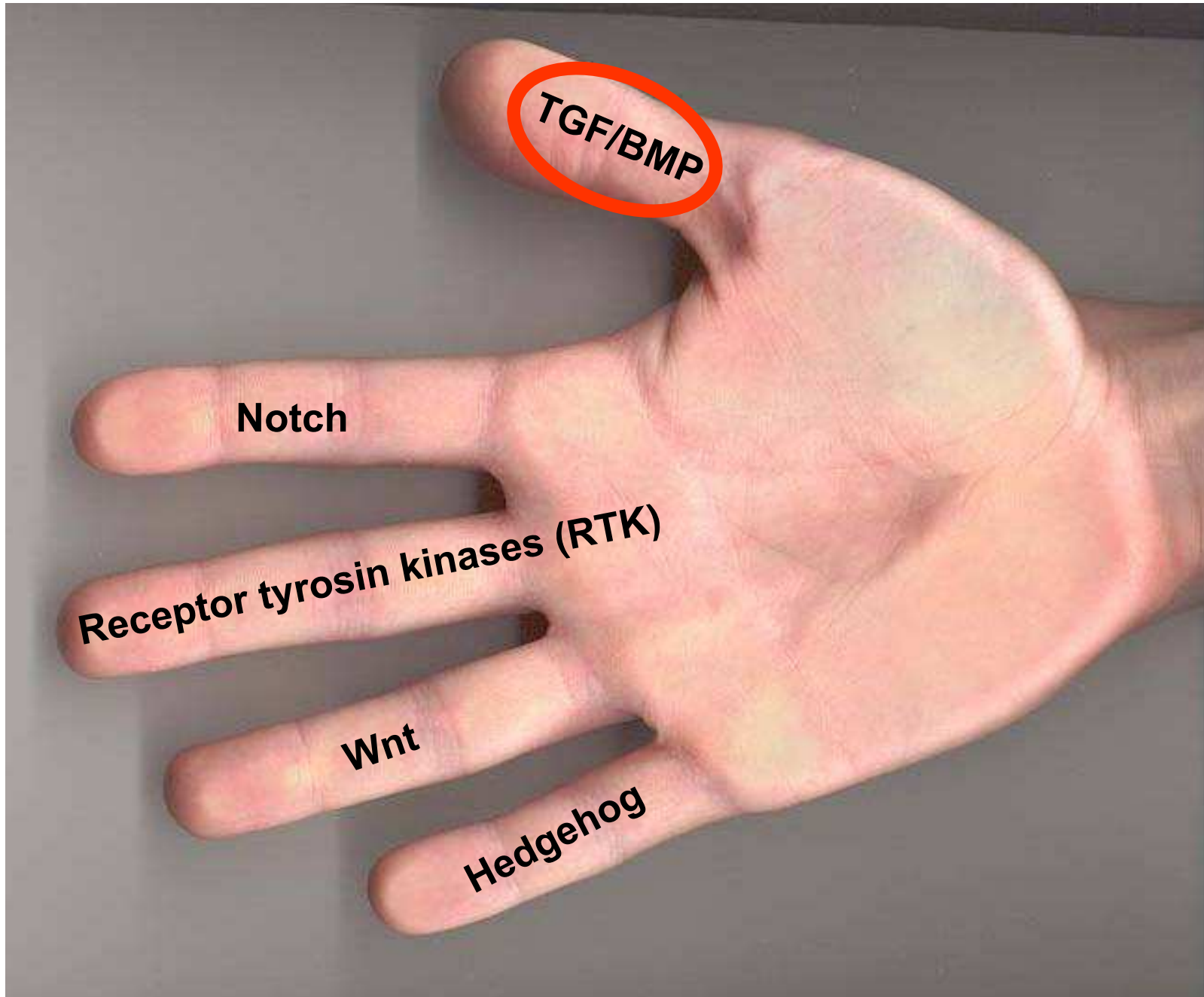
transkripce určuje  
citlivost buňky k  
vnějším signálům  
(např. regulací  
exprese receptorů či  
komponent přenosu  
signálu)

b) transkripční program v jádře

# Signály z vnějšího prostředí



# Signály z vnějšího prostředí



# TGF/BMP

- TGF – transforming growth factor
- BMP – bone morphogenetic protein
- patří do TGF $\beta$  nadrodiny

# TGF $\beta$ nadrodina má následující podrodiny:

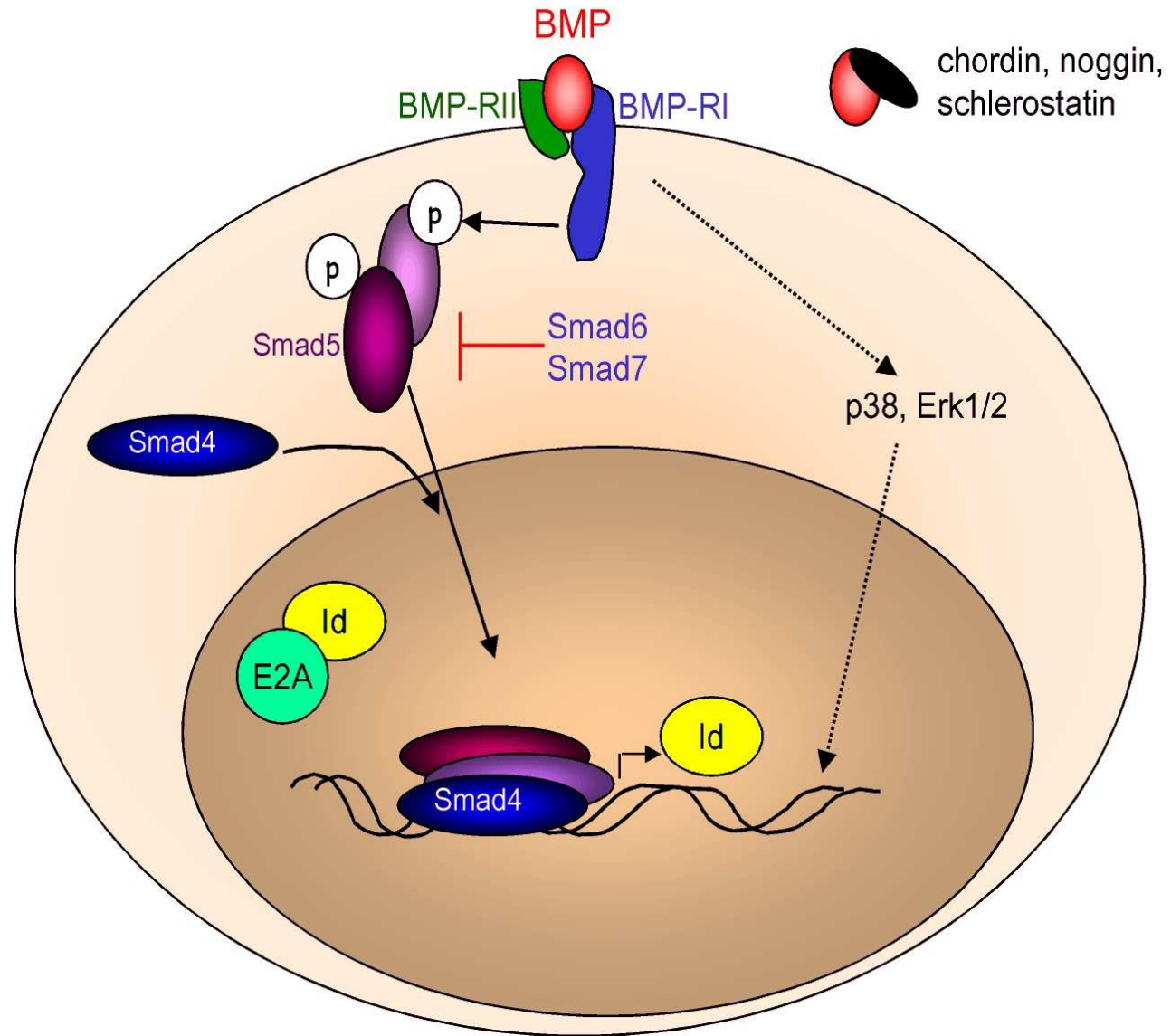
1. TGF $\beta$ 1-3
2. BMPs – 20 různých ligandů
3. GDF (growth differentiation factor): 9 ligandů
4. activin/inhibin/nodal

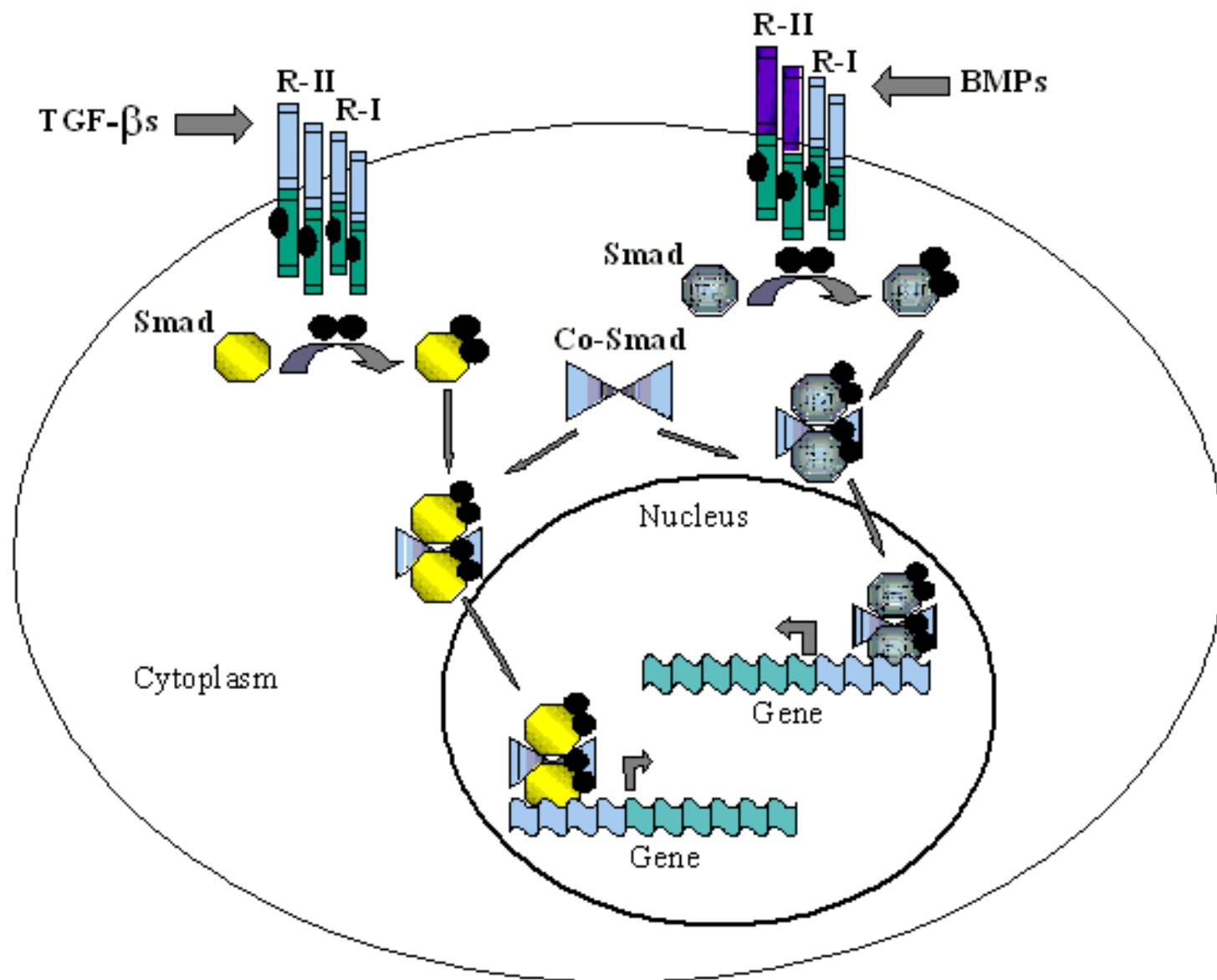
Společným znakem je signalizace přes:

- konzervativní rodinu Ser/Thr kinázových receptorů – jsou dvou typů a po vazbě ligandu dimerizují
- cytoplazmatická signalizace přes tzv. SMAD proteiny



# BMP signaling pathway

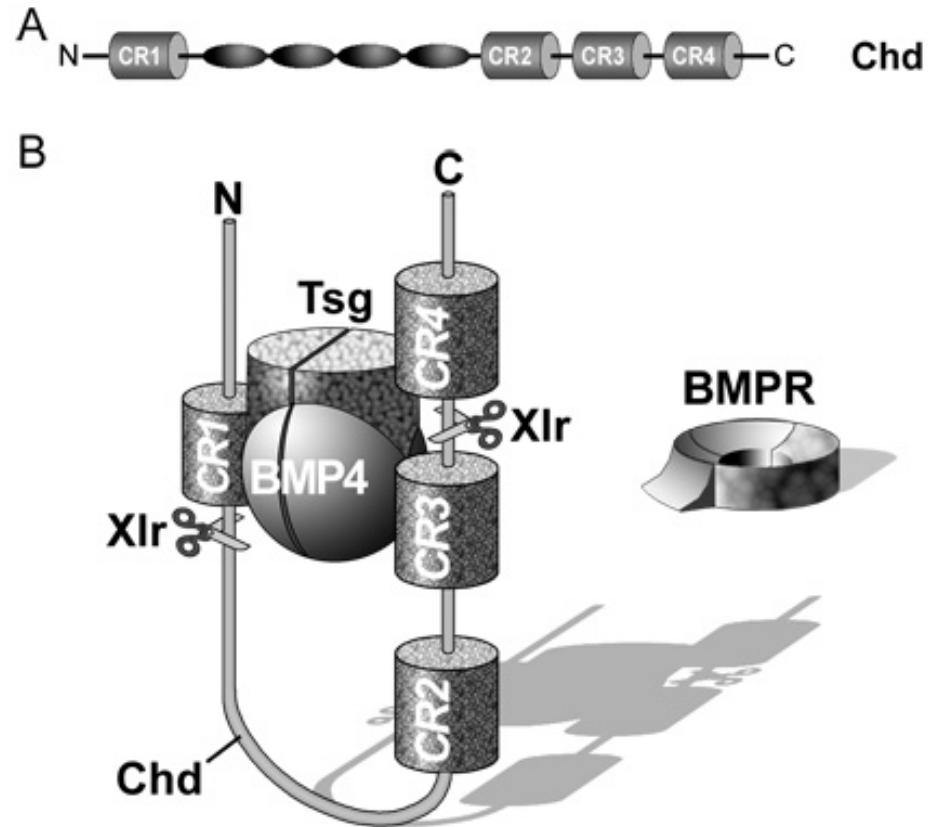




# Inhibitory BMP faktorů,

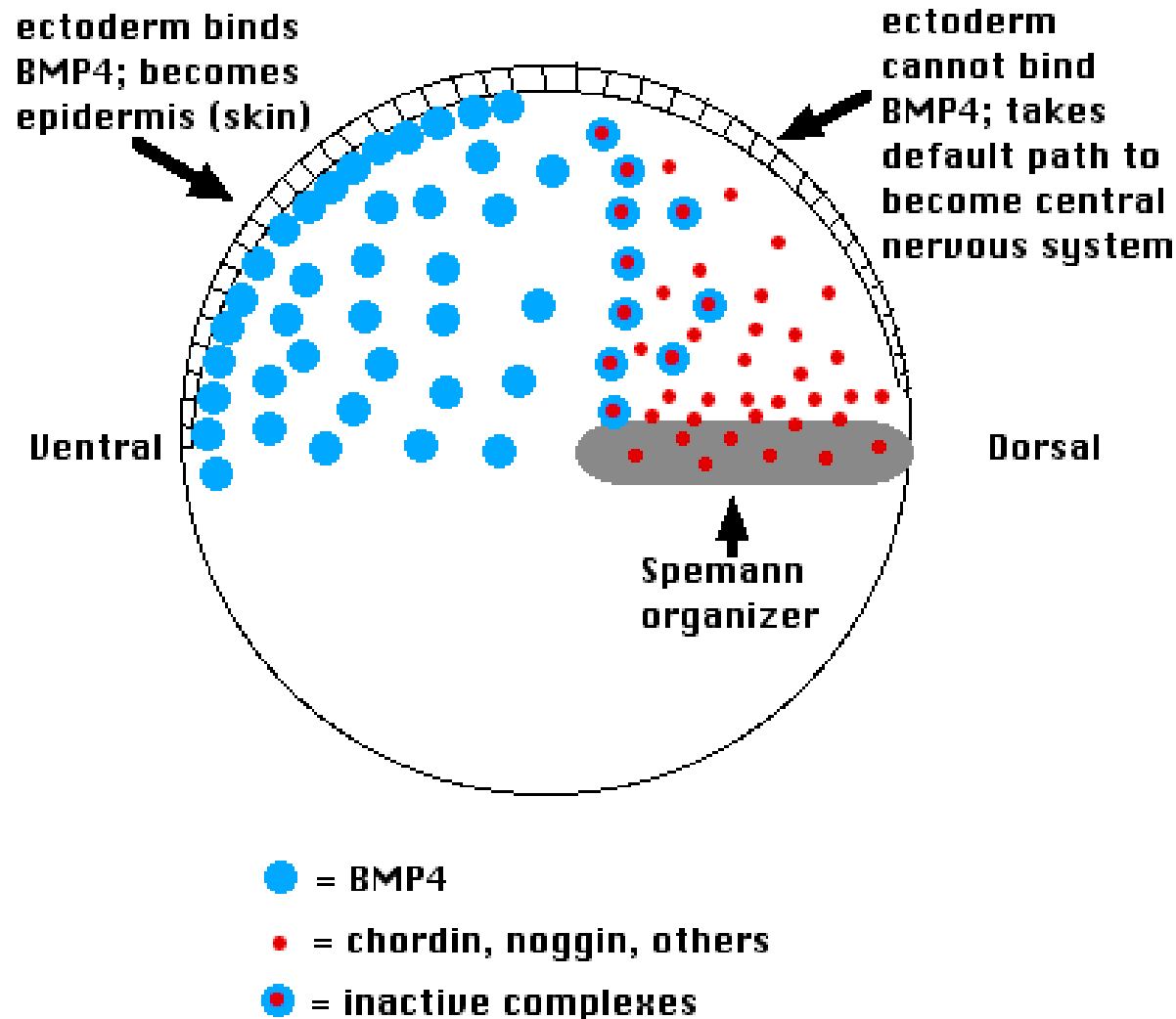
jsou klíčové pro fyziologické funkce BMP:

- noggin
- chordin (Chd)
- sklerostin

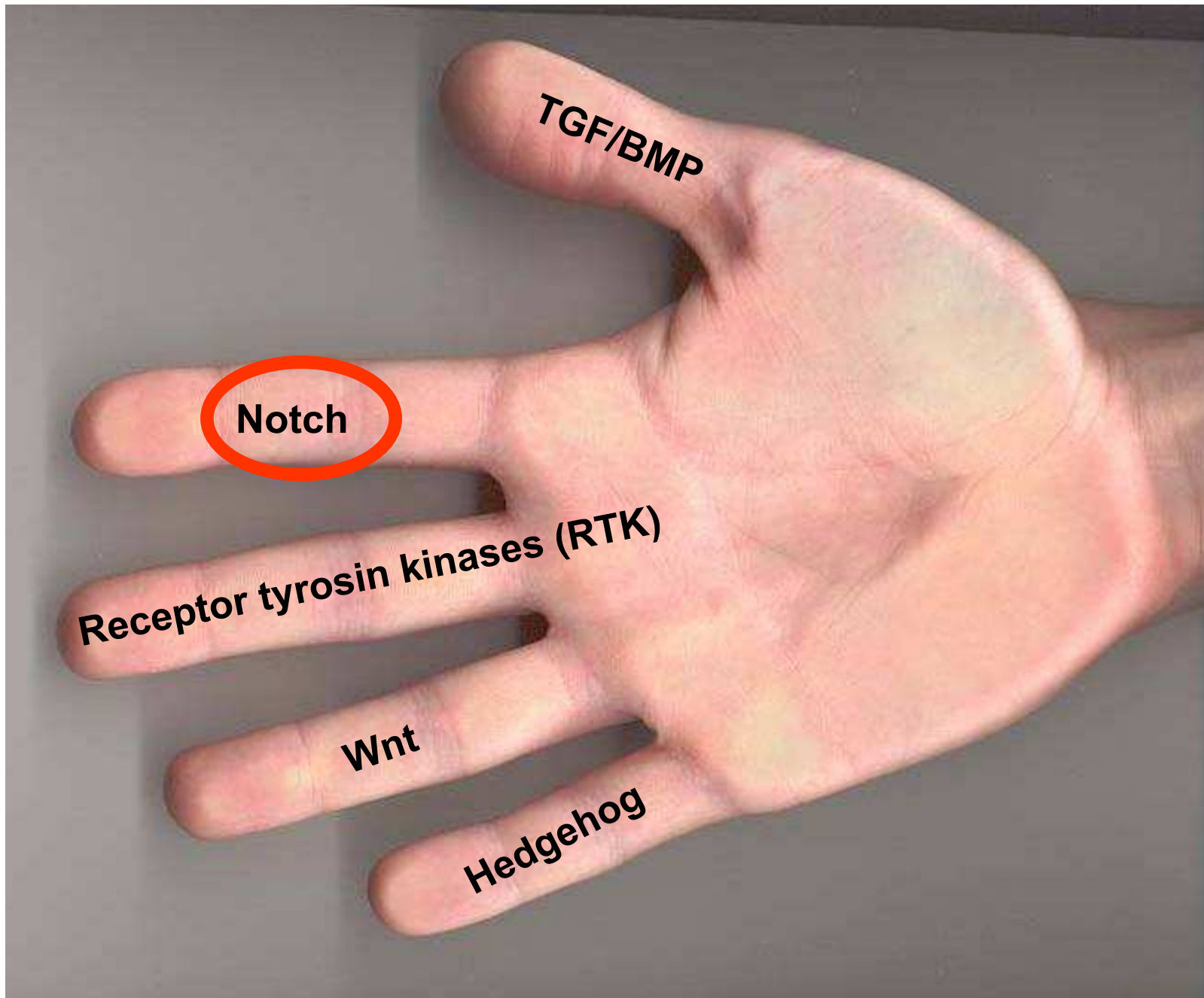


Přímá fyzická interakce mezi chordinem a BMP je podstatou inhibičního působení chordinu

# Role BMP inhibitorů v Spemannově organizátoru

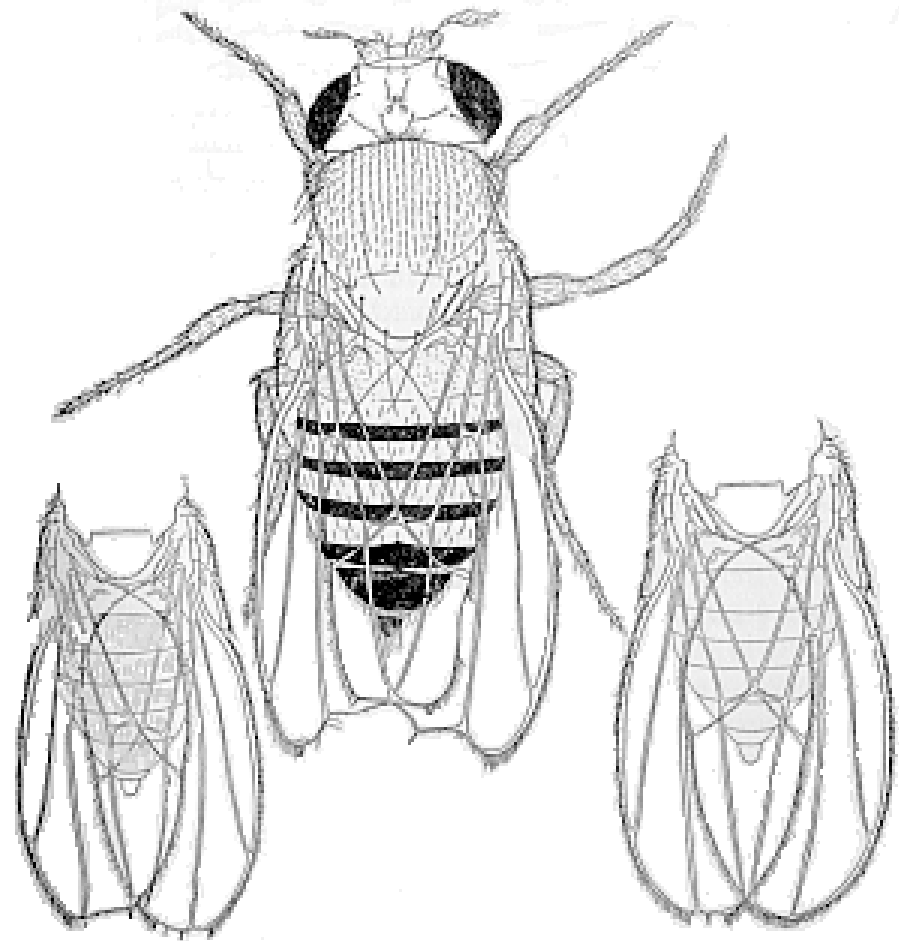


# Signály z vnějšího prostředí

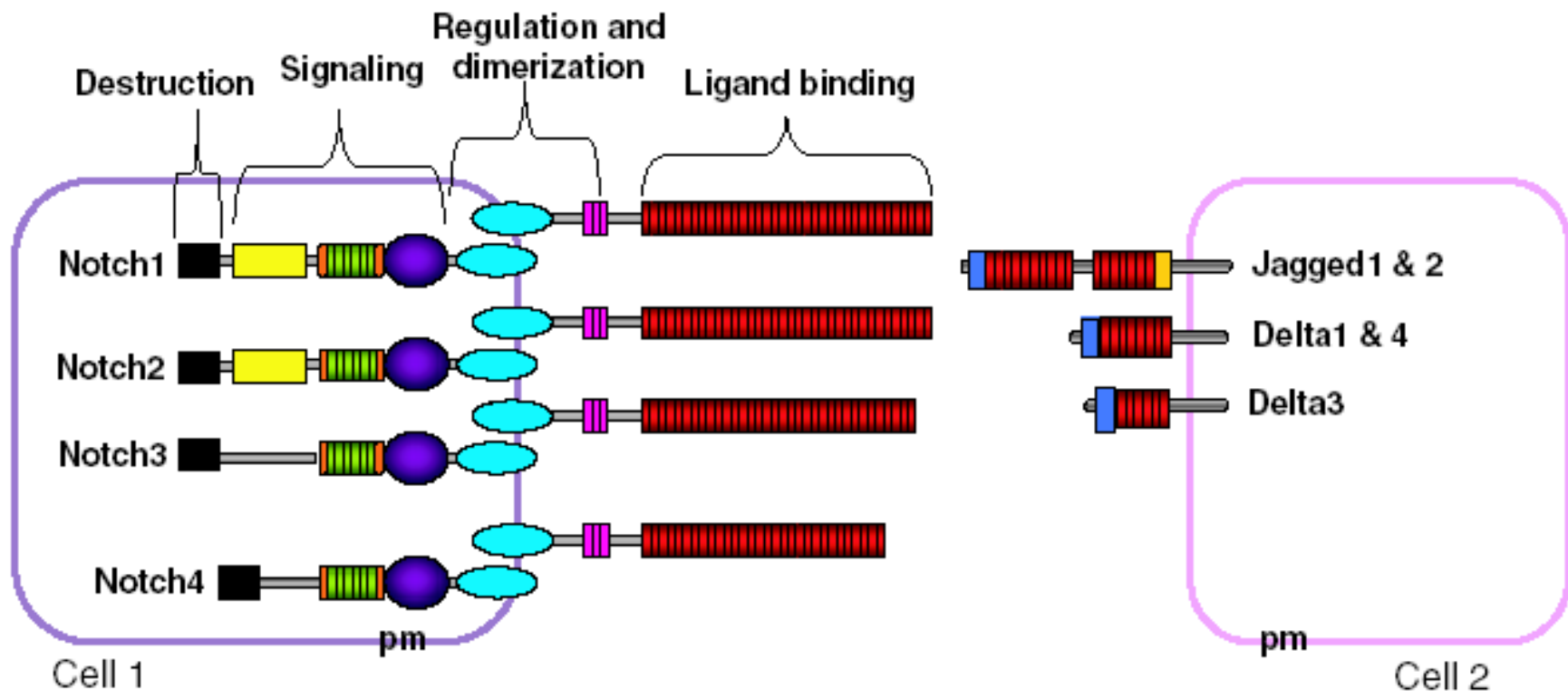


# Notch

- Notch=zářez – podle prvního fenotypu octomilky se zářezy na křídlech (T.H. Morgan, 1919)



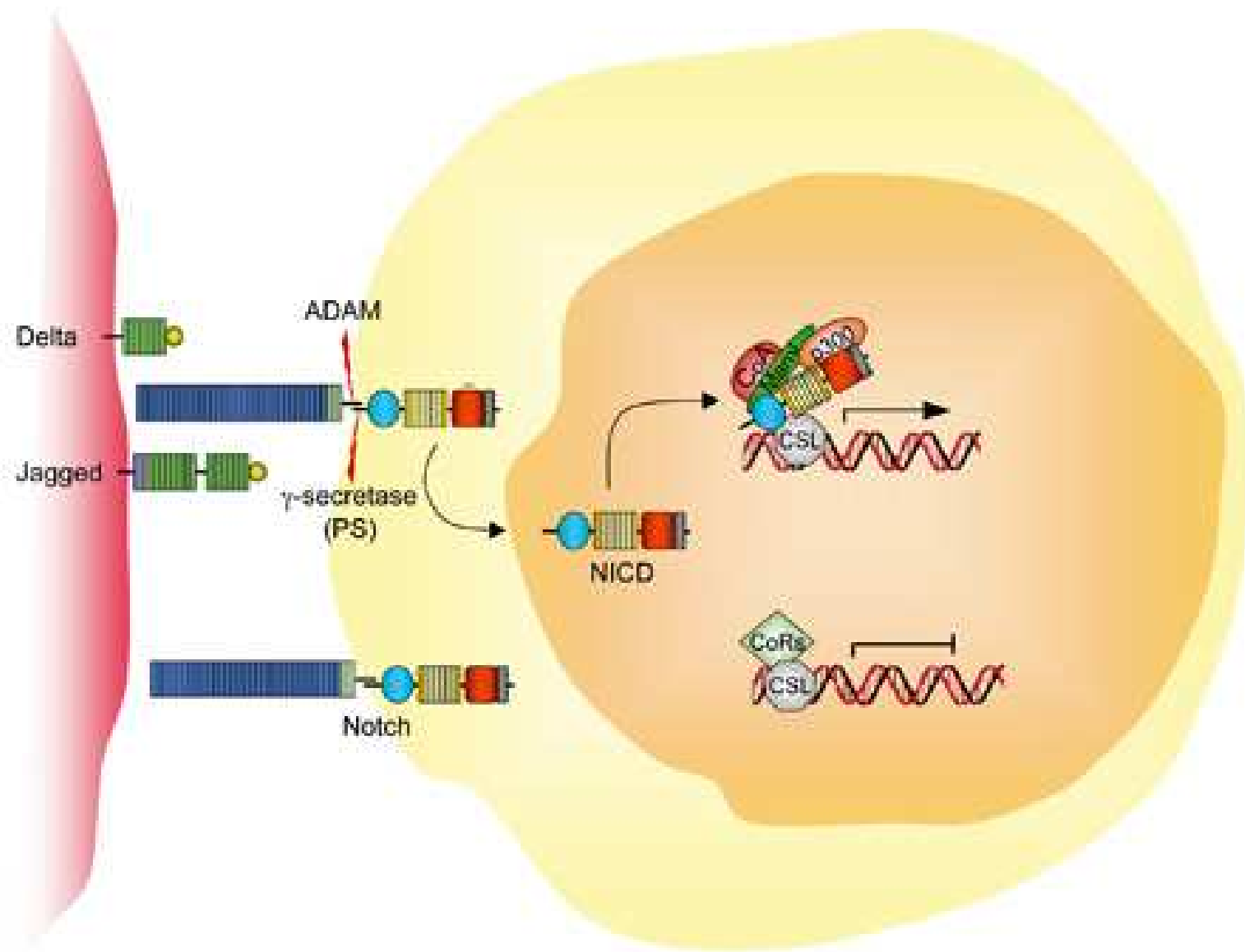
A



receptory Notch1-4

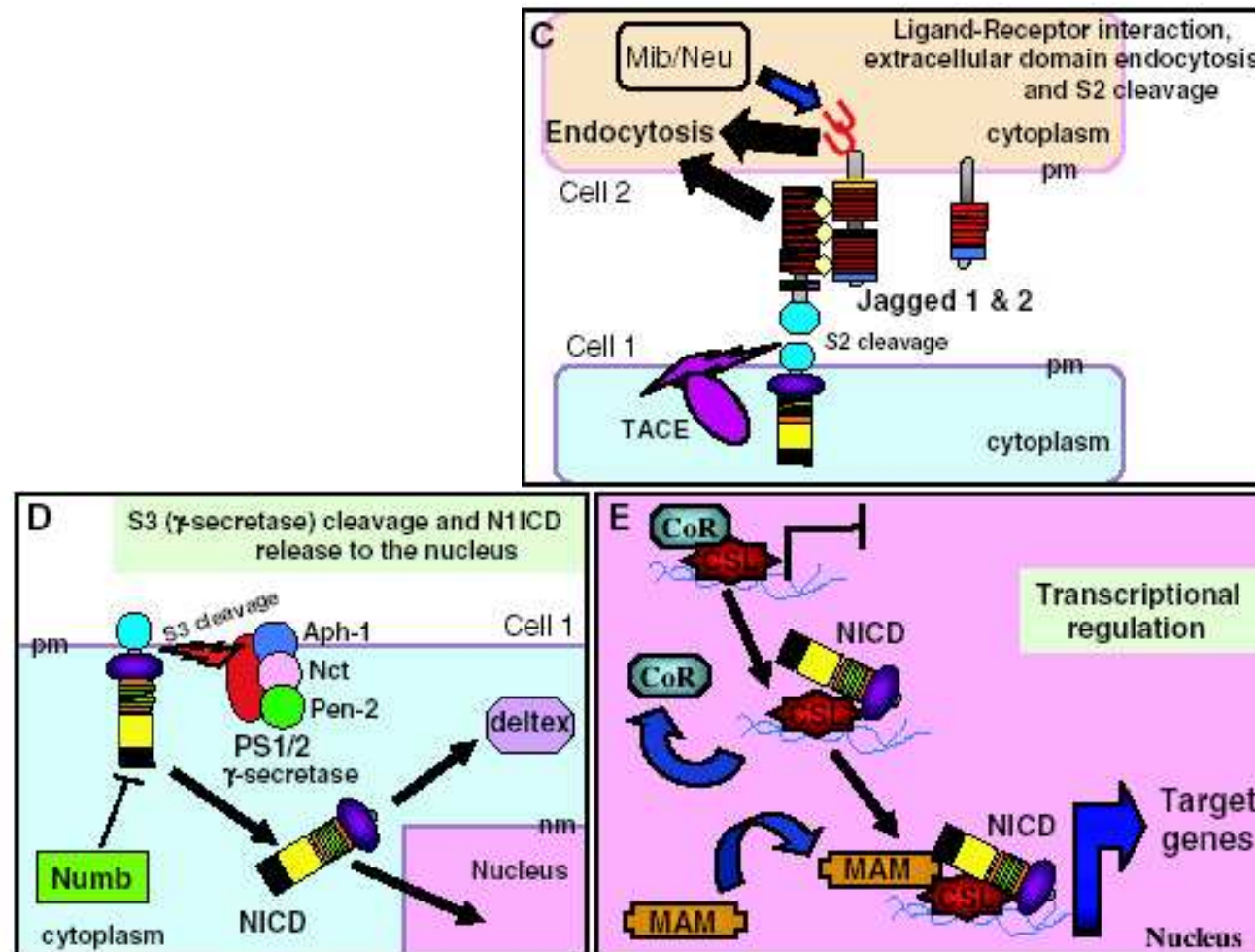
Notch ligandy – jsou vázány na buněčný povrch

# Notch dráha - overview





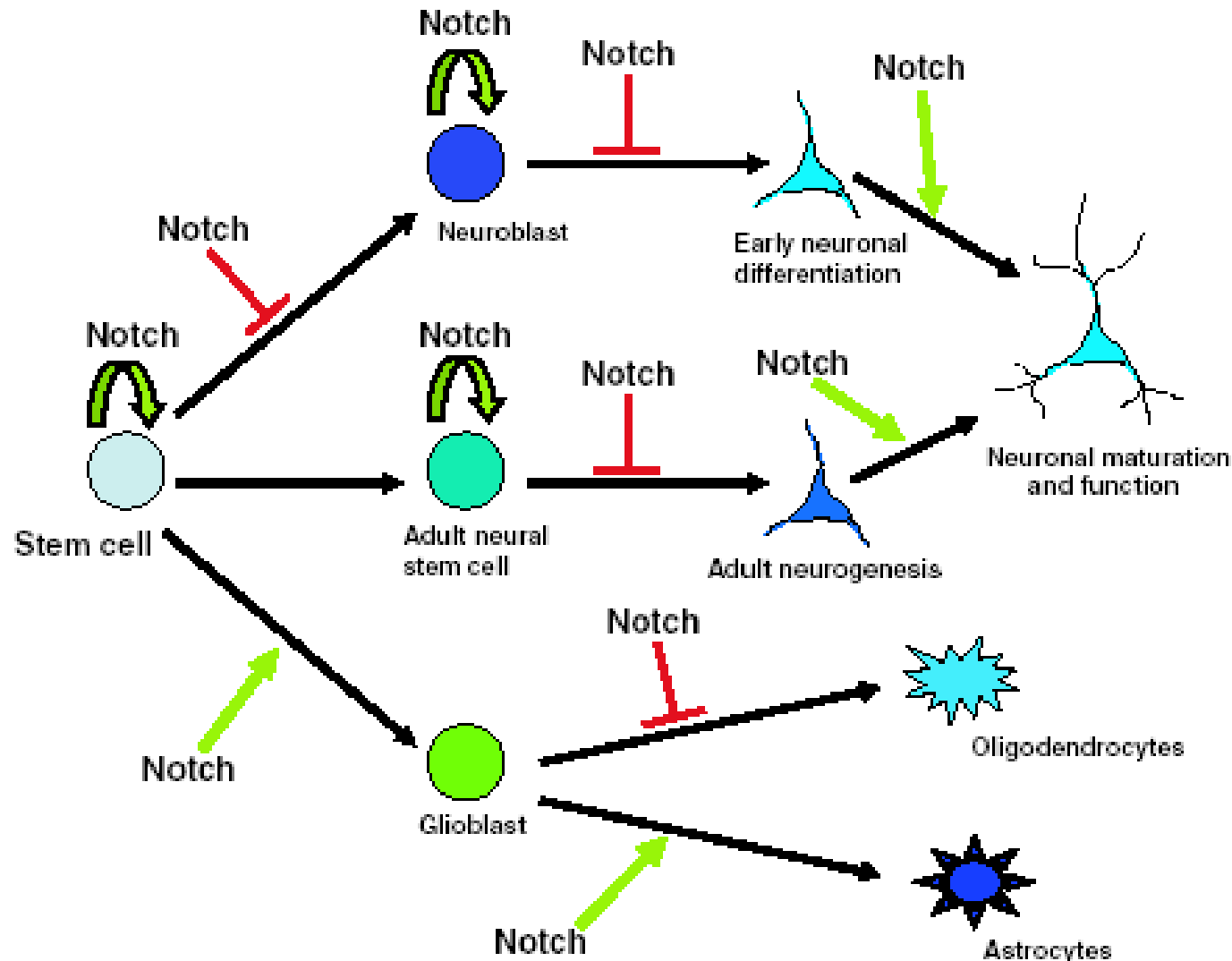
# Notch signalling step-by-step



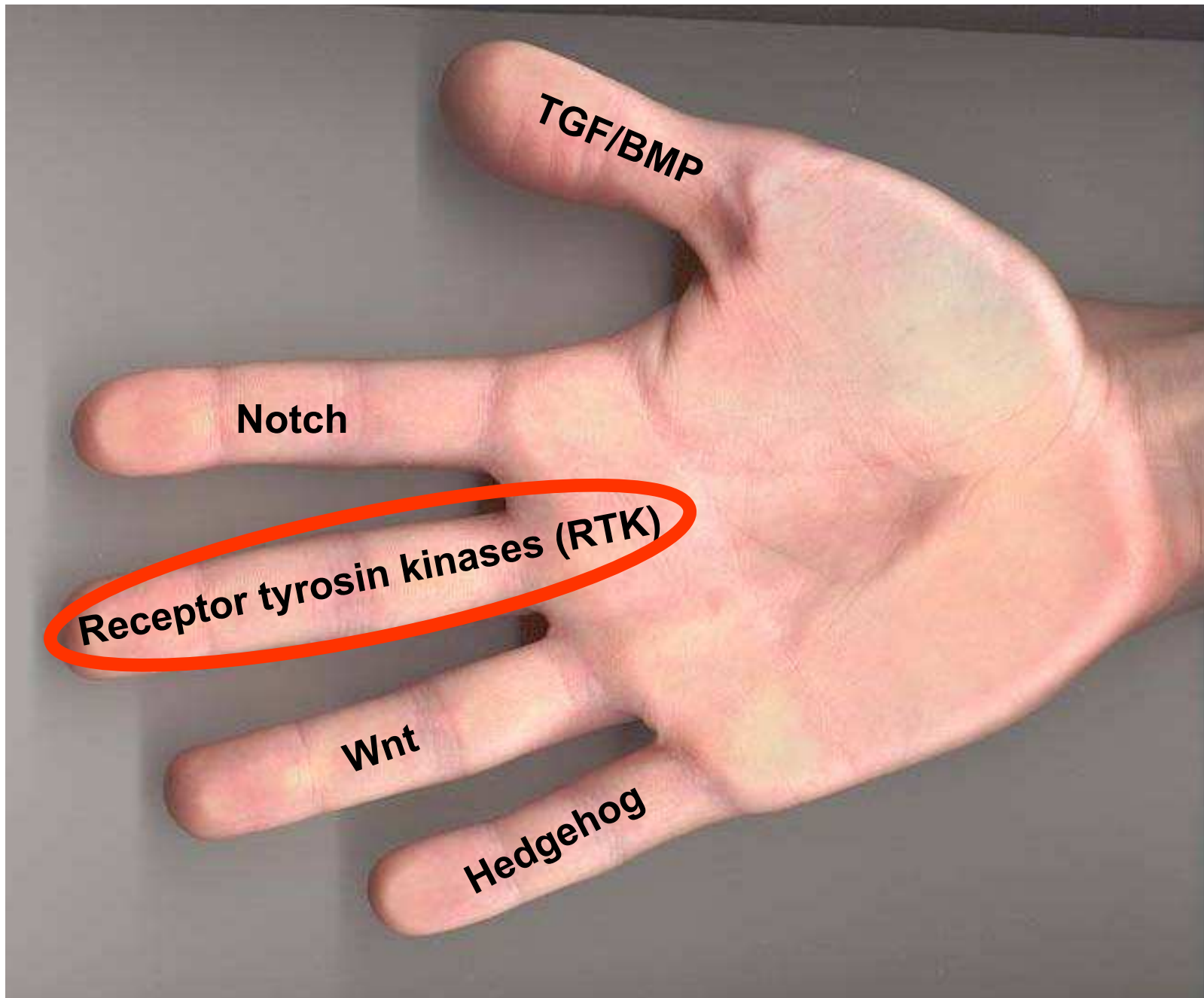
Notch is expressed in the cell membrane as a heterodimer. C, Binding to Delta or Jagged ligands initiates two consecutive proteolytic cleavage events; the first is mediated by the ADAM protease TACE and occurs on the extracellular side of Notch, near the transmembrane domain (site 2 cleavage). D, The second cleavage (S3) occurs within the transmembrane domain and is mediated by  $\gamma$ -secretase activity, a complex composed of four different integral membrane proteins: presenilin, nicastrin (Nct), Aph-1, and Pen-2 (286). NICD is released and translocates to the nucleus. In the cytoplasm, the Numb protein negatively regulates Notch signaling, possibly by promoting receptor turnover. Deltex proteins may transduce Notch signals independently of CSL. E, In the nucleus NICD binds to the CSL transcription factor, converting it from a transcriptional repressor into a transcriptional activator by displacing a CoR complex and recruiting coactivators such as MAML1 (MAM). This leads to transcriptional activation of downstream target genes. pm, Plasma membrane; nm, nuclear membrane.

Notch dráha, stejně jako ostatní morfogenetické systémy, reguluje (ať už negativně nebo pozitivně) jednotlivé vývojové procesy na několika stupních.

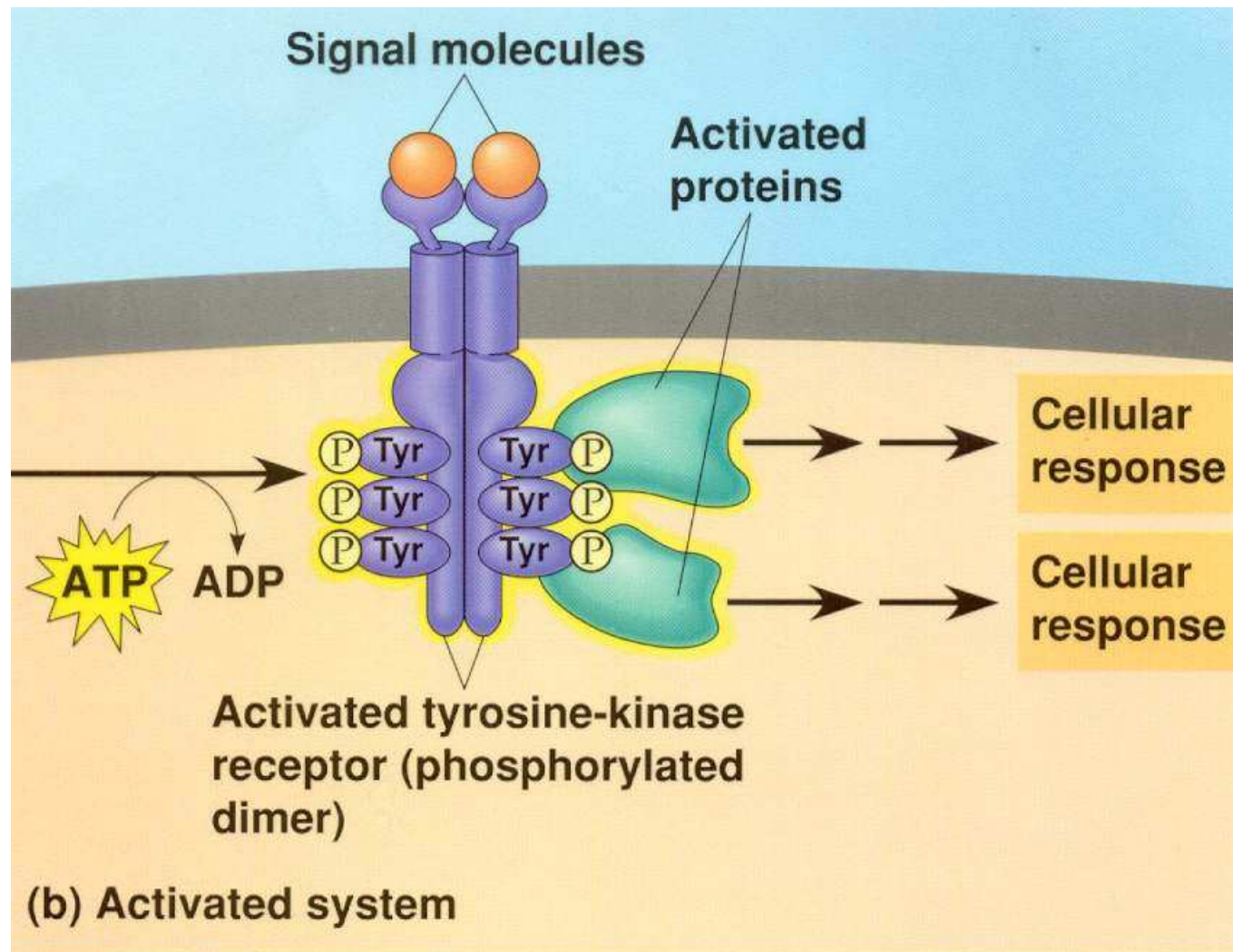
**Příklad: vývoj jednotlivých buněčných typů v nervovém systému**



# Signály z vnějšího prostředí



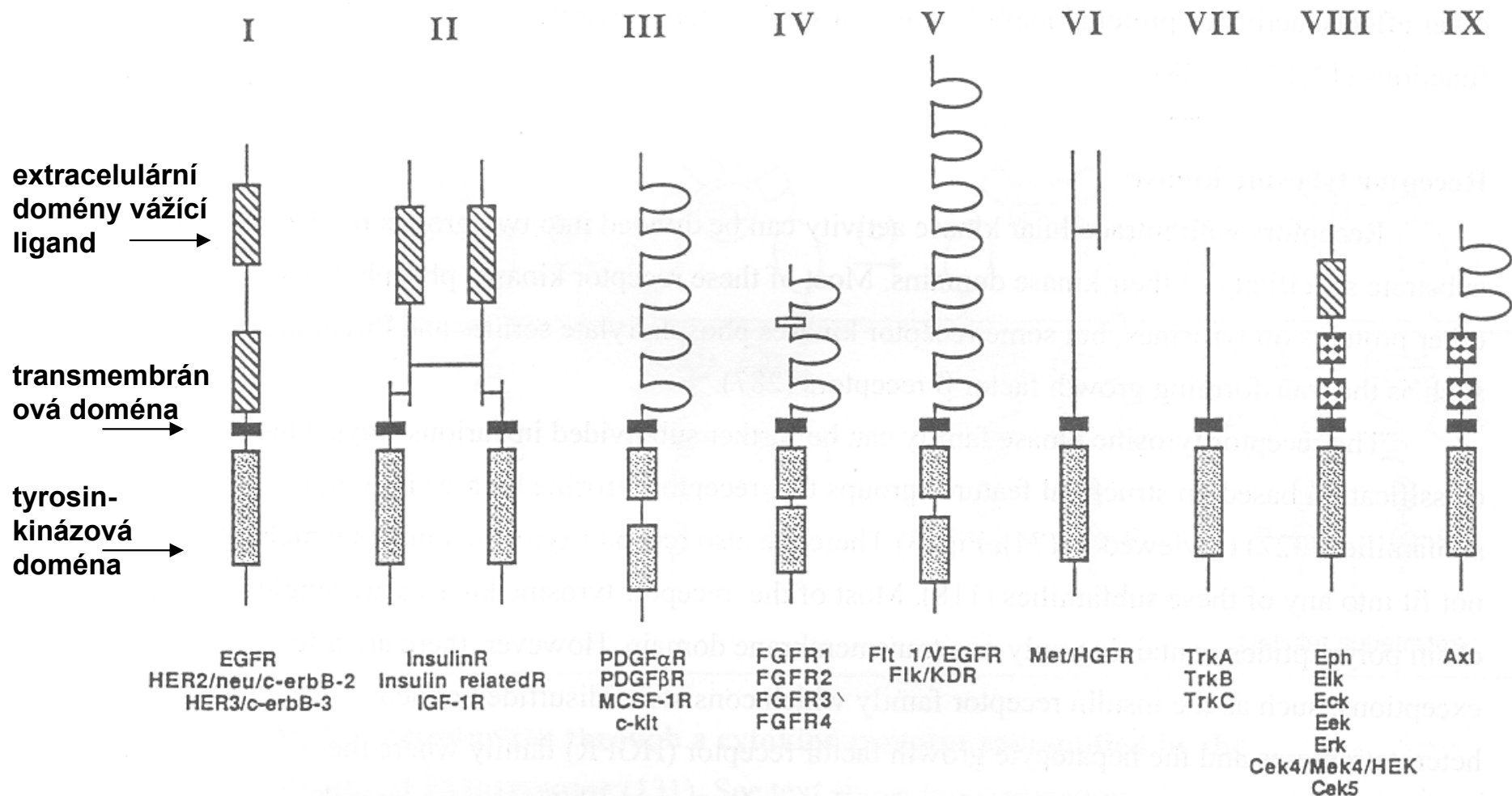
# Receptorové tyrosin kinázy (RTK)



# Hlavní skupiny RTKs:

- EGF (epidermal growth factor) receptor family
- Insulin receptor family
- PDGF (platelet-derived GF) receptor family
- FGF (fibroblast GF) receptor family – přednáška č. 9
- VEGF (vascular endothelial GF) receptor family
- HGF (hepatocyte GF) receptor family
- Trk receptor family
- Eph receptor family
- RET receptor family

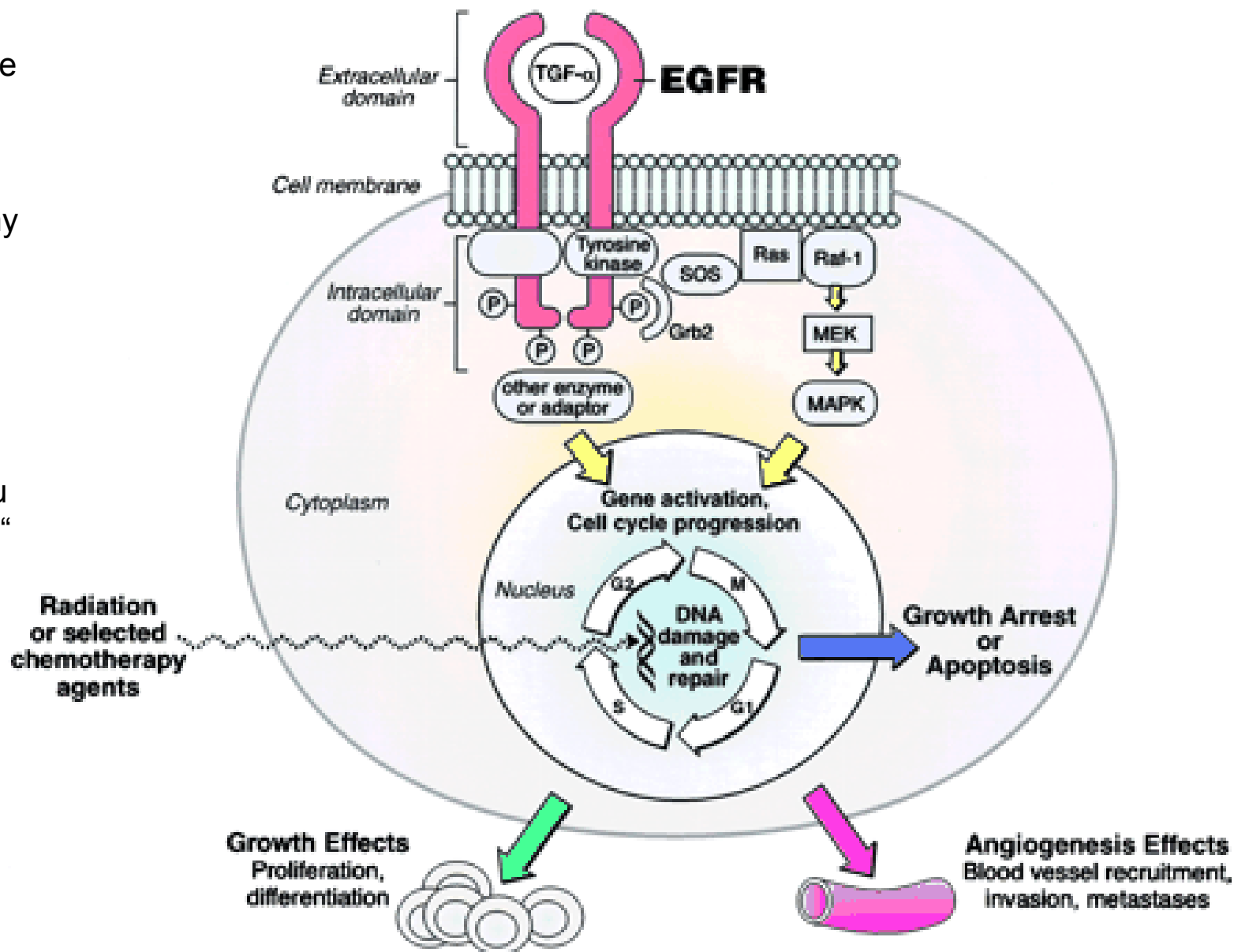
# Schematická struktura jednotlivých receptorů



# Obečné schéma aktivace RTKs

(zde na příkladu EGFR)

1. ligand se specificky váže na receptor
2. receptor dimerizuje
3. tyrosin-kinázové domény se navzájem fosforylují
4. autofosforylace vede k navázání (recruitment) adaptérových proteinů (zde Grb2)
5. v závislosti na receptoru se aktivují „downstream“ signální dráhy – zde např. Ras/Raf1/MEK/MAPK kinázová dráha,
6. která vede k regulaci transkripce

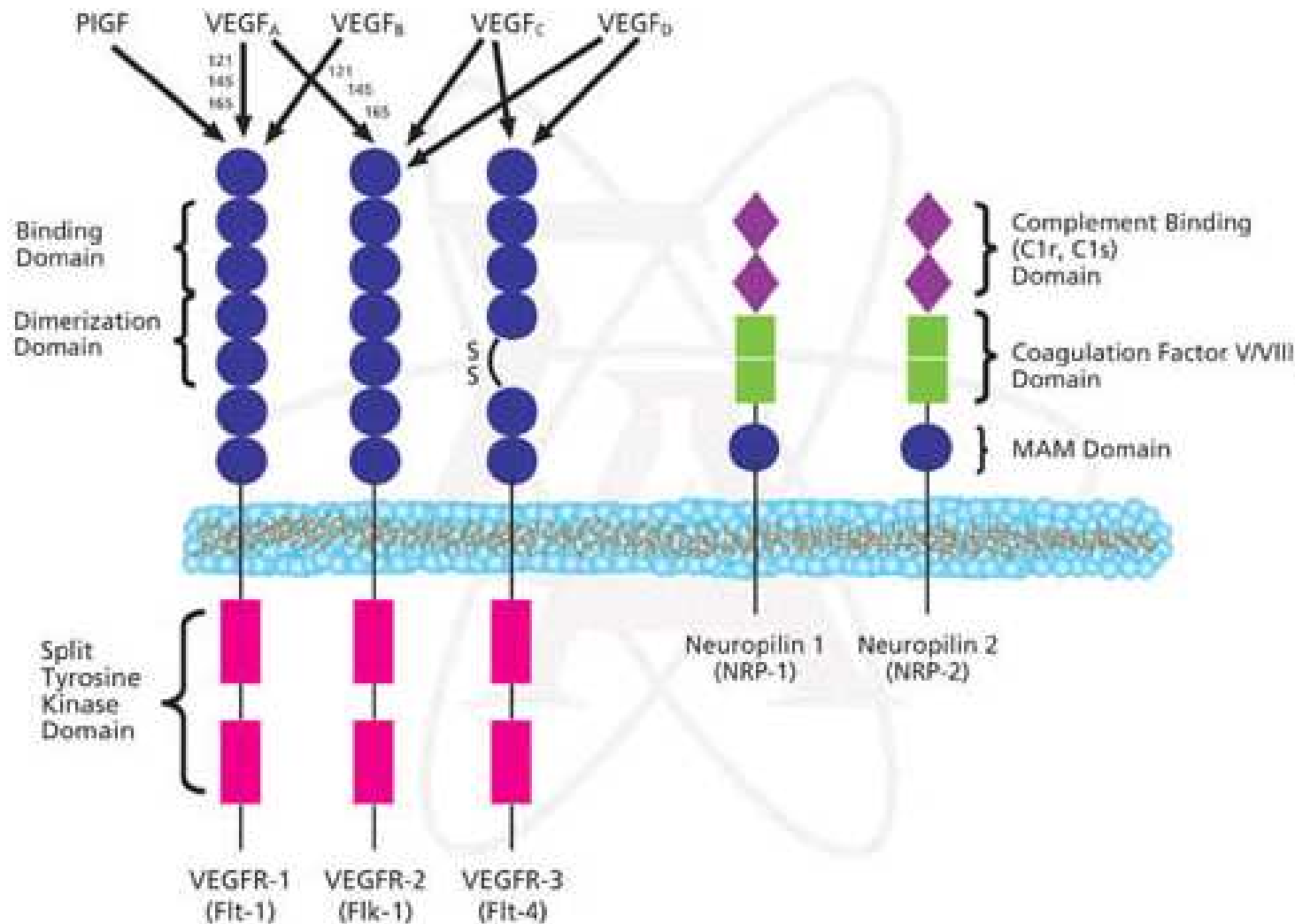


# Vybrané ligand:RTK receptorové systémy a jejich modelové funkce ve vývoji

- VEGF/VEGFR
  - ephrin/Eph
  - Trk family
- FGF/FGFR – viz přednáška č. 9



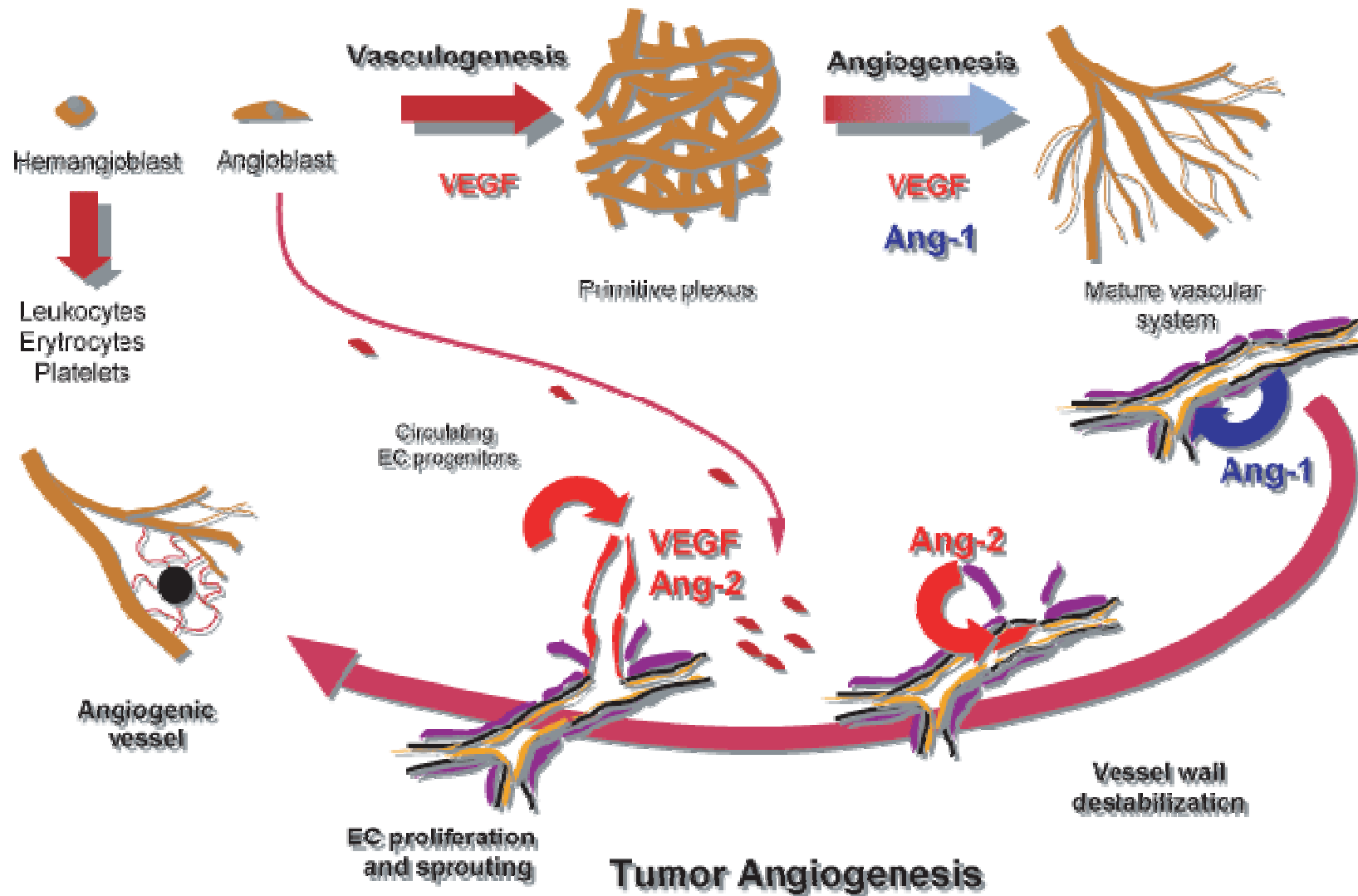
# Vascular endothelial growth factors (VEGF) a jejich receptory (VEGFR)



# VEGF/VEGFR ve vývoji

- reguluje vznik a vývoj cévní soustavy
- hypoxie (=nedostatek kyslíku) indukuje HIF (hypoxia-induced factor), který reguluje produkci VEGF.
- VEGF je schopen regulovat vznik de novo cév v hypoxické části embrya
- - podobný mechanismus se uplatňuje i při onkogenezi, kde VEGF podporuje prokrvení nádorů a tím podporuje jejich růst

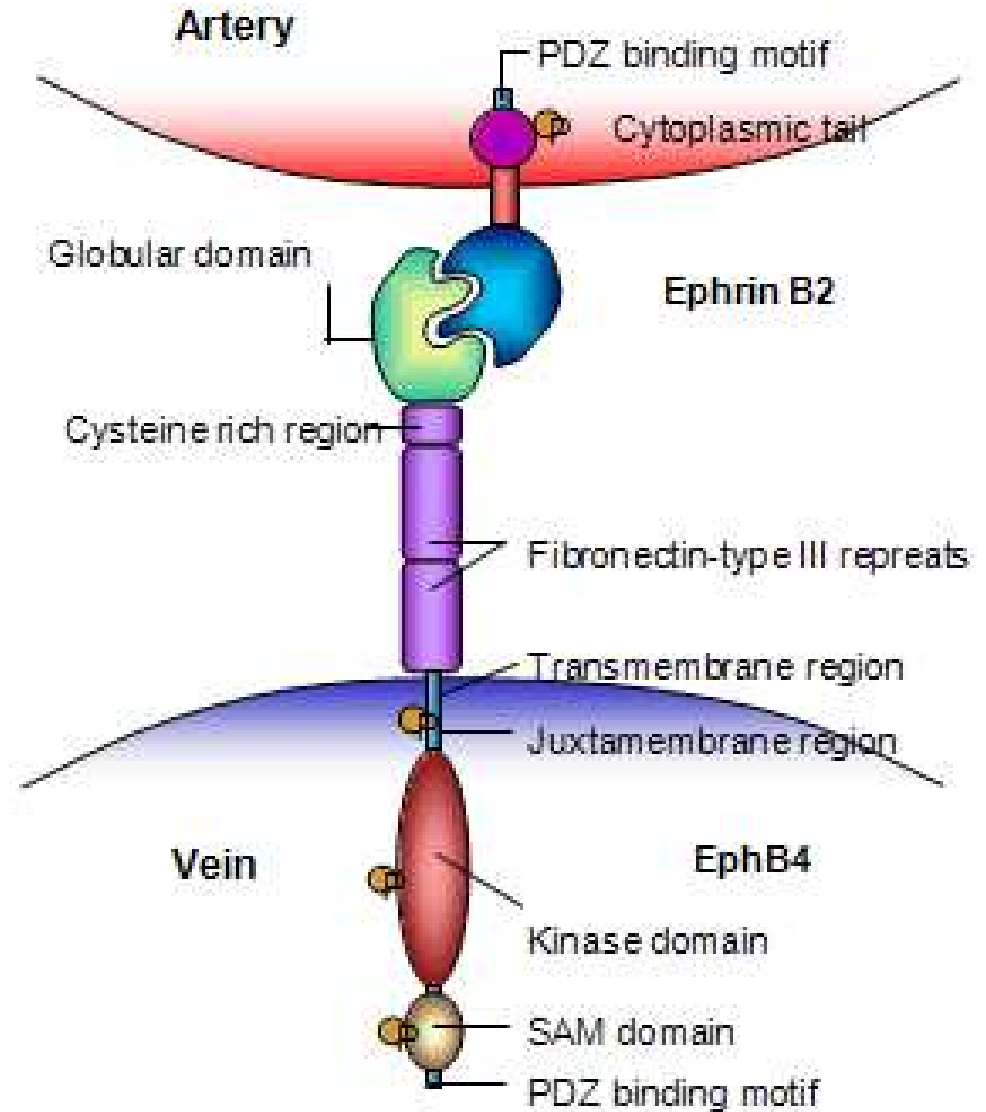
## Developmental Angiogenesis



Blood vessel formation and tumor angiogenesis. During development, VEGF induces differentiation and proliferation of endothelial cells from its progenitors (the hemangioblast and angioblast) to form a poorly differentiated primitive vascular plexus (vasculogenesis). Angiopoietin-1 (Ang-1) and other morphogens (e.g. Ephrins-Eph) induce remodeling of the vascular plexus into a hierarchically structured mature vascular system through endothelial cell sprouting, trimming differentiation and pericytes recruitment (angiogenesis). During tumor angiogenesis, angiopoietin-2 (Ang-2) destabilizes the vessel wall of mature vessels. Quiescent endothelial cells become sensitive to VEGF (or other angiogenic factors), proliferate and migrate to form new vessels. Bone marrow-derived endothelial cell progenitors are found in the peripheral blood and can recruit at sites of angiogenesis.

# Eph/ephrin komplex

- ephrin – jsou membránově vázané ligandy (podobně jako ligandy Notch dráhy)
- ephriny A – na membráně upevněny pomocí tzv. GPI kotvy
- ephriny B – transmembránové ligandy, které samy jsou schopny signálovat do buňky
- Eph/ephrin systém je zapojen zejména do „navigace“ buněk (např. buněk cév) či jejich částí (např. navádění axonů v nervové soustavě) ve vyvíjejícím se embryu. Jde o obecný mechanismus regulující migraci buněk.



Schematic representation of EphB4 and Ephrin B2 structures

## Eph/ephrin

při „axon guidance“ tj. navádění jednotlivých axonů v nervovém systému

- axon repulsion tj. vazba ephrinu na Eph indukuje odklon axonu z místa, kde k této interakci dochází

-reverse signalling – tj. nesignáluje jen receptor, ale i ligand

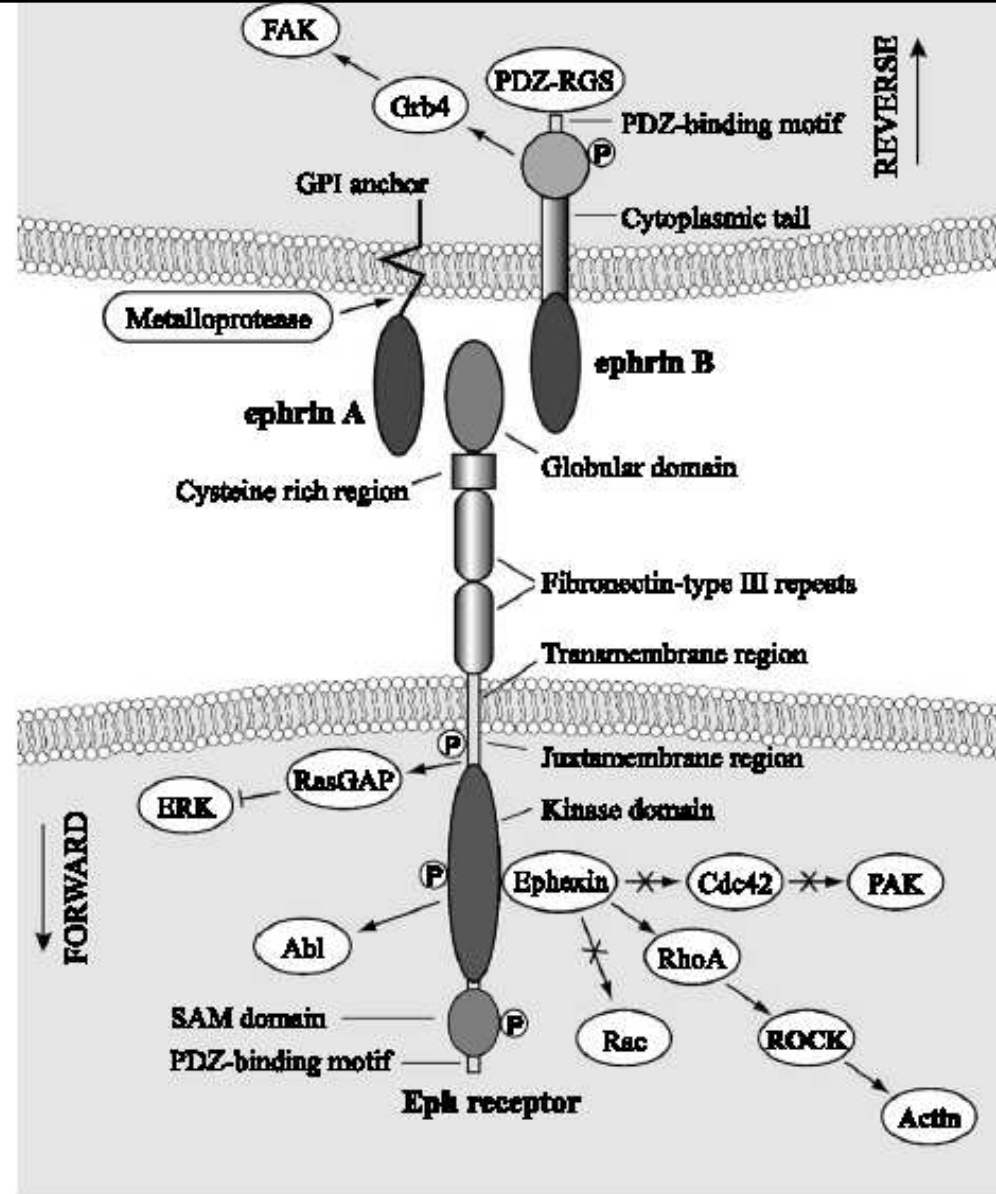
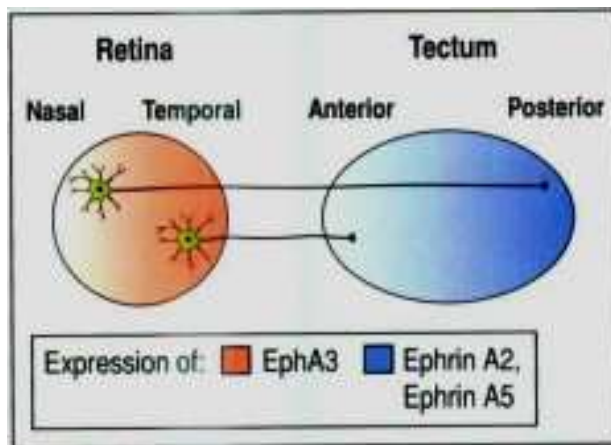
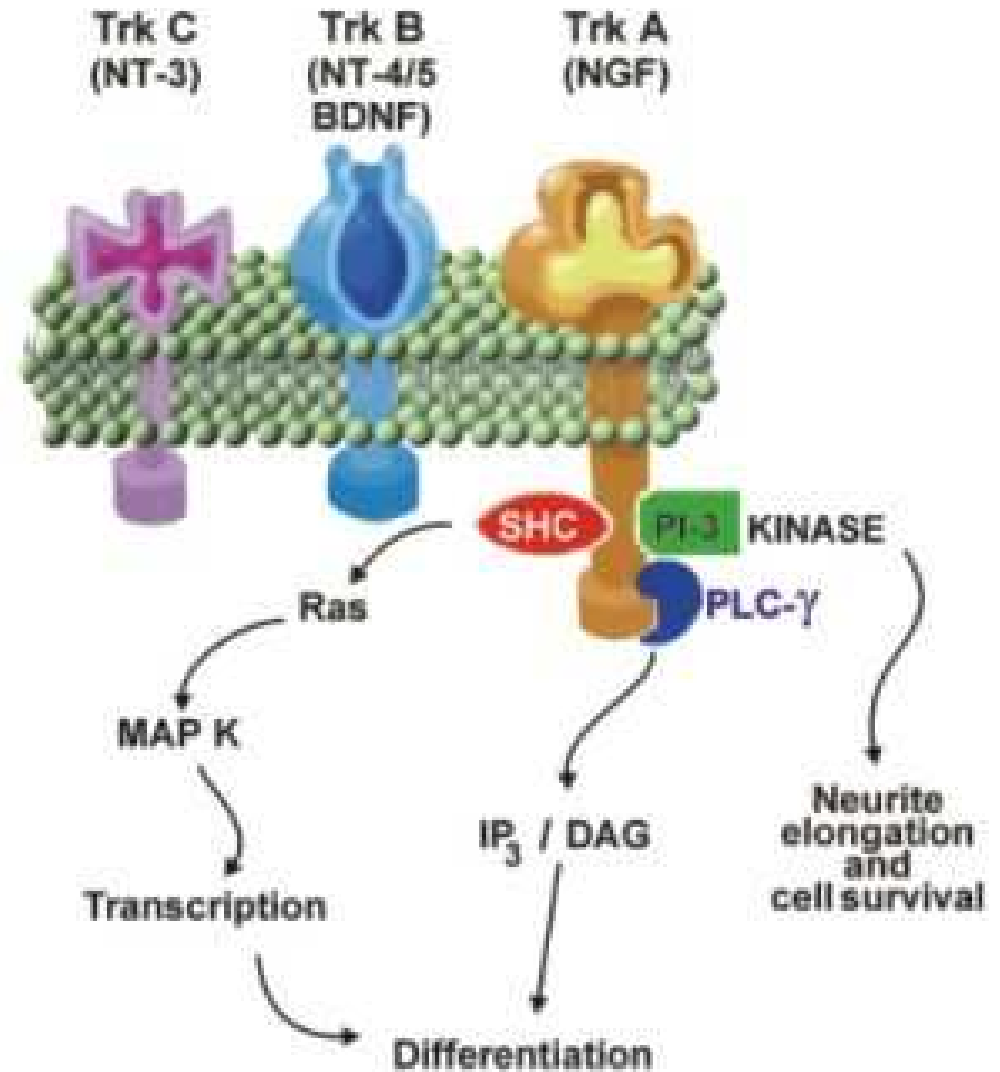


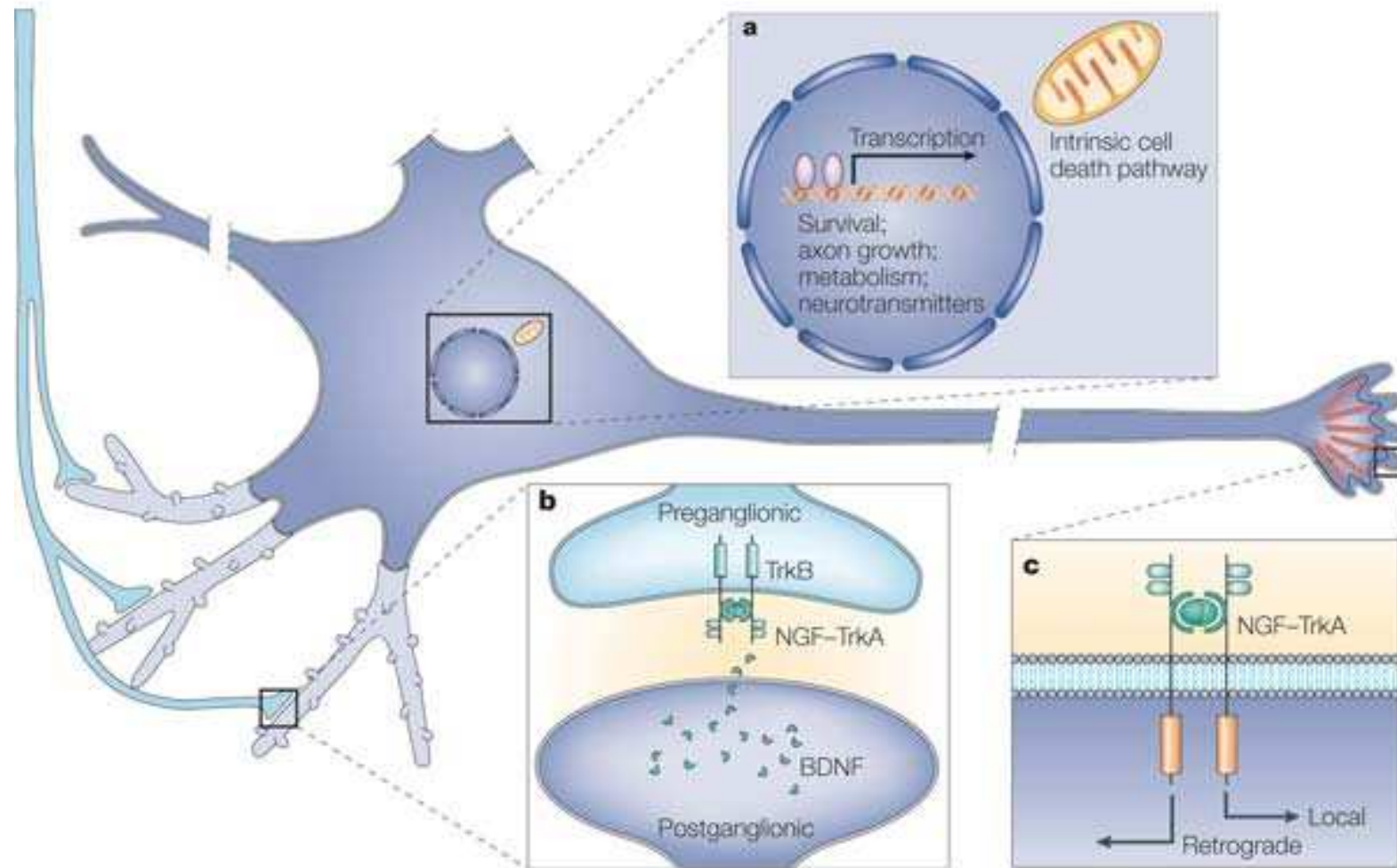
Fig. 1. Forward and reverse signaling by the ephrin–Eph complex. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored ephrin-A<sub>s</sub> bind to EphA receptors whereas the transmembrane ephrin-B<sub>s</sub> bind to EphB receptors. The ephrin–Eph receptor binding initiate forward signaling in the Eph receptor bearing cells and reverse signaling in the cells that express ephrins. Major events associated with forward signaling involve the exchange factor ephexin, which links the Eph receptor with the Rho GTPases and then to regulation of actin remodeling. Other important events implicate the inactivation of focal adhesion kinase (FAK) and decreased integrin-mediated adhesion through activation of the phosphatases Shp2 by EphA. In contrast, the recruitment of the adaptor protein Nck to EphB and the activation of Src are associated with increased integrin-mediated adhesion. Reverse signaling by ephrin-B<sub>s</sub> is characterized by the recruitment of SH2 domain containing protein such as Grb4 to phosphotyrosine residues on ephrin-B<sub>s</sub>. PDZ-RGS3 are PDZ-binding proteins that bind to ephrin-B<sub>s</sub> to modulate signaling through G-protein-coupled receptors. In the case of ephrin-A<sub>s</sub>, the reverse signaling implies their aggregation with signaling molecules in membrane raft microdomains. Interestingly, their activity can be modulated by enzymatic cleavage by metalloproteases. SAM, sterile  $\alpha$  motif; PDZ, PSD-95 disc large zonula occludens-1. Reproduced with permission from Nature Reviews Molecular Cell Biology, Kullander and Klein. Copyright 2002 Macmillan Magazines Ltd. (Kullander and Klein (2002)).

# Trk (tropomyosine-related kinase)

- tři receptory exprimované v nervovém systému – TrkA, TrkB a TrkC
- specificky váží neurotrofické peptidy – NT3-5, BDNF=brain derived neurotrophic factor, NGF=neural growth factor



Neurotrofní látky – podporují přežívání neuronů – a tak regulují vzájemné propojení nervových buněk (po lopatě – neuron, který není synapticky spojen s jiným zahnve)

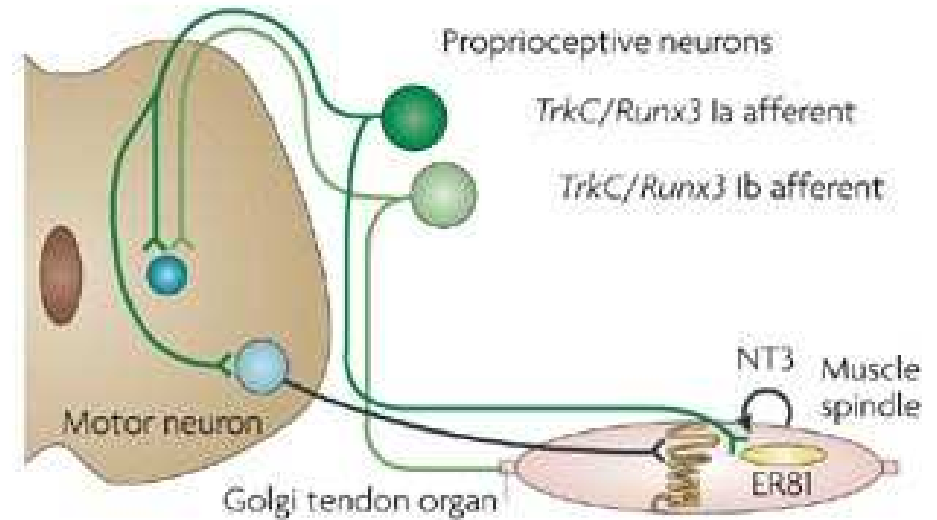
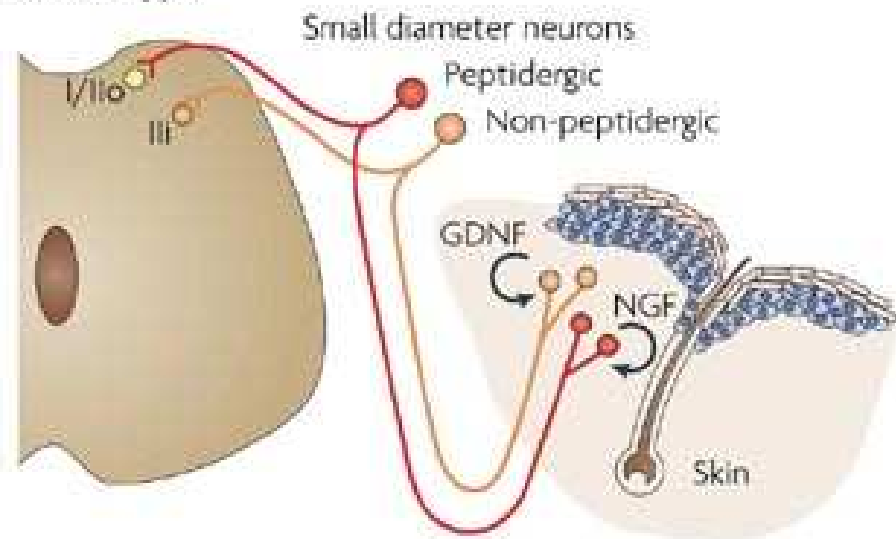


Nature Reviews | Neuroscience

a | Neurotrophin signalling events initiated in developing axons signal retrogradely to neuronal cell bodies to inhibit intrinsic cell death pathways. These signalling events also influence transcriptional programs that are involved in cell survival, axon growth, synaptogenesis, metabolism and the establishment of neurotransmitter and neuropeptide phenotypes. b | The establishment of pre- and postganglionic synaptic contacts in sympathetic neurons is influenced by retrograde nerve growth factor (NGF)–TrkA signalling. A potential synaptogenic signal downstream of retrograde NGF–TrkA signalling is the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF). BDNF regulates the formation and maintenance of presynaptic contacts by signalling trans-synaptically to TrkB receptors on preganglionic sympathetic neurons. c | Neurotrophin-dependent axon growth is supported by both local and retrograde signalling through the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signalling pathways. Retrograde neurotrophin signalling also regulates axon growth and target innervation through the activation of transcriptional programs.

# TrkA/C systém determinuje synaptická spojení v periferním nervstvu

a Wild type

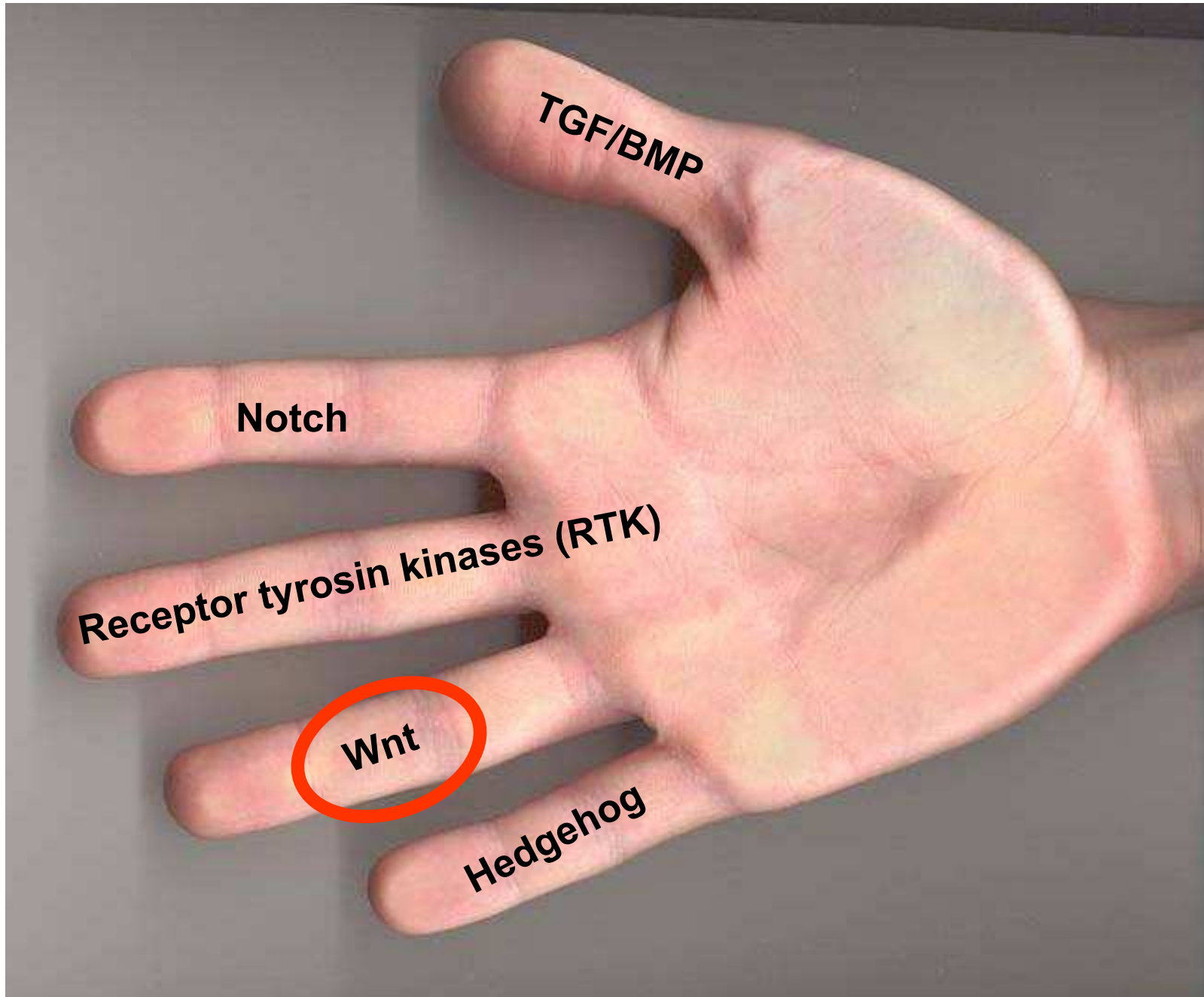


nociceptory (receptory bolesti) – jsou determinovány expresí TrkA a přežívají díky NGF v kůži

proprioceptory (receptory polohy/napětí svalu) – jsou determinovány expresí TrkC a přežívají díky NT3 ve svalu



# Signály z vnějšího prostředí

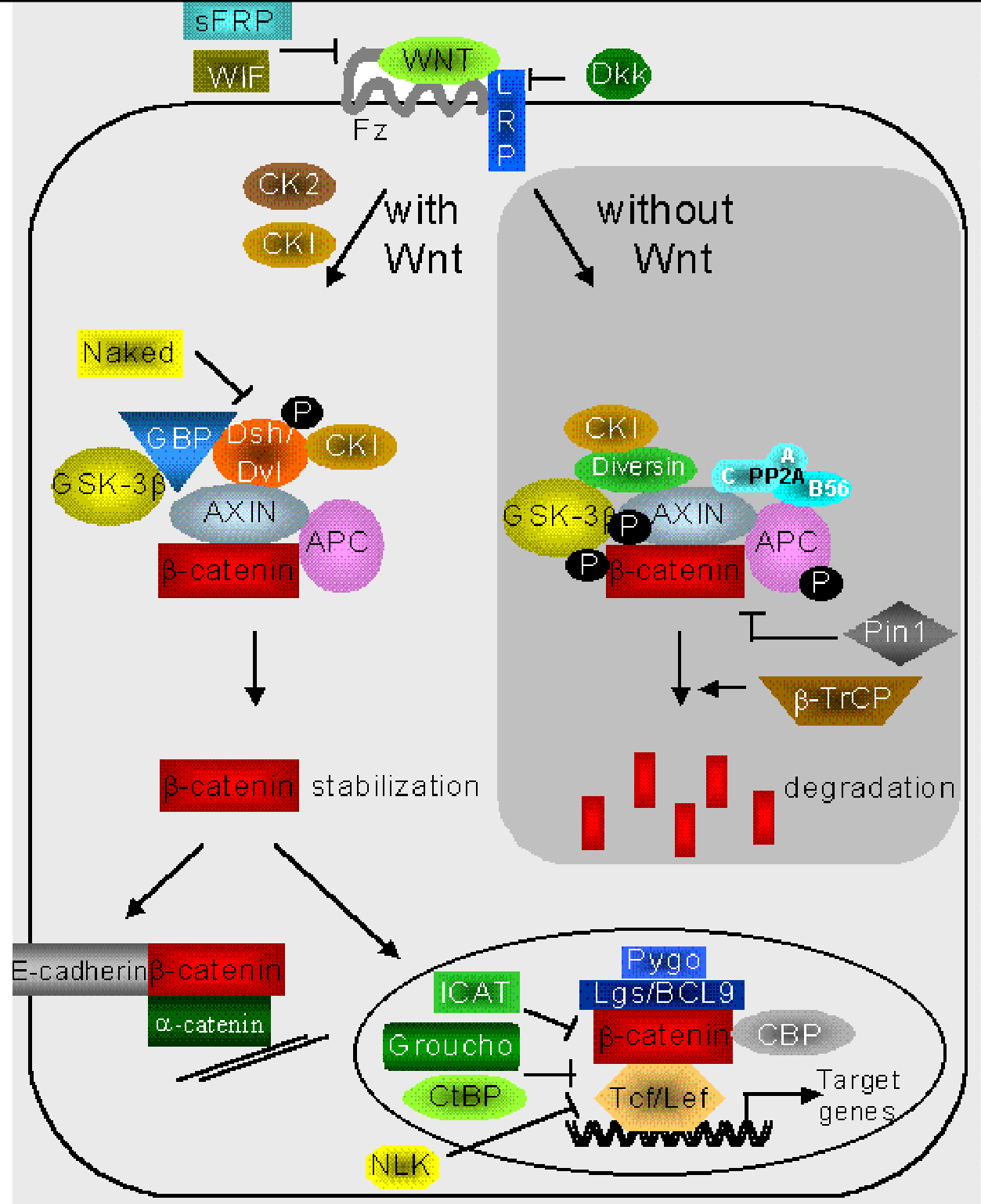


# Wnts – viz přednáška č. 10

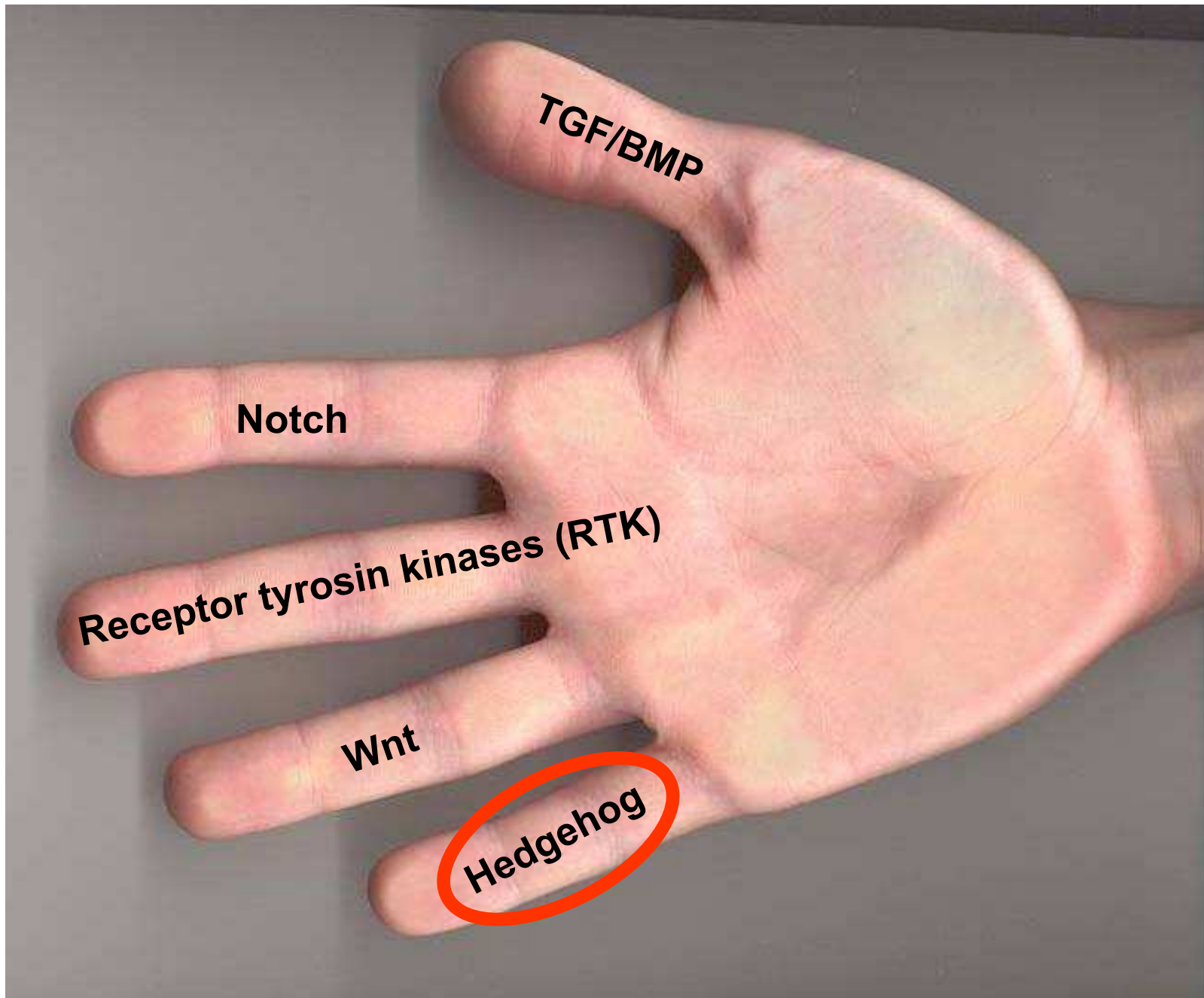
- rodina ligandů
- 19 členů u člověka a myši
- glykosylované a palmitoylované extracelulární proteiny
- Název: z Wingless – první mutace u Drosophily a Int – onkogen přenášený MMTV-virem a způsobující prsní karcinomy

# Wnt/ $\beta$ - kateninová dráha

- nejlépe poznaná
- Wnt=ligand
- Frizzled=receptor
- beta-katenin je hlavní součástí této dráhy, po aktivaci aktivuje ve spolupráci s dalšími faktory transkripci

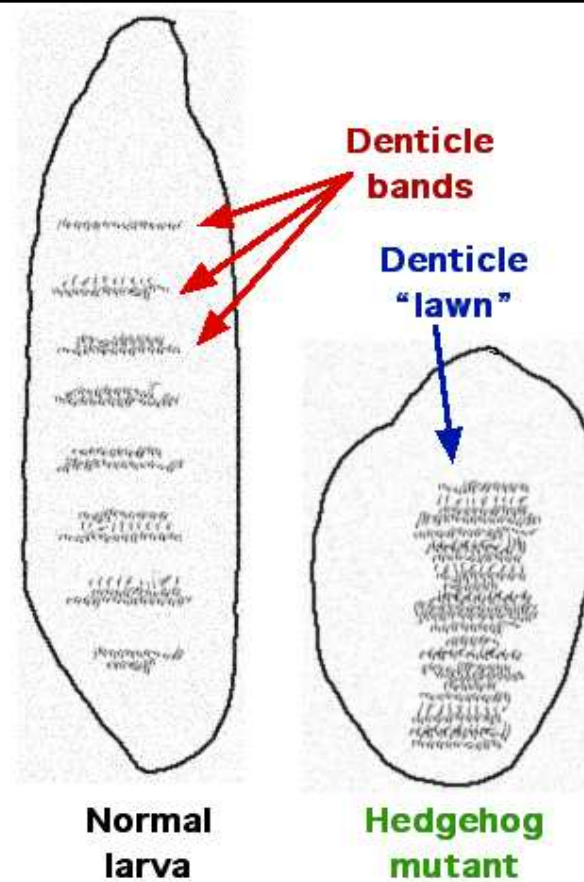


# Signály z vnějšího prostředí



# Hedgehog dráha

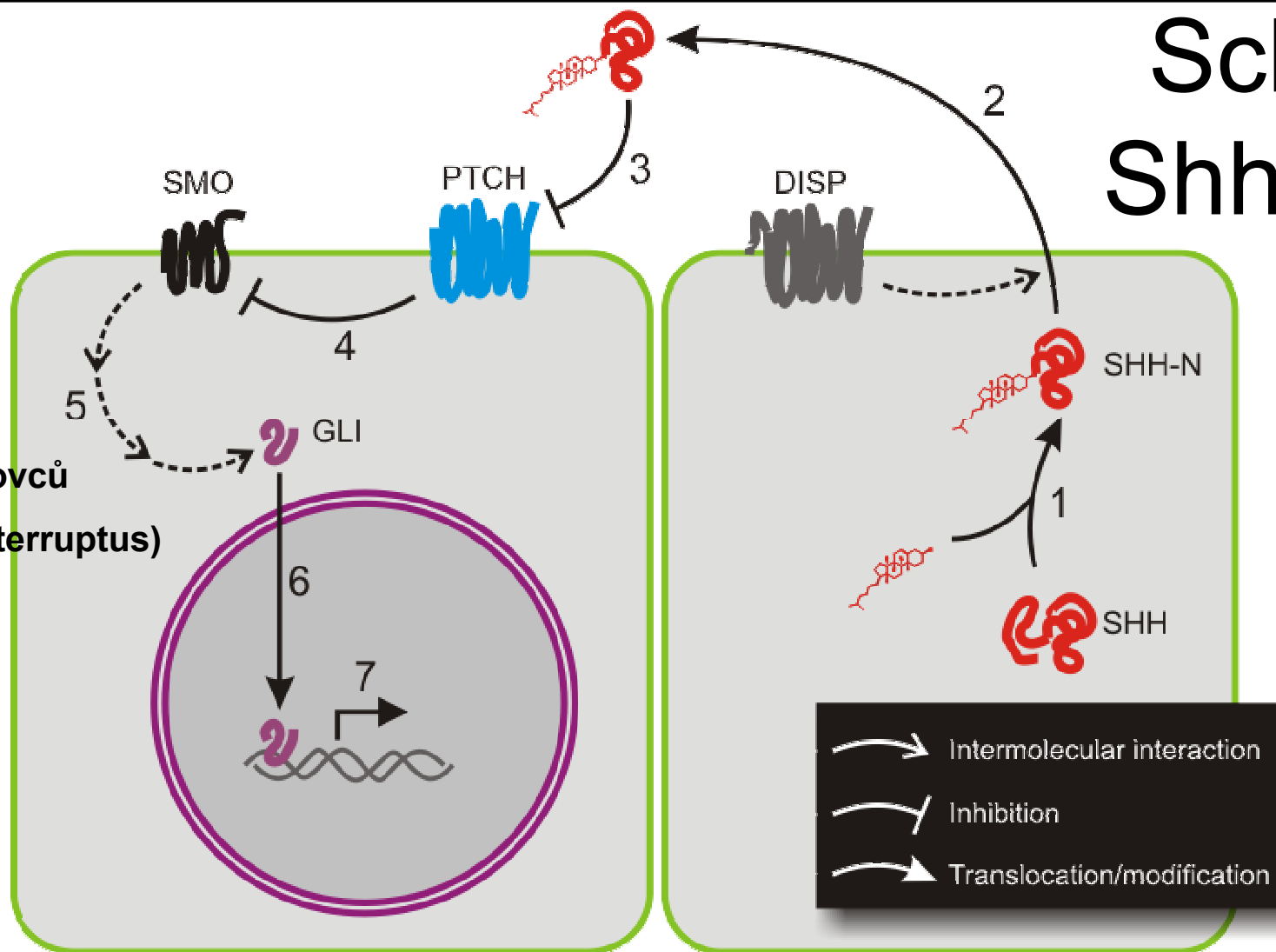
- hedgehog (Hh) u octomilky – název „ježek“ podle fenotypu larvy
- u savců jsou tři homology – sonic hedgehod (Shh), indian hedgehog (Ihh) a desert hedgehog (Dhh)



Sonic the Hedgehog

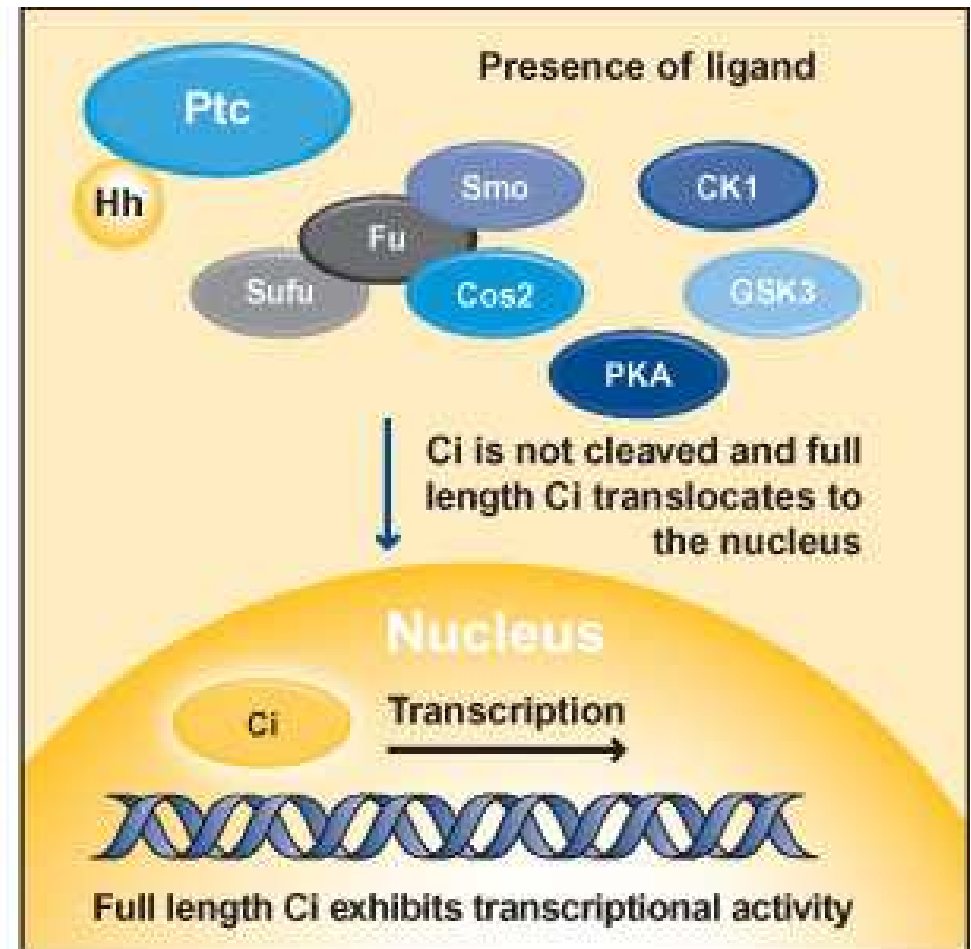
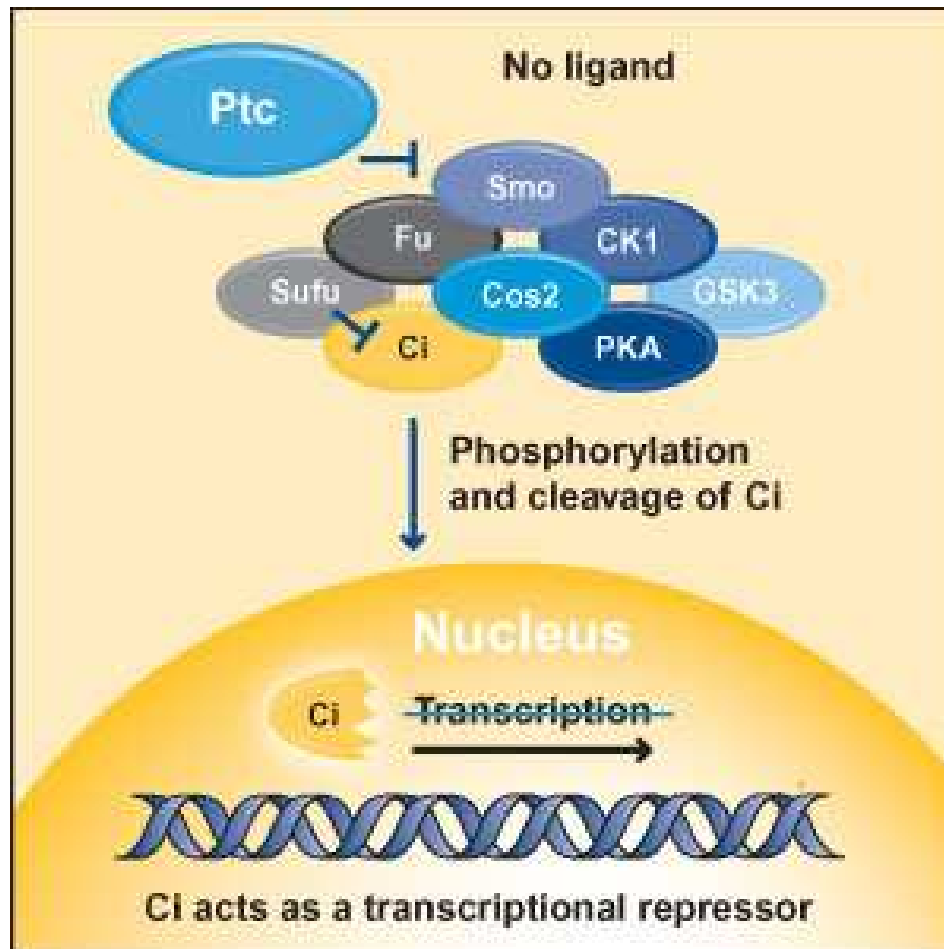
# Schéma Shh dráhy

Gli – u obratlovců  
 Ci (cubitus interruptus)  
 u octomilky

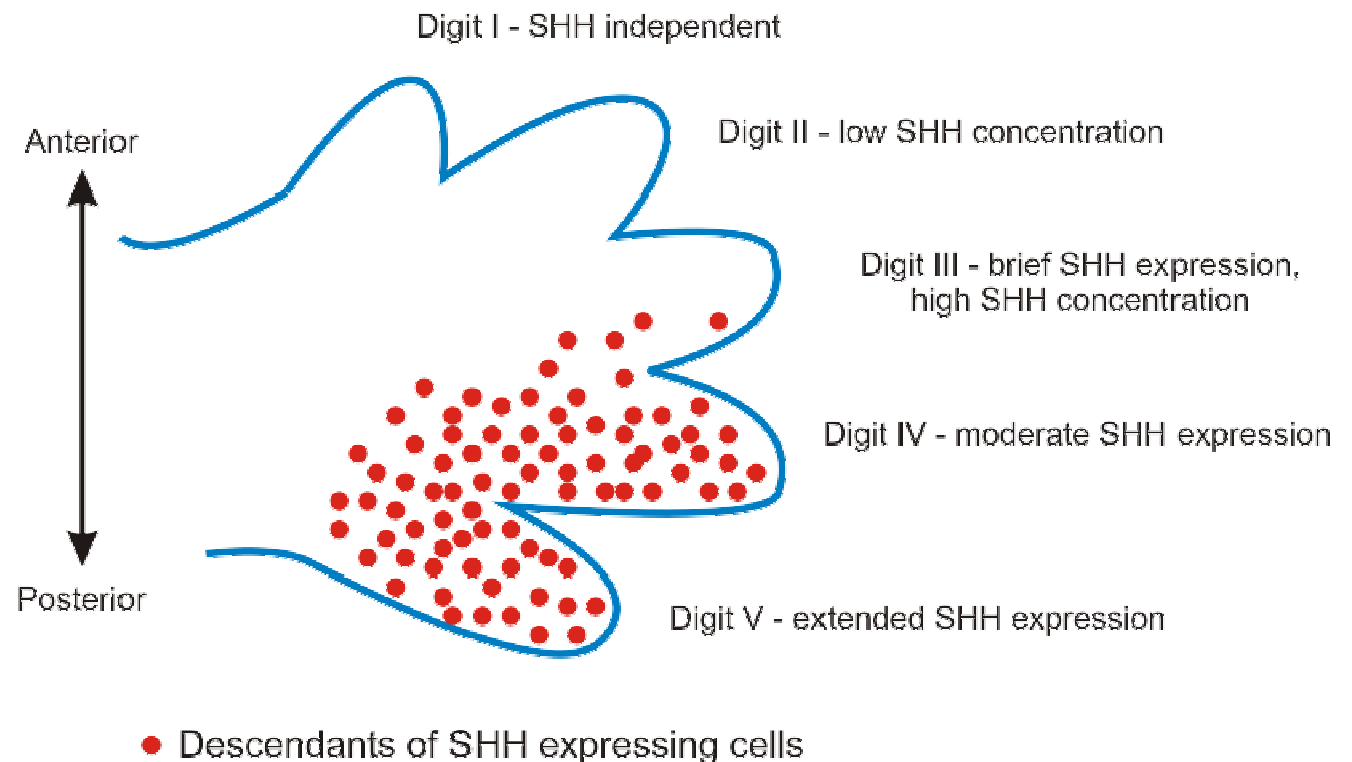


[Sonic hedgehog](#) (SHH) is [translated](#) as a ~45kDa precursor and undergoes [autocatalytic](#) processing to produce an ~20kDa N-terminal signaling domain (referred to as SHH-N) and a ~25kDa C-terminal domain with no known signaling role (1 on figure 5). During the cleavage, a [cholesterol](#) molecule is added to the carboxyl end of the N-terminal domain, which is involved in trafficking, secretion and receptor interaction of the ligand. When SHH reaches its target cell, it binds to the [Patched-1](#) (PTCH1) receptor(3). In the absence of ligand, PTCH1 inhibits Smoothened (SMO), a downstream protein in the pathway(4). It has been suggested that SMO is regulated by a small molecule, the cellular localisation of which is controlled by PTCH. PTCH1 has a sterol sensing domain (SSD), which has been shown to be essential for suppression of Smo activity. A current theory of how PTCH regulates SMO is by removing oxysterols from SMO. PTCH acts like a sterol pump and remove oxysterols that have been created by 7-dehydrocholesterol reductase. Upon binding of a Hh protein or a mutation in the SSD of PTCH the pump is turned off allowing oxysterols to accumulate around SMO. This accumulation of sterols allows SMO to become active or stay on the membrane for a longer period of time. The binding of SHH relieves SMO inhibition, leading to activation of the GLI transcription factors(5): the [activators](#) [Gli1](#) and [Gli2](#) and the [repressor](#) [Gli3](#). The sequence of molecular events that connect SMO to GLIs is poorly understood. Activated GLI accumulates in the nucleus(6) and controls the transcription of hedgehog target genes(7).

# Schéma aktivace transkripčního faktoru Ci (= Gli)



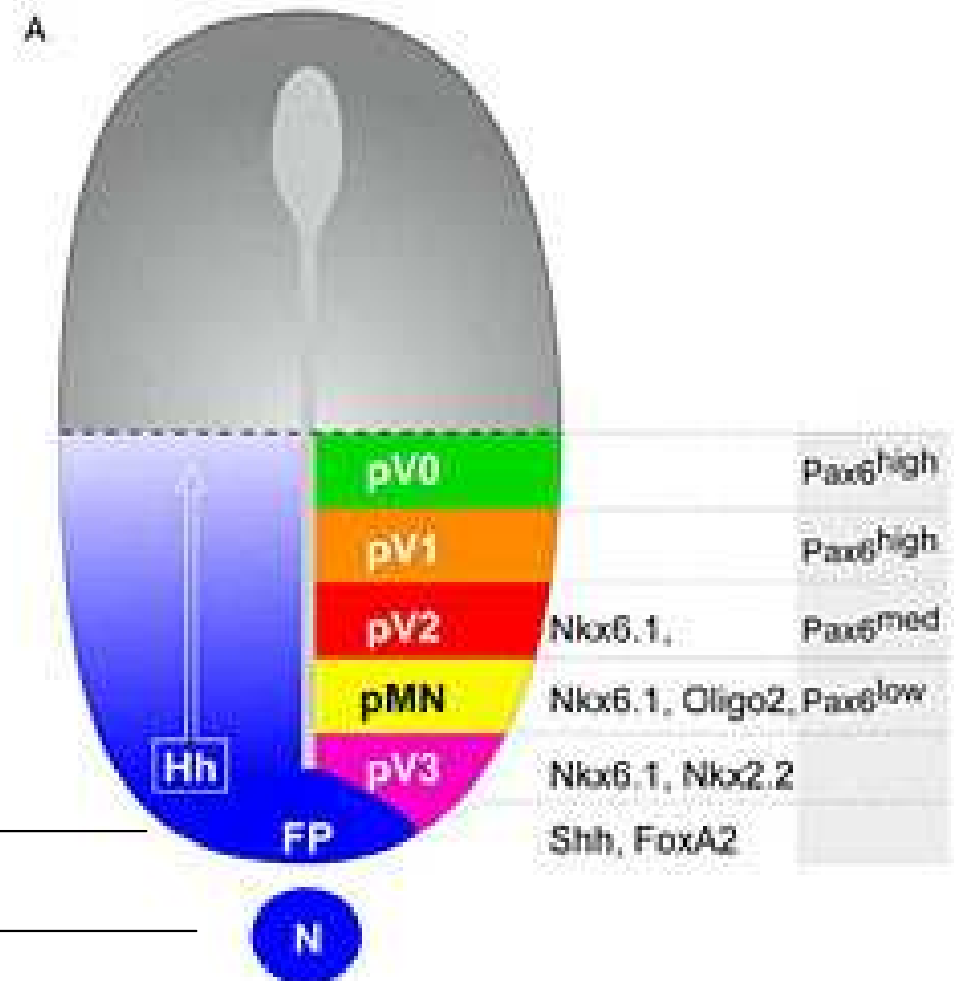
Shh – jeden z nejlépe popsaných klasických morfogenů (tzv. model francouzské vlajky) – v závislosti na koncentraci morfogenu se spouští odlišné transkripční programy



Např. specifikace jednotlivých prstů končetiny



Shh – jeden z nejlépe popsáných klasických morfogenů (tzv. model francouzské vlajky) – v závislosti na koncentraci morfogenu se spouští odlišné transkripční programy



floor plate – nejspodnější část  
nervové trubice

notochord – zdroj Shh

Např. specifikace jednotlivých neuronálních typů ve vyvíjející se nervové trubici

# Přirozené inhibitory Shh dráhy



cyclopamin – teratogenní alkaloid z náprstníku,  
poprvé identifikován jako látku způsobující cyklopii  
(= 1 oko) u ovcí