

# Молекулярно-генетичні механізми нейроонтогенезу

В. І. Цимбалюк, В. М. Семенова, В. В. Медведєв

Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова АМН України  
Вул. Мануїльського, 32, Київ, 04050, Україна

---

*На ґрунті літературних даних представлено сучасні уявлення щодо молекулярно-генетичних механізмів нейроонтогенетичних процесів, запропоновано схематичне трактування поступової диференціації нейрональної клітини у ході ускладнення топології міжнейронних зв'язків, а також наведено відомості стосовно онтогенетичної ролі нейрональних стовбурових прогеніторів та розглянуто можливість вивчення топологічних перебудов нейрональних ансамблів під час генерування енграм пам'яті з точки зору мікроембріональних процесів.*

---

*Ключові слова: нейрональна індукція, сигнальна трансдукція, генетична експресія, гомеодоменні фактори транскрипції, диференціація і детермінація, фактори росту, нейрогенна стовбурова клітина.*

---

**Вступ.** Завдяки фундаментальним досягненням молекулярної біології, молекулярної генетики, нейрофізіології і нейронаук у цілому протягом останнього десятиріччя одержано багато якісно нової інформації, яка суттєво поглибила розуміння тонких механізмів регуляції нейроембріогенезу та підтримання структурно-функціональної цілісності нервової системи на усіх етапах її розвитку.

Необхідно зазначити, що множина відомих факторів регуляції різноманітних етапів нейроонтогенезу значно розширилася. Водночас історично склалося так, що перші дослідження, присвячені вивченню молекулярних механізмів нейроонтогенезу проводили на доступних в експериментальному плані організмах, таких як личинки *Drosophila melanogaster*, зародки амфібій (*Xenopus*) і птахів, а згодом і на зародках філогенетично ближчих до людини тварин (здебільшого лабораторних мишей). При цьому досягнення у вивченні нейрогенної індукції отримано завдяки дослідженню ембріогенезу у безхребетних (*D. melanogaster*) та амфібій (*Xenopus*). Усім відомі, наприклад, результати піонер-

ських робіт Шпемана та Магнольда з вивчення індуктивного впливу дорзальної губи бластопора зародків амфібій на здійснення гастрულляції та нейруляції. Загалом, з точки зору концепції паралелізму ранніх стадій ембріонального розвитку різноманітних організмів, немає жодних вагомих підстав для сумніву у можливості проектування отриманих даних на механізми раннього нейроонтогенезу вищих ссавців, необхідно лише пам'ятати про величину філогенетичної відмінності експериментального організму від, приміром, людини.

Отже, відкриття загальних рис найбільш ранніх стадій нейроонтогенезу на прикладі безхребетних чи нижчих хребетних не повинно вважатися безперспективним у плані побудови концепції перебігу аналогічних процесів у ході онтогенезу людського мозку.

Дослідження так званої патернізації нервової трубки на сьогоднішній день здебільшого проводять як на курячих та мишачих зародках, так і на рибах, що допомагає наблизитися до розуміння механізмів розвитку спинного, заднього, середнього та проміжного мозку вищих ссавців. Загальні ж принципи молекулярних механізмів перебігу онто-

генезу головного мозку ссавців, на жаль, залишаються об'єктом для широких дискусій та теоретичних побудов.

Зважаючи на таку ситуацію, доцільно, на нашу думку, навести загальні погляди на молекулярні механізми нейроонтогенезу.

Враховуючи значущість історичного компонента в оглядових роботах такого роду, видається зовсім не зайвим доповнити статтю ще й широкими історичними довідками стосовно особливостей відкриття згадуваних у тексті генів. Однак сьогодні робити історичні зрізи щодо розвитку основних уявлень про молекулярні механізми нейроонтогенезу, на нашу думку, ще надто рано.

Молекулярні механізми первинної нейрогенної індукції. Вважається, що існує певна ієрархічна часова система онтогенетичного розгортання транскрипції клітинних геномів за допомогою гомеодомених факторів транскрипції (ФТ). Найвиразнішою є просторово-часова дивергентність активності ФТ, а їхні комбінації визначають вид і властивості будь-якої клітини [1].

Згідно з сучасними уявленнями теоретичної нейроембріології постулюється, що під час нейруляції відбуваються процеси індуктивної взаємодії між клітинами ектодерми та хордального тяжа. Досліди на зародках ксенопусів показали, що клітини ектодерми на стадії ранньої гастрюляції секретують білок BMP4 (bone morphogenic protein 4), який опосередковано через ФТ Sox2, Zic1, Xzic3, GATA1, Msx1, Xiro, Xlrou2, SoxD та neurogenin активує експресію генів *Myt1*, *NeuroD* і *Delta*, визначаючи подальшу нейрональну детермінацію клітин [2—4]. Однак уже на стадії утворення нейрональної пластинки ектодермальні клітини втрачають здатність продукувати BMP4 і його концентрація в структурах нейроепітеліального типу зменшується та утримується на низькому рівні через експресію у первинних нейрогенних тканинах хребетних аналогів матриксних факторів, які зв'язують BMP4 і знайдені у тканинах зародків ксенопусів, мишей і щурів — фолістатину, хордину (chordin), ногіну (noggin) [5—8].

Найважливішим фактором нейродетермінації вважається секретований клітинами хордального тяжа білок SHH (Sonic hedgehog). Ген цього ключового нейрогенного білка виявився досить консервативним у філогенетичному плані і відіграє однаково важливу роль у нейроонтогенезі як земноводних, ссавців, так і безхребетних (у *D. melanogaster*,

наприклад, білку SHH відповідає продукт експресії гена *Hedgehog*).

У ході багаторічного вивчення молекулярних механізмів первинної нейрогенної індукції на зародках ссавців, птахів, земноводних і комах побудовано певну загальну схему реалізації нейрогенної дії SHH. Так, вважається, що SHH зв'язується з молекулами поверхневих рецепторів, розташованих над хордою клітин ектодерми типу Ptc (наприклад, *patched1* — продукт гена *Patched D. melanogaster*, а також його аналоги у хребетних відповідають за чутливість ембріональних клітин до білків групи *hedgehog*, у тому числі і SHH). Це веде до розблокування активності трансмембранного білка типу Smo (продуктом експресії гена *smoothened D. melanogaster* є білок з класу G-залежних трансмембранних рецепторів) і активації специфічного макромолекулярного комплексу, до якого входять філогенетичні аналоги білків *D. melanogaster* Su(fu) (протеїнкіназа Suppressor of fused) і Fu білки (fused; продуктом експресії гена *fused* (17C-D ділянка X-хромосоми *D. melanogaster*) є серин-треонінова протеїнкіназа Fused), протеїнкіназа A, регулятори транскрипції з групи Gli(1—3) (від англ. glioma — ген *gli*, вперше виявлений під час дослідження генетичних маркерів пухлинних клітин, отриманих із гліом головного мозку людини) тощо. Su(fu)-кіназа, інактивуючи специфічну до білка Gli протеазу типу Cos-2 (ген *costal-2 D. melanogaster*), потенціює Gli-залежну транскрипцію багатьох генів, у тому числі і гомеодомених ФТ [9].

Встановлено, що продукція надлишку мономерів рецепторних білків типу Ptc по відношенню до одиниць білка Smo зумовлює безактиваційне зв'язування молекул SHH. За умови супутньої експресії фактора Hip (hedgehog-interacting protein) це призводить до суттєвого зменшення Gli-опосередкованої сигнальної трансдукції. Відомо, що білок SHH репресує утворення ФТ Gli3 та активує ФТ Gli1 і Gli2, які беруть участь у модуляції і передачі SHH-сигналу до ядра клітини, тоді як Gli3 діє антагоністично до SHH-Gli1 каскаду [10].

На ранніх стадіях нейрогенезу молекули SHH надходять до клітин-мішеней шляхом тканинної дифузії [11], проте, як показали дослідження пізніших стадій нейрогенезу *D. melanogaster*, молекули SHH можуть транспортуватися внутрішньоклітинно по дендритах або цитонемах [12], що регулюється цитоплазматичними факторами *tout-velu* та *dispatched* [13, 14].

Для всіх хребетних, як і комах, доведено наявність зв'язків між системами сигнальної трансдукції SHH, FGF (fibroblast growth factor) і Wnt (див. нижче) [10], а також існування антагоністичних взаємодій між SHH та BMP за рахунок високоафінного зв'язування деяких видів білків Gli з молекулами факторів транскрипції типу SMAD [15]. У синтетичному вигляді процес нейрогенної індукції під час гастрюляції хребетних виглядає наступним чином. За наявності в оточенні ектодермальних клітин молекул SHH та паралельного виключення впливу BMP4 розпочинається експресія білків групи нейрогеніну. Останній є фактором транскрипції класу basic helix-loop-helix (bHLH) і відіграє одну з центральних ролей у спрямуванні генетичної експресії клітин по нейрональному шляху. Одним із безпосередніх ефектів цього ФТ вважається потенціювання експресії генів *Delta* і *NeuroD* (ФТ типу bHLH, який безпосередньо активує нейрогенну детермінацію у хребетних) [4].

Молекули трансмембранного протеїну Delta комплементарно взаємодіють з рецепторами типу Notch (монорецептор клітинної поверхні з молекулярною масою 300 кДа), представленими на поверхні суміжних ектодермальних клітин. Обидва поверхневих білки є досить консервативними у філогенетичному відношенні і відіграють рівнозначну роль у нейрогенезі як комах, так і різноманітних представників типу хребетних. У людини теж експресуються аналоги рецепторного білка *D. melanogaster* Notch, наприклад, білок Notch3.

Під час зв'язування та активації Notch відбувається відщеплення цитоплазматичного домену NICD (notch intracellular domain), котрий згодом мігрує у ядро і асоціюється з фактором транскрипції RBP-Jk (Recombination signal-sequence binding protein). Комплекс Notch—RBP-Jk активує транскрипцію генів типу *HES* (Hairy/Enhancer of split) і *HERP* (HES-related repressor protein). Продуктами експресії цих висококонсервативних генів є фактори транскрипції із репресивними функціями, що належать до структурного класу білків типу bHLH. У процесі Notch-залежної сигнальної трансдукції у *D. melanogaster* значну роль відіграють також фактори *Grocho* та *Hairless*. У кінцевому підсумку, незважаючи на репресію транскрипції різноманітних генів, відбувається пригнічення експресії генів *neurogenin-1* і *neurogenin-2*, характерних для нейрогенезу хребетних, у тому числі ссавців [7, 8, 16].

Отже, у клітинах, розташованих ближче до первинних продуцентів молекул SHH, кількість трансмембранних мономерів протеїну Delta презумптивно вища, ніж у клітинах, які перебувають під дією менших концентрацій білка SHH. Це означає, що в останніх гени *neurogenin-1* та *neurogenin-2* знаходяться під негативним впливом фактора Delta, опосередкованим репресивною сигнальною трансдукцією з Notch-рецепторів.

Таким чином, білок SHH виступає швидше фактором зрушення первинної детермінаційної рівноваги у системі двох суміжних клітин, що і є визначальним моментом поступової нейрональної індукції.

У хребетних існують і інші позаклітинні ліганди Notch з антагоністичними властивостями — Jagged (наприклад, *Jagged1* експресується у клітинах людського організму) і *Fringe* [8]. У дрозофіл металопротеїназа *Kuzbanian* разом з конвертазою комплексу Гольджи *Furin* бере участь як у пост-транскрипційній конверсії молекул Notch, так і в примембранному руйнуванні білків *Delta* і *Notch* з утворенням пептидів, репресивно діючих на Notch. З внутрішньоклітинним доменом Notch рецепторів ссавців можуть взаємодіяти протеаза *presenilin*, білки *Bcl-3* (представник родини білків I $\kappa$ B) і *Nur-77* (білковий фактор, що бере участь у лімфогенезі). Для Notch-сигнального каскаду *D. melanogaster* характерна також участь білків *Numb*, *Dishvelled* (Wingless каскад) і *Disabled* (група Abl киназ) [16, 17]. Не виключено, що кожному з них відповідають певні білкові аналоги вищих ссавців.

Описані вище фактори первинної індукції є елементами так званих антеріоральних градієнтів. Проте існує і постеріоральний нейруляційний градієнт, котрий, як показано дослідями на представниках різних класів хребетних, забезпечується синтезом і дифузиею похідних ретиноевої кислоти [18] та білків родини FGF [7] з каудальних відділів ектодерми та первинної мезодерми. Однак реалізація їхнього морфогенетичного впливу можлива лише за умови виключення секреції BMP-4 [7].

Відомі також і локальні (у певному розумінні) нейруляційні градієнти. Так, клітини гензенівського вузлика мишачих зародків на стадії інвагінації первинної смужки експресують гомеодоменні ФТ *Lim-1* (походження аббревіатури, швидше за все, пов'язане з анатомічним терміном limb) і *Otx-2* (orthodenticle homolog ttx; аналог фактора *Otd*

(orthodenticle) *D. melanogaster*; у людини ген *OTX-2* розташований в локусі 14q21-q22). Під час дослідів на зародках ксенопусів встановлено, що ендомезодермальні клітини дорзальної губи бластопора, складаючи в подальшому передній фронт гастрюляційної міграції, секретують білок *serbeug* [5, 7, 8]. Не виключено, що аналогічний додатковий пронеурогенний фактор може секретуватися і під час ранньої нейруляції ссавців.

Таким чином, на сьогоднішній день у досить загальних рисах схема первинної нейрональної індукції на молекулярно-генетичному рівні уже відома.

Молекулярні механізми розвитку ромбенефалічних структур. На ранніх етапах розвитку довгастого мозку ссавців і птахів виділяють стадію восьми ромбомерів (r1—r8). Через наявність різниці в концентраціях факторів індукції уздовж АР (anterior-posterior) осі нейрональні клітини різних ромбомерів проявляють експресію різних гомеодомених ФТ [7, 19]. Сукупність ФТ та позиційних генів, які експресуються клітинами одного ромбомеру, називають патерном, а поділ нервової трубки на ділянки з різними патернами експресії отримав назву патернізації нервової трубки.

Відомо, що поряд з експресією уздовж r5—r6 мишачих зародків протоонкогену *kreisler*, продуктом експресії якого є фактор транскрипції типу «лейцинової блискавки» з родини *c-maf*, інший ФТ, *Krox-20* (група ФТ типу «цинкових пальців», zinc-finger), синтезується лише у клітинах 3-го і 5-го ромбомерів. Через це (з аналогічною для *Krox-20* періодичністю уздовж АР-осі) активується експресія наступної групи генів ФТ ссавців: *Sek-1*, *Sek-3* і *Sek-4* (кодують рецепторні тирозинові кінази з підгрупи ефринів).

Для активації генів *Elk-2* і *Elk-L3* особливе значення має відсутність експресії *Krox-20* і наявність первинних факторів індукції. Останніми у процес детермінації експресії завдяки постеріоральним індукторам включаються філогенетично консервативні гомеобоксні гени типу *HOX* (аналогі генів групи *НОМ-С D. melanogaster*), які найактивніше експресуються в каудально локалізованих ромбомерах мишачих зародків. Гени *HOX* у геномі людини розташовані кластерами: 7p15-p14, 17q21-q22, 12q12-q13 та 2q31. Як і у філогенетично нижчих організмів, роль цих позиційних регуляторів транскрипції колосальна.

Так, за чітку топічну детермінацію нейронів

ромбенефалічних ядер черепно-мозкових нервів ссавців відповідають регулятори транскрипції CO-UP-TFI, GATA2, GATA3, Pax6, Lhx3/Lhx4, Phox2b, Phox2a, ErbB2, ErbB3, *neurogenin-1*, *neurogenin-2*, Mash1, Isl1, Isl2, Lim3. Диференційна експресія цих регуляторів виникає внаслідок утворення патернів ромбомерної експресії генів *Rar*, *Wnt1*, *Gbx2*, *kreisler*, *Krox-20*, *Hoxa1*, *Hoxa2*, *Hoxa3*, *Hoxb1*, *Hoxb2*, *Hoxb3*, *Gli1/Gli2*, а регуляція і спрямування специфічного росту аксональних закінчень та міграції нейронів ядер черепно-мозкових нервів здійснюються завдяки синтезу клітинними угрупованнями ромбомерів факторів росту Ret, Gfr, GDNF (glial-derived neurotrophic factor), neurturin, persephin, artemin, Brn3a, Semaphorin 3a, neuropilin 1 та 2, ErbB4, HGF (hepatocyte growth factor) [19].

Відомо, що для нейробластів заднього мозку ссавців характерна рання експресія гена *Gbx2*, а подальші проліферація та диференціація мозочкових клітин відбуваються внаслідок експресії генів *RU49/Zipr1*, *Zic1*, *Zic3*, *Math1*, *Wnt3* і *En2* [20]. Встановлено, що клітини Пуркінє мишачих зародків підтримують проліферацію нейробластів, які мігрують повз молекулярний шар до поверхні кори мозочка за рахунок секреції молекул SHH [10].

Молекулярні механізми розвитку середнього і переднього мозку. Під час розвитку структур середнього мозку важливе значення має ділянка перехийка (isthmus), клітини якої утворюють кільцеподібну область секреції FGF-8.

Як показано дослідями з представниками різних типів організмів, цей фактор росту разом з білком SHH активує експресію висококонсервативного білка Wnt-1 («wingless-like» intermediate1 — аналог фактора wingless *D. melanogaster*) і, таким чином, створює первинний істмічний градієнт. Виявлено, що молекули Wnt-1 за допомогою специфічного поверхневого рецептора типу Frizzled (*D. melanogaster*) активують інгібітор кінази GSK-3 (glycogen synthase kinase-3) — білка типу Dishevelled (*D. melanogaster*), а завдяки взаємодії з рецептором LRP5/6 (low-density-lipoprotein-receptor-related protein 5/6, належить до філогенетично висококонсервативної групи рецепторів) [21] репресують діяльність активатора кінази GSK-3, яка через її причетність до протеолітичної деградації  $\beta$ -катеніну спричинює зростання ядерної концентрації останнього. Як продемонстровано у дослідях на експериментальних мишах, високоафінний до

LPR5/6 білок Dickkopf вважається функціональним антагоністом Wnt-1 [21]. Відомо, що в ядрах клітин практично усіх хребетних молекули  $\beta$ -катеніну утворюють комплекси з ФТ, аналогічними CтBP (C-terminal binding protein, *D. melanogaster*), Lef1/Tcf, Groucho (*D. melanogaster*) і SMAD. При цьому активується експресія генів *Lef1*, цикліну *D1*, *HOX*, *msx*, *msx1*, *Tabby* [22]. Крім того, катеніни беруть участь у сигнальній трансдукції з молекул кадгеринів [23].

Таким чином, у клітинах мезенцефалічного відділу нервової трубки риб, птахів і ссавців індукується експресія генів *Pax-2* (аббревіатура від raised box), *Pax-5* і *Pax-8*, а згодом і *En1* та *En2*, що спричиняє виникнення градієнта концентрацій білків RAGS (repulsive axon guidance signal) і ELF-1 (Eph ligand family-1), які беруть участь у проектуванні закінчень нейробластів сітківки ока [7].

Стосовно молекулярно-генетичних механізмів розвитку теляцефалону ссавців експериментально встановлено, що товщина різних ділянок неокортексту ссавців залежить від експресії нейронами промітогенного ФТ BF-1 (brain factor 1) [24]. Відомо, що нейрони глибоких шарів кори та тектума за допомогою секреції молекул білка SHH підтримують проліферацію нейрональних прогеніторів субвентрикулярної зони (SVZ) [10]. Незважаючи на виявлену різницю в експресії генів дорзальної (*Emx1/2*, *Pax6*, *Trb1*) та вентральної (*Dlx1/2*) ділянок кінцевого мозку ссавців [25], а також активну на цій стадії нейрогенезу експресію деяких інших генів (*Emx*, *Dlx*, *Nkx* — група гомеобоксних генів; гени типу winged helix *BF-1*, *BF-2*; а також гени *Tbr-1* і *Wnt-3*) [7, 26], залишається відкритим питання щодо загального розуміння процесу топічної диференціації нейрональних клітин на початкових стадіях розвитку прозенцефалічних структур. Враховуючи складність нейрональних сіток великих півкуль головного мозку, на нашу думку, відбувається скоріш не просторова, а функціональна ієрархізація певних ділянок кінцевого мозку.

Молекулярні механізми ембріогенезу структур спинного мозку. Дослідами на зародках ксенопусів, курей та експериментальних мишей встановлено, що експресія генів *Pax* клітинами каудальної частини нейрональної пластинки активується ще до утворення нервових валіків та нервової борозни, тоді як білок SHH, секретований у міжклітинний простір клітинами хордального тяжа, пригнічує і

виключає експресію цих генів. Тому клітини каудальної нейроектодерми, які розташовані безпосередньо над хордальним тяжем, втрачають здатність експресувати гени *Pax* і починають у невеликій кількості синтезувати молекули SHH. Клітини нервової пластинки, локалізовані дещо латеральніше від серединних, повільно експресують ген *Pax6* і лише у клітинах, які займають найбільш латералізовану позицію, зберігається первинний профіль активності генів *Pax* [8].

Подальша диференціація клітинного складу нервової трубки на рівні спинного мозку забезпечується послідовним залученням гомеодомених ФТ групи Lim (LH2a/LH2b, Lim-1 і Lim-2, Lmx1, Lim-3 і Gsh-4) [5, 7, 8, 27]. Так, вентрально розташовані попередники мотонейронів активно експресують гени *isl1* та *isl2*, тоді як інтернейрони дорзальної порції — виключно *isl1* [8, 27]. Немає сумніву, що усі ці еволюційно висококонсервативні гени відіграють аналогічну роль у розвитку спинного мозку і вищих ссавців.

Механізми аксонального росту, трансмедіації та топічного проектування. На даний момент існує доволі відносний ситуативний поділ зовнішньоклітинних регуляторів аксонального росту на контактні та гуморальні (дифузійні); при цьому в кожній групі виділяють репульсивні (які пригнічують ріст) та атракторні (які активують ріст) фактори. Відповідно виділяють такі механізми спрямування аксонального росту, як хеморепульсія, хемоатракція, контактні репульсія і атракція, а також фасцикуляція (використання для атракції стовбура випереджального чи протилежно спрямованого аксона).

До відомих регуляторів аксонального росту належать трансмембранні білки групи CAM (cell adhesion molecules) з внутрішньоклітинними тирозинкіназними та тирозин-фосфатазними доменами, молекули позаклітинного матриксу, нетрини, семафорини, кадгерини тощо [28—31]. Варіанти аналогів білків, які регулюють ріст нервових закінчень, присутні в геномах усіх без винятку представників типу хребетних, у тому числі людини.

Сигнальна трансдукція з рецепторів цих факторів росту, як правило, характеризується значною розгалуженістю. Досить наочно це можна продемонструвати на прикладі уже згаданого нами фактора росту HGF (інший варіант назви — «scatter factor») [32]. Дослідженнями на багатьох біологічних системах (ссавці, птахи, амфібії) виявлено,

що HGF-залежна сигнальна трансдукція починається з рецепторного білка Met, який через тирозин-кінази Gab1 та Grb2 активує цитоплазматичну кіназу Nck, яка забезпечує фосфорилування іншої кінази — JNK (c-Jun N-terminal kinase). Білок Met зв'язує також молекули фосфатидил-інозитол-3-кінази та фосфоліпази C $\alpha$ ; PI3K активує цитоплазматичну кіназу Akt. Через взаємодію з тирозин-кіназою Src і тирозин-фосфатазою SHP2 забезпечується активація факторів транскрипції Nck і STAT [32]. Ремоделювання білків цитоскелету здійснюється шляхом активування регуляторів MENA (Mammalian enabled) та VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein), котрі завдяки профіліну розпочинають полімеризацію актину [33, 34]. Таким чином, велика кількість цитоплазматичних і ядерних факторів трансдукції обумовлює поступове молекулярне виокремлення тих із них, які причетні до регуляції росту кожного аксона та неповторності спектра активності ФТ.

Процес загального аксонального росту починається із проростання поодиноких аксональних закінчень уздовж первинних репелентних та атракторних градієнтів. Важливу роль на цьому етапі відіграє радіарна глія [35]. Аксони, що ростуть у певному напрямку, орієнтуються на точки вибору — ділянки з високою концентрацією одного чи кількох факторів спрямування аксонального росту, просторове розташування яких, очевидно, визначається під час ранньої нейрональної індукції [30].

Через значне посилення доцентрової сигналізації від аксональних рецепторів поблизу точок вибору відбувається поетапне поглиблення диференціації нейрона, прямим наслідком чого є перелаштування рецепторного апарату аксонального конуса росту. Останній втрачає здатність позитивно реагувати на розташований поряд домінуючий фактор і водночас перемикається на ріст уздовж градієнта уже іншого, секретованого наступною точкою вибору, атрактанту.

Аналогічно забезпечується проростання аксонами середньої лінії (трансмедіанізація), клітини і матрикс якої продукують цілу гаму регуляторів аксонального росту. Так, у численних дослідках на *D. melanogaster* виявлено, що нетрин UNC-6, дифузно розповсюджуючись по обидва боки від середньої лінії, створює атракативний градієнт для аксональних конусів росту, які несуть на своїй поверхні специфічний для цього фактора рецептор DCC (клас Ig-CAM). Після того як аксон доростає до

середньої лінії, DCC-рецепторний комплекс через тирозин-кінази активує синтез трансмембранного білка UNC-5, що спричиняє зв'язування та зміну конфігурації DCC і фактично втрату конусом росту здатності оцінювати нетриновий сигнал як атракативний.

За таким же принципом у зоні середньої лінії діють фактори Axonin-1/NrCAM і Comm [30]. Однак чи не найцікавіше працює система Robo. Robo (Roundabout) — це специфічний до медіанного хеморепеленту Slit рецептор конуса росту [36—39]. За наявності активної атракції аксон, незважаючи на значну репеленцію Slit-протеїном, повільно вростає в ділянку середньої лінії. Одночасно нейронами експресуються і поверхневі приховувачі молекул Slit — Robo-2, які завдяки специфічній фосфатазі перебувають у нефункціональному стані. Оскільки для трансдукції репелентного впливу рецептори Robo, очевидно, використовують цитоплазматичні протекінкінази, то в умовах гіперактивації великими кількостями ліганду Slit Robo-2-специфічна фосфатаза інактивується сайт-специфічним фосфорилуванням.

Таким чином, Robo-2 починає конкурувати з Robo за молекули Slit, що зменшує рівень репелентного впливу на конус росту. Як тільки аксональне закінчення вийде за межі середньої лінії, загальний репульсивний ефект Robo знову зростає. Завдяки тому, що супутні фактори аксонального росту з цього моменту демонструють виключно репелентну налаштованість, стає очевидною неможливість повернення до середньої лінії. Крім того, Robo та Slit здатні перемикати атракторний сигнал з комплексу DCC—нетрин-1 на репелентний [40]. Зрозуміло, що подібні процеси, але в набагато складнішому вигляді, мають місце під час трансмедіанізації у ссавців.

Вважається, що під час встановлення проєкційних зв'язків з певними ділянками центральної нервової системи використовуються щонайменше три механізми проєктивного росту аксональних закінчень [30]. У першому випадку аксон, утримуючи на своїй поверхні певну кількість рецепторів до атрактанту, рухається у градієнтному полі цього фактора росту проєкційної області до того моменту, поки негативний ефект від зв'язування високої його концентрації не переважає позитивний.

Згідно з другим механізмом, точка проєктування визначається місцем зрівноваження впливу на аксональний конус росту двох протилежно спрямо-

ваних градієнтів атрактанту та репелента проекційної зони.

Третій механізм реалізується при наявності загального атрактивного впливу та локального репелентного градієнта вздовж клітин області проектування. Саме так відбувається проектування відростків гангліонарів сітківки на ділянку тектума у амфібій, птахів і ссавців: у сітківці створюється збільшувальний назо-темпоральний градієнт експресії репелентного ефринового рецептора, а в області тектума — відповідний АР градієнт концентрації ефринів, який постійно зростає (наприклад, ELF-1 та AL-1). Тому назальні ділянки (мінімальна чутливість конуса росту до репелента) проектується на задні області тектума, а темпоральні (максимальна чутливість конуса росту до репелента) — на передні його відділи [28, 30].

На цей час для мозку птахів, амфібій і ссавців встановлено існування вторинних локальних телецефалічних градієнтів, наприклад: 1) зростання експресії *Raxb* від низького рівня в медіокаудальних областях півкуль мозку до високого — в ростролатеральних відділах кори головного мозку та протилежний градієнт експресії *Emx2*; 2) комплементарні градієнти експресії генів ефринових рецепторів (ядра таламічних нейронів) і ефринів (кортикальні нейробласти); 3) постцентральний градієнт експресії генів [28]. Виявлено диференційну експресію в нейронах різних полів кори головного мозку генів таких білків, як латексин, *Tbr-1*, кадгерин 6 та 11, *KOUP-TF1*, *CHL1*, *2m3* і *36m1* [26, 28]. Доведено також наявність градієнтного варіювання рівня експресії генів ефринів і ефринових рецепторів у різних полях кори великих півкуль [41].

Молекулярні механізми онтогенетичної диференціації та субтипівання нейрогенних стовбурових клітин (НСК). Практично для всіх варіантів НСК різноманітних ділянок нервової трубки експериментально встановлено факт слабкої часової рестрикції та топічної диференціації. У досліджах на дрозофілі показано, що гени *Hunch-back*, *Kruppel*, *POU-1* і 2, *Kastor* та *grainyhead* специфічно експресуються у нейробластах, отриманих з різних ділянок нервової трубки у різні моменти розвитку [42]. Крім того, відомо, що на стадії нейруляції НСК при низьких концентраціях FGF активно проліферують і диференціюються по нейрональному типу [43]. Із зростанням концентрації FGF вимикається ногіновий блок BMP і НСК починають

диференціюватися за гліальним типом (стадія гліогенезу) [6]. Далі під дією спочатку високих концентрацій FGF і BMP в НСК активується синтез рецепторів до EGF (epidermal growth factor) [44]. Зростання тканинних концентрацій EGF призводить до відносного зниження чутливості НСК до FGF. На пізніх стадіях нейроонтогенезу три гліогенні фактори — FGF, EGF і BMP підтримують стійку гліальну спрямованість диференціації НСК, що утримується впродовж усього життя людини, при цьому нейрогенеративні потенції НСК не зменшуються [43—45].

Загальні аспекти специфікаційного процесу під час розвитку нейроцитів. У процесах спеціалізації та детермінації нейроцитів прослідковується певна стадійність.

Так, стадія первинної специфічності нейробластів характеризується початком росту аксонів і міграції нейробластів завдяки наявності вторинних градієнтів. Орієнтаційна здатність конусів росту на цьому етапі поступово зростає до рівня розпізнавання патернів поверхневих рецепторів окремого нейроцита. У той час, коли аксон окремо взятого нейроцита максимально виростає, аксональні закінчення інших нейронів так само наближаються до цитолемі його тіла. Починається рецепторний обмін факторами, під час якого до ядра кожної нервової клітини одночасно надходить сигнальна інформація від власного тіла та аксонального конуса росту, що спричиняє зміну експресії ієрархічно нижчих ФТ, активацію дендритогенезу, поглиблення диференціації молекулярного рецепторного апарату конуса росту, орієнтаційна здатність якого сягає рівня розпізнавання патернів молекулярних сигналів від окремих дендритів.

Аналогічно відбувається третинна специфікація нейроцитів, тоді як подальші детермінаційні зміни не мають загальної стадійності. При цьому втрачається незворотність перемикання експресійної активності, що створює умови для ремоделювання нейрональних ансамблів упродовж всього постнатального розвитку людини. Наприклад, відомо, що в генеруванні довготривалої потенціалії гіпокампульних нейронів беруть участь різноманітні нейроонтогенетичні фактори росту та диференціації клітин [46—49], фактори транскрипції [49, 50], а також позиційні регулятори ранніх стадій нейроонтогенезу [49]. Останнє вказує на наявність залежного від довготривалої потенціалії ремоделювання нейрональних ансамблів гіпокампу

та темпоральної асоціативної кори під час запам'ятовування просторової інформації.

Очевидно, що спектр ФТ, які працюють під час мнестичного ремоделювання топологій нейрональних ансамблів, дуже широкий і потребує ретельного подальшого вивчення, як і факт можливого виникнення нових мутаційних форм ФТ під час ремоделювання. Це переводить розгляд згаданих процесів у площину мікроеволюційного відбору на тканинному рівні.

Таким чином, наведений аналіз літератури, який висвітлює результати новітніх молекулярно-генетичних досліджень останніх років у галузі вивчення нейроонтогенезу, дозволяє значно поглибити сьогоденні уявлення щодо ключових механізмів цього складного багатоступеневого процесу.

V. I. Tsybalyuk, V. M. Semenova, V. V. Medvedev

Molecular-genetic mechanisms of neuroonothogenesis

#### Summary

*The authors present the current scientific data on molecular-genetic mechanisms of neurogenesis, propose a schematic interpretation of gradual differentiation of neuronal cells during the complication of inter-neuronal links, review the data on the onthogenetical role of neuronal stem progenitors and consider the microembrional interpretation of topological reconstruction of neuronal networks during the generation of memory's engrammes.*

*Key words: neuronal induction, signalling transduction, genetic expression, transcription homeodomen factors, differentiation and determination, growth factors, neuronal stem cell.*

V. И. Цымбалюк, В. М. Семенова, В. В. Медведев

Молекулярно-генетические механизмы нейроонтогенеза

#### Резюме

*В обзоре освещены современные представления о молекулярно-генетических механизмах нейроонтогенетических процессов, предложено схематическое описание постепенной дифференциации нейрональной клетки в ходе усложнения топологии межнейронных связей, а также приведены данные относительно онтогенетической роли нейрональных стволовых прогениторов. Рассмотрена возможность описания топологических перестроек нейрональных ансамблей, возникающих во время генерирования энграмм памяти как микроэмбриональных процессов.*

*Ключевые слова: нейрональная индукция, сигнальная трансдукция, генетическая экспрессия, гомеодоменные факторы транскрипции, дифференциация и детерминация, факторы роста, нейрогенная стволовая клетка.*

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сингер М., Берг П. Гены и геномы / Пер. с англ.—М.: Мир, 1998.—Т. 2.—391 с.
2. Bertrand N., Castro D. S., Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types // Nat. Revs Neurosci.—2002.—3, N 7.—P. 517—530.

3. Munoz-Sanjuan I., Brivanlou A. H. Neural induction, the default model and embryonic stem cells // Nat. Revs Neurosci.—2002.—3, N 4.—P. 271—280.
4. Sasai I. Identifying the missing links: genes that connect neural induction and primary neurogenesis in vertebrate embryos // Neuron.—1998.—21, N 3.—P. 455—458.
5. Gomez-Skarmeta J. L., Campuzano S., Modolell J. Half century of neural pre patterning: the history of a few bristles and many genes // Nat. Revs Neurosci.—2003.—4, N 7.—P. 587—598.
6. Li W., LoTurco J. J. Noggin is negative regulator of neuronal differentiation in developing neocortex // Develop. Neurosci.—2000.—22, N 1—2.—P. 68—73.
7. Lumsden A., Krumlauf R. Patterning the vertebrate neuraxis // Science.—1996.—274, N 5290.—P. 1109—1114.
8. Tanabe Y., Jessell T. M. Diversity and pattern in the developing spinal cord // Science.—1996.—274, N 5290.—P. 1115—1132.
9. Goodrich L. V., Scott M. P. Hedgehog and patched in neural development and disease // Neuron.—1998.—21, N 6.—P. 1243—1257.
10. Altaba A. R. J., Palma V., Dahmane N. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain // Nat. Revs Neurosci.—2002.—3, N 1.—P. 24—33.
11. Zeng X., Goets J. A., Suber L. M., Scott W. J., Schreiner C. M., Robbins D. J. A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling // Nature.—2001.—411, N 6838.—P. 716—720.
12. Ramirez-Weber F. A., Kornberg T. B. Cytonemes: cellular processes that project to the principal signalling center in *Drosophila* imaginal discs // Cell.—1997.—90, N 2.—P. 257—269.
13. Bellaïche Y., The I., Perrimon N. Tout-velu is a *Drosophila* homologue of the putative tumor suppressor EXT-1 and is need for 11h diffusion // Nature.—1998.—394, N 6688.—P. 85—88.
14. Burke R., Nellen D., Bellotto M., Hafen E., Senti K. A., Dickson B. J., Basler K. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified Hedgehog from signaling cells // Cell.—1999.—99, N 7.—P. 803—815.
15. Liu F., Massague J., Ruiz i Altaba A. Carboxy-terminally truncated Gli3 protein associate with Smads // Nat. Genet.—1998.—20, N 4.—P. 325—326.
16. Artavanis-Tsakonas S., Rand M. D., Lake R. I. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development // Science.—1999.—284, N 5415.—P. 770—776.
17. Baron M. An overview of the Notch signalling pathway // Semin Cell Develop. Biol.—2003.—14, N 2.—P. 113—119.
18. Maden M. Retinoid signalling in the development of the central nervous system // Nat. Revs Neurosci.—2002.—3, N 11.—P. 843—853.
19. Cordes S. Molecular genetics of cranial nerve development in mouse // Nat. Revs Neurosci.—2001.—2, N 9.—P. 611—623.
20. Wang V. Y., Zoghbi H. Y. Genetic regulation of cerebellar development // Nat. Revs Neurosci.—2001.—2, N 7.—P. 484—491.
21. Mao B., Wu W., Li Y., Hoppe D., Stannek P., Glinka A., Niehrs C. LDL-receptor protein 6 (LRP6) is a receptor for Dickkopf proteins // Nature.—2001.—411, N 6835.—P. 321—325.
22. Fuchs E. At the roots of never-ending cycle // Develop. Cell.—2001.—1, N 1.—P. 13—25.
23. Miller J. R. Signal transduction through  $\beta$ -catenin and speci-



- fication of cell fate during embryogenesis // *Genes and Develop.*—1996.—10, N 20.—P. 2527—2539.
24. Xuan S., Baptista C. A., Balas G., Tao W., Soares V. C., Lai E. Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres // *Neuron.*—1995.—14, N 6.—P. 1141—1152.
  25. Gotz M., Wizenmann A., Reinhardt S., Lumsden A., Price J. Selective adhesion of cells from different telencephalic regions // *Neuron.*—1996.—16, N 3.—P. 551—564.
  26. Rallu M., Corbin J. G., Fishell G. Parsing the prosencephalon // *Nat. Revs Neurosci.*—2002.—3, N 12.—P. 943—951.
  27. Eisen J. S. Patterning motoneurons in the vertebrate nervous system // *TINS.*—1999.—22, N 7.—P. 321—326.
  28. Benson D. L., Colman D. R., Huntley G. W. Molecules, maps and synapse specificity // *Nat. Revs Neurosci.*—2001.—2, N 12.—P. 899—909.
  29. Piccolo S., Agius E., Lu B., Dale L., De Robertis E. M. Cleavage of Chordin by Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Speman organiser activity // *Cell.*—1997.—91, N 3.—P. 407—416.
  30. Tessier-Lavigne M., Goodman C. S. The molecular biology of axon guidance // *Science.*—1996.—274, N 5290.—P. 1123—1132.
  31. Wilkinson D. G. Multiple roles of eph receptors and ephrins in neural development // *Nat. Revs Neurosci.*—2001.—2, N 3.—P. 155—164.
  32. Maina F., Klein R. Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons // *Nat. Neurosci.*—1999.—2, N 3.—P. 213—217.
  33. Hu S., Reichardt L. F. From membrane to cytoskeleton: Enabling a connaction // *Neuron.*—1999.—22, N 3.—P. 419—422.
  34. Lanier L. H., Gates M. A., Witke W. Mena is required for neurulation and commissure formation // *Neuron.*—1999.—22, N 2.—P. 313—322.
  35. Alvarez-Buylla A., Garcia-Verdugo J. M., Tramontin A. D. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells // *Nat. Revs Neurosci.*—2001.—2, N 4.—P. 287—293.
  36. Brose K., Bland K. S., Wang K. H., Ammot D., Henzel W., Goodman C. S., Tessier-Lavigne M., Kidd T. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance // *Cell.*—1999.—96, N 6.—P. 795—806.
  37. Kidd T., Bland K. S., Goodman C. S. Slit is the midline repellent for the Robo receptor in *Drosophila* // *Cell.*—1999.—96, N 6.—P. 785—794.
  38. Li H.-S., Chen I.-H., Wu W., Fagaly T., Zhou L., Yuan W., Dupuis S., Jiang Z.-H., Nash W., Gick C., Ornitz D. M., Wu J. Y., Rao Y. Vertebrate Slit, a secreted ligand for the transmembrane protein Roundabout, is repellent for olfactory bulb axons // *Cell.*—1999.—96, N 6.—P. 807—818.
  39. Nguyen Ba-Charvet K. T., Brose K., Marillat V., Kidd T., Goodman C. S., Tessier-Lavigne M., Sotelo C., Chedotal A. Slit-2 mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons // *Neuron.*—1999.—22, N 3.—P. 463—473.
  40. Stein E., Tessier-Lavigne M. Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by Slit through a Robo/DCC receptor complex // *Science.*—2001.—291, N 5510.—P. 1928—1938.
  41. Donoghue M. J., Rakic P. Molecular evidence for the early specification of presumptive functional domains in the embryonic primate cerebral cortex // *J. Neurosci.*—1999.—19, N 14.—P. 5967—5979.
  42. Isshiki T., Pearson B., Holbrook S., Doe S. Q. *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny // *Cell.*—2001.—106, N 4.—P. 511—521.
  43. Quian X., Shen Q., Goderine S. K., He W., Capela A., Davis A. A., Temple S. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cell // *Neuron.*—2000.—28, N 1.—P. 69—80.
  44. Burrows R. C., Wancio D., Levitt P., Lillien L. Response diversity and the timing of progenitor cell maturation are regulated by developmental changes in EGFR expression in the neocortex // *Neuron.*—1997.—19, N 2.—P. 251—267.
  45. Mehler M. F., Mabie P. C., Zhu G., Gokhan S., Kessler J. A. Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive CNS lineage fate // *Develop. Neurosci.*—2000.—22, N 1—2.—P. 74—85.
  46. Contractor A., Rogers C., Maron C., Henkemeyer M., Swanson G. T., Heinemann S. F. Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP // *Science.*—2002.—296, N 5574.—P. 1864—1869.
  47. Gerlai R. Eph receptors and neural plasticity // *Nat. Revs Neurosci.*—2001.—2, N 3.—P. 205—209.
  48. Lauri S. E., Kaukian S., Kinnunen T., Ylinen A., Imai S., Kaila K., Taira T., Rauvala H. Regulatory role and molecular interactions of a cell-surface heparin sulfate proteoglycan (N-syndecan) in hippocampal long-term potentiation // *J. Neurosci.*—1999.—19, N 4.—P. 1226—1235.
  49. Sanes J. R., Lichtman W. Can molecules explain long-term potentiation? // *Nat. Neurosci.*—1999.—2, N 7.—P. 597—604.
  50. Bozon B., Davis S., Laroche S. Regulated transcription of the immediate-early gene Zif268: mechanism and gene dosage-dependent function in synaptic plasticity and memory formation // *Hippocampus.*—2002.—12, N 5.—P. 570—577.

УДК 611.018.8.013  
Надійшла до редакції 20.11.03