

Molekulární biologie pro informatiky - 7

Molekulární mechanismy signalizace

Signální molekuly

Signál

- faktor, kterým se zprostředkovává a předává nějaká informace
- signální molekula je molekula ve funkci signálu
- extracelulární - zdroj mimo buňku, ligand reagující s buňkou pomocí receptoru
 - např. hormony, růstové faktory, neurotransmitery
- intracelulární - zdroj uvnitř buňky, např. druzí přenašeči, další složky signálních drah

Extracelulární signály

- proteiny, peptidy, aminokyseliny, nukleotidy, lipidy, steroidy, mastné kyseliny a jejich deriváty, plyny
- hormony - odvozené od aminokyselin (adrenalin, thyroxin)
 - peptidy a proteiny (inzulín, glukagon, oxytocin)
 - steroidní (testosteron, estrogen, kortizol)
 - vitamín D, kyselina retinová
- cytokiny - interleukiny, interferony
 - nádorové nekrotické faktory (TNF- α , TNF- β , TNF- γ)
 - růstové faktory (EGF, PDGF, IGF-1, GM-CSF, GHF, NGF)
- nervové mediátory (acetylcholin, GABA)
- lokální mediátory (histamin, oxid dusnatý)

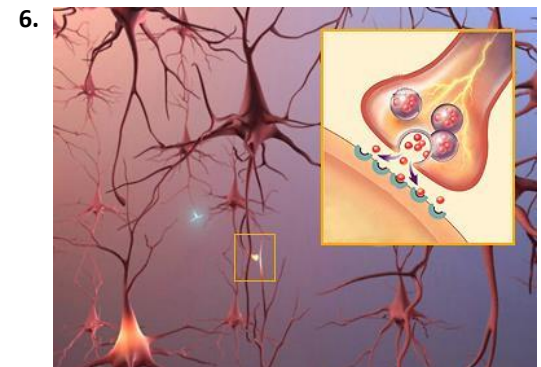
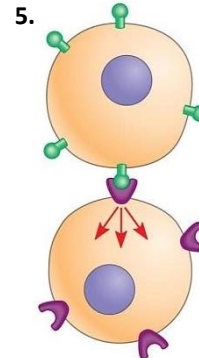
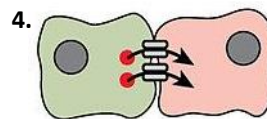
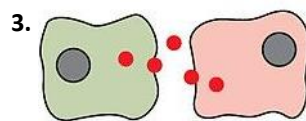
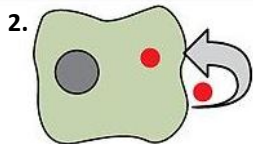
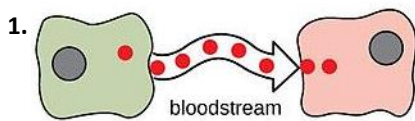
Signály **hydrofilní** povahy: vazba na membránové receptory, krátkodobá odpověď

Signály **lipofilní** povahy: vazba na intracelulární receptory, dlouhodobá odpověď

Signalizace

Extracelulární signalizace

- přenos signálu z buňky, která je jeho zdrojem na receptor cílové buňky, která signál přijímá
1. endokrinní - značná vzdálenost mezi zdrojovou a cílovou buňkou překonávána krví, např. hormony
 2. autokrinní - stejná buňka je zdrojová i cílová
 3. parakrinní - produkce signálu do tělních tekutin, lokální účinek na okolní buňky
- např. histamin, NO
 4. dutým spojem - mezi oběma buňkami, které jsou v těsném kontaktu vytvořena tubulární struktura
- dutý spoj (gap junction) u živočišné buňky, plazodezmata u rostlin
- např. Ca^{2+} , cAMP
 5. přímým kontaktem - ligand i receptor jsou umístěny na povrchu buněk, které se při signalizaci dostávají do přímého kontaktu např. Fas + FasL
 6. synaptická - v nervové soustavě, přenos signálu mezi neurony, neuronem a svalovou buňkou
- vliv na permeabilitu membrán, např. acetylcholin



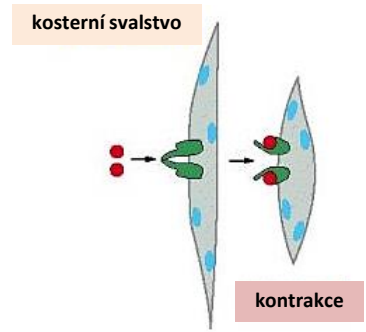
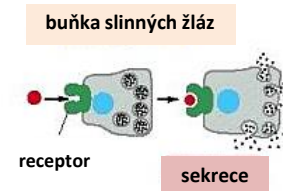
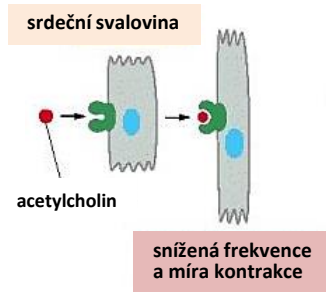
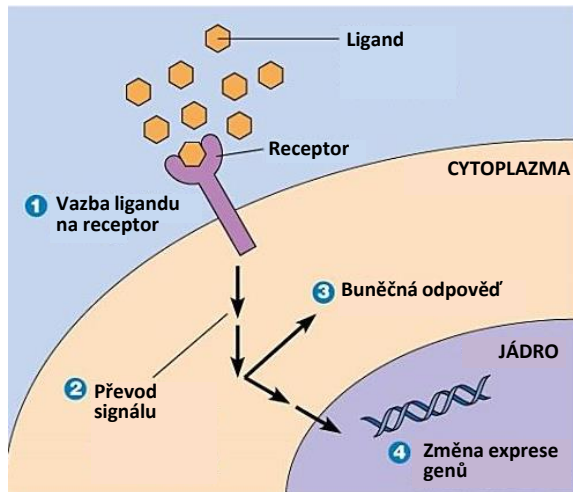
Signalizace

Intracelulární signalizace

- dráha přenosu signálu uvnitř buňky
- vazba signálu na receptor indukuje enzymatickou aktivitu uvnitř buňky a signál je převeden na cílovou molekulu, která realizuje odpověď buňky na extracelulární signál

Odpověď buňky

- přítomnost receptorů a výbava buňky rozhoduje o tom, na který signál bude buňka reagovat
- stejný signál může mít různé účinky u různých buněk
 - např. acetylcholin vyvolává kontrakci kosterních svalů, dilataci srdeční svaloviny, sekreci slin
- změna genové exprese, aktivity metabolických enzymů, konfigurace cytoskeletu, permeability membrány pro ionty, aktivace syntézy DNA, indukce apoptózy
- rychlost reakce - v s až min při změně funkce proteinů, v min až hod při změně v expresi genů



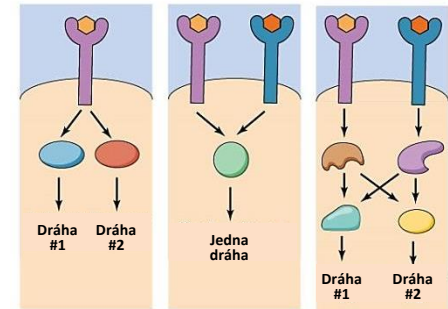
Signální dráhy

První přenašeč signálu: prvotní signál zachycený buňkou.

Druhé přenašeče signálu: malé molekuly produkované uvnitř buňky po vazbě ligandu na receptor mění aktivitu dalších složek signální dráhy

Intracelulární signalizace zahrnuje řetězec dějů

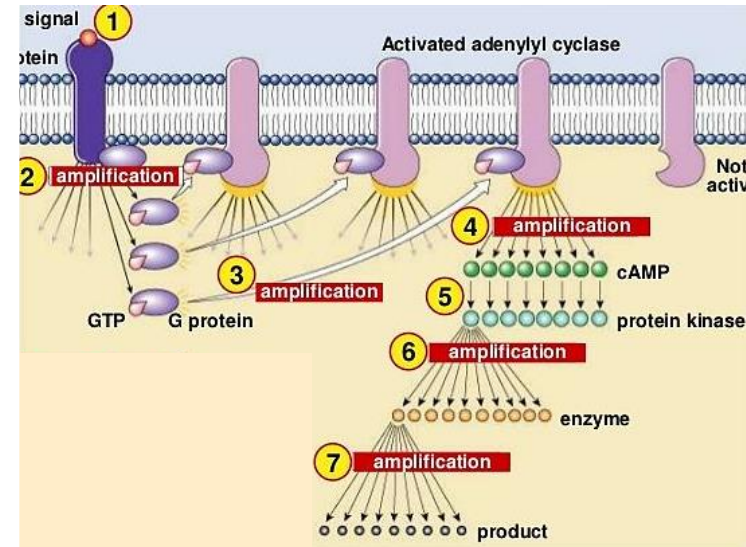
- přenos signálu a jeho převod do srozumitelné podoby
- zesílení (amplifikace) původního signálu a jeho případné rozdělení
- propojení signálních drah
- na každý krok řetězce můžou působit další faktory
- zapojené enzymy jsou přísně regulovány



Po přijetí signálu se rovnováha signálních molekul velmi rychle obnovuje. Odpověď buňky je po rozložení nebo inaktivaci signální molekuly zastavena

Ztráta senzitivity buněk

- dlouhodobé vystavení buněk působení ligandu může vést ke ztrátě jejich citlivosti na tento ligand
- změny na úrovni receptoru
 - odstranění receptoru z povrchu buňky
 - změny receptoru, které snižují jeho afinitu k ligandu či schopnost převodu signálu do nitra buňky



Intracelulární receptory

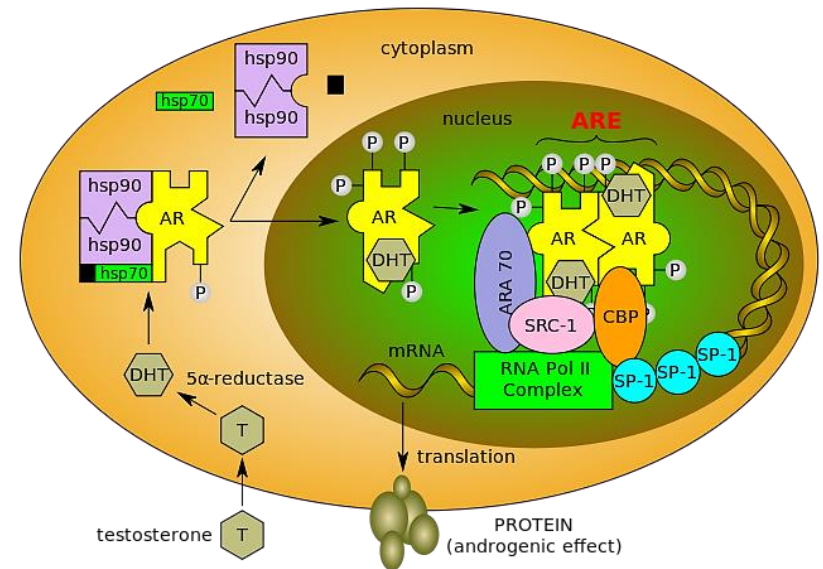
- receptory steroidních a tyroidních hormonů, vitamínu D, kyseliny retinové, oxidu dusnatého
- ligandy difundují cytoplazmatickou membránou a vazbou na receptor vyvolají změnu v jeho konformaci, tím se zvýší afinita receptoru k DNA a receptor reguluje transkripci cílových genů

Funkční domény receptorů

- doména pro vazbu ligandu - v nepřítomnosti ligandu může být vázán inhibitor, např. antiestrogen
- aktivační doména - vazba k TFIID, TFIIB
- DNA vazebná doména - vazba k regulačním oblastem DNA, motiv dvou zinkových prstů
- doména pro dimerizaci - dimerizace nutná pro plnou aktivaci receptoru

1. Cytoplazmatické receptory

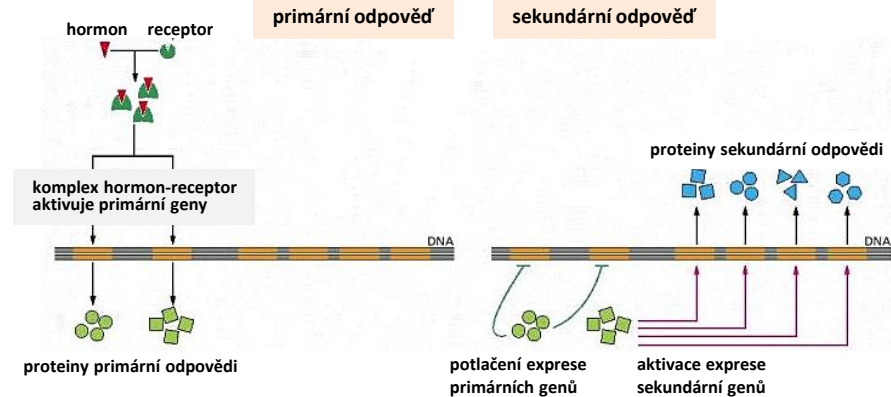
- steroidní hormony, gestageny, glukokortikoidy, testosteron, ekdyzon, mineralkortikoidy
- na inaktivní formu vázány HSP proteiny (HSP70, 90), které se uvolní po vazbě ligandu
- receptor tvoří homodimery a přechází do jádra, kde aktivuje příslušné geny
- např. androgenní receptor



Intracelulární receptory

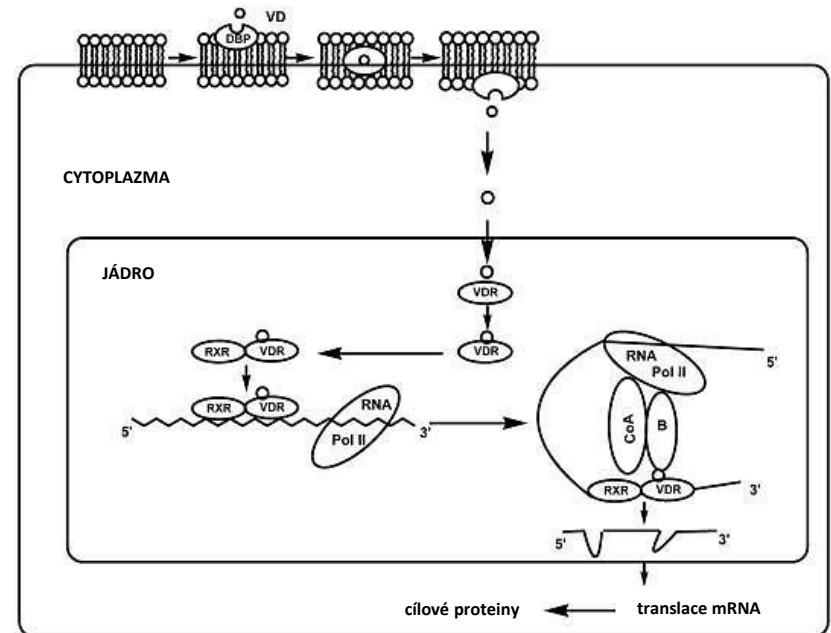
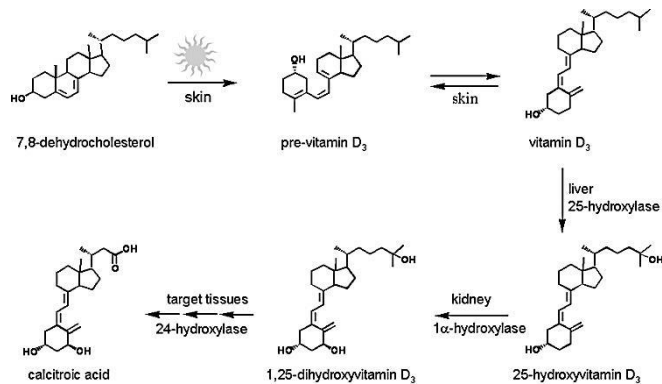
1. Cytoplazmatické receptory

- reakce na steroidní hormony bývá dvoustupňová, brzká primární a opožděná sekundární odpověď



2. jaderné receptory

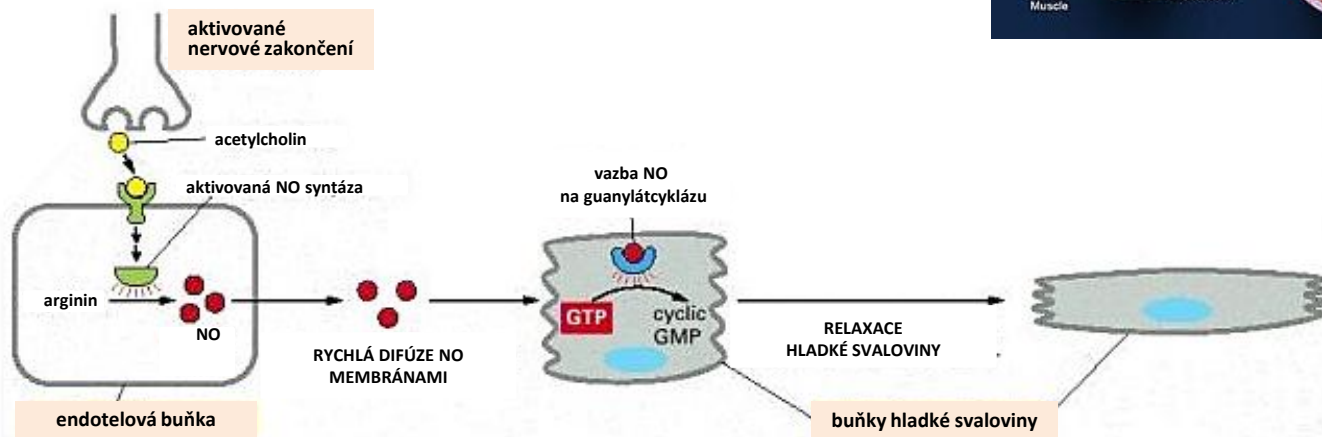
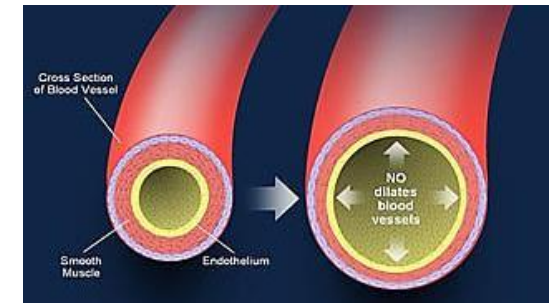
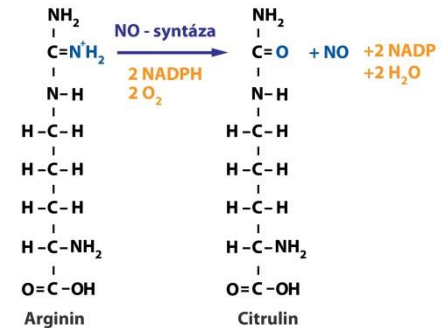
- tyroidní hormony, vitamín D, kyselina retinová
- tvoří heterodimery, často s RXR
- např. vitamín D - v krvi vázán na DBP protein, v jádře receptor VDR, který dimerizuje s RXR, váže se k DNA a spolu s dalšími koaktivátory spouští transkripci cílových genů



Intracelulární receptory

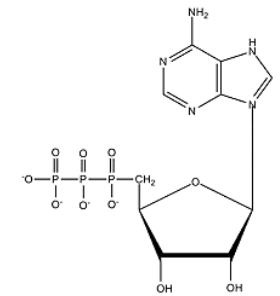
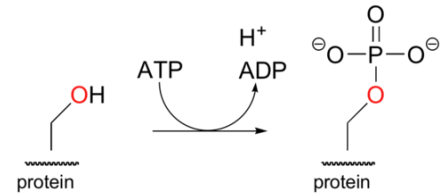
Oxid dusnatý (NO)

- toxický nestabilní plyn, proniká volně přes membrány buněk
- parakrinní signál kardiovaskulárního systému
- v buňkách vzniká deaminací argininu za působení NO syntázy
- velmi rychlý, lokální účinek, rozklad na dusitany a dusičnany
- acetylcholin z nervových zakončení vyvolá vznik a uvolnění NO z endotelových buněk, NO difunduje k buňkám hladké svaloviny, ve kterých se váže na guanylátcyklázu, aktivovaný enzym pak spouští signální řetězec vedoucí k relaxaci svalové buňky
- vazodilatátor - zvyšuje průchodnost cév
- aplikace nitroglycerinu při angíně pectoris prodloužení účinku NO po aplikaci viagry



Přehled proteinkináz

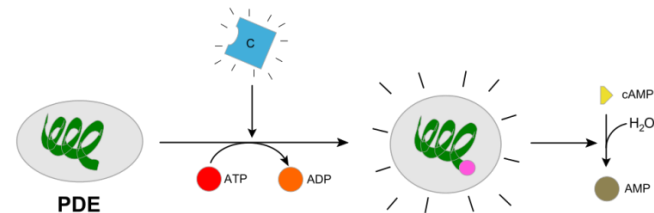
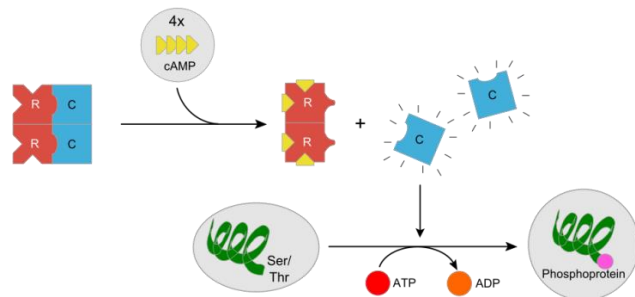
- proteinkinázy katalyzují vazbu fosfátové skupiny (fosforylaci) na AK zbytky v proteinech
- tyrosinkinázy - vazba fosfátu na fenolickou skupinu Tyr
- serin/treoninkinázy - vazba fosfátu na hydroxylovou skupinu Ser či Thr
- jako donor fosfátové skupiny využívají ATP za vzniku ADP
- fosforylace mění biochemické vlastnosti proteinu



SERIN / TREONIN KINÁZY

1. proteinkináza A, PKA

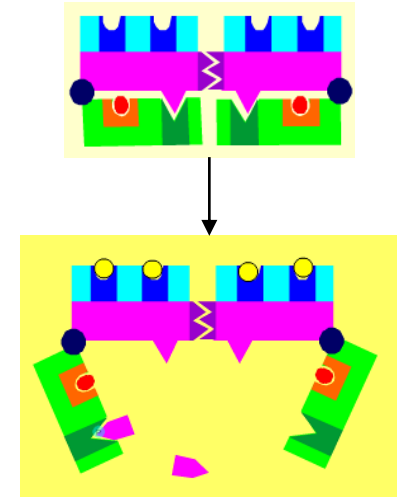
- cAMP dependentní protein kináza, aktivuje se účinkem cAMP
- homodimer obsahující regulační (R) a katalytické (C) domény
- R blokují katalytické podjednotky a váží PKA na určité místo v buňce
- po vazbě cAMP na R jsou C uvolněny a mohou fosforylovat cílové proteiny
- účinek signalizace podle buněčného typu, např. rozklad glykogenu v svalových vláknech, syntéza somatostatinu v D-buňkách



Přehled proteinkináz

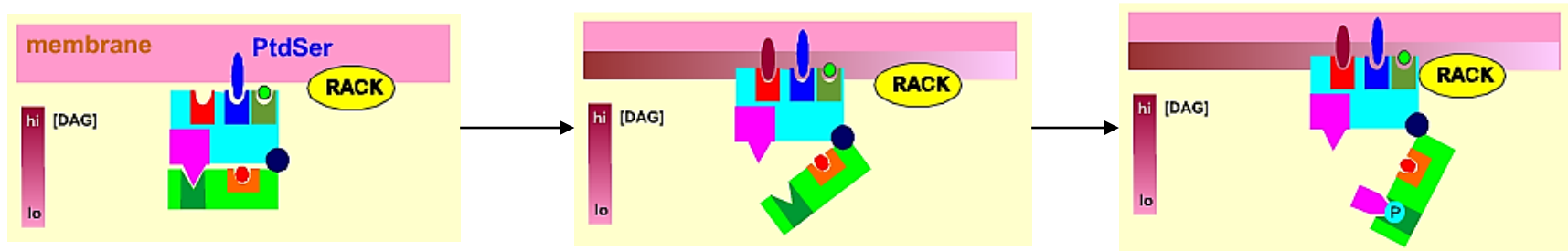
2. proteinkináza G, PKG

- cGMP dependentní protein kináza, aktivuje se účinkem cGMP, homodimer
- regulační doména: dimerizace, vazba cGMP, blok aktivního místa
- katalytická doména: fosforylace, uvolněna po vazbě cGMP k regulační d.
- PKG-I v cytoplazmě hladké svaloviny, krevních destiček, endotelu, části neuronů, kardiomyocytů
- PKG-II vázána k plazmatické membráně v buňkách ledvin, střevní mukózy, pankreatu, aj.



3. proteinkináza C, PKC

- monomer, aktivuje se účinkem DAG, PtdSer a Ca^{2+} , působí v blízkosti plazmatické membrány
- regulační doména - vazba DAG, PtdSer a Ca^{2+} , blok aktivního místa
- katalytická doména - fosforylace, uvolněna po vazbě ligandů k regulační doméně
- fosforylace různých proteinů v závislosti na typu buňky a buněčném kompartmentu



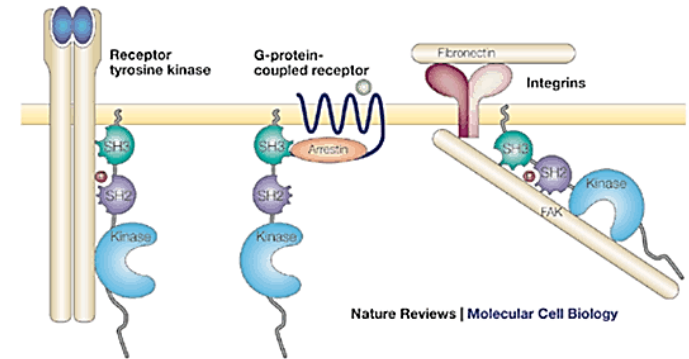
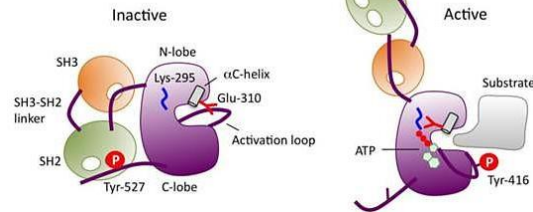
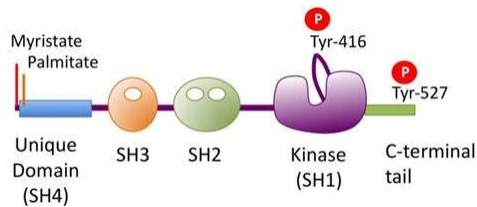
Přehled proteinkináz

TYROSIN KINÁZY

- kinázová doména - sekvenčně homologický úsek (SH1) u všech tyrosinkináz
- receptorové - vázané na plazmatickou membránu jako součást receptorů
- nereceptorové - nejsou součástí receptorů, pouze s nimi asociují; děleny do rodin:

1. proteinkinázy Src-rodiny

- kinázová doména SH1; regulační domény SH2, SH3
- ukotvení k membráně myristilovou kyselinou (SH4)
- c-Src - v inaktivní formě fosforylace Tyr-527, který se váže na SH2, konformace blokuje SH1
 - aktivace defosforylací či vyvázáním fosfátu na Tyr-527, fosforylace Tyr-416
- asociace s receptory - receptorové tyrosinkinázy, receptory vázané s G-proteiny, adhezní receptory



2. proteinkinázy Jak-rodiny

- přímá aktivace receptory pro interferon, Jak/STAT signální dráha

3. proteinkinázy Syk-rodiny

Přehled proteinkináz

MAP-PROTEINKINÁZY

- proteinkinázy aktivované mitogeny
- mitogeny jsou růstové faktory stimuluující buňky k dělení
- fosforylace na Ser či Thr nebo současně na Thr a Tyr

1. MAP-kinázakinázakinázy (MAPKKK)

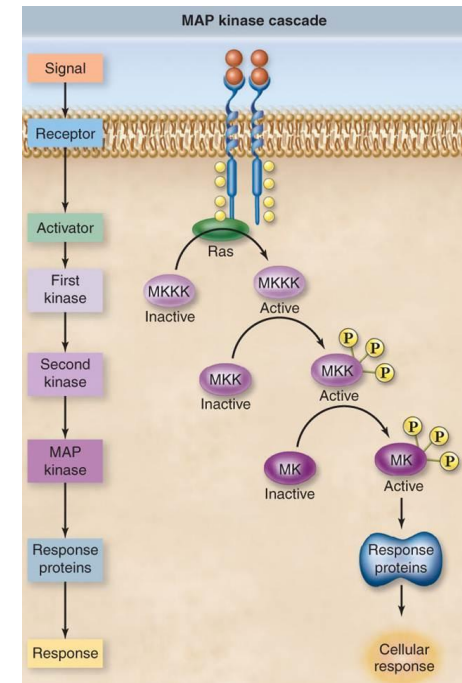
- aktivují MAPKK na serinu nebo treoninu
- např. Raf-proteinkináza přímo aktivovaná Ras proteinem

2. MAP-kinázakinázy (MAPKK)

- aktivují MAPK současnou fosforylací treoninu a tyrosinu v sekvenci Thr-X-Tyr
- např. MAP/ERK-proteinkináza (MEK-proteinkináza)

3. MAP-kinázy (MAPK)

- po své aktivaci migrují k cílovým molekulám



SERIN / TREONIN KINÁZY

- proteinkináza A (PAK)
- proteinkináza G (PKG)
- proteinkináza C (PKC)
- Ca²⁺/kalmodulin d. proteinkináza II (CaMKII)

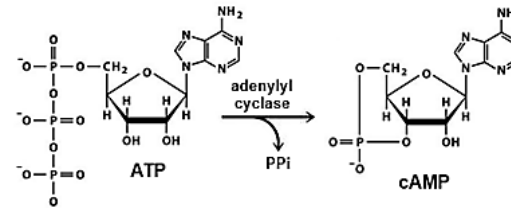
NERECEPTOROVÉ TYROSIN KINÁZY

- proteinkinázy Src-rodiny
- proteinkinázy Jak-rodiny
- proteinkinázy Syk-rodiny

Další enzymy signálních drah

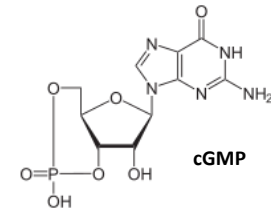
Adenylátcykláza

- katalyzuje uvolnění bisfosfátu z ATP za tvorby cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP)



Guanylátcykláza

- katalyzuje uvolnění bisfosfátu z GTP za tvorby cyklického guanosinmonofosfát (cGMP)

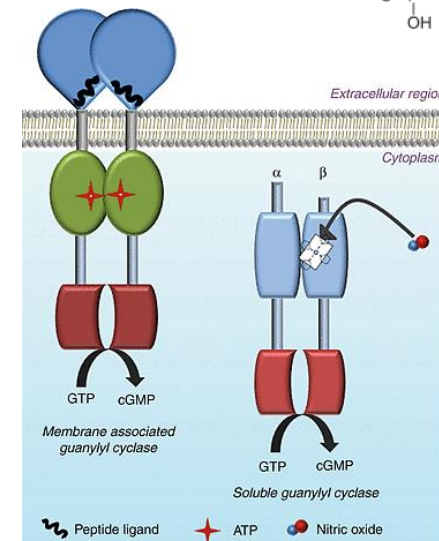


Typ 1 - homodimer vázaný na plazmatickou membránu, kde

- působí jako receptor pro různé ligandy
- domény: extracelulární, transmembránová kinázová, cyklázová
- př. ANF: atriální natriuretický faktor, vyloučení Na⁺ a vody z ledvin

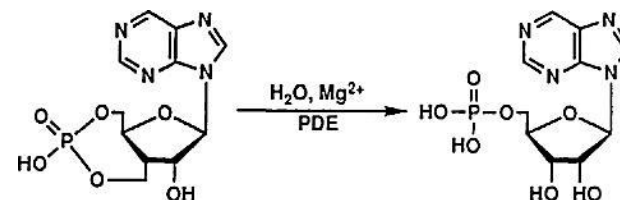
Typ 2 - rozpustný heterodimer z alfa a beta řetězce

- aktivace vazbou NO
- domény: vazebná (hem), cyklázová

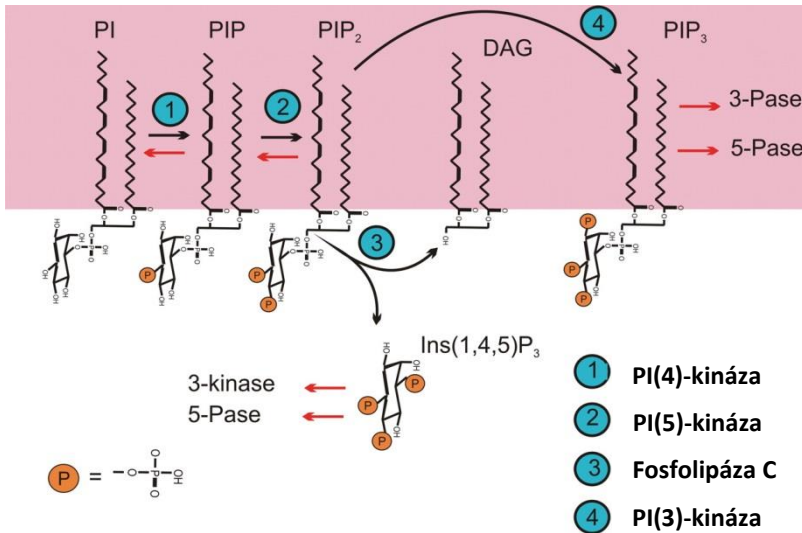


cAMP-fosfodiesteráza, cGMP-fosfodiesteráza

- hydrolýza cAMP / cGMP na AMP / GMP



Další enzymy signálních drah



PI fosfatidylinositol
PIP fosfatidylinositol-4-fosfát
PIP₂ fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP₃ fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát

DAG diacylglycerol
Ins(1,4,5)P₃ inositol-1,4,5-trisfosfát

Fosfolipáza C (PLC)

- hydrolyzuje PIP₂ na DAG a Ins(1,4,5)P₃
- aktivovány receptory vázanými s G-proteiny, receptorovými proteinkinázami

Fosfatidylinositol-3-fosfatáza

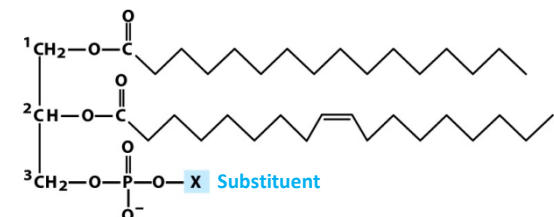
- katalyzuje hydrolýzu 3-fosfátu z PtdIns(3)P / PtdIns(3,4)P₂ / PtdIns(3,4,5)P₃ za tvorby H₃PO₄ a PtdIns / PtdIns(4)P / PtdIns(4,5)P₂

1-fosfatidylinositol-3-kináza, PI(3)K

- tři typy enzymu, které katalyzují fosforylace opačné k fosfatidylinositol-3-fosfatáze

Fosfolipáza D

- hydrolyzuje glycerofosfolipidy (nejčastěji fosfatidylcholin) za vzniku kyseliny fosfatidové a příslušného substituentu (cholinu)



Povrchové receptory

Signalizace zprostředkovaná povrchovými receptory

1. mimobuněčný signál - ligand, první přenašeč
2. povrchový receptor
3. sekundární přenašeč - nízkomolekulární látka, produkt enzymatické reakce
4. cílová molekula - efektor

Typy povrchových receptorů

1. Receptory spojené s iontovými kanály

- vazba ligandu ovlivňuje průchodnost kanálů
- změna permeability membrány
- rychlá signalizace na synapsích

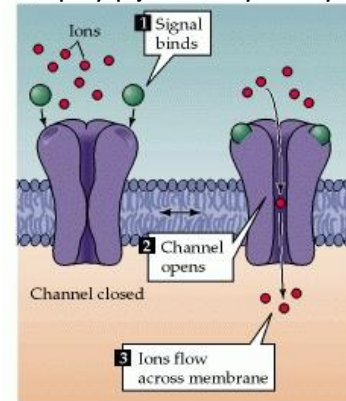
2. Katalytické receptory

- získání katalytické schopnosti po vazbě ligandu
- transmembránové proteiny s proteinkinázovou aktivitou

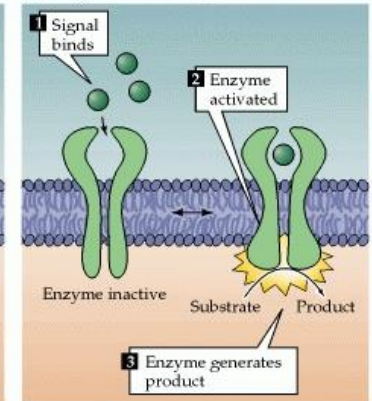
3. Receptory vázané na G protein

- bez enzymové aktivity
- přes G-protein ovlivňují aktivitu enzymů nebo průchodnost kanálků

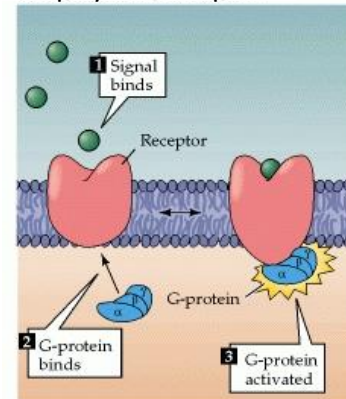
Receptory spojené s iontovými kanály



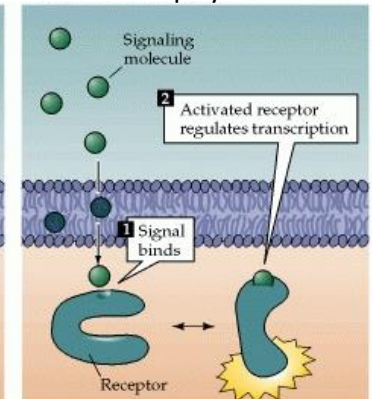
Katalytické receptory



Receptory vázané na G-protein



Intracelulární receptory

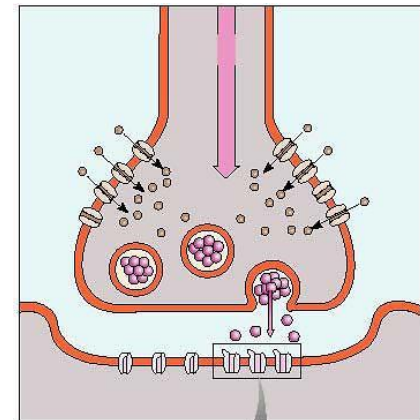
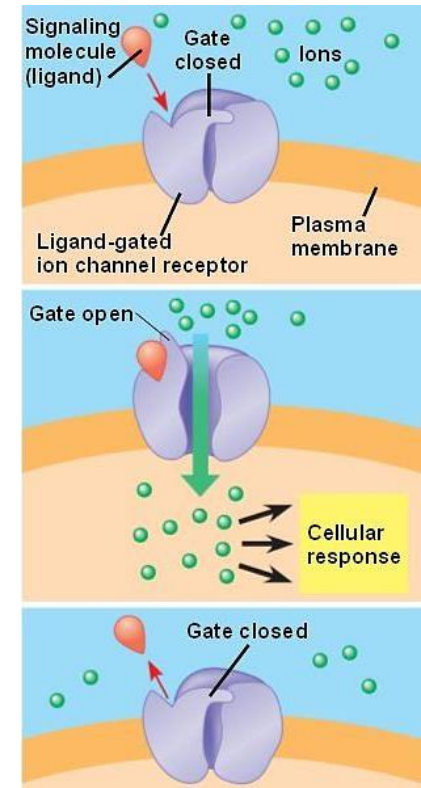


Receptory spojené s iontovým kanálem

- oligomerní proteiny v plazmatické membráně
- tvoří iontový kanál regulovaný ligandem
- vazba ligandu indukují konformační změny receptoru
- tím dochází k otevření kanálu a pohybu iontů mezi buňkou a jejím okolím
- po rychlé disociaci ligandu z receptoru se kanál opět uzavírá
- ligandy - neurotransmitery, peptidové hormony
- molekuly procházející kanálem - ionty Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-

Signalizace na synapsích

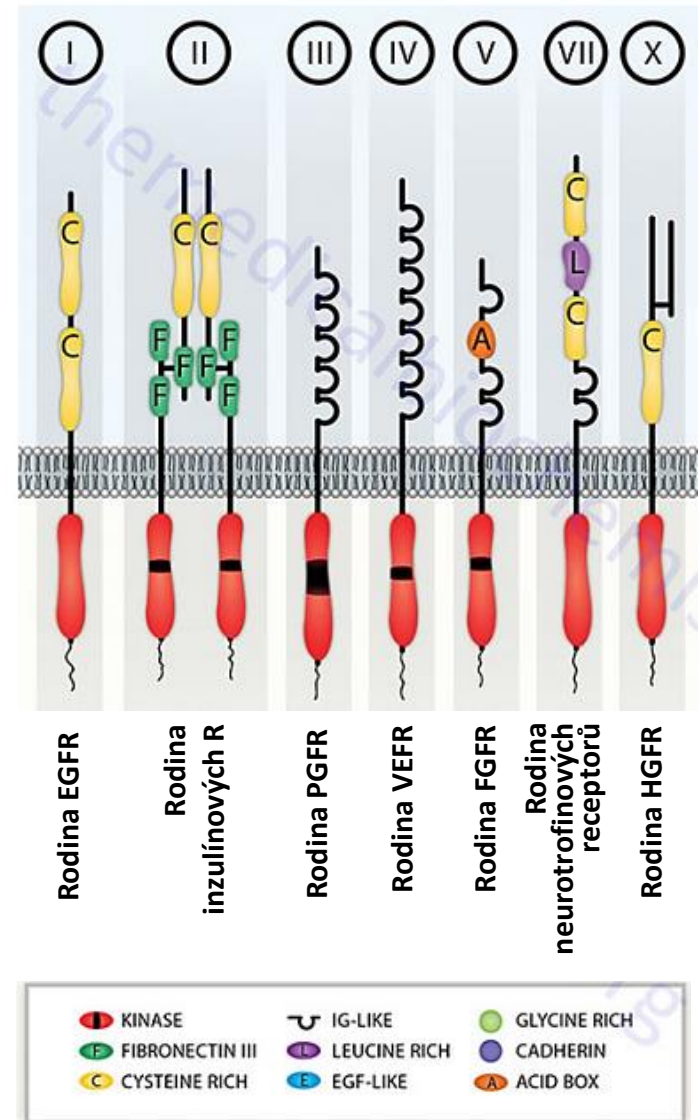
- převod chemických signálů do elektrických, u elektricky vzrušivých buněk
- excitovaný presynaptický neuron vypouští neurotransmitter, který se váže na receptor spojený s iontovým kanálem
- otevřeným kanálem proudí ionty, které vyvolají excitaci postsynaptického neuronu
- př. receptor pro serotonin
 - vyvolává vypuštění řady neurotransmiterů
 - cíl antidepresiv a antipsychotik
- př. receptor pro GABA (γ -aminomáslená kyselina)
 - hlavní inhibiční neurotransmitter CNS
 - ovlivňuje chování drogově závislých jedinců



Katalytické receptory

Tyrosinproteinkinázové receptory

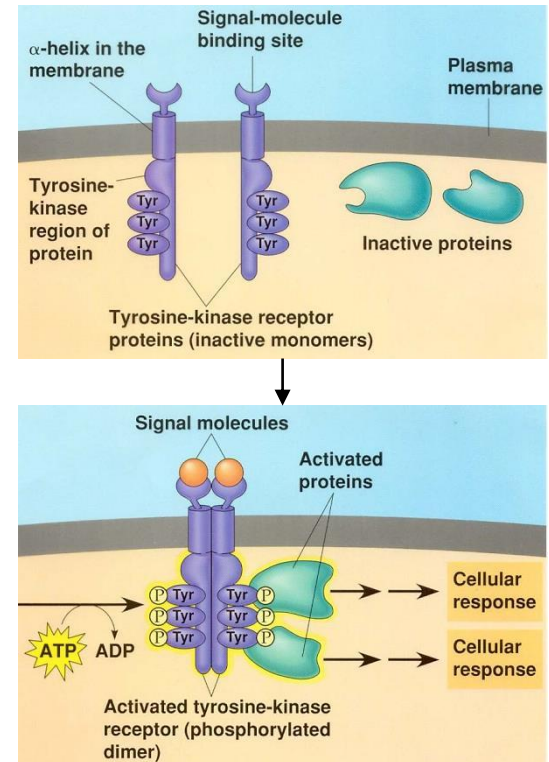
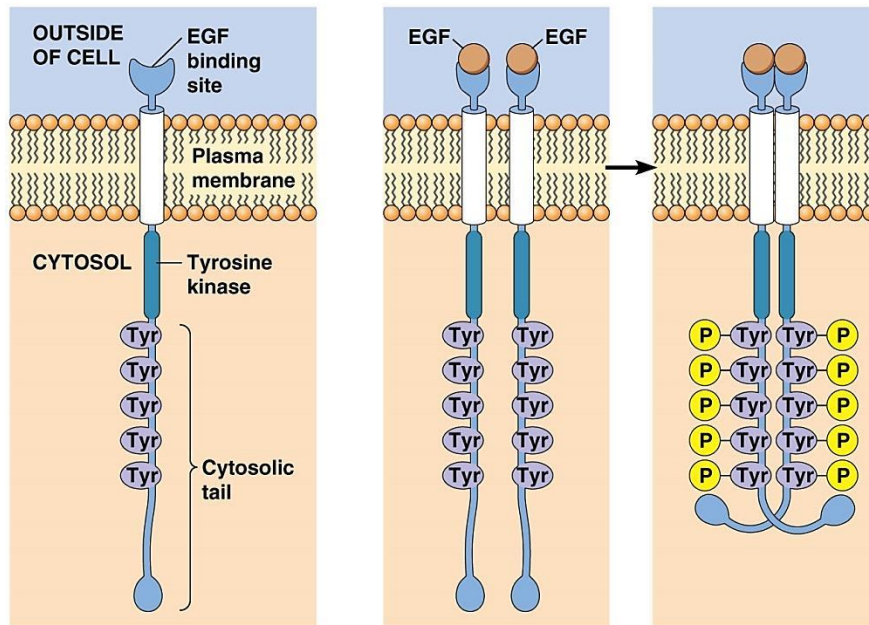
- tyrosinproteinkinázová aktivita regulovaná ligandy
- společné strukturní rysy zahrnující tři domény
 - **extracelulární doména**
 - N-konec, glykosylována
 - vazba ligandu
 - určuje typ signálu, na který bude buňka citlivá
 - **transmembránová doména**
 - krátká, hydrofobní, α -šroubovice
 - **cytoplazmatická doména**
 - C-konec, tyrosinproteinkinázová aktivita
 - určuje typ signální dráhy a tím i buněčnou odpověď
- kolem 50 receptorů
- 14 rodin podle motivu v extracelulárních doménách



Katalytické receptory

Aktivace tyrosinproteinkinázových receptorů

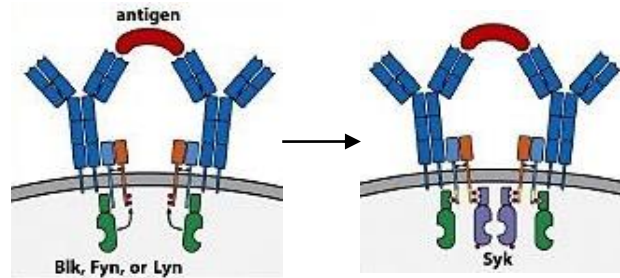
- vazba ligandu do vazebného místa v extracelulární doméně
- změna konformace a dimerizace receptoru
- autofosforylace receptoru: každý monomer fosforyluje Tyr svého partnera
- stimulace tyrosinproteinkinázové aktivity
- P-Tyr jsou vazebnými místy pro intracelulární proteiny, které předávají signál dál



Katalytické receptory

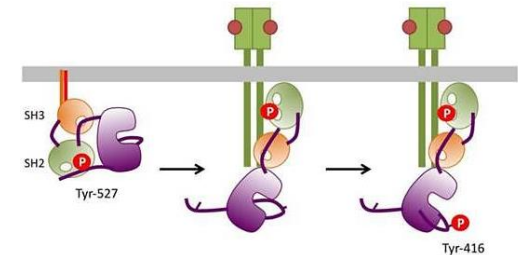
Receptory s přidruženou tyrosinproteinkinázovou aktivitou

- nemají cytoplazmatickou tyrosinproteinkinázovou doménu
- po vazbě ligandu dimerizují a aktivují nereceptorové tyrosinproteinkinázy
- imunoglobulinové receptory
 - BCR, TCR; vazba antigenů
 - asociace s kinázami Src- a Syk-rodin
- receptory pro cytokiny
 - např. Epo, GM-CSF, HGF, IL2-7, IL10, interferony



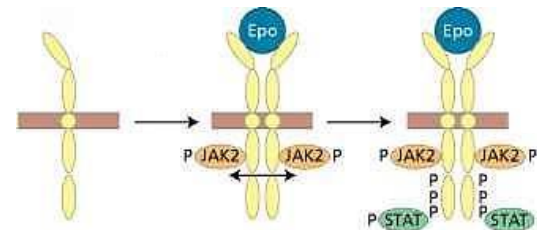
Receptory asociované s proteinkinázami Src-rodiny

- po dimerizaci receptoru aktivována Src-kináza
- na její P-Tyr-416 se SH2 doménou váží adaptorové molekuly, které přenáší signál na další složky signální dráhy



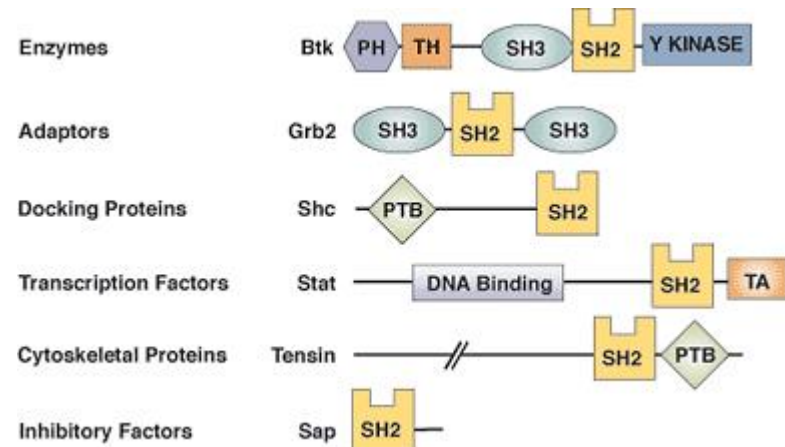
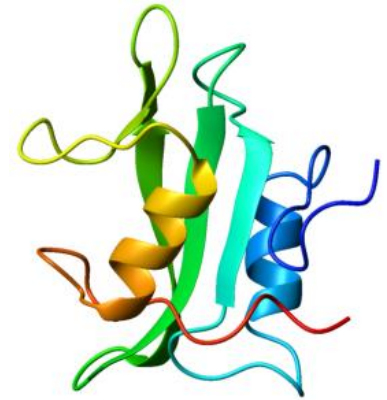
Receptory asociované s proteinkinázami Jak-rodiny

- po dimerizaci receptoru aktivována Jak-kináza
- fosforylace receptoru
- vazba (přes SH2 doménu) a fosforylace STAT



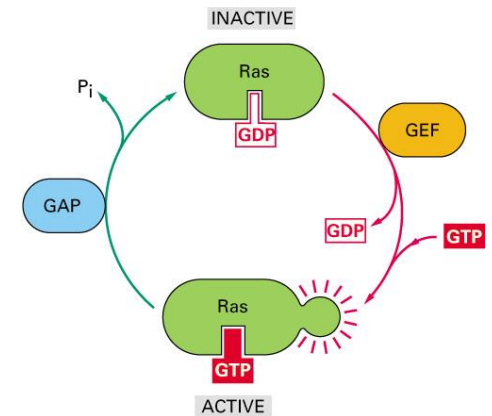
SH2 doména

- **Src Homology 2**, popsána u Src-kinázy
- u většiny eukaryotických organismů (ne u kvasinek)
- strukturní doména o zhruba 100 aminokyselinách
- vazba na fosforylovaný tyrosin, rozeznává sekvenci 3-6 aminokyselin
- po spojení s P-Tyr se mění konformace a aktivita proteinu s SH2
- **podíl na interakcích signálních molekul**
 - různé SH2, které se liší rozeznávanými sekvencemi
 - spojuje katalytické receptory s např. FLC, G proteiny, transkripčními faktory
 - součástí enzymů (Src, Jak, Lck, Fyn, Syk, PLCG, PI3K)
 - adaptorových molekul (Grb2)
 - transkripčních faktorů (STAT)
 - regulátorů signalizace (SOCS)
- signální dráha přes proteiny Ras = příklad zapojení SH2 domény do signalizací



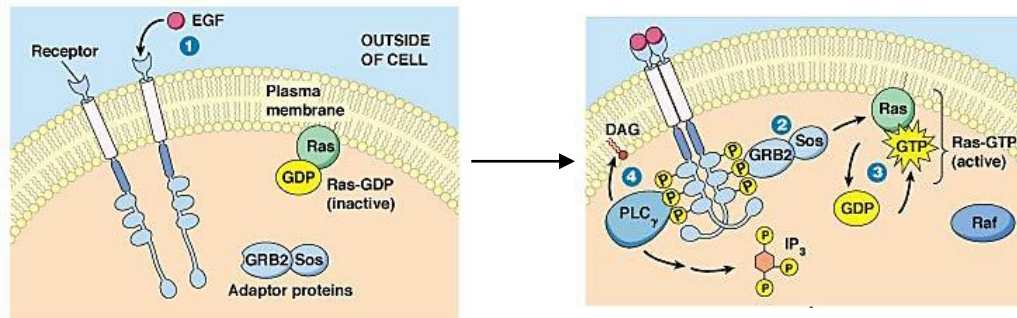
Rodina proteinů Ras

- skupina malých monomerních GTPáz, schopnost vázat GDP/GTP
- G doména váže za přítomnosti Mg^{2+} GDP/GTP
- CAAX box, po prenylaci vazba k plazmatické membráně
- aktivovány **GEF faktorem** (guanin nucleotide exchange factor), který uvolňuje GDP
- Ras potom váže GTP, aktivuje se a přenáší signál na své efekторы
- inaktivaci zajišťuje **GAP protein** (GTPase-activating protein), který podporuje hydrolýzu GTP
- nadrodina proteinů Ras - rodiny Ras (růst a diferenciace buněk), Rho (morfologie a pohyb buněk), Rab a Arf (transport měchýřků), Ran (jaderný transport)



Signalizace přes Grb2-Sos

- Grb2 se přes SH2 doménu spojuje s aktivovanými tyrosinproteinkinázovými receptory
- SH3 doménu konstitutivně váže k proteinu Sos
- Sos funguje jako GEF a zajišťuje aktivaci Ras

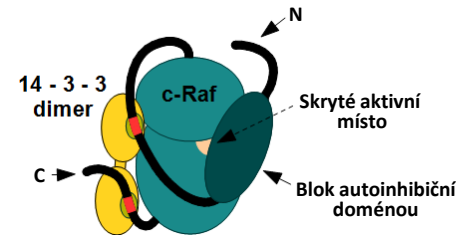
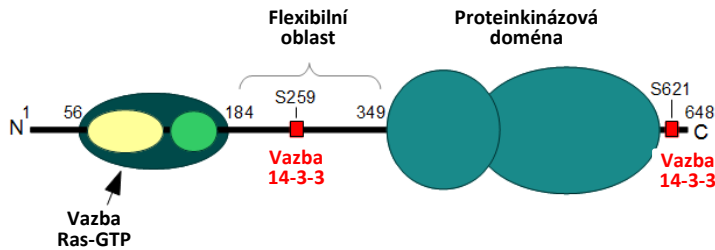


Rodina proteinů Ras

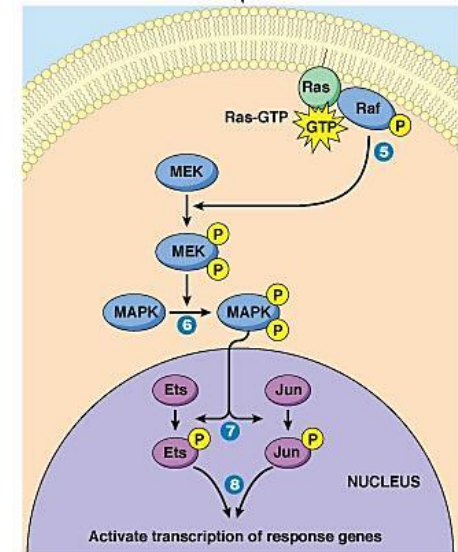
Aktivovaný Ras-GTP váže a aktivuje své efektory, hlavním efektem proteinů Ras je kináza Raf

MAPK dráha zahájená aktivací Raf

- Raf - Ser/Thr MAPKKK
 - v inaktivním stavu udržuje faktor 14-3-3 konformaci blokující katalytické místo
 - vazba Ras-GTP indukuje disociaci 14-3-3, fosforyluje Raf v pozicích Ser338 a Tyr341



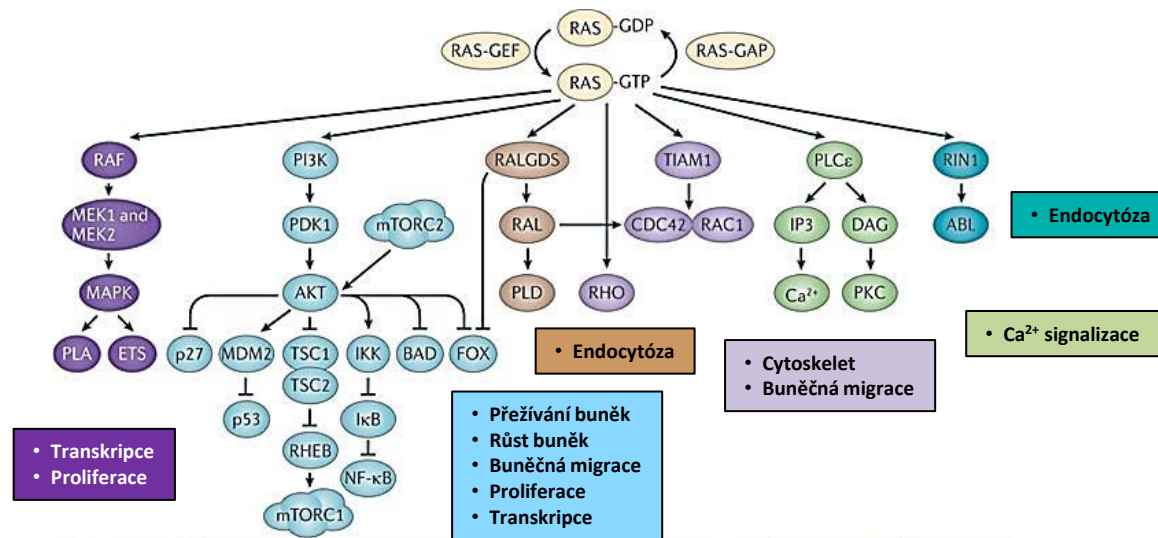
- MAPKK - MEK1/2
- MAPK - ERK, transport do jádra, kde aktivuje transkripční faktory
- transkripční faktory se váží na SRE (serum response elements) a indukují transkripci specifických genů (SRF, serum response factor)
- přenos signálů od mitogenů
- dominantní při signalizaci určující růst, vývoj a diferenciaci buněk



Rodina proteinů Ras

- GEF faktory aktivující Ras proteiny - Sos: signál od proteinkinázových receptorů přes Grb2
- Ras-GRP: signál od fosfolipázy C přes DAG
 - Ras-GRF: signál od Ca²⁺ iontového kanálu přes kalmodulin

Efektory proteinů Ras



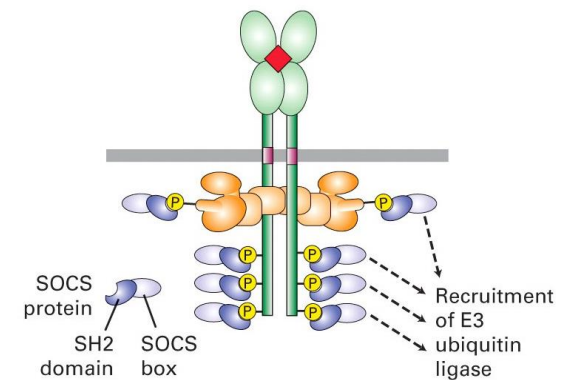
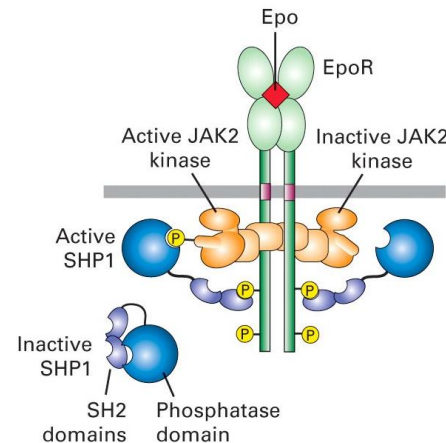
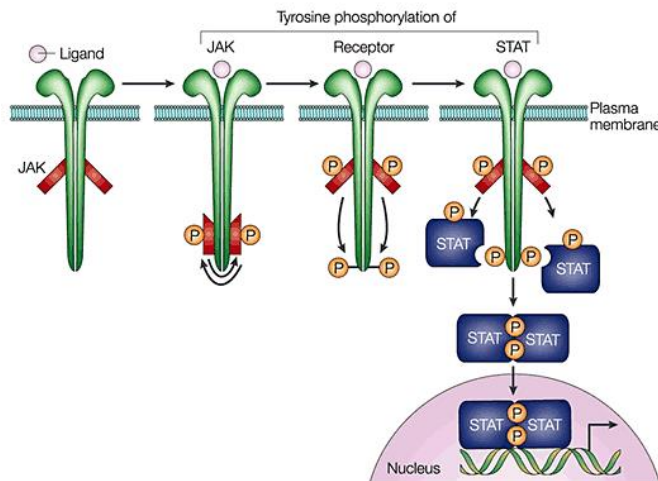
Nádorová onemocnění

- stále aktivní Ras-GTP (blok hydrolýzy GTP, mutace GAP proteinů)
- H-Ras, K-Ras a N-Ras nejčastější onkogeny nádorových onemocnění (u 20 - 30 % nádorů)
- inhibitory Ras proteinů předmětem protinádorové léčby - např. inhibitory prenylace, siRNA proti mutantním Ras, reoviry

Přímá aktivace transkripčních faktorů

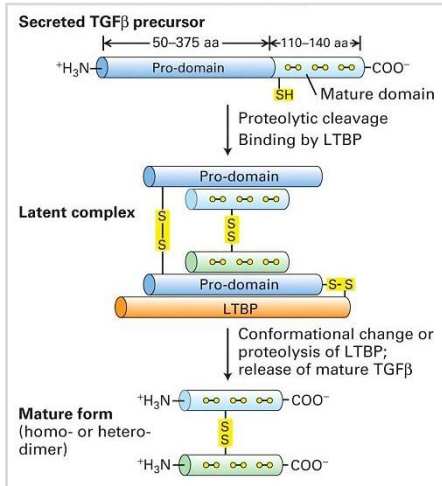
Signální dráha Jak/STAT

- STAT jsou transkripční faktory s SH2 doménou, v cytoplazmě, po aktivaci translokace do jádra
- Jak konstitutivně asociuje s receptorem
- vazba cytokinu stimuluje dimerizaci receptoru, fosforylace Jak, fosforylace receptoru
- na fosforylovaný receptor se váže STAT, který je aktivován fosforylací od Jak
- aktivovaný STAT se odděluje od receptoru, dimerizuje a přechází do jádra
- vazba na specifické enhancery a aktivace cílových genů
- negativní regulace dráhy
 - fosfatáza SHP1: SH2 doménou vazba na P-Tyr aktivovaného receptoru, defosforylace Jak
 - proteiny SOCS: vazba na P-Tyr aktivovaného receptoru, blok struktury přes doménu SOCS-box váží ubikvitin ligázu, degradace Jak v proteazomu



Přímá aktivace transkripčních faktorů

Signalizace TGFβ (Transforming Growth Factor β)



- tři izoformy (TGFβ1-3) s tkáňově a vývojově specifickou expresí
- syntéza ve formě prekurzoru sekretováno do extracelulárního prostoru
- tvorba latentního komplexu: odštěpení prodomény, vazba na LTBP protein
- po aktivaci uvolněn zralý TGFβ ve formě dimeru

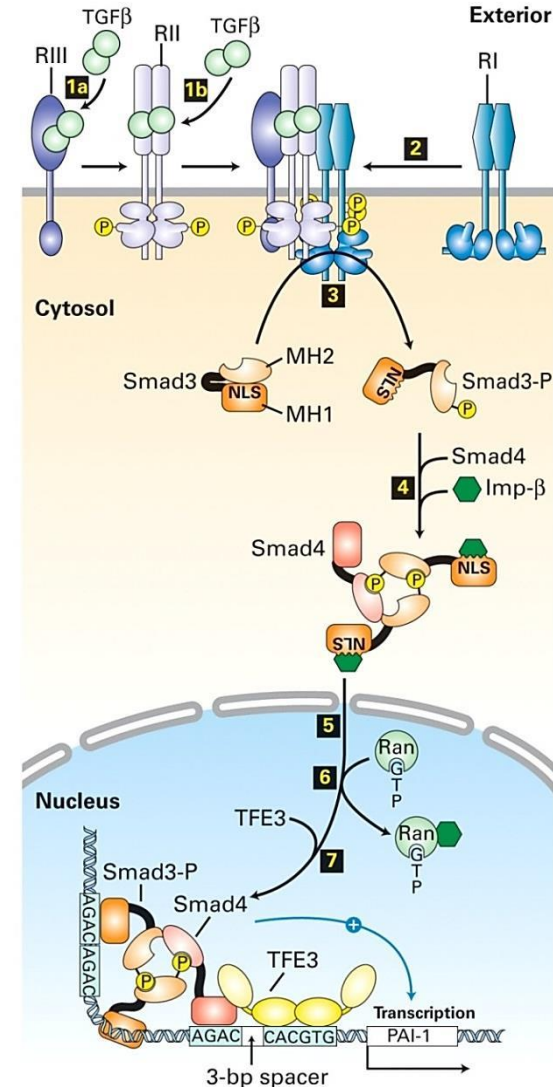
• tři typy receptorů

RI a RII - transmembránové dimery

- Ser/Thr kinázovou aktivita v cytosolické doméně

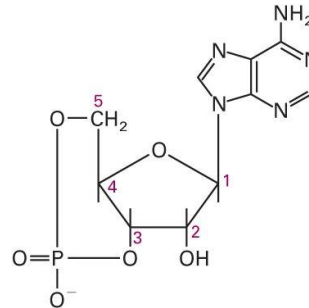
RIII - vazba a koncentrace TGFβ blízko povrchu buněk

- po vazbě TGFβ na RII (přímo/přes RIII) je RI přitažen a aktivován
- RI fosforyluje Smad3, který v dimerizuje a tvoří komplex se Smad4 a Importinem β
- po translokaci do jádra se Importinem β uvolní
- komplex Smad3/Smad4 váže transkripční faktor TFE3 a reguluje transkripci cílových genů

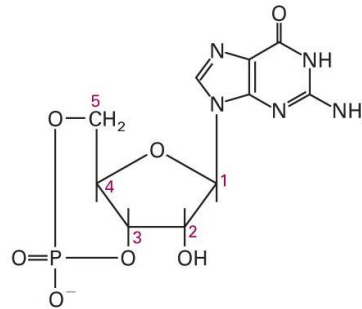


Sekundární přenašeče

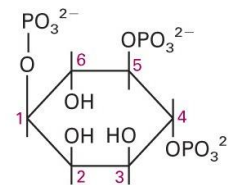
- nízká molekulová hmotnost
- dobře rozpustné
- krátký poločas rozpadu
- intracelulární signály
- přenos, amplifikace a rozdělení signálu z receptorů
- po přijetí signálu aktivovány enzymy zodpovědné za jejich tvorbu
- jejich koncentrace v buňce stoupá a klesá v závislosti na přítomnosti mimobuněčného signálu
- vyvolávají rychlou změnu aktivity enzymů nebo jiných proteinů



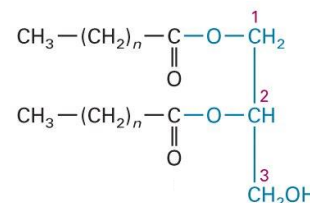
3', 5'-cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)
Aktivuje proteinkinázu A (PKA)



3', 5'-cyklický guanosinmonofosfát (cGMP)
Aktivuje proteinkinázu G (PKG)



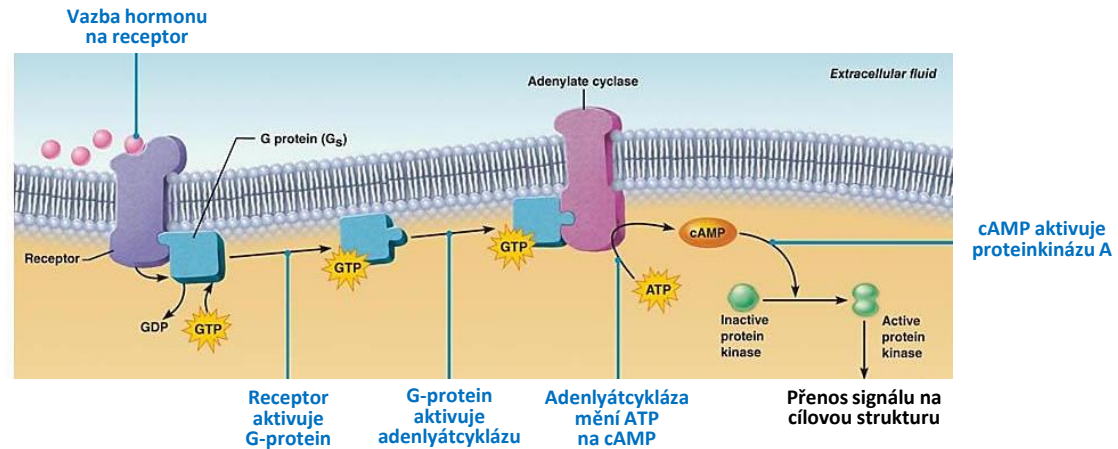
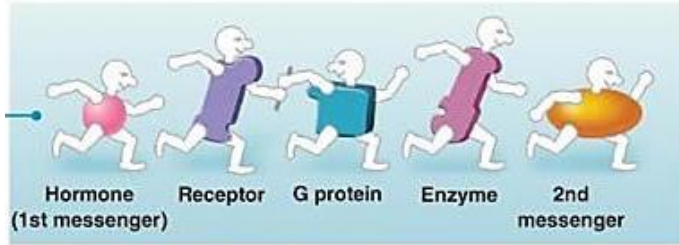
Inositol-1,4,5-trisfosfát (Ins(1,4,5)P₃)
Otevírá Ca²⁺ kanály ER



1,2-diacylglycerol (DAG)
Aktivuje proteinkinázu C (PKC)

Receptory vázané na G-protein

G-proteiny (trimerní)



Přenos signálu z receptoru na producenta sekundárních přenašečů

Podjednotka α - vazebné místo pro GDP/GTP, GTPázová aktivita

Podjednotky $\beta\gamma$ - ukotvení G-proteinu v plazmatické membráně

Základní stav

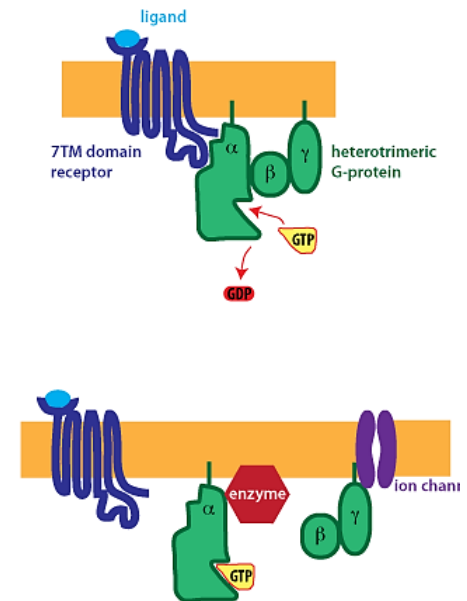
- asociace $\alpha\beta\gamma$ podjednotek, GDP na podjednotce α

Aktivace

- vazba ligandu na receptor vede k výměně GDP za GTP (GEF faktor)
- disociace α od $\beta\gamma$
- α a $\beta\gamma$ regulují aktivitu specifických cílových proteinů

Inaktivace

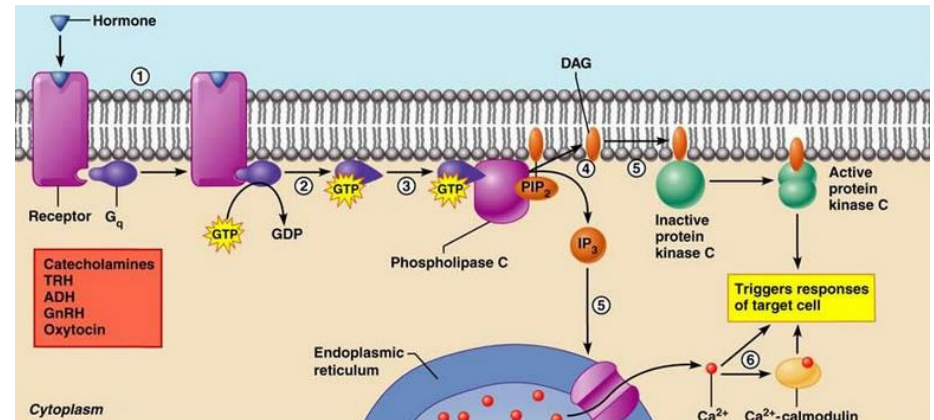
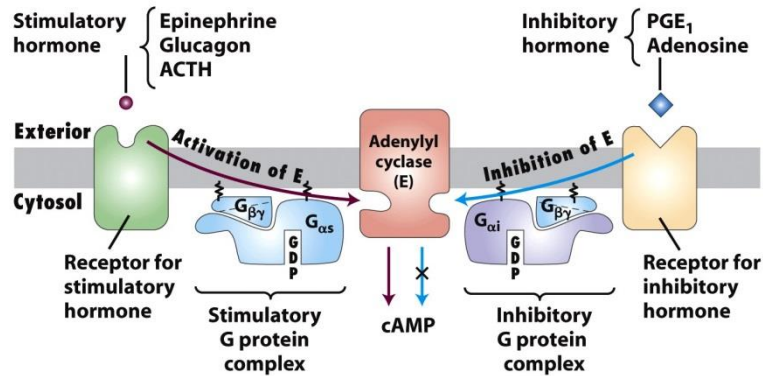
- po hydrolýze GTP na GDP (GAP protein) návrat do trimerního stavu



Receptory vázané na G-protein

U savců 20 typů α , 5 typů β , 6 typů γ ; podle α podjednotek řazeny do 4 tříd

Gαs	α	aktivace adenylátcyklázy, Ca ²⁺ kanálů
Gαi	α	inaktivace adenylátcyklázy, aktivace fosfolipázy C a cGMP fosfodiesterázy
	$\beta\gamma$	aktivace K ⁺ kanálů a fosfolipázy C
Gαq	α	aktivace fosfolipázy C
Gα12	α	aktivace Rho



Efektory

- adenylátcykláza - nárůst cAMP - aktivace PKA, regulace iontových kanálů
- fosfolipáza C - vznik DAG, Ins(1,4,5)P3 - aktivace PKC, otevření Ca²⁺ kanálů
- GTPáza Rho - aktivace ROCK kinázy
- Ca²⁺ kanál - vazba na kalmodulin - aktivace CaMKII

Receptory vázané na G-protein

Robert J. Lefkowitz, Brian K. Kobilka

2012 NC za chemii

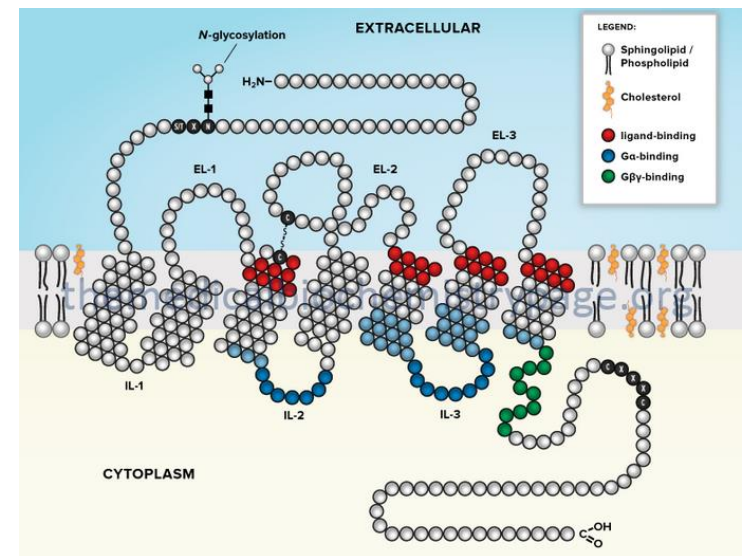
za studium receptorů vázaných na G-proteiny



- největší rodina buněčných povrchových receptorů
- sedm α helixů (22-24 AK) v plazmatické membráně
- α helixy spojeny variabilními smyčkami
 - extracelulární: vazba ligandu
 - intracelulární: vazba G-proteinu
- vazba ligandu mění konformaci intracelulární části receptoru, na kterou se váže a aktivuje G proteinu

Ligandy

- neurotransmitery, neuropeptidy
- odoranty, lipidy
- hormony - např. serotonin, epinefrin, glukagon, tyrotropin, kalcitonin, ACTH, prostaglandiny
- ztráta citlivosti vlivem přetrvávající přítomnosti ligandu



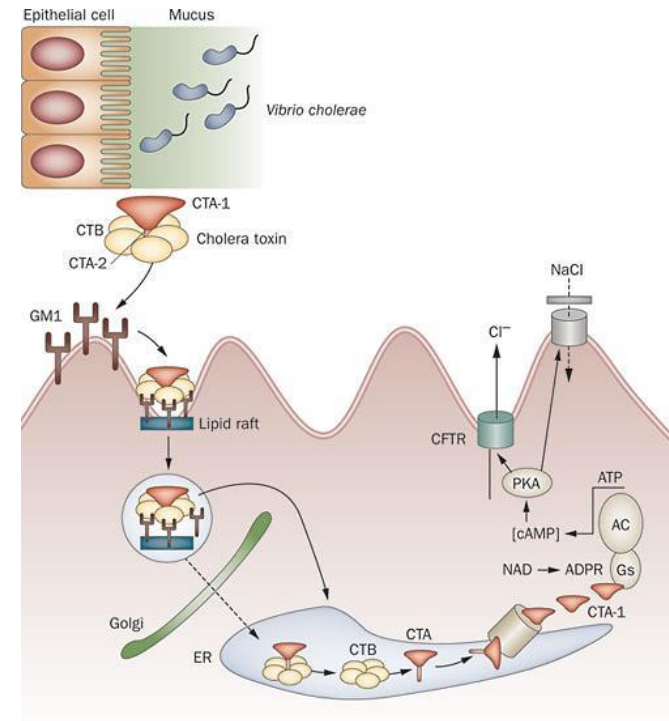
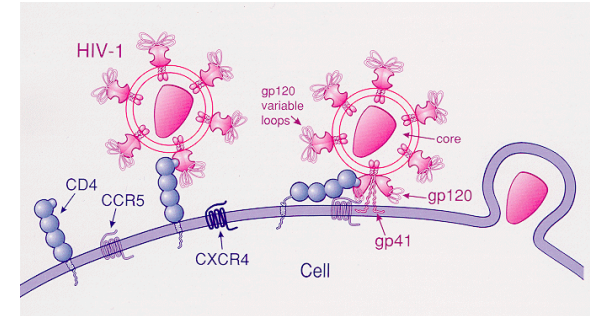
Receptory vázané na G-protein

Biologické účinky

- růst a diferenciace buněk, chemotaxe
- přenos signálů z chuťových, pachových a světelným vjemů
- nervová signalizace
- regulace krevního tlaku, funkce endokrinních žláz
- embryogeneze a vývoj organismu

Nemoci spjaté s G-proteiny

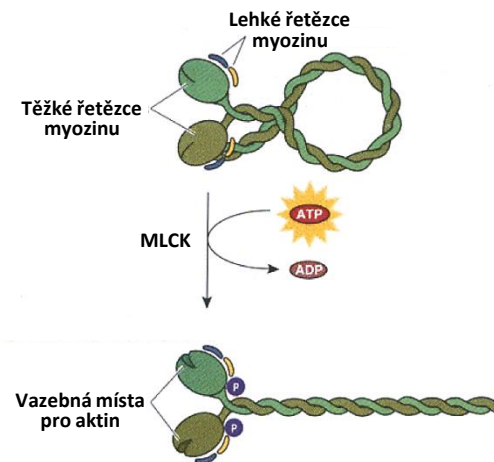
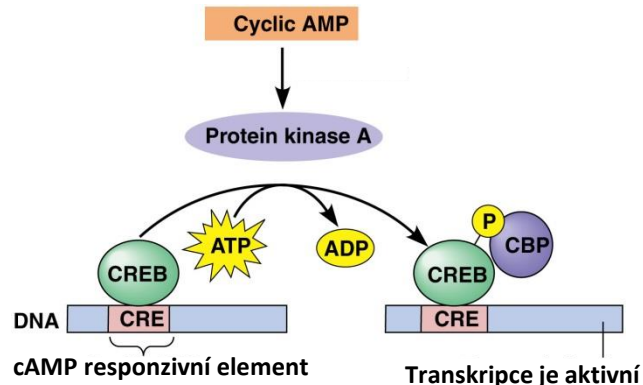
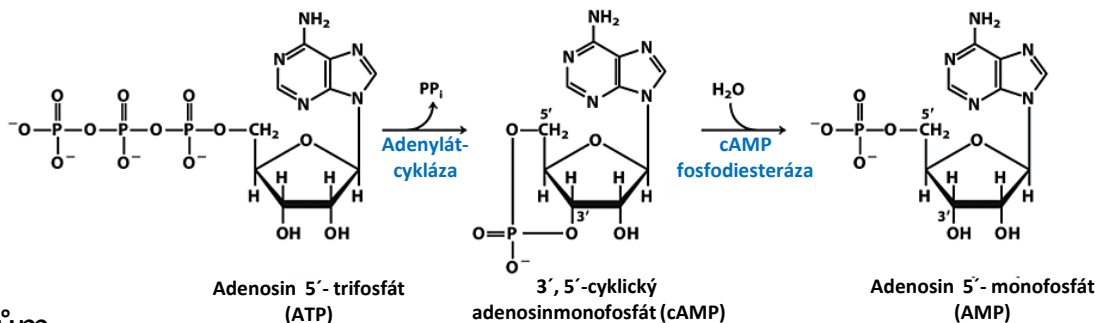
- nádorová onemocnění
 - mutace receptorů nalezeny u zhruba 1/5 nádorů
- infekce virem HIV
 - receptory CXCR4 a CCR5 využívány pro vstup viru do buněk
- cholera (*Vibrio cholerae*)
 - cholera toxin složený z podjednotek A a B
 - podjednotka B zajišťuje vazbu na povrch buněk (GM1)
 - podjednotka A podporuje ADP-ribosylace G α s, která pak není schopna hydrolýzy GTP
 - hyperaktivace adenylátcyklázy - vysoká koncentrace cAMP v epitelu střeva - propustnost iontových kanálů - únik vody a iontů do lumen střeva - prudké průjmy



Nitrobuněčné signální dráhy

Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)

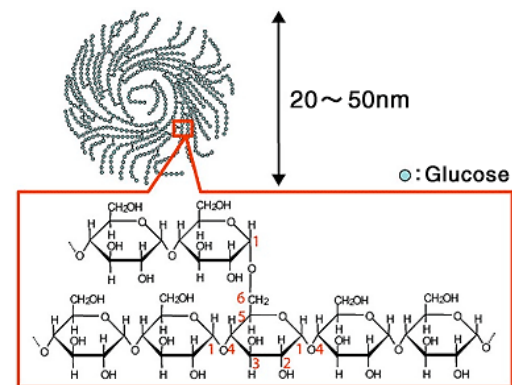
- koncentrace závislá na aktivitě
 - adenylátcyklázy
 - cAMP fosfodiesterázy
- rychlý nárůst koncentrace v buňkách vystavených příslušnému ligandu
- přenos signálu z membrány k proteinům cytosolu nebo jádra
- vazba na regulační doménu PKA - uvolnění katalytické domény - fosforylace cílových substrátů
 - i) transkripční faktor CREB: spolu s CBP/p300 se váže k sekvencím CRE a aktivuje příslušné geny
 - ii) receptory steroidních hormonů
 - iii) kináza lehkého řetězce myozinu (MLCK) v buňkách hladké svaloviny



Nitrobuněčné signální dráhy

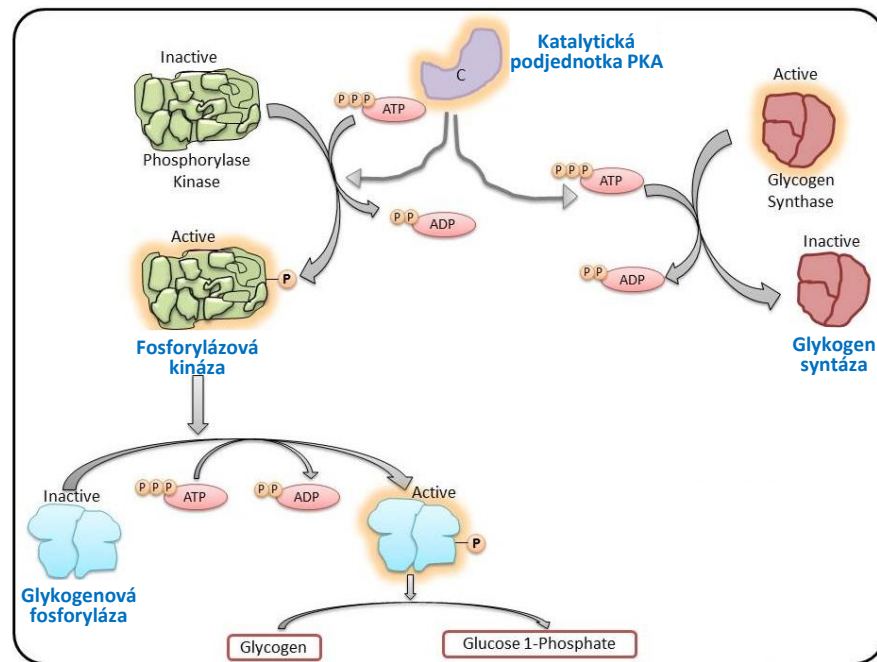
Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)

- objeven při studiu metabolismu glykogenu (Sutherland, 1958)
- glykogen představuje zásobárnu glukózy v lidském těle
- při stresu se do krve produkuje adrenalin, který stimuluje svalové a jaterní buňky k uvolnění a štěpení glykogenu



Mechanismus

- vazba adrenalinu na β -adrenergní receptory svalových buněk
- aktivace G-proteinu
- aktivace adenylátckylázy
- zvýšení hladiny cAMP
- aktivace PKA
- fosforylace/aktivace fosforylázové kinázy
- fosforylace/aktivace glykogenové fosforylázy
- štěpení glykogenu na glukóza-1-fosfát, která je po defosforylaci uvolněna do krve
- zároveň PAK fosforyluje/inaktivuje glykogen syntázu



Signalizace přes inzulinový receptor

Inzulín - heterodimerní hormon produkovaný B buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní

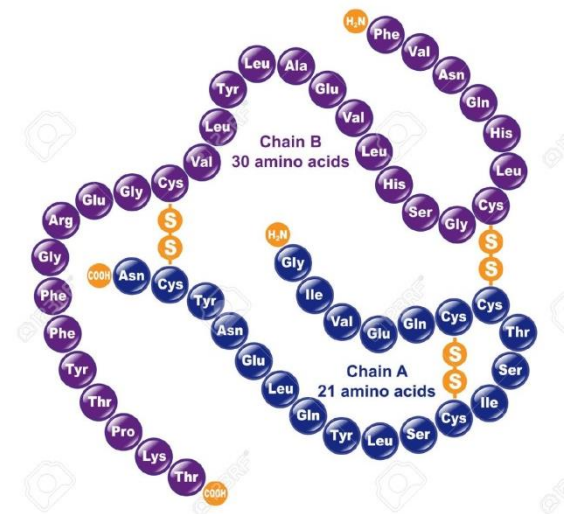
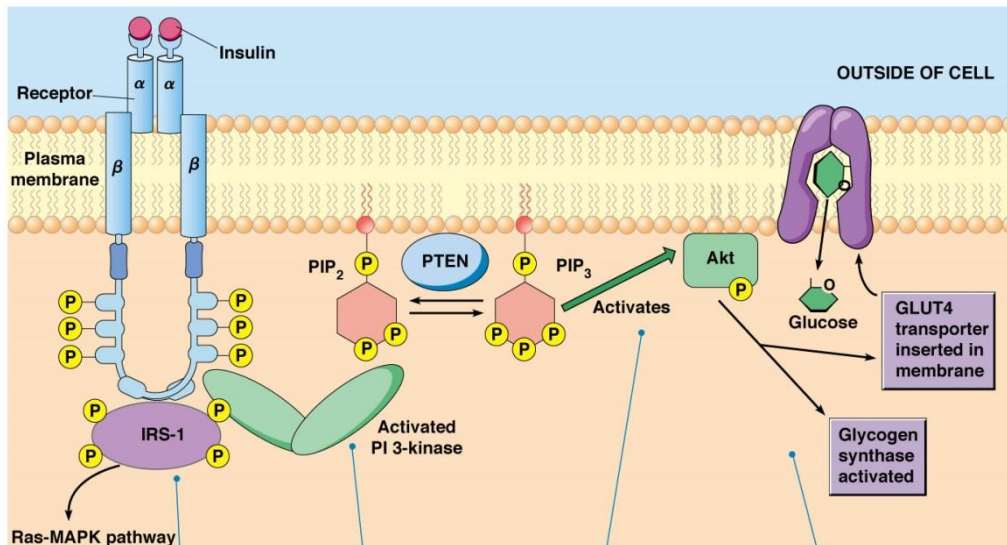
- snižuje hladinu glukózy v krvi, podporuje její využití buňkami a přeměnu na glykogen
- nedostatečná tvorba - diabetes mellitus 1. typu

Inzulínový receptor - IR, tyrosinproteinkinázový receptor rodiny 2, heterotetramer

- nedostatečná funkce - diabetes mellitus 2. typu

Signální dráha

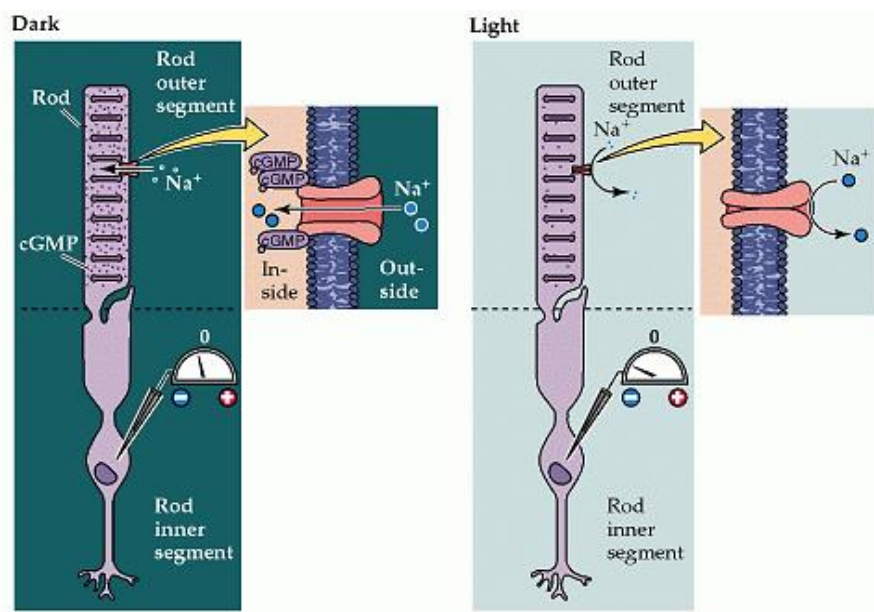
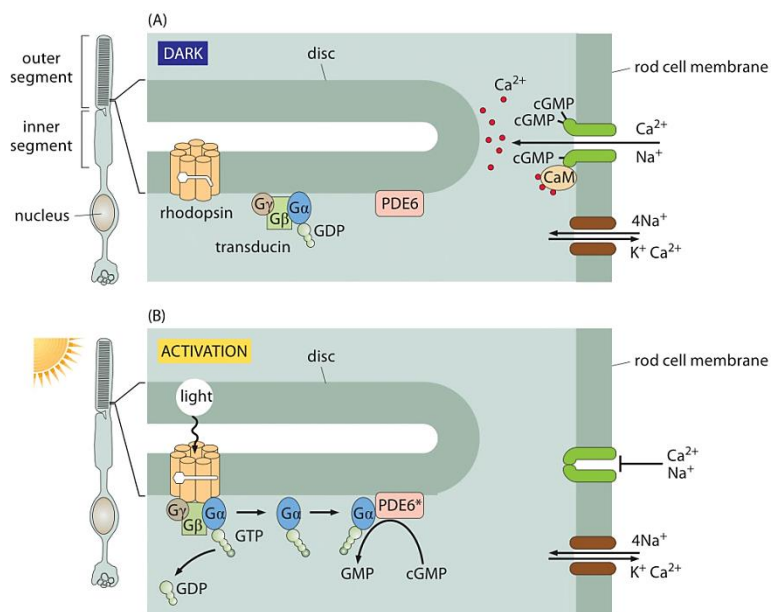
- vazba inzulinu - autofosforylace/aktivace IR - fosforylace/aktivace IRS-1
- na IRS-1 se přes SH2 domény váží
 - i) Grb2-Sos - Ras-Raf-MAPK dráha
 - ii) PI(3)K - tvorba PIP3 - aktivace Akt - translokace glukózového transportéru GLUT4 k membráně - aktivace glykogen syntázy



Nitrobuněčné signální dráhy

Cyklický guanosinmonofosfát (cGMP)

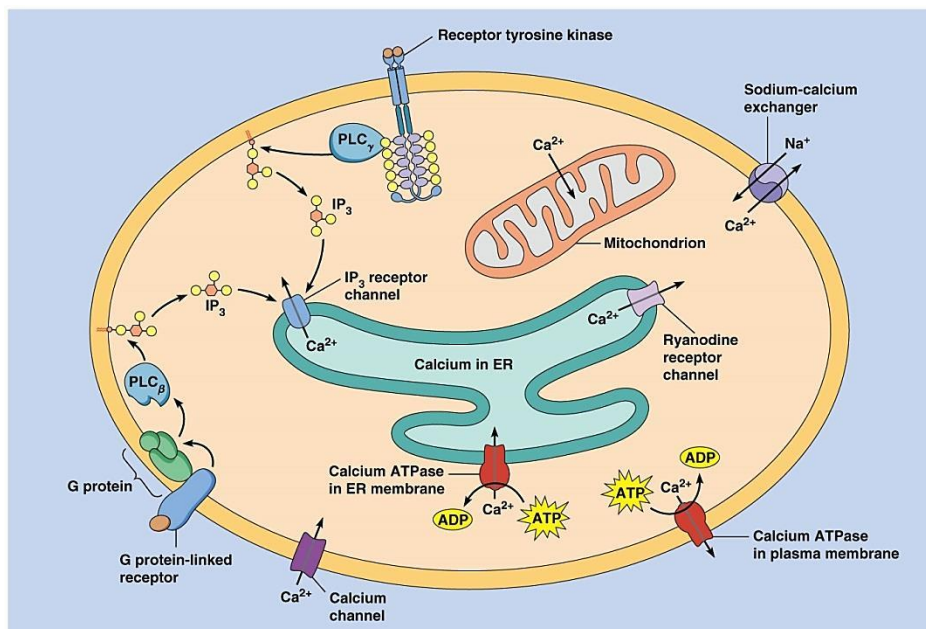
- koncentrace závislá na aktivitě guanylátcyklázy (solubilní, receptorová) a cGMP fosfodiesterázy
- aktivuje PKG - stimulace iontových kanálů (Ca^{2+} , Na^+)
 - uvolnění hladké svaloviny, dilatace tepen, sekrece Na^+ a vody v trávicí soustavě
- mění propustnost iontových kanálů v tyčinkách oční sítnice
 - ve tmě: guanylátcykláza tvoří cGMP, které udržují iontové kanály otevřené
 - za světla: absorpce fotonu - aktivace rodopsinu - aktivace G-proteinu - aktivace fosfodiesterázy - hydrolýza cGMP - zavření iontových kanálů - hyperpolarizace membrány - vizuální signál



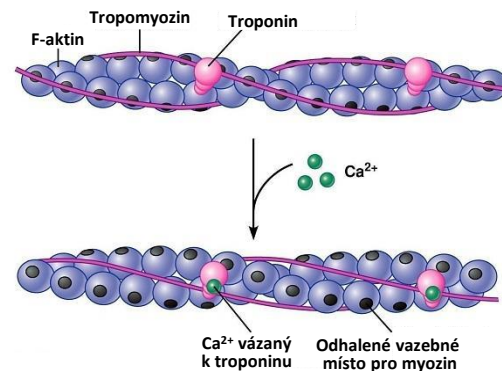
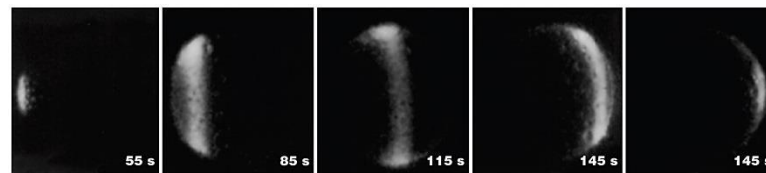
Nitrobuněčné signální dráhy

Dráha Ca^{2+}

- rozdílná koncentrace v cytoplasmě (10^{-7} M) a mimobuněčné tekutině (10^{-3} M)
- buňka jej nepřijímá, aktivně vyčerpává, váže do organel
- zvýšení koncentrace v cytoplasmě aktivuje nitrobuněčný signální mechanismus
 1. depolarizace membrán akčním potenciálem
 2. fosfolipáza C štěpí PIP_2 , vzniklý $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ otvírá Ca^{2+} kanál endoplazmatického retikula
- cílové proteiny - troponin C v buňkách kosterního svalstva (svalová kontrakce)
 - kalmodulin



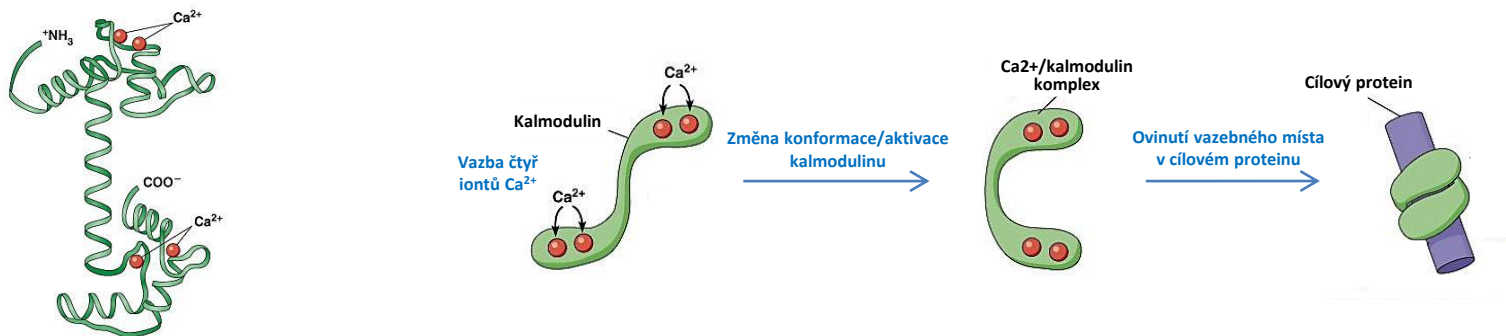
Ca^{2+} signální vlna v oplozeném vajíčku



Nitrobuněčné signální dráhy

Kalmodulin

- zprostředkovává Ca^{2+} signál
- dvě globulární domény (vazba Ca^{2+}) spojené flexibilní oblastí (vazba k různým substrátům)
- vazba čtyř iontů Ca^{2+} mění jeho konformaci, vyšší afinita k proteinům, které mění svoji aktivitu
- důležitou cílovou molekulou je CaMKII
- úloha v metabolismu (aktivace fosforylázové kinázy), kontrakci hladké svaloviny (aktivace MLCK), expresi genů (CREB), sekreci neurotransmiterů, zánětu, pohybu buněk, apoptóze

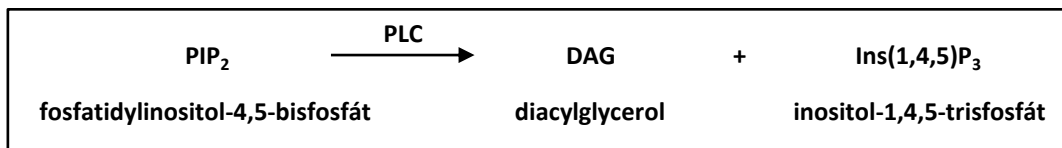


Interakce cAMP a Ca^{2+} drah

- vzájemné ovlivňování se
 - komplex Ca^{2+} /kalmodulin může vázat a regulovat aktivitu adenylátcyklázy a fosfodiesterázy
 - PKA může fosforylovat některé kanály určující obsah Ca^{2+} v cytosolu
- CaMKII může být fosforylována PKA
- PKA a CaMKII často fosforylují aminokyseliny stejného proteinu (např. CREB)

Nitrobuněčné signální dráhy

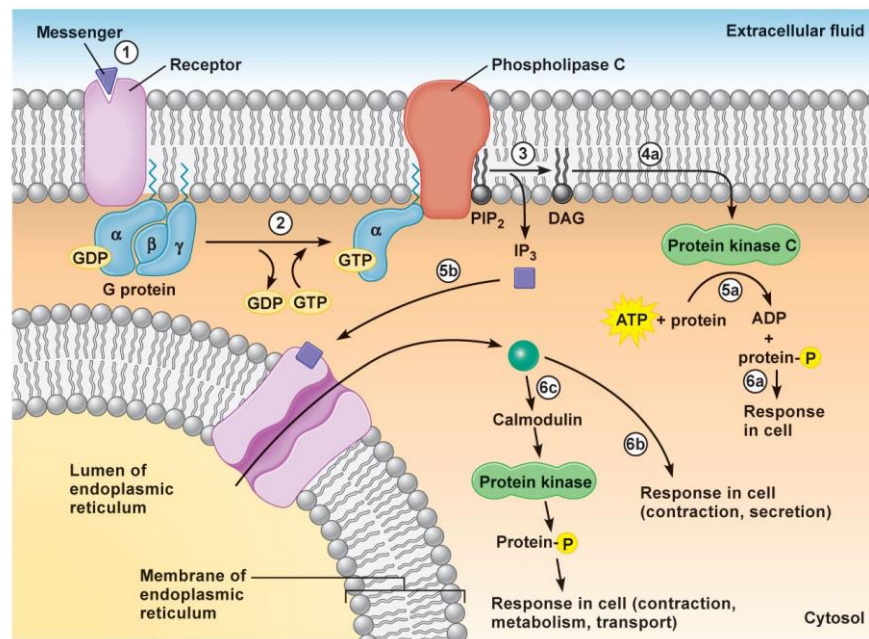
Dráha inositolových fosfolipidů



- PLC β aktivována G-proteinem z rodiny G α_q
- PLC γ aktivována po vazbě na tyrosinproteinkinázový receptor (SH2 doména)
- Ins(1,4,5)P $_3$ uvolňuje Ca $^{2+}$ z buněčných zásob
- DAG aktivuje PKC, PI3K

NF κ B

- transkripční faktor inhibovaný v cytoplasmě vazbou I κ B
- PKC fosforyluje I κ B a tím stimuluje jeho polyubikvitinaci a degradaci proteazomem
- po degradaci I κ B se NF κ B translokuje do jádra, kde podporuje expresi genů důležitých pro imunitu, proliferaci buněk, apoptózu, embryonální vývoj
- deregulace jeho dráhy spjata s nádorovými a zánětlivými onemocněními



Oxid dusnatý při vazodilataci - mechanismus účinku

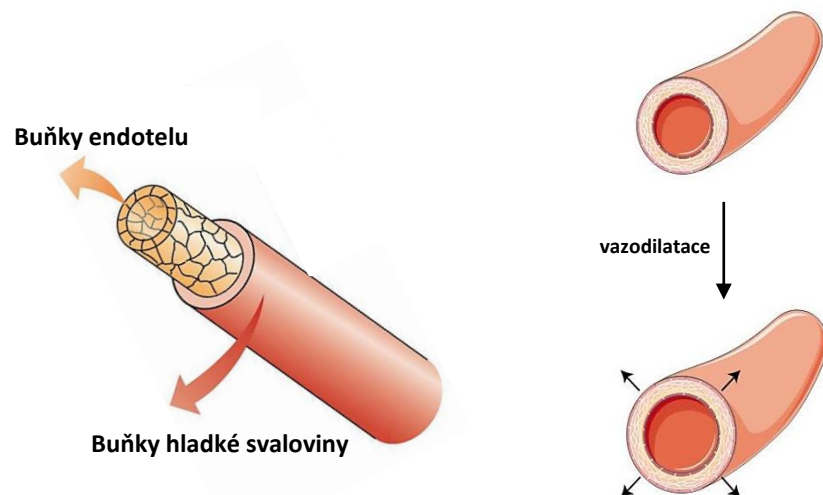
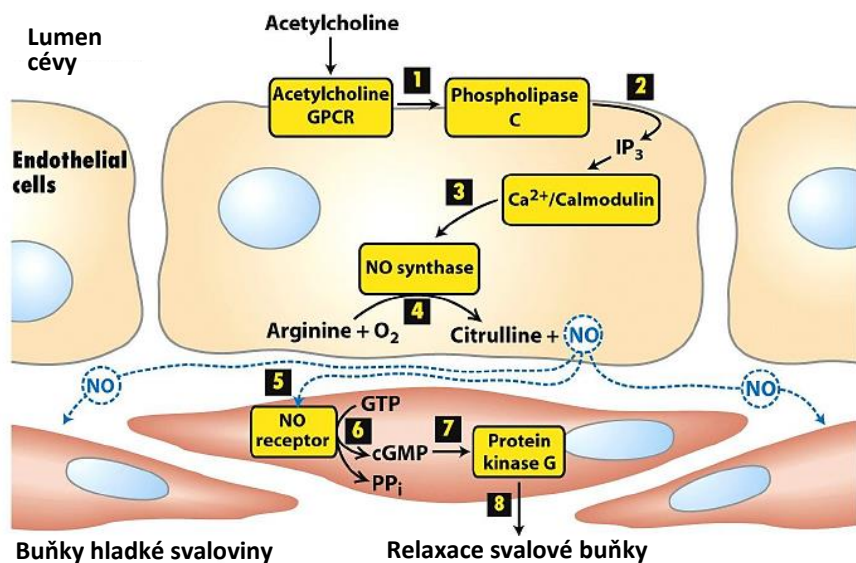
Nervová zakončení signalizující uvolnění hladké svaloviny uvolňují acetylcholin

Buňky endotelu

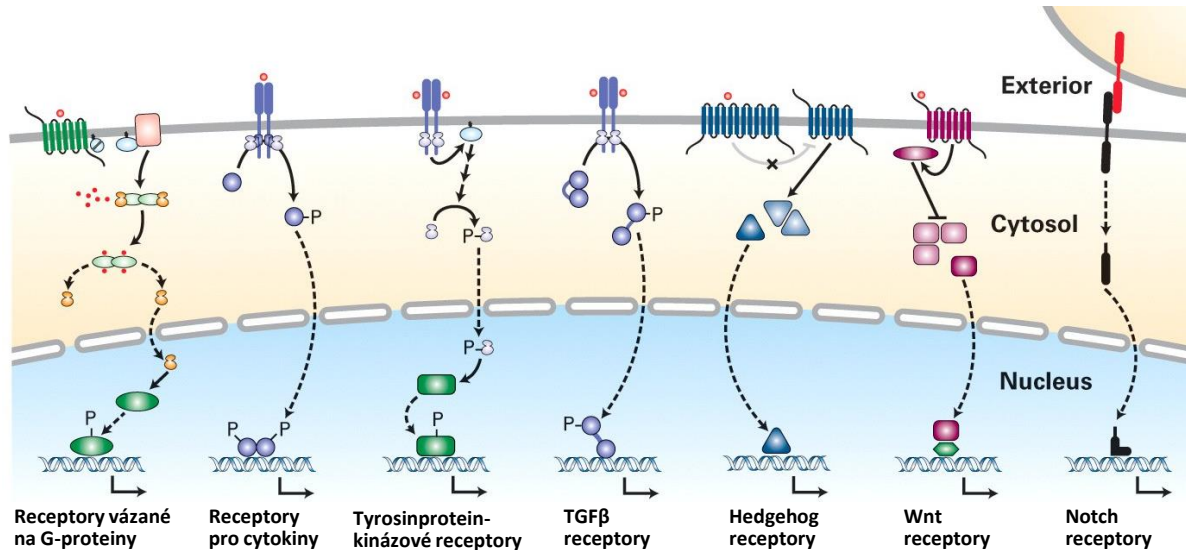
- vazba acetylcholinu na receptor vázaný na G-protein, aktivace $G\alpha_q$
- aktivace $PLC\beta$, produkce $Ins(1,4,5)P_3$
- uvolnění Ca^{2+} z endoplazmatického retikula, tvorba komplexu Ca^{2+} /kalmodulin
- aktivace NO syntázy, produkce NO, který difunduje k buňkám hladké svaloviny

Buňky hladké svaloviny

- vstup NO membránou, aktivace rozpustné guanylátcyklázy, produkce cGMP
- aktivace PKG, fosforylace řady svalových proteinů, relaxace svalové buňky



Hlavní třídy povrchových receptorů



Tvorba či uvolnění sekundárního přenašeče - receptory vázané na G-proteiny

Přímá aktivace transkripčního faktoru - receptory pro cytokiny, TGFβ receptory

Spuštění fosforylační kaskády - tyrosinproteinkinázové receptory

Uvolnění aktivního transkripčního faktoru z komplexu v cytosolu - Wnt receptory

Proteolytické štěpení inhibitoru uvolňuje transkripční faktor - Hedgehog a Notch receptory

Dva typy buněčné odpovědi

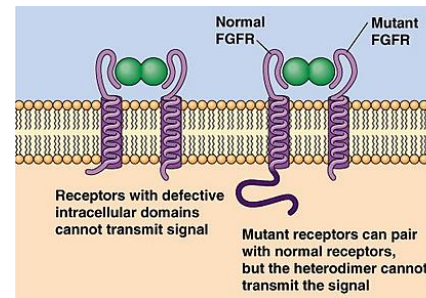
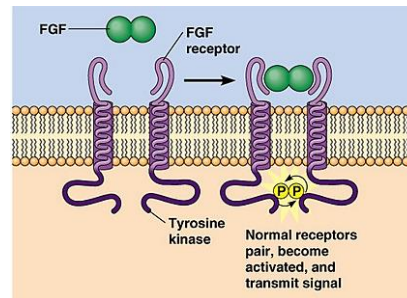
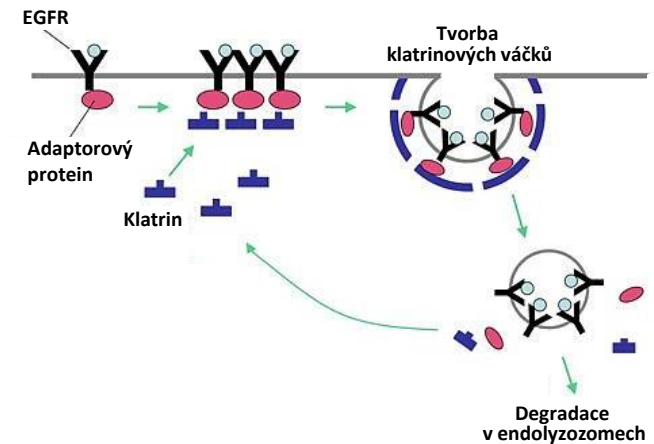
i) aktivace enzymů - receptory vázané na G-proteiny

ii) aktivace genové exprese - ostatní třídy povrchových receptorů

Aktivace více nitrobuněčných signálních drah - receptory vázané na G-proteiny, tyrosinproteinkinázové receptory, receptory pro cytokiny

Utlumení signálních drah

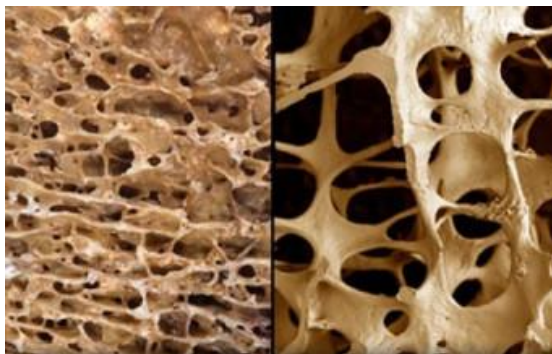
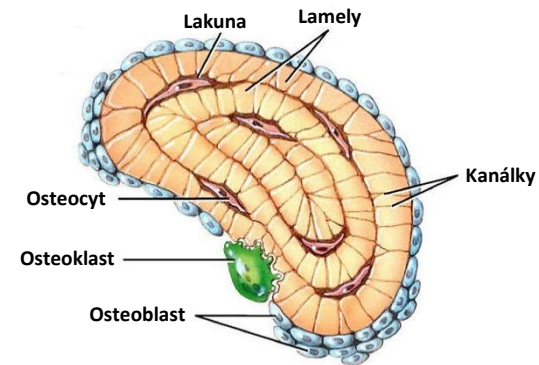
- snížení hladiny hormonů, defosforylace složek signálních drah, degradace sekundárních přenašečů
- nitrobuněčné negativní regulátory (SOCS)
- odstranění receptorů z povrchu buňky endocytózou
 - např. receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) je po vazbě EGF, pohlcen do klatrinových váčků, transportován do lysozomů a degradován
 - recyklace některých receptorů, např. LDLR
- přítomnost mutantních složek signálních drah
 - např. dominantně negativní mutace receptoru pro fibroblastový růstový faktor (FGF)



- sekrece proteinů, které vycytávají hormony
 - tyto proteiny dokáží vázat hormon, ale nejsou schopny aktivovat nitrobuněčnou signalizaci
 - např. kontrola resorpce kostí

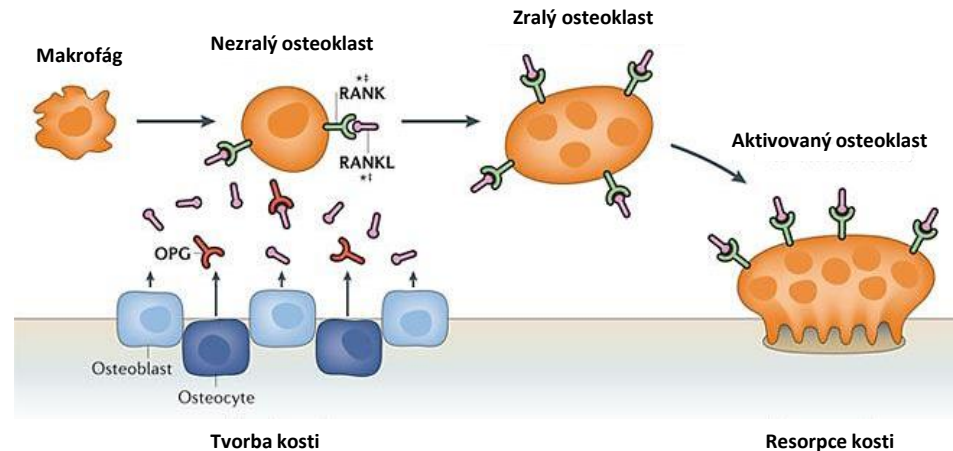
Tvorba kostí u savců

- rovnováha mezi tvorbou a rozkladem kostní tkáně
 - osteoklasty: odbourávání kostní hmoty, receptor RANK
 - osteoblasty: tvorba mezibuněčné hmoty
 - produkce ligandu RANKL a osteoprotegerinu (OPG)
 - osteocyty: klidová forma osteoblastu
- vazba RANKL na RANK aktivuje buněčné signální dráhy, které indukují diferenciaci osteoklastů a resorpci kostí
- útlum resorpce kosti přes sekreci OPG, který brání vazbě RANKL na RANK
- poruchy tvorby kostí u člověka
 - i) osteoporóza: přílišná resorpce kosti, nedostatečná denzita kostní tkáně, zvýšená křehkost kostí
 - ii) osteopetróza: abnormálně nízká resorpce kosti, zvýšená denzita kostní tkáně
 - lámání kostí, poškození kostní dřeně



Normální stav

Osteoporóza



Zvídavé otázky

Buňka dokáže rychle odpovědět na extracelulární signál pokud:

- A. buňka nevyžaduje receptor pro signální molekulu
- B. odpověď nevyžaduje, aby se změnily proteiny v cílové buňce
- C. odpověď nevyžaduje, aby se spustila exprese genů či syntéza proteinů

Co potřebuje cílová buňka, aby mohla odpovědět na extracelulární signální molekulu?

- A. přístup k signální molekule
- B. přítomnost odpovídajícího receptoru
- C. odpovídající intracelulární signální dráhu
- D. vše z uvedeného

Po vazbě ligandu se tyrosinproteinkinázové receptory aktivují dimerizací, což umožňuje:

- A. každý polypeptidový řetězec dimeru fosforyluje sám sebe na tyrosinu cytoplazmatické domény
- B. každý polypeptidový řetězec dimeru fosforyluje druhý řetězec na tyrosinu cytoplazmatické domény
- C. internalizaci receptoru, což umožní fosforylaci a aktivaci různých intracelulárních signálních proteinů

Jaká je funkce diacylglycerolu (DAG) v dráze inositolových fosfolipidů?

- A. Aktivuje fosfolipázu C (PLC)
- B. Sám o sobě váže a aktivuje proteinkinázu C (PKC)
- C. Spolu s Ca^{2+} váže PKC z cytosolu k plazmatické membráně a aktivuje ji
- D. Váže se k Ca^{2+} kanálům, otevírá je a umožňuje extracelulárními Ca^{2+} dostat se do buňky

Mutantní Ras protein, který se často vyskytuje u nádorů, nemůže hydrolyzovat GTP na GDP a proto:

- A. se nemůže zapnout
- B. se nemůže vypnout
- C. nemůže být degradován
- D. je schopný přímo aktivovat MAPK dráhu

Zvídavé otázky

Každý extracelulární signál indukuje podobnou odpověď v rozdílných cílových buňkách (ANO / NE)

Jaká je funkce inositol-1,4,5-trisfosfátu (Ins(1,4,5)P₃) v dráze inositolových fosfolipidů?

- A. vytváří díry do membrány endoplazmatického retikula (ER), čímž vypouští Ca²⁺ z ER do cytoplazmy
- B. váže se k Ca²⁺ kanálům v membráně ER, čímž je otevírá a vypouští Ca²⁺ z ER do cytoplazmy
- C. Přímo aktivuje proteinkinázu C (PKC)
- D. Aktivuje fosfolipázu C (PLC)

Když je adenylát cykláza aktivována přes receptor vázaný na G-protein, tak:

- A. mění AMP na cAMP
- B. mění ADP na cAMP
- C. mění ATP na cAMP
- D. mění cAMP na AMP

Protein Ras je aktivován Ras-aktivačním proteinem, který:

- A. způsobuje vazbu Ras ke G-proteinu
- B. fosforyluje Ras
- C. defosforyluje Ras
- D. vyvolává u Ras výměnu GDP za GTP

Paralelní intracelulární signální dráhy mohou interagovat mimojiné proto, že proteinkinázy z jedné dráhy mohou fosforylovat a regulovat proteiny z jiných drah (ANO / NE)

Která z následujících molekul není malou intracelulární signální molekulou (sekundárním přenašečem)?

- A. cAMP
- B. Fosfolipáza C
- C. Inositol-1,4,5-trisfosfát
- D. Diacylglycerol

