

ФАКТОРЫ РОСТА И ИХ УЧАСТИЕ В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Поскольку в многоклеточном организме каждая клетка находится под влиянием большого числа самых разнообразных факторов, регуляцию клеточного цикла удобнее изучать вне организма, культивируя клетки в искусственных питательных средах. Было замечено, что в этих условиях для нормального размножения эукариотических клеток, помимо таких компонентов, как незаменимые аминокислоты, витамины и сахара, необходимы также соединения полипептидной природы, стимулирующие вступление клеток в цикл и его прохождение. Эти соединения получили название факторов роста. При отсутствии или недостатке факторов роста в питательной среде клетки переходят в состояние пролиферативного покоя. Для возникновения митогенного сигнала факторам роста нет необходимости проникать в клетку. Каждый фактор роста взаимодействует с чувствительными по отношению к нему специфическими рецепторами, расположенными на поверхности клетки, вызывая модификацию структуры плазматической мембраны. Вследствие этого, на внутренней поверхности мембраны возникают новые регуляторные сигналы, в передаче которых участвуют так называемые вторичные посредники (малые молекулы) и группа специфических протеинкиназ. В результате происходит активация факторов транскрипции и экспрессия генов пролиферативного ответа, что в конечном итоге инициирует репликацию ДНК и вступление клетки в митоз. Более подробно эти процессы будут рассмотрены в разделе, посвященном механизмам передачи митогенного сигнала.

Стимулированные митогенами клетки проходят в пререпликативном периоде несколько этапов, отличающихся по функциональным и метаболическим характеристикам. В 1977 году Плейджер и соавторы (Pledger et al.) обнаружили, что для прохождения пререпликативного периода и инициации синтеза ДНК, как правило, недостаточно воздействовать на клетки каким-либо одним фактором роста. Под влиянием первоначального воздействия клетки лишь приобретают компетентность к пролиферации, то есть становятся чувствительными к новым воздействиям, от которых уже зависит их дальнейшая прогрессия в периоде G, завершающаяся вступлением в S-период. В соответствии с этим, все факторы роста (как и другие регуляторы размножения) были подразделены на факторы компетентности и факторы прогрессии. Совместное действие нескольких факторов роста является одним из наиболее общих принципов регуляции клеточного цикла у многоклеточных организмов.

Прежде чем перейти к характеристике конкретных факторов роста, следует отметить, что некоторые из них, будучи стимуляторами для одних типов клеток, ведут себя как ингибиторы по отношению к другим. Более того, на особенности их воздействия (стимуляция или подавление пролиферации) могут влиять условия культивирования клеток, а также присутствие в среде других регуляторов.

Здесь мы остановимся только на тех факторах роста, роль которых в регуляции размножения клеток изучена наиболее

Основные полипептидные факторы роста, участвующие в регуляции размножения клеток

PDGF	Фактор роста из тромбоцитов
EGF	Эпидермальный фактор роста
FGF	Фактор роста фибробластов
IGF-I (SmC)	Инсулиноподобный фактор роста I (соматомедин C)
IGF-II (SmA)	Инсулиноподобный фактор роста II (соматомедин A)
TGF α	Трансформирующие факторы роста TGF α
IL-(1,2,3...)	Интерлейкины (1,2,3 и т.д.)
CSF-(1,2)	Факторы, стимулирующие рост клеточных колоний

Число известных факторов роста давно превысило сотню, и многие из них объединены в структурно и функционально сходные семейства. Все они представляют собой полипептиды с молекулярной массой в пределах 7-70 кД.

Фактор роста из тромбоцитов (PDGF)

Этому соединению (мол. масса 30 кД) посвящена, пожалуй, самая большая литература, среди которой выделяются работы шведских исследователей Хелдина и Вестермарка (Heldin, Westermark, 1990 и др.). Освобождаясь при разрушении сосудистой стенки, PDGF участвует в процессах тромбообразования и заживления ран. В структурном отношении PDGF представляет собой основной белок, молекула которого состоит из двух полипептидных цепей (субъединиц) А и В, кодируемых отдельными генами. Субъединицы А и В образуются путем ограниченного протеолиза молекул-предшественников. Обнаружены три изоформы молекулы PDGF: гомодимеры А-А и В-В и гетеродимер А-В, цепочки которых соединены дисульфидными мостиками. Эти изоформы различаются в функциональном отношении. Дело в том, что рецепторы PDGF также представляют собой димерные молекулы, обозначаемые как $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ и $\beta\beta$. Оказалось, что субъединица В молекулы PDGF способна связываться с обеими субъединицами рецептора — α и β , в то время как субъединица А связывается только с субъединицей α (рис. 26). Отсюда следует, что максимальное насыщение рецепторов PDGF, иначе говоря, наибольшая митогенная стимуляция достигается при использовании изоформы В-В.

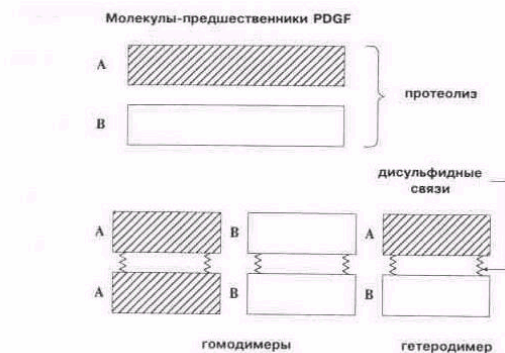


Рис.25. Образование трех изоформ димерной молекулы PDGF.

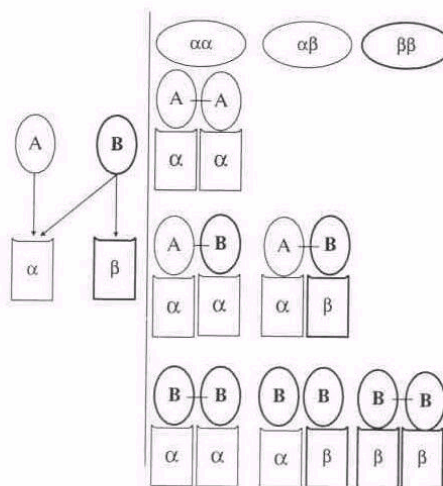


Рис.26. Связывание изоформ PDGF с димерными рецепторами.

В ранее упомянутой работе Плейджера и соавторов было показано, что PDGF является мощным фактором компетентности для покоящихся фибробластов, а функцию факторов прогрессии выполняют компоненты плазмы, не связанные с тромбоцитами (такие, как незаменимые аминокислоты, эпидермальный фактор роста, инсулин). В дальнейшем оказалось, что изоформа PDGF А-А может выполнять только функцию фактора компетентности, в то время как изоформы А-В и В-В способны в значительной мере обеспечивать как компетентность, так и прогрессию. Естественно, что PDGF не может служить фактором компетентности для всех типов клеток, о чем речь пойдет ниже.

Эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (FGF) и инсулиноподобные факторы роста (IGF)

EGF был выделен в 1972 году из подчелюстных желез мыши в лаборатории Стенли Коэна (Cohen, 1987), но не сразу привлек к себе всеобщее внимание, поскольку Коэн предпочел досконально изучить его свойства, не прибегая к предварительным публикациям. В результате исследователи получили готовый, всесторонне охарактеризованный регулятор клеточного цикла, с которым можно было уверенно работать, а Коэн был удостоен в 1986 году Нобелевской премии. “Меня настолько никто не принимал всерьез и не проявлял никакого интереса к моей работе, что я был полностью свободен и мог отдаться ей целиком”, — сказал он в своей Нобелевской речи.

В настоящее время EGF изучен не менее обстоятельно, чем PDGF, и широко используется при исследовании регуляции размножения клеток, особенно на этапе передачи митогенного сигнала. Ему посвящена обширная литература, в том числе монография Никольского и соавторов (1987). Мол. масса EGF составляет около 6 кД и характерной особенностью его молекулы является высокое содержание тирозина. Для фибробластов мыши, обработанных PDGF, EGF выполняет роль фактора прогрессии, точно так же, как и для хондроцитов, приобретающих компетентность под влиянием инсулиноподобных факторов роста. Впрочем известны случаи, когда клетки (например, эмбриональные клетки крысы линии EL2) могут размножаться в присутствии только одного EGF. Семейство факторов роста фибробластов включает в себя близкие по составу кислый (aFGF) и щелочной (bFGF) факторы, которые были выделены из экстрактов клеток головного мозга и гипофиза в лаборатории Господаровича (Gospodarowicz et al., 1986). Оба соединения могут выполнять роль факторов компетентности при воздействии на фибробласты и другие клетки мезенхимного происхождения или же обеспечивать прогрессию при стимуляции хондроцитов инсулиноподобными факторами роста. В экспериментах FGF обычно используют в сочетании с другими регуляторами размножения клеток. В организме он принимает участие в процессе ангиогенеза, стимулируя рост и развитие эндотелия.

Семейство инсулиноподобных факторов роста (IGF), которые называют также соматомединами (Sm), включает в себя два полипептида — IGF-I (Sm-C) и IGF-II (Sm-A). Оба они имеют близкую по значению мол. массу (~7 кД), сходный аминокислотный состав и образуются из более крупных молекул путем протеолиза. К этой же группе относят и инсулин, который однако стимулирует размножение культивируемых клеток лишь в концентрациях, значительно превышающих физиологические. При этом он способен взаимодействовать не только со своими собственными рецепторами, но и с рецепторами к IGF-I. Что касается регуляции клеточного цикла, то, как мы уже видели, представители семейства IGF могут выполнять роль факторов компетентности или прогрессии, в зависимости от типа клеток.

Трансформирующие факторы роста (TGF).

Трансформирующие факторы роста исходно получили свое название вследствие способности стимулировать в мягком агаре рост некоторых клеточных линий, зависящих от прикрепления к субстрату. В последующем оказалось, что их функция в клетке значительно многообразнее, а два из них — TGF α и TGF β принимают непосредственное участие в регуляции клеточного цикла. Особенно это касается TGF β , считающегося в настоящее время одним из ключевых регуляторов механизма размножения клеток.

TGF α был впервые получен из кондиционированной среды, в которой выращивали клетки, трансформированные вирусом саркомы мыши. Он обнаруживается также в больших количествах в эмбриональных клетках млекопитающих. Характерно, что молекула TGF α близка по своей аминокислотной последовательности молекуле EGF, и оба фактора взаимодействуют с одними и теми же рецепторами. При этом аффинность взаимодействия TGF α к рецептору выше, по сравнению с EGF.

Семейство TGF β объединяет три изоформы молекулы: гомо-димеры TGF β 1 и TGF β 2, а

также гетеродимер TGF β 12 (мол. масса -25 кД). Своеобразие TGF β заключается в том, что он обнаруживается в самых различных тканях, выполняя при этом двоякую роль — стимулятора размножения клеток мезенхимного происхождения, в том числе фибробластов, и ингибитора размножения эпителиальных клеток. Мультифункциональная роль TGF β будет более подробно освещена в разделе о взаимодействии стимуляторов и ингибиторов клеточной пролиферации.

Интерлейкины (IL) и факторы, стимулирующие рост клеточных колонии (CSF)

Эту группу факторов роста объединяет не первичная структура, а общая функциональная направленность — участие в реакциях клеточного иммунитета и кроветворения, где они могут выступать и как стимуляторы, и как ингибиторы размножения и дифференцировки лимфоцитов на разных этапах иммунного ответа. Поэтому они получили название лимфокинов.

На рис. 27 представлена схема взаимодействия разных интерлейкинов в иммунном ответе клеток на проникновение в организм чужеродной молекулы — антигена. Клетки иммунной системы — макрофаги выделяют интерлейкин 1 (IL-1), одна из функций которого заключается в стимуляции образования предшественников В-лимфоцитов в костном мозге. Для полного иммунного ответа необходимо подключение вырабатываемых в тимусе Т-лимфоцитов. Другая функция IL-1 состоит в стимуляции размножения Т-лимфоцитов, активированных антигенами (так называемых Т-хелперов), секретирующих ключевой лимфокин IL-2, который непосредственно стимулирует пролиферацию цитотоксических Т-клеток, уничтожающих зараженные клетки.

В настоящее время насчитывается около двадцати различных лимфокинов. Некоторые из них охарактеризованы достаточно полно, другие изучены менее подробно, но все они выполняют определенные функции в иммунном ответе и в процессе кроветворения. Так, IL-3 секретируется активированными Т-хелперами и стимулирует пролиферацию и созревание предшественников лимфоцитов и других кроветворных клеток, в связи с чем его называют мульти-CSF. К группе CSF относятся гликопротеиды CSF-1, стимулирующий дифференцировку макрофагов, и CSF-2, действующий на предшественники макрофагов и гранулоцитов. Т-хелперы вырабатывают также IL-4 — белок с мол. массой 13 кД, стимулирующий пролиферацию Т-лимфоцитов и тучных клеток, а цитотоксичные Т-лимфоциты секретируют IL-5 (мол. масса 12,3 кД), стимулирующий пролиферацию и дифференцировку предшественников В-лимфоцитов.

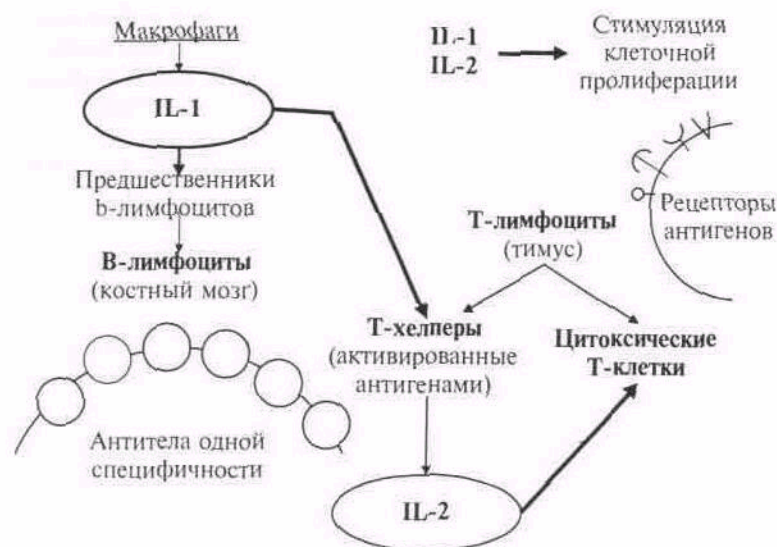


Рис.27. Схема взаимодействия интерлейкинов в иммунном ответе клеток (объяснение в тексте).

В некоторых случаях лимфокины могут действовать и как ингибиторы

пролиферативных процессов. Показано, что IL-1 подавляет рост эндотелия, выступая как антагонист FGF, а IL-6, вырабатываемый фибробластами, с одной стороны, стимулирует размножение гепатоцитов, а с другой — подавляет пролиферацию клеток меланомы.

Рецепторы факторов роста. Мембранные белки и вторичные посредники

При взаимодействии с чувствительными к ним клетками экзогенные факторы роста в первую очередь соприкасаются с клеточной поверхностью. Происходящие при этом события схематически изображены на рис. 28.

Первая реакция клетки на воздействие факторов роста состоит в их связывании со специфическими рецепторами (по образному выражению Берриджа, “антеннами”), находящимися в плазматической мембране. Их назначение, как и других компонентов мембраны, о которых будет идти речь в дальнейшем, заключается в преобразовании внешних сигналов во внутриклеточные. В настоящее время существует обширная литература, посвященная строению и функциям рецепторов различных факторов роста, и здесь будут рассмотрены лишь те аспекты вопроса, которые необходимы для понимания принципа передачи в клетку митогенного сигнала.

Рецепторы полипептидных факторов роста представляют собой преимущественно интегральные мембранные гликопротеиды. Их домены, способные связывать лиганды, расположены на внешней стороне плазматической мембраны, а эффекторные домены находятся на ее внутренней, цитоплазматической поверхности. После связывания факторов роста с рецепторами образовавшиеся лиганд-рецепторные комплексы группируются в кластеры на внутренней поверхности мембраны и затем подвергаются интернализации по механизму типа эндоцитоза и разрушению с участием лизосом. Число рецепторов на поверхности клетки определяется скоростью интернализации комплексов, возвращением части освободившихся от лигандов рецепторов на поверхность клетки и синтезом рецепторов *de novo*.

В результате связывания факторов роста с рецепторами их цитоплазматические домены приобретают способность фосфорилировать определенные белки по тирозиновым остаткам. Протеинкиназная активность рецепторов увеличивается в результате их аутофосфорилирования, как это, например, показано для рецепторов EGF и PDGF.

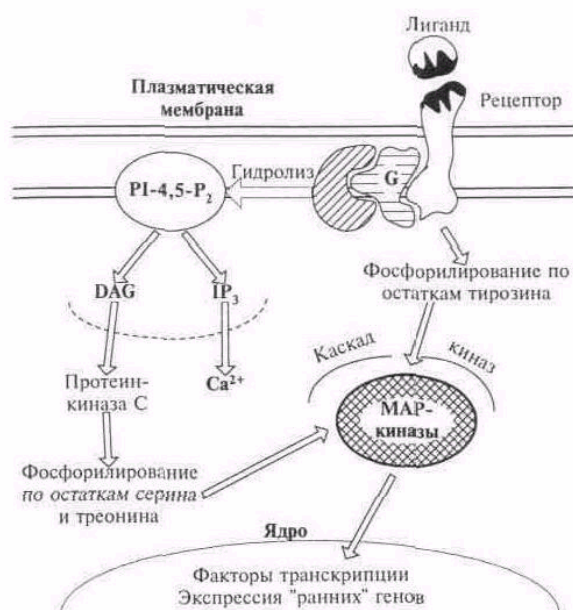


Рис.28. Схематическое изображение передачи митогенного сигнала в ядро. G — G-белки, PhC — фосфолипаза C, PI-4,5-P₂ — фосфатидил-инозит-4,5-дифосфат, DAG — диацилглицерин, IP₃ — трифосфоинозит.

Тем временем в плазматической мембране обеспечивается дальнейший процесс

передачи информации с участием цепочки мембранных белков, последовательно взаимодействующих друг с другом. Подобное взаимодействие вызывает конформационную перестройку каждого следующего в цепочке белка — изменение его структуры и функции.

Элементы, получающие информацию от первого звена — рецептора поверхности, представляют собой мембранные белки, активирующиеся при связывании гуанозинтрифосфата (GTP) и расщеплении его до гуанозиндифосфата (GDP). Эти белки, получившие название G-белков, были открыты и подробно изучены Гилманом (Gilman) и соавторами (США), удостоенными за эти исследования Нобелевской премии (Barries, 1986). Активированные G-белки взаимодействуют со следующим элементом цепочки — так называемым усилительным ферментом фосфолипазой C, которая расщепляет мембранный фосфолипид — фосфатидилинозит-4,5-дифосфат на диацил-глицерин (DAG) и трифосфоинозит (IP₃), превращая таким образом молекулы вещества-предшественника в молекулы-посредники, или “вторичные мессенджеры”. При этом DAG и IP₃ могут оставаться на внутренней стороне мембраны. Дальнейшие события разворачиваются в цитоплазме. DAG активирует Ca²⁺- и фосфолипидзависимую протеинкиназу C, которая, осуществляя фосфорилирование белков по остаткам серина и треонина, посылает сигналы в ядро, а IP₃ стимулирует мобилизацию кальция из внутриклеточных депо, что усиливает реакции фосфорилирования, а также активирует транспорт Ca через наружную мембрану клетки.

Эти столь очевидные теперь процессы, которые можно записать с помощью нескольких символов и стрелок, явились плодом десятилетних усилий и поисков представителей разных стран, в первую очередь, лабораторий, возглавляемых Берриджем (Berridge, США), Мичеллом (Michell, Англия) и Нишизукой (Nishizuka, Япония).

Описанный путь передачи митогенного сигнала характерен для многих факторов роста, в частности, для PDGF. Однако расщепление P1-4,5-P на DAG и IP₃ не является обязательным условием передачи сигнала. Известно, например, что EGF не способствует накоплению IP₃ и слабо мобилизует Ca из внутриклеточных депо. В то же время он активно участвует в гидролизе фосфатидилхолина с образованием DAG, что косвенно приводит к активации протеинкиназы C. В некоторых случаях при воздействии митогенов содержание IP₃ возрастает за счет фосфорилирования его предшественников с помощью фермента трифосфоинозит(P1-3)киназы и протекает без участия фосфолипазы C и последующего гидролиза P1-4,5-P. Наряду с фосфолипазой C, в качестве усилительного фермента, активируемого G-белками, функционирует также аденилатциклаза, которая превращает аденозинтрифосфат (АТФ) в циклический аденозинмонофосфат (сАМР), участвующий в многочисленных внутриклеточных событиях при размножении и дифференцировке клеток. На отдельных этапах в процесс передачи митогенного сигнала в ядро включаются метаболические реакции, протекающие по принципу обратной связи, что может усиливать или ослаблять сигнал. Таким образом, регуляторные возможности клетки в этом плане в высшей степени многообразны.

МАР-киназы и каскад их фосфорилирования

Как уже было сказано в предыдущем разделе, в результате связывания факторов роста с рецепторами последние приобретают способность фосфорилировать белки по тирозиновым остаткам. В начале 90-х годов было установлено, что такими белками являются преимущественно протеинкиназы, которые, будучи активированы митогенами, вызывают каскад последовательного фосфорилирования протеинкиназ как по тирозиновым остаткам, так и по остаткам серина и треонина, причем процесс может переключаться с одних остатков на другие (см. рис. 28). Эти протеинкиназы получили название МАР-киназ (mitogen-activated protein kinases) или ERK (extracellular-signal-regulated kinases). Они представляют собой семейство белков с мол. массой 44 кД (ERK1) и 42 кД (ERK2). Возможность их двоякого (dual) действия оказалась необычайно важным свойством для передачи митогенного сигнала

в ядро, поскольку при этом активируются не только сами МАР-киназы, но также и факторы транскрипции, являющиеся их субстратами. Факторами транскрипции считаются ядерные регуляторы, вызывающие экспрессию линейно расположенных генов, в том числе генов пролиферативного ответа. Следует особо отметить большой вклад, который внесли в эту область исследования работы Биохимического центра в Ницце, возглавляемого Поуссегуром (Pouyssegur, 1997).

Активация факторов транскрипции происходит, как правило, в ядре, причем МАР-киназы способны проникать в ядро только в фосфорилированном виде. Однако в некоторых случаях факторы транскрипции могут пребывать в латентном состоянии в цитоплазме, где и происходит их активация, после чего они уже сами перемещаются в ядро (Karin, Hunter, 1995). Весь процесс передачи митогенного сигнала от момента взаимодействия фактора роста с рецептором до начала экспрессии генов пролиферативного ответа занимает 8-10 минут.

В поддержании жизни высших организмов ключевую роль играет контроль пролиферации, дифференцировки и направленного движения клеток. Нормальное протекание этих процессов обеспечивает правильное развитие и защитные реакции организма. Постоянно регенерирующие ткани (например, эпителий или клетки крови) также требуют строгой регуляции пролиферации стволовых клеток. Утрата или ослабление контроля могут быть причиной тяжелых заболеваний, включая рак и атеросклероз. Необходимая регуляция клеточной пролиферации, дифференцировки и клеточной подвижности осуществляется с помощью различных механизмов. Одним из них является взаимодействие клетки с ростовыми факторами.

Факторами роста называют группу белковых молекул, индуцирующих синтез ДНК в клетке (Goustin A.S. et al., 1986). Позднее было обнаружено, что спектр воздействий на клетки этих компонентов гораздо шире, чем предполагалось вначале. Так, некоторые белки этой группы в зависимости от типа клеток-реципиентов могут индуцировать дифференцировку и подавлять пролиферацию. Кроме того, к ним относят регуляторные полипептиды, модулирующие подвижность клеток, но не обязательно влияющие на деление клеток (Stoker M. and Gherardi E., 1987). Главное отличие факторов роста от белковых гормонов - аутокринный механизм действия или паракринный механизм действия (холокринный механизм действия для гормонов; Deuel T.F., 1987).

Первые публикации о возможности поддержания в живом состоянии фрагментов биологической ткани *in vitro* появились 90 лет назад, но рутинное культивирование отдельных клеток стало возможным менее 50 лет назад. Успешное поддержание процесса деления клеток млекопитающих зависит от компонентов среды культивирования. Традиционно среда для культивирования состоит из питательных веществ и витаминов в забуференном солевом растворе. Ключевым компонентом является сыворотка животных, например, эмбриональная бычья сыворотка. Без такой добавки наибольшая часть культивируемых клеток не будут воспроизводить собственную ДНК и, следовательно, не будут пролиферировать. Позже был изолирован полипептид с молекулярной массой 30 кД, секретируемый тромбоцитами, обладающий митогенными свойствами. Он был назван фактором роста, произведенным тромбоцитами (PDGF).

Как и в случае с гормонами, факторы роста взаимодействуют с соответствующими рецепторами факторов роста с высокой степенью аффинности и могут инициировать множественные эффекты: от процессов регуляции роста, дифференцировки и экспрессии генов до инициирования апоптоза. Эффекты факторов роста, в отличие от гормонов, могут продолжаться в течение нескольких дней.

Факторы роста обычно представляют собой небольшие полипептиды, которые стимулируют или ингибируют пролиферацию определенных типов клеток. Как правило, они секретируются одними клетками и действуют на другие клетки, хотя иногда бывает так, что они действуют на те же клетки, которые их секретируют. Эти факторы важны для процессов развития эмбриона и также для поддержания клеточного баланса у взрослого организма. Например, для уравновешенного обновления клеток кожи, кишечника и кроветворной системы. Во всех этих случаях сравнительно небольшое число плюрипотентных стволовых клеток закладывают основу для образования значительного большего числа прогениторных клеток, которые затем дифференцируются дальше, превращаясь в зрелые постмитотические клетки. Последние заменяют старые клетки, которые погибают, например, за счет апоптоза.

Факторы роста действуют на свои клетки-мишени, которые отличаются от других клеток рецепторами, экспонированными на поверхности клеточных мембран и характерными именно для данного типа клеток.

В конечном счете клетка выходит из фазы отдыха G0 и начинает делиться. Интегральная картина взаимодействий множества факторов с множеством клеток сложна, тем более, что часто даже отдельно взятый ростовой фактор обладает несколькими функциями. Удаление ростовых факторов из среды не всегда приводит просто к остановке клеточного деления, но часто вызывает программируемую клеточную смерть.

Факторы роста не только промотируют клеточное деление, но и наоборот некоторые из них ингибируют этот процесс. Роль ингибитора, в частности, выполняют члены большого семейства ростовых факторов - TGF-бета . см. рис 5 сс и Табл 2. Факторы роста и их роль в нормальном организме

Несмотря на огромное разнообразие охарактеризованных факторов роста и колоссальную разницу клеточных ответов (обзор Cross M. and Dexter T.M., 1991), можно сформулировать общие правила регуляции:

1. Для поддержания жизни нормальных клеток высших организмов абсолютно необходимо их взаимодействие с уникальной комбинацией специфических ростовых факторов.
2. Одна и та же клетка может взаимодействовать с несколькими факторами роста; один и тот же фактор роста может оказывать влияние на разные типы клеток.
3. Уровень экспрессии данного ростового фактора, а также восприимчивость и характер ответа являются специфичными для каждого данного типа клеток.

В основе раковых заболеваний лежат нарушения контроля пролиферации, а также взаимодействий клеток друг с другом. Часто неопластическая трансформация затрагивает имеющуюся в клетке собственную программу регуляции - реакции на ростовые факторы. С этим так или иначе связаны функции большинства онкогенов.

Процессы пролиферации клеток и постепенного приобретения ими специализированного характера (дифференцированного) происходят в организме высокоупорядоченно и согласованно. Эта упорядоченность основана на том, что в результате межклеточных взаимодействий включаются различные внутриклеточные программы, определяющие поведение клетки в зависимости от поведения ее соседей и от потребностей организма. Ключевую роль в межклеточной сигнализации играют секретируемые полипептиды, которые получили название полипептидных ростовых факторов.

Факторы роста, представляющие собой эндогенные полипептиды, являются идеальными претендентами для лечения инсульта, так как обладают нейропротективными, репаративными и пролиферативными свойствами.

Факторы роста известны как белки, индуцирующие синтез ДНК и вхождение клетки в митоз , однако они могут выполнять и другие функции.

Так, например, PDGF (тромбоцитарный фактор роста) стимулирует дифференцировку клеток PC12 (линия крысиной феохромоцитомы) а EFG (фактор роста эпидермиса) может подавлять пролиферацию клеток кишечного эпителия крыс.

Факторы роста служат хемоаттрактантами (PDGF - для фибробластов, HGF/SF (гепатоцитарный фактор роста /скэттер-фактор) - для клеток MDCK (эпителий почки) - Stoker 1989).

Кроме того, они оказывают влияние на морфологию клеток . Многие факторы обладают обеими активностями - индуцируют и морфологические изменения, и пролиферацию клеток , как например, PDGF, однако известны и факторы - мотогены , индуцирующие подвижность клеток (Stoker M., 1989 , Gherardi E., 1991).

У HGF/SF, выделяемого в среду фибробластами , в зависимости от клеток-реципиентов превалирует то или иное действие - так, было показано, что он индуцирует деление гепатоцитов, и в то же время вызывает поляризацию и увеличение подвижности клеток эпидермального происхождения (Takaishi K. ea, 1994 ; Stoker M., 1989).

При действии HGF/SF на линию 308R наблюдалось полное диссоциирование колоний кератиноцитов на отдельные клетки, которое блокировалось антителами к HGF/SF (Takaishi K. ea, 1994).

Большинство полипептидных факторов роста действует одновременно по паракринному и аутокринному механизму . Однако отдельные факторы, такие как инсулиноподобные факторы роста , способны оказывать эндокринное действие (Holly J.M., Wass J.A., 1989).

Помимо этого, существует еще один способ действия факторов роста, который получил название интракринного (Logan A., 1990). Факторы роста при этом не секретируются и не нуждаются в поверхностных рецепторах, опосредующих их активность. Они остаются внутри клетки и действуют в качестве посредников, регулируя ее функции. Ряд цитоплазматических факторов роста и цитокинов, действующих подобным образом, достаточно хорошо изучен. Это предшественники интерлейкинов 1 α и 1 β , цилиарный нейротрофический фактор, FGF-1 и FGF-2 . Эти факторы вызывают заметный биологический эффект до появления их на поверхности клетки-продуцента или в окружающем ее пространстве.

В регуляторных белках, обладающих интракринным действием, имеются сигнальные последовательности, обеспечивающие внутриклеточную локализацию. До сих пор очень мало известно о внутриклеточной компартментализации факторов роста и их значении в рассматриваемых процессах. Полагают, что различные внутриклеточные пулы факторов роста могут использовать пара-, ауто- и интракринные механизмы для достижения специфического клеточного ответа.

Действие факторов роста необходимо рассматривать в связи с другими стимуляторами, прежде всего гормонами, и с учетом типа клеток-мишеней и их тканевого микроокружения. Фактор роста, высокомитогенный для одного типа клеток, может действовать как ингибитор пролиферации для другого типа клеток. Так, полипептиды, которые индуцируют дифференцировку и останавливают пролиферацию лейкозных клеток, помогают росту недифференцированных эмбриональных клеток (Williams L.T., 1989).

Большинство полипептидных факторов роста действует одновременно по паракринному и аутокринному механизму. Однако отдельные факторы, такие как инсулиноподобные факторы роста , способны оказывать эндокринное действие (Holly J.M., Wass J.A., 1989).

Помимо этого, существует еще один способ действия факторов роста, который получил название интракринного (Logan A., 1990). Факторы роста при этом не секретируются и не нуждаются в поверхностных рецепторах, опосредующих их активность. Они остаются внутри клетки и действуют в качестве посредников, регулируя ее функции. Ряд цитоплазматических факторов роста и цитокинов, действующих подобным образом, достаточно хорошо изучен. Это предшественники интерлейкинов 1 α и 1 β , цилиарный нейротрофический фактор, FGF-1 и FGF-2 . Эти факторы вызывают заметный биологический эффект до появления их на поверхности клетки-продуцента или в окружающем ее пространстве.

В регуляторных белках, обладающих интракринным действием, имеются сигнальные последовательности, обеспечивающие внутриклеточную локализацию. До сих пор очень

мало известно о внутриклеточной компартментализации факторов роста и их значении в рассматриваемых процессах. Полагают, что различные внутриклеточные пулы факторов роста могут использовать пара-, ауто- и интракринные механизмы для достижения специфического клеточного ответа.

Действие факторов роста необходимо рассматривать в связи с другими стимуляторами, прежде всего гормонами, и с учетом типа клеток-мишеней и их тканевого микроокружения. Фактор роста, высокомитогенный для одного типа клеток, может действовать как ингибитор пролиферации для другого типа клеток. Так, полипептиды, которые индуцируют дифференцировку и останавливают пролиферацию лейкозных клеток, помогают росту недифференцированных эмбриональных клеток (Williams L.T., 1989).

Фактор роста: кинетика клеточного ответа

В этом разделе рассмотрена динамика процессов, происходящих в клетках после их стимуляции на примере PDGF.

Таблица 3. Временной ход клеточных реакций на PDGF (ФБ)

(по Auger K.R. ea, 1989; Molloy C.J. ea, 1989; Meisenheilder J. ea, 1989; Ridley A.J. and Hall A., 1992)

время	реакции
0 мин	Связывание PDGF
1 мин	Активация PDGF-R. Активация фосфатидилинозитольного пути
2-4 мин	Начало раффлинга. Ускорение полимеризации актина
5-10 мин	Максимальный раффлинг. Начало сборки фокальных контактов и стресс-фибрилл. Активация PI3K-пути
10-15 мин	Индукция транскрипции специфических генов (например, коллагеназы и транзина)
15-30 мин	Максимальная скорость образования фокальных контактов и стресс-фибрилл
30-60 мин	Необратимое воздействие на клетку
6 ч	Индукция S-фазы
24 ч	Удвоение клеток

Табл.3 . Временной ход клеточных реакций на PDGF (ФБ) (по Auger K.R. ea, 1989 ; Molloy C.J. ea, 1989 ; Meisenheilder J. ea, 1989 ; Ridley A.J. and Hall A., 1992)

В приведенной таблице собраны различные данные - от активации рецептора до изменения в актиновом цитоскелете , до индукции деления клеток . Клеточная реакция на фактор роста комплексная и растянута во времени; следует отметить, что активация основных путей распространения сигнала происходит в течение первых 5 мин после воздействия PDGF.

К сожалению, нет данных по активации рецептором PDGF p21ras. Однако, при стимуляции фибробластов (NIH 3T3 , с повышенной экспрессией EGF-R) активация наблюдалась через 2-4 мин (Gale N.W. ea, 1993). Судя по тому, что активация остальных путей происходит очень быстро, результаты по p21ras , вероятно, не будут сильно отличаться от данных, полученных для EGF-R.

Факторы роста: классификация

В последние годы выделяют и описывают все новые факторы роста, и по мере накопления данных становится ясно, что многие из этих факторов структурно подобны друг другу, и их можно объединить в семейства.

В настоящее время выделяют семейства

IGF (инсулиноподобные факторы роста):

Рост-стимулирующий эффект СТГ опосредуется ИФР-гормонами, которые образуются под влиянием СТГ в печени и других тканях. Выделены два вида ИФР: инсулиноподобный фактор роста I (ИФР-I) и инсулиноподобный фактор роста II (ИФР-II). Это близкие по строению одноцепочечные белки, сходные с проинсулином. ИФР-I и ИФР-II присутствуют в сыворотке преимущественно в виде комплексов со связывающими белками. Наиболее распространен ИФР-связывающий белок типа 3.

ИФР-I и ИФР-II по-разному влияют на клетки-мишени. Это объясняется различиями взаимодействия ИФР с рецепторами. Как ИФР-I, так и ИФР-II связываются с рецепторами ИФР-I, однако сродство ИФР-I к рецепторам ИФР-I гораздо выше, чем сродство ИФР-II. Оба ИФР участвуют в развитии плода; в постэмбриональном периоде основное значение в регуляции роста имеет ИФР-I. Он стимулирует пролиферацию клеток всех тканей, в первую очередь - хрящевой и костной. Физиологическая роль ИФР-II в развитии ребенка и во взрослом организме пока не выяснена.

Так же как и СТГ, оба ИФР действуют на гипоталамус и аденогипофиз по принципу обратной связи, контролируя синтез соматолиберина и соматостатина и секрецию СТГ.

Инсулиноподобные факторы роста (ИФР-1 и ИФР-2) не относятся к панкреатическим гормонам, но тем не менее близки к инсулину по структуре и функции. Влияние инсулина на рост и репликацию клеток трудно отделить от аналогичных эффектов со стороны ИФР-1 и ИФР-2. Действительно, инсулин и инсулиноподобные факторы роста могут взаимодействовать в этом процессе. Структурное сходство этих белков показано на рис. 51.8. Более детальное сравнение проведено в табл. 51.5.

ИФР-1 и ИФР-2 представляют собой одноцепочечные полипептиды, состоящие из 70 и 67 аминокислот соответственно. Степень гомологии между двумя этими гормонами достигает 62%, причем 50% аминокислотных остатков в каждом из них идентичны таковым в инсулине. Молекулы этих факторов роста имеют разные антигенные участки и по-разному регулируются.

Инсулин оказывает более сильное влияние на метаболизм, чем инсулиноподобные факторы роста, однако последние сильнее стимулируют рост клеток. Каждый из этих гормонов имеет свой специфический рецептор.

Эти гормоны способны в какой-то степени перекрестно связываться с рецепторами, чем, возможно, и объясняется присущая им смешанная биологическая активность. Как правило, способность этих гормонов стимулировать рост наиболее всего коррелирует с их сродством к рецепторам ИФР-1 и ИФР-2.

В 1957 г. была сформулирована гипотеза, что проводником биологического действия СТГ в организме является циркулирующий в крови "сульфирующий фактор" [Salmon J.W.D. and Daughaday W.H., 1957], содержание которого в крови увеличивалось под действием СТГ. Несколько лет спустя в крови людей была обнаружена инсулиноподобная активность, которая не подавлялась антителами к инсулину (nonsuppressible insuline-like activity) [Froesch B.R. et al, 1966].

Поздние проводники биологического действия СТГ стали называться соматомединами [Daughaday W.H. et al, 1972].

Очистка и исследование веществ, определяющих неподавляемую антителами инсулиноподобную активность крови, закончились выделением двух пептидов и

установлением их аминокислотных последовательностей [Rinderknecht E. and Humbel R.E., 1978a , Rinderknecht E. and Humbel R.E., 1978b].

Они проявили высокую гомологию с проинсулином и были названы инсулиноподобными ростовыми факторами I и II . Параллельные исследования некоторых соматомединов показали их полную идентичность с ИРФ-I и было обнаружено, что ИРФ-I способен стимулировать рост гипопизэктомированных крыс [Schoenie E. et al, 1982], что подтверждало представление об ИРФ-I как проводнике биологического действия гипопизарного СТГ, т.е. о соматомедине. ИРФ-I тормозит секрецию СТГ по механизму отрицательной обратной связи.

Однако впоследствии были выявлены заметные различия в биологическом действии СТГ и ИРФ-I на рост разных органов и тканей [Skottner A. et al, 1989] и показано существование прямого действия СТГ на ткани без участия ИРФ-I.

Тем не менее СТГ стимулирует экспрессию гена ИРФ-I в печени и жировой ткани [Coleman M. et al, 1994]. Он увеличивает также образование мРНК ИРФ-I в тимусе [Florini J.R. et al, 1996], хотя и в меньшей степени, чем в других органах

FGF

Группа гепаринсвязывающих белков, первоначально экстрагированных из головного мозга и гиповиза, обладает митогенным действием на некоторые фибробластоподобные клетки, например культуры 3Т3 , и поэтому в свое время их назвали факторами роста фибробластов (FGF - fibroblast growth factor). Факторы роста фибробластов - семейство структурно связанных полипептидов, которые митогенны для большого числа типов клеток.

Семейство FGF в настоящее время представлено девятью членами. Молекулярная масса различных форм FGF-2 колеблется от 16800 до 25000. Представители FGF-семейства как FGF-1 (кислый) и FGF-2 (основной) являются продуктами различных генов и имеют до 53% аминокислотной гомологии.

Помимо FGF-1 и FGF-2 семейство включает онкобелки int-2 (FGF-3) и hst (FGF-4), FGF-5, фактор роста кератиноцитов , фактор роста эндотелия сосудов и другие факторы (Пальцев М.А., Иванов А.А., 1995).

FGF (Deuel T.F., 1987) стимулирует синтез ДНК и деление различных клеток мезенхимального происхождения , включая гладкомышечные и клетки сосудистого эндотелия (Stoker M. and Gherardi E., 1991).

Оба этих типа клеток участвуют в образовании сосудистых стенок (показано, что гладкомышечные клетки реагируют также и на PDGF , в то время как сосудистый эндотелий не несет на своей поверхности PDGF-R). Синтез и секреция FGF активно делящимися фибробластами, по-видимому, играет роль в индукции ангиогенеза в течение заживления ран или при неопластической трансформации.

Молекула FGF-1 представлена простой полипептидной цепью с молекулярной массой 16800(Пальцев М.А., Иванов А.А., 1995).

Пептид, включающий в свою структуру 111 аминокислотных остатков; сходен по ряду свойств с фактором роста эндотелиальных клеток (beta-ECGF). Получен из мозга рогатого скота (Esch F. et al., 1985), из ткани человека (Garuelle D. et al., 1988). Тромбоксан А2 и ангиотензин II стимулируют гипертрофию вазальной мускулатуры, влияя на FGF . Его функция непосредственно зависит от активности протеинкиназы C (li S. et al., 1994). См. также: Huges S. et al., 1993 .

Биологические активности членов FGF-семейства разнообразны. Они являются митогенами для различных клеток нейроэктодермального и мезодермального происхождения (Klagsbrun M., 1989), стимуляторами ангиогенеза (Folkman J., Klagsbrun M., 1987), поддерживают и стимулируют дифференцировку клеток различных нейрональных типов *in vivo* и *in vitro* (Saunders K.B., D'Amore P.A., 1991).

FGF связываются с высокоаффинными рецепторами , низкоаффинными сайтами клеточной поверхности и с внеклеточным матриксом (Moscatelli D., 1987).

Способность гепарина или гепаринаразрушающих ферментов подавлять низкоаффинное связывание предполагает, что эти факторы могут связываться с гепарансульфатом матрикса.

PDGF

Наиболее хорошо изученным представителем группы белковых факторов роста (мито- и мотогенов) является тромбоцитарный фактор роста (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF). Несмотря на огромное количество данных, накопленных с момента открытия PDGF, теории, объясняющей большинство его эффектов в живом организме, не существует - поэтому новые и новые исследования приносят новые и новые результаты. Например, совсем недавно было высказано предположение, что факторы роста и PDGF, в частности, могут изменять пролиферативный статус клетки, влияя на интенсивность белкового синтеза, но не затрагивая при этом усиления транскрипции генов раннего ответа, как *c-myc* и *c-fos*. Действительно, известна система (культивируемые гладкомышечные клетки, в которой PDGF-AA ведет к повышению уровня белкового синтеза, и только PDGF-BB является митогеном. Так что существуют еще множество аспектов биологии этого одного из важнейших факторов роста, и, несомненно, в ближайшие годы можно ожидать интересные результаты, служащие подтверждением неослабевающего интереса к биологии клеточного роста.

EGF

Эпидермальный фактор роста (EGF - Epidermal Growth Factor, урогастрон, фактор роста эпидермальный) - полипептид с молекулярной массой 6000, молекула которого состоит из 53 аминокислотных остатков, был впервые изолирован из слюнных желез мыши. Впоследствии он был найден во многих нормальных и патологически измененных тканях. Доказанные и гипотетические функции EGF можно классифицировать как эндокринные и паракринные.

EGF найден в крови, моче, цереброспинальной жидкости, молоке, слюне, желудочном и панкреатическом соке.

Биологические секреты и сыворотка крови содержат различные формы EGF с разной молекулярной массой: 6000 - EGF, 9000 - пре-EGF, 25000 - секреторный комплекс, 75000 - комплекс, состоящий из двух молекул EGF и двух молекул белков-носителей.

Сильный митоген на культурах различных фибробластов. Участвует в поддержании гастроинтестинальной функции; обладает ранозаживляющей активностью (Savage C. et al., 1972, Goodlad R. & Wringht N., 1989).

Физиологическая роль секретируемого и циркулирующего EGF до конца не ясна. Иммуногистологические исследования с применением антител к EGF подтвердили биохимические данные и показали, что основным местом синтеза EGF служат слюнные железы. Помимо слюнных желез, EGF иммуногистохимически выявлен в пилорических железах желудка и железах двенадцатиперстной кишки, в почечных канальцах, поджелудочной железе, передней доле гипофиза. Молочные железы в период лактации и некоторые примордиальные фолликулы яичника новорожденных также содержат EGF.

Некоторые ткани, например дистальные канальцы почки, синтезируют пре-EGF, но не формируют зрелый EGF (Rall L.B. et al., 1985).

EGF играет важную роль в канцерогенезе. В определенных условиях он может вызывать малигнизацию клеток (Velu T.J. et al., 1987). EGF активирует протоонкогены *c-fos* и *c-myc* (Bravo R. et al., 1985).

TGF

Некоторые опухолевые клетки секретируют факторы, которые при добавлении в среду позволяют фибробластам расти в суспензии, тогда как нормальные фибробласты могут расти только при условии, что они прикрепляются к твердой поверхности. Такие факторы получили название трансформирующих ростовых факторов (TGF) (transforming growth

factors, TGF). Один из них, TGF-бета, структурно похож на эпидермальный ростовой фактор EGF. Оба эти фактора связываются с одним рецептором. Семейство TGF-бета включает более 40 различных членов, сгруппированных в несколько подсемейств. Оно включает также активины, ингибины и другие цитокины. Прототипом этого семейства является фактор TGF-бета 1. У млекопитающих экспрессируются также изоформы TGF-бета 2 и TGF-бета 3. Здесь речь будет идти о наиболее изученном TGF-бета1. Члены этого семейства оказывают множественные влияния на большое число типов клеток и участвуют в регуляции роста клеток, их дифференцировки и апоптозе а также в модуляции иммунной системы [Heldin ea 1997]. Эти факторы играют важную роль в развитии, начиная с оплодотворенного яйца. В соответствии со своей многофункциональностью семейство TGFбета может играть множество ролей в опухолеобразовании. На ранних стадиях они могут действовать как супрессоры опухолей. p15INK4b и p27KIP1a являются ключевыми компонентами передачи ингибиторных сигналов, индуцируемых связыванием TGF-b со своими рецепторами (Рис. 2). В конце 90-х гг обнаружено, что активированные рецепторы TGF-b фосфорилируют специфические сигнальные эффекторы, белки Smad2 и Smad3, вызывая их связывание с опухолевым супрессором Smad4. Образующиеся комплексы транслоцируются из цитоплазмы в ядро, где они регулируют транскрипцию специфических генов, в частности ингибиторов Cdk. В результате активируются и p21WAF1/CIP1, и p15INK4b [Datto, ea 1997, Grau, ea 1997, Miyazaki, ea 1997, Massague, ea 1995]. Последний вытесняет p27KIP1a из комплекса с Cdk4/6 и подавляет образование их комплексов с циклинами D, необходимых для продвижения по G1 (рис. 1). Высвобожденный p27KIP1a, в свою очередь, связывает и ингибирует комплексы циклин E - Cdk2, ответственные за начало S-фазы. Повышение экспрессии p21WAF1/CIP1 также ведет к подавлению активности комплексов циклин D - Cdk4,6 и циклин E - Cdk2. В результате клетка останавливается в G0/G1 и не входит в S-фазу (рис. 3). Затем на более поздних стадиях, когда клетки приобретают нечувствительность к ингибированию роста извне, он, наоборот, может действовать, как промотор опухолеобразования, стимулируя ангиогенез, иммуносупрессию и синтез внеклеточного матрикса. Это способствует росту и метастазированию опухолей. Трансформирующий фактор роста бета сдерживает пролиферацию клеток молочной железы. Трансформирующий фактор роста бета - мощный стимулятор выработки коллагена.