

# PATOBIOCHEMIE



Trendlink. [online]. [cit. 2014-08-18]. Dostupné z: <http://www.trendlink.com/aktien/Biochemie>

*Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie*

Mgr. Marie Brázdová, Ph.D.

[brazdovam@vfu.cz](mailto:brazdovam@vfu.cz)



Biofyzikální ústav AV ČR. [online]. [cit. 2014-08-18]. Dostupné z: <http://www.ibp.cz/cs/o-instituci/zakladni-informace/>

Biofyzikální ústav, Akademie  
věd České republiky, v.v.i.  
Královopolská 135  
612 65 Brno

# Patobiochemie

Patobiochemie se zabývá poruchami biochemických dějů v organismu, biochemickými změnami v průběhu chorobných stavů a snaží se o jejich vysvětlení na molekulární úrovni.

## ***Přednášející:***

Mgr. Marie BRÁZDOVÁ, Ph.D.

Mgr. J. Jelínek, Mgr. I. Kučerová, Mgr. Veselý, Mgr. Čech

**Po: 45-135    7:15-8:45**

## ***Cvičící:***

Mgr. Marie BRÁZDOVÁ, Ph.D.

Mgr. J. Jelínek, Mgr. I. Kučerová, Mgr. A. Polášková, Mgr. R. Helma, Mgr. M. Petr, Mgr. Adámik

(laboratoř 45-324, centrální laboratoře)

# SYLABUS PRAKTICKÝCH CVIČENÍ:

(po 14:45-17:00; ut 7-9:15, 9:15-11:30, 11:30-13:45)

1. Cvičení: Analýza onkogenů pomocí imunodetekce na membráně. **(14.2.;21.2.MB) (Laboratoře 324, šatna 3.patro)**
2. Cvičení: Základní biochemická vyšetření. Seznámení s biochemickým analyzátozem Dimension. **(28.2.;7.3.JJ, centrální laboratoře, šatna suterén)**
3. Cvičení: Imunochemické metody. Chemiluminiscenční metody. Využití imunoanalyzátoru Immulite. **(14.3.;21.3.JJ, centrální laboratoře, šatna suterén)**
4. Cvičení: Hematologické metody. Využití automatických hematologických analyzátorů v klinické praxi. Koagulační metody **(28.3., 4.4., seminář, učebna )**
5. Cvičení: Zápočtový test **(11.4.;18.4.MB, učebna)**

# Sylabus Patobiochemie 2016/2017 (přednášky 45-135 posluchárna, po 7:15-8:45)

- 1. Úvod do předmětu, význam studia patobiochemie. Rozsah a požadavky k úspěšnému ukončení předmětu zkouškou, doporučená literatura. Principy regulací metabolismu. Receptory. Biochemické komunikace. **(13.2.MB)**
- 2. Příčiny a druhy poruch. Dědičné metabolické poruchy. Enzymy, regulace metabolismu. Příčiny zvýšené aktivity buněčných enzymů v plasmě. Klinicky významné enzymy. **(20.2.MB)**
- 3. Sacharidy, metabolismus glukosy a jeho poruchy. Regulace glykemie, poruchy. Patobiochemie diabetu mellitu, druhy DM. Poruchy metabolismu glykogenu, glykogenosy. **(27.2.MB)**
- 4. Metabolismus aminokyselin a jeho poruchy. Druhy nemocí, terapie. **(6.3.MB)**
- 5. Poruchy metabolismu lipidů. Cholesterol, lipoproteiny. Lipidosy, dyslipoproteinemie. **(13.3.MB)**
- 6. Patobiochemie arteriosklerózy. Ischemická porucha srdeční - srdeční markery. **(20.3.JJ)**
- 7. Krev, proteiny krevní plasmy. Srážení krve, koagulopatie. Dysproteinemie. Porfyriny. Biosyntéza, poruchy metabolismu. Porfyrie, hemoglobinopatie. **(27.3.Kučerová)**
- 8. Nukleové kyseliny poruchy metabolismu purinů a pirimidinů. Hyperurikemie, orotacidurie, terapie. **(3.4.MB)**
- 9. Xenobiotika a jejich účinky na organismus. Detoxikace, mechanismus. Biologické oxidace. Účinky volných radikálů na organismy. Lipoperoxidace, antioxidanty. **(10.4.MB)**
- 10. Tumor, tumorové markery. Základní charakteristika nádorové buňky. Strategie laboratorních vyšetření. Požadavky na ideální nádorový marker. Používané tumorové markery. **(24.4.MB)**
- 11. Vztah patobiochemie a klinické biochemie. Klinicko-biochemická analytika a její specifické rysy. Terminologie klinické biochemie. Analyzovaný materiál. Odběr materiálu. Mechanizace a automatizace v klinické biochemii. Analyzátoři, jejich rozdělení z různých hledisek. Diagnostické soupravy. Organizace práce v klinicko-biochemické laboratoři, laboratorní a nemocniční informační systémy. **(15.5.CL)**
- 12. Analýza moče a močového sedimentu. Imunochemické metody. **(22.5.CL)**

# Studijní literatura:

moodle- patobiochemie 2017, patobiochemie2015, patobiochemie

- G.F.Hoffmann et al. *Dědičné metabolické poruchy*. Grada,, 2006.
- J.Koolman, K.H.Rohm. *Barevný atlas biochemie*. Grada, 2012.
- Ledvina a kol. *Biochemie pro studující medicíny - I. a II.díl*. Karolinum, 2005.
- Murray et al. *Harper's Illustrated Biochemistry. 29th Edition*. Lange, 2012.
- KARLSON, P.; GEROK, W.; GROSS, W. *Pathobiochemie*. Academia, Praha, 1987.
- *Laboratorní diagnostika*. Edited by Tomáš Zima. 1. vyd. Praha: Galén, 2003. ISBN 80-7262-201-3.
- *Clinical biochemistry :metabolic and clinical aspects*. Edited by S. K. Bangert - William J. Marshall. New York: Churchill Livingstone, 1995. ISBN 0-443-04341-8.
- MASOPUST, Jaroslav. *Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. část I. a část II. ISBN 80-7184-649-3.
- *Clinical guide to laboratory tests*. Edited by Norbert W. Tietz. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1995. ISBN 0-7216-5035-X.
- RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.

# Požadavky ke zkoušce z patobiochemie

**Zkouška** se skládá z části písemné a části ústní

Test: min 60% (E), ....90-95% (A)

Ke zkoušce se mohou přihlásit pouze ti studenti, kterým byl udělen **zápočet** z praktického cvičení.

**Praktická cvičení:** účast 100%, test před úlohou, protokoly, zápočtový test 80%

# Principy regulací metabolismu. Hormony. Biochemické komunikace.

## PRINCIPY REGULACE METABOLISMU:

TEORETICKÉ ZÁKLADY

ZPĚTNÁ VAZBA

ENZYMY -BIOKATALYZÁTORY

HORMONY (Obecné mechanismy účinku hormonů a neurotransmiterů)

RECEPTORY (Typy membránových receptorů a intracelulární receptory)

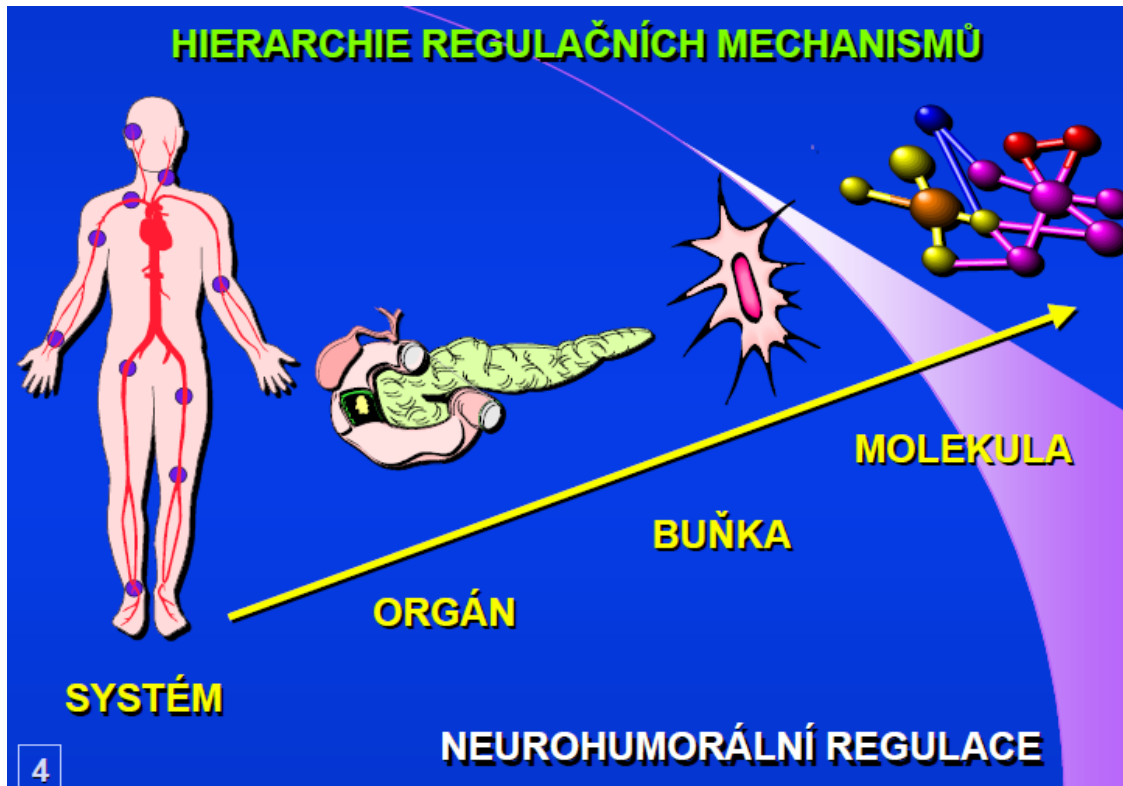
ENZYMY

METABOLICKÉ REGULACE

**Aktivita metabolických drah** musí být neustále monitorována a upravována, aby syntéza a degradace metabolitů uspokojila převládající fyziologické požadavky. Přepínání mezi různými **katabolickými a anabolickými reakcemi** je nezbytné jednak podle aktuálních metabolických potřeb každé **buňky**, jednak podle potřeb **celého organismu**.

Pro zachování existence živých objektů je proto nutné propojení jednotlivých částí organismu a zajištění vzájemné regulace.

# Regulace metabolismu probíhá na různých úrovních, ale vždy na molekulárním podkladě.

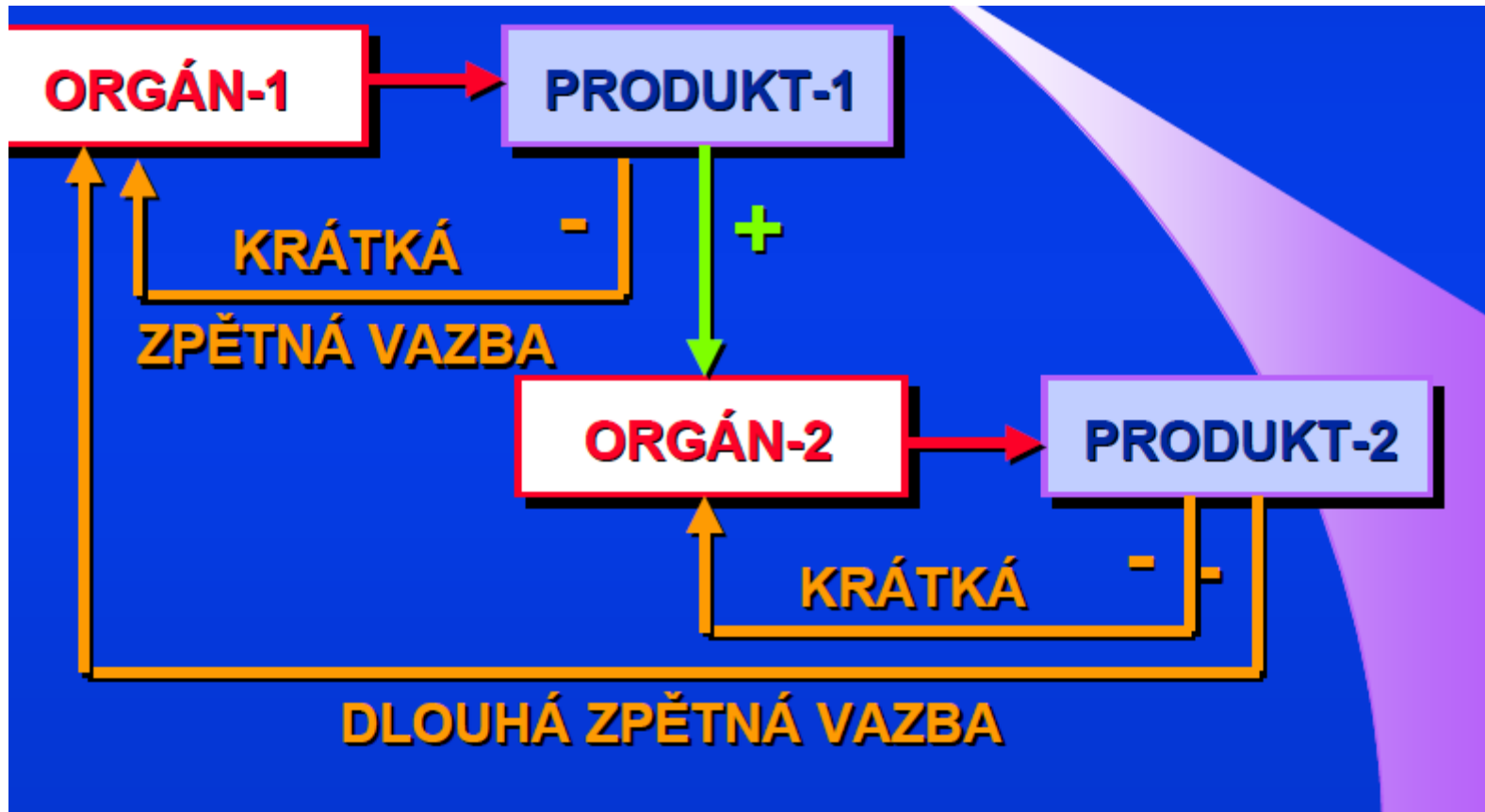


Pro život mnohobuněčného organismu je nezbytná **spolupráce mezi blízkými a vzdálenými buňkami**, neboť buňky musí vzájemně sladit své chování. Jde nejen o vzájemnou regulaci (**neurohumorální regulace**), ale i o společné využívání produktů různých metabolických pochodů, probíhajících v různých buňkách v různé míře.

Cílem je přizpůsobit se neustále se měnícím vnějším i vnitřním podmínkám. Vzájemnou komunikaci mezi buňkami zajišťují **signální molekuly**, které jsou zachyceny cílovými buňkami pomocí specifických **receptorových proteinů (receptorů)**. Extracelulární signál je pak převáděn na intracelulární signály, které řídí chování buňky. Signál je mezi buňkami přenášen na různou vzdálenost, s různou rychlostí a selektivitou.



# Základním regulačním mechanismem – zpětná vazba



## Regulace metabolismu probíhá na různých úrovních, ale vždy na molekulárním podkladě.

Centrálním nástrojem regulace metabolismu je **regulace enzymových reakcí**

regulace **v určitém buněčném kompartmentu**

regulace **v rámci kompletní buňky**

(proteom, specifické receptory, izoenzymy, transportéry, energetický stav buňky)

regulace vyplývající z **komunikace mezi buňkami**

**úrovně regulace se překrývají.**

# Enzymy

Regulace buněčných dějů v rámci samotné buňky souvisí s regulací přicházející z okolí - regulační děje navazující na vnější signál probíhají obdobným mechanismem, jako regulace zprostředkované samotnou buňkou. **Všechny regulační kaskády vždy vedou**

Takový enzym je označován **jako klíčový nebo regulační enzym** a obvykle se v buňce vyskytuje v nízké koncentraci (regulace je obecně založena na).

Rychlost celé metabolické dráhy (sledu následných **změně koncentrace aktivního enzymu** reakcí) je tak dána reakcí, která je za daných podmínek **nejpomalejší**.

Všechny kroky metabolických drah regulovány nebývají, regulace nejčastěji zahrnuje pouze **klíčové reakce metabolismu**.

Regulován bývá enzym, který katalyzuje **první rozhodující reakci** metabolické dráhy, vycházející z obecné hotovosti intermediárního substrátu. Nejčastěji jde o silně exergonické, tj. prakticky nevratné, reakce.

# Regulace enzymové aktivity

- regulace **množství enzymu** (syntéza a degradace)
- regulace **aktivity enzymu** (modifikace enzymu proteolýzou, kovalentní modifikací, allosterická regulace, interakce s regulačními proteiny)
- **dostupnost a koncentrace** substrátu (regulace transportu)

## BIOKATALYZÁTORY

### KATALÝZA

JE ZMĚNA RYCHLOSTI CHEMICKÉ REAKCE  
ÚČINKEM KATALYZÁTORU

PODÍLÍ SE NA REAKCI, ALE SAMI SE  
NESPOTŘEBOVÁVAJÍ

**AKTIVÁTORY** - RYCHLOST REAKCE ZVYŠUJÍ

**INHIBITORY** - RYCHLOST REAKCE SNIŽUJÍ

# Významné regulační mechanismy

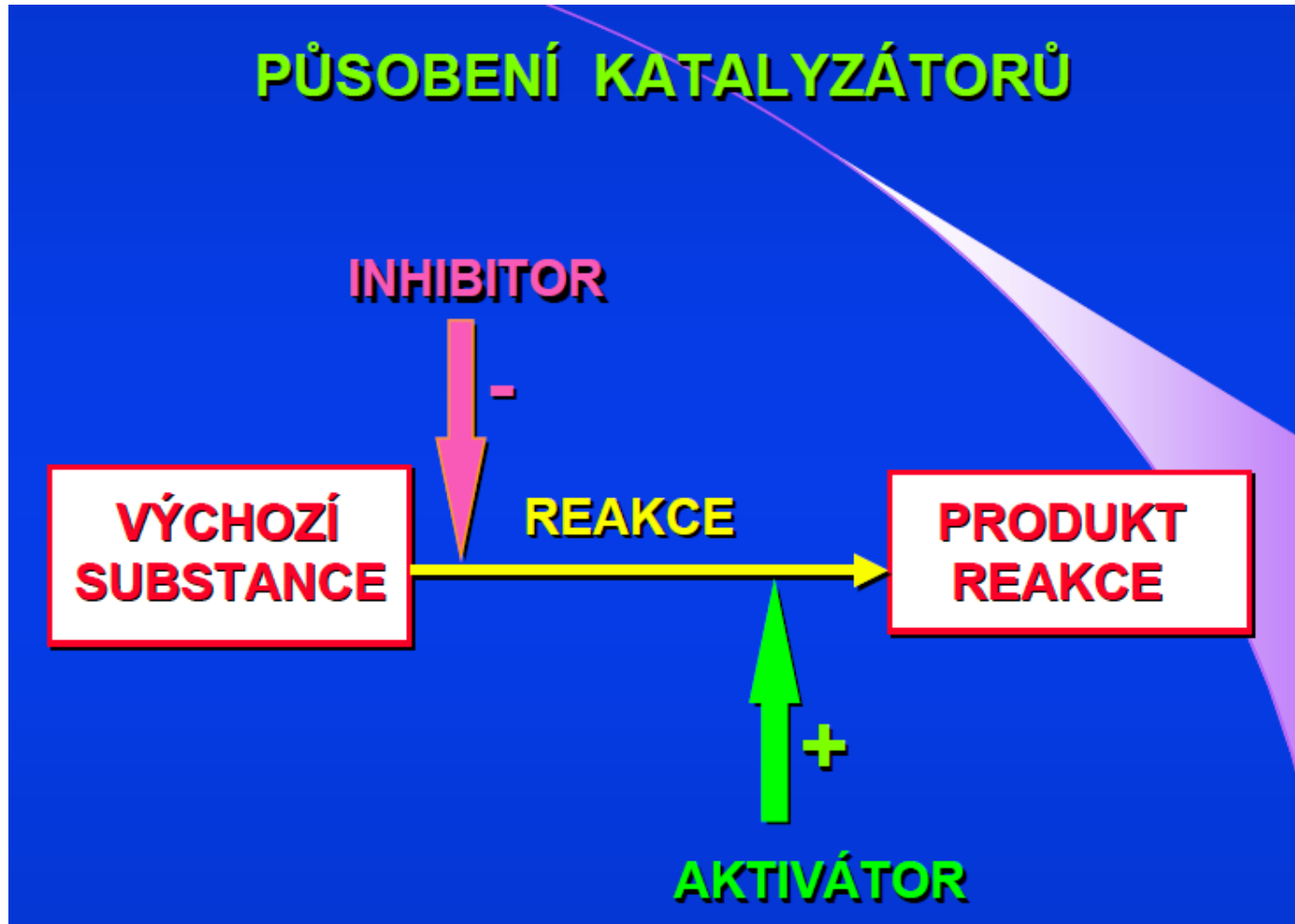
**1) dostupnost substrátů** - zvyšuje se s jejich zvýšeným příjmem nebo syntézou a také s transportem na místo, kde mohou být metabolizovány, snižuje se s jejich odběrem dalšími metabolickými drahami

**2) využívání produktů** - pokud je produkt reakce ihned využíván následnou reakcí jako substrát (metabolické dráhy), nedochází k hromadění tohoto produktu a reakce dále probíhá ve směru jeho další tvorby; začne-li se nevyužitý produkt hromadit, často pak slouží jako inhibitor reakce, nebo sledu reakcí, vedoucích k jeho vzniku

**3) dostupnost potřebných koenzymů** - většina enzymů potřebuje pro svou katalytickou funkci vhodný koenzym, který se během přeměny substrátu také mění: při jeho regeneraci následnou drahou je rychlost reakce dána rychlostí této následně probíhající zpětné přeměny koenzymu

**4) aktivita potřebných enzymů** - závisí jednak na koncentraci daného enzymu v buňce, jednak na tom, jak velká část z přítomných molekul enzymu je aktivní; z regulačního hlediska je nejvýhodnější měnit aktivitu enzymů katalyzujících nejpomalejší reakci dané metabolické dráhy

# Aktivita enzymů – inhibitory, aktivátory



## Regulace na úrovni makroorganismu

Pro život mnohobuněčného organismu je nezbytná **spolupráce mezi blízkými a vzdálenými buňkami**, neboť buňky musí vzájemně sladit své chování. Jde nejen o vzájemnou regulaci (**neurohumorální regulace**), ale i o společné využívání produktů různých metabolických pochodů, probíhajících v různých buňkách v různé míře.

Cílem je přizpůsobit se neustále se měnícím vnějším i vnitřním podmínkám. Vzájemnou komunikaci mezi buňkami zajišťují **signální molekuly**, které jsou zachyceny cílovými buňkami pomocí specifických **receptorových proteinů (receptorů)**.

**Extracelulární signál** je pak převáděn na **intracelulární signály**, které řídí chování buňky. Signál je mezi buňkami přenášen na různou vzdálenost, s různou rychlostí a selektivitou.

## Mezibuněčná komunikace

- koordinace růstu, diferenciací, metabolismu buněk tkání a jiných mnohobuněčných struktur
- **buňky - komunikace přímým kontaktem buňka-buňka** - specialisované spoje v plasmatické membráně - výměna malých molekul - např. koordinace metabolických odpovědí; určení tvaru buněk
- interakce buňka-buňka = počátek vývoje a diferenciací tkání, vazba specifického proteinu jedné buňky na receptor buňky druhé
- **extracelulární signální molekuly** - syntetizovány “**signalizujícími**” buňkami, vyvolají odpověď jen v “**cílových**” buňkách, majících **receptory**
- **signální transdukce** - proces “přeměny” extracelulárního signálu na buněčnou odpověď

### Komunikace extracelulárními signály: 6 kroků

- 1) syntéza signální molekuly “signalizující” buňkou
- 2) uvolnění signální molekuly “signalizující” buňkou
- 3) transport “signálu” k cílové buňce
- 4) detekce “signálu” specifickým receptorovým proteinem
- 5) změna buněčného metabolismu, funkce nebo vývoje vyvolaná komplexem signál-receptor
- 6) odstranění signálu, obvykle “ukončí” buněčnou odpověď



# Komunikace mezi buňkami

**Signální transdukce** je proces, při němž **signální molekuly (působky)** přenášejí specifické informace přes membrány z **vnějšku cílové buňky** do jejího nitra, kde vyvolávají příslušnou biologickou odpověď.

Ve vyšších organismech se uplatňují **hlavní signální systémy**, pomocí kterých je regulována a integrována činnost buněk.

Kromě nich se v metabolismu uplatňují další, do těchto systémů nezařazené signální molekuly.

## Hlavní signální systémy ve vyšších organismech

System	Zdroj signálních molekul	Signální molekuly
Endokrinní	Endokrinní žlázy, rozptýlené žlázové buňky	Hormony
Nervový	Nervová buňka	Neurotransmitery, neurohormony
Imunitní	Buňky imunitního systému	Cytokiny
Další typy	Různé buňky	Ikosanoidy, růstové faktory

# Účinky signálních molekul

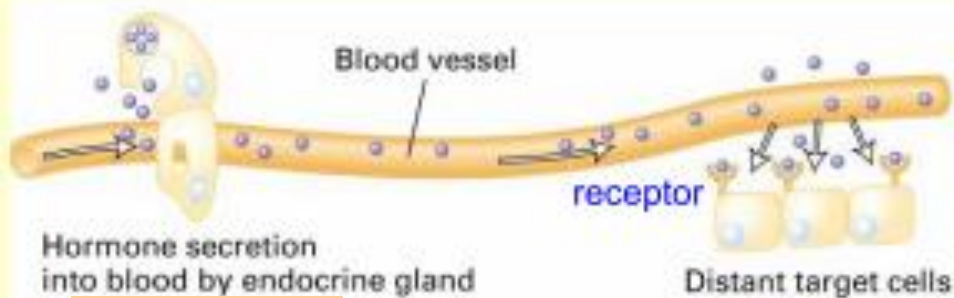
Název účinku	Charakter účinku
<b>endokrinní</b>	<b>Působek</b> je přenášen <b>krví</b> na cílovou buňku, která je většinou vzdálena od místa vzniku. Typicky <b>hormony</b>
<b>parakrinní</b>	Působek je secernován <b>do bezprostředního</b> okolí buňky (lokální mediátory). Působkem jsou ovlivněny jen buňky v nejbližším okolí.
<b>autokrinní</b>	Buňka sekretuje působek a je současně cílem. Rysy jsou obdobné parakrinnímu působení.

**Endokrinní** — působek je přenášen krví na cílovou buňku, která je většinou vzdálena od místa vzniku. Typicky jsou to hormony. Koncentrace působku v krvi je velmi nízká ( $10^{-12}$ – $10^{-9}$  mol/l) – **cílová buňka má proto velkou afinitu k působku**-- **vazba hormonu k receptoru je velmi silná, hormon nesnadno disociuje**. Dalším rysem je, že trvá určitou dobu, než se koncentrace hormonu v krvi zvýší a hladina hormonu v krvi zůstává po určitou dobu (několik minut až hodin) zvýšena.

**Parakrinní** – působek je secernován do bezprostředního okolí buňky (lokální mediátory). Působkem jsou ovlivněny jen buňky v nejbližším okolí. Koncentrace působku v okolí buněk je vyšší ( $10^{-9}$ – $10^{-6}$  mol/l). Afinita receptorů k působku je nižší -- po poklesu koncentrace v okolí buňky se působek od receptoru oddělí. Parakrinní signalizace je určena pro rychlou a lokalizovanou komunikaci mezi buňkami.

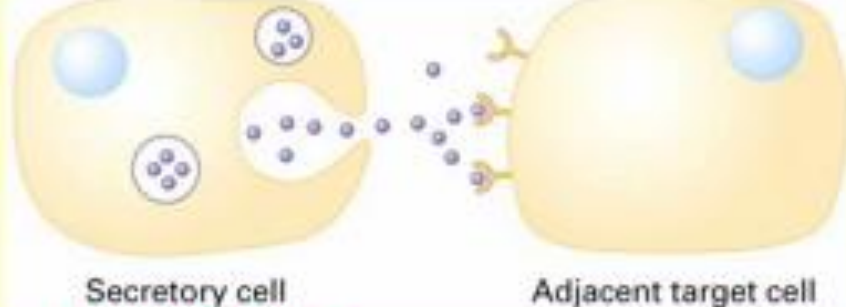
**Autokrinní** – buňka sekretuje působek a je současně cílem. Rysy jsou obdobné parakrinnímu působení.

**Juxtakrinní** – signalizace mezi buňkami nebo buňkou a extracelulární matrix vyžaduje těsný kontakt.



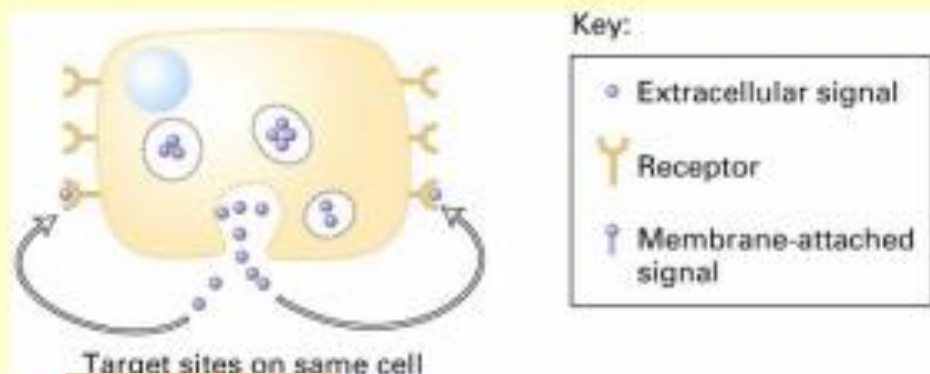
### 1. endokrinní

signální molekuly **hormony** - ovlivní cílové buňky vzdálené od místa syntézy



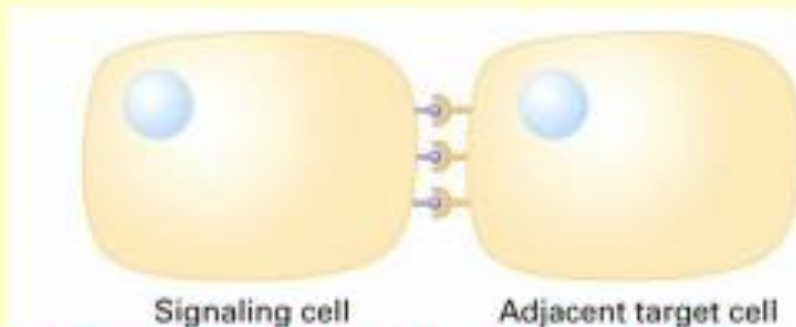
### 2. parakrinní

signální molekuly uvolněné buňkou ovlivní cílové buňky v těsné blízkosti **nervové buňky** - **neurotransmitery**



### 3. autokrinní

Buňky odpovídají na látky, které samy produkují **růstové faktory** stimulují růst b., které je produkují (nádorové b.)



### 4. Signalisace proteiny plasmatické membrány

**Juxtakrinní** — signalizace mezi buňkami nebo buňkou a extracelulární matrix vyžaduje těsný kontakt

- Některé signální molekuly - kombinace více typů signalisací - napr. **Epinephrine** - jako neurotransmitter i jako hormon

## signální systémy

TEST

# Obecné mechanismy účinku hormonů a neurotransmiterů.

## Typy signálních molekul v neurohumorálních regulacích:

<b>Působek</b>	<b>Zdroj</b>
<b>HORMONY</b>	vylučované endokrinními žlázami, rozptýlenými žlázovými buňkami, ikosanoidy mnoha jinými typy buněk
<b>NEUROHORMONY</b>	vylučované neurony do krevního oběhu
<b>NEUROTRANSMITERY</b>	vylučované na synaptických zakončeních
<b>CYTOKINY, RŮSTOVÉ FAKTORY, IKOSANOIDY</b>	Vylučovány mnoha typy buněk, zpravidla ne z endokrinních žláz

# RECEPTORY

Společným rysem všech **látek s modulačními účinky** na buňky je jejich působení prostřednictvím **receptorů**.

**Receptory** jsou **allosterické proteiny**, které mění svou konformaci po navázání ligandu.

**Ligandem** jsou **signální molekuly**.

**Agonisté** jsou ligandy, které po navázání na receptor **vyvolají transdukcii signálu**,

**antagonisté** po navázání na receptor **brání transdukcii signálu**.

## Receptorové proteiny

- specifické proteiny lokalizované **na povrchu** cílové buňky, nebo **v cytosolu** nebo **v jádře**
- **signální molekula** (hormon, feromon, neurotransmitter) funguje jako ligand, který se váže do specifického místa receptoru
- vazba ligandu **vyvolá změnu konformace receptoru** ⇒ **iniciace buněčných změn**
- **různé skupiny buněk** ⇒ různé receptory pro stejný ligand ⇒ různé odpovědi na stejný signál
- **různé ligand/receptor komplexy** ⇒ mohou vyvolat stejné b. odpovědi u určitých typů buněk.

**Receptorový protein** ⇒ vazebná specifita pro určitý ligand

**Ligand/receptor komplex** ⇒ efektorová specifita ⇒ vyvolá specifickou buněčnou odpověď

- Ve většině případů - role ligandu je pouze se vázat na receptor, ligand není metabolisován na užitečné produkty, nemá enzymatickou aktivitu
- **Cílové buňky** - většinou modifikují nebo degradují ligand -modifikace nebo terminace odpovědi na signál

**Receptory** jsou lokalizované buď na **vnějším povrchu cytoplazmatické membrány**, nebo **intracelulárně (cytosol, jádro)**.

Ve své struktuře mají dvě **hlavní komponenty**:

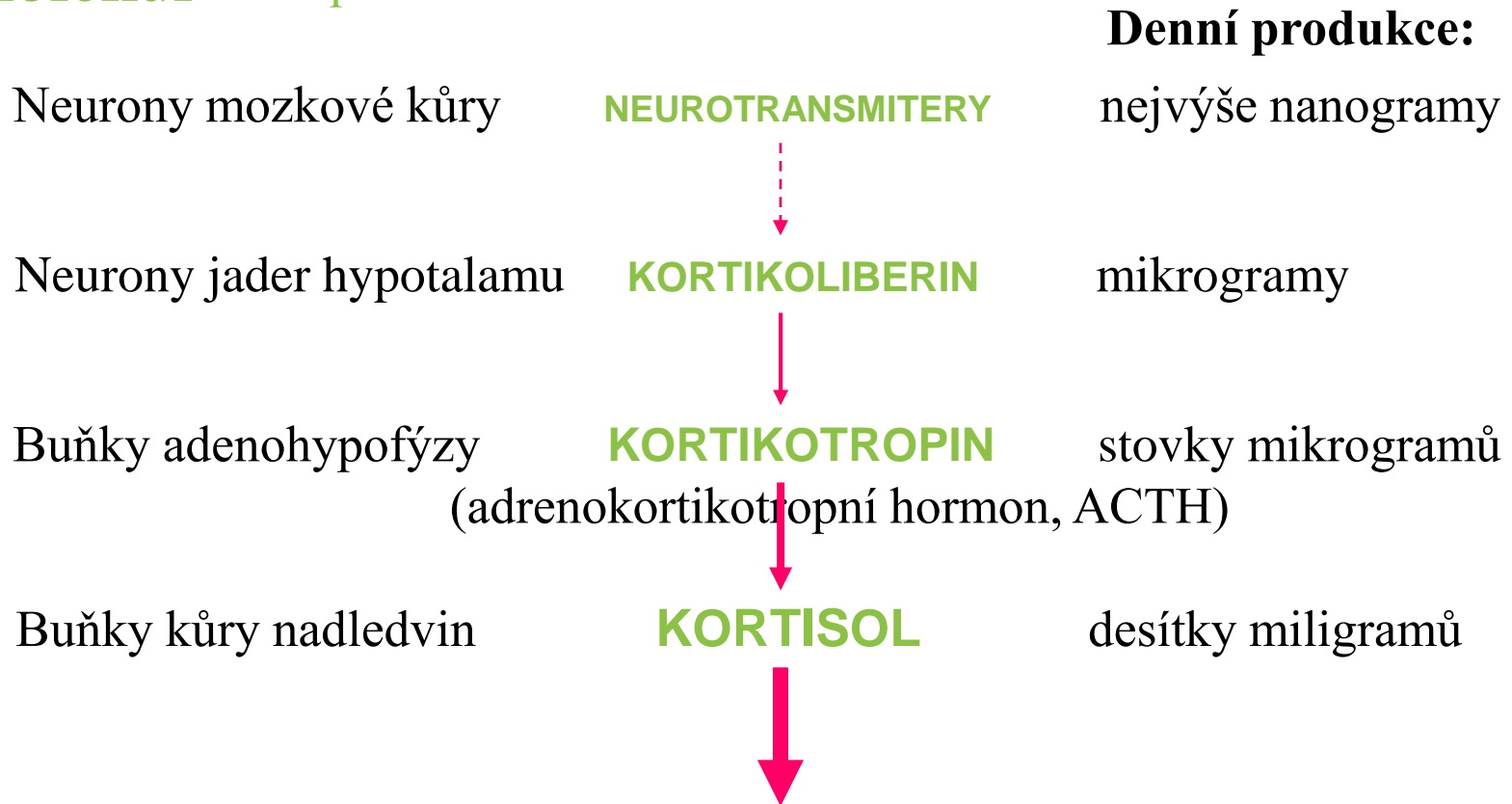
(1) doménu vázající ligand, která zajišťuje specifitu vazby s příslušným ligandem; (2) efektorovou doménu, která zahajuje vznik biologické odpovědi po vazbě ligandu.

Aktivovaný receptor může vstoupit do reakce s dalšími buněčnými komponentami a realizovat tak proces signální transdukce.

Tkáně, jejichž buňky nemají žádné molekuly specifického receptoru, nemohou reagovat na příslušný hormon.

Charakteristickým rysem přenosu signálu prostřednictvím receptorů je jeho **amplifikace** (zesílení), kdy jedna jediná molekula hormonu je schopna vyvolat buněčnou odezvu s 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup>krát vyšší intenzitou.

# Princip hierarchie v některých hormonálních regulacích a zesílení toku informací pomocí signálních molekul Např.



## **CÍLOVÉ BUŇKY PERIFERNÍCH TKÁNÍ**

Kortizol zvyšuje celkovou pohotovost organismu při zátěžových situacích ([stresech](#), [infekčních chorobách](#), velké tělesné námaze, dlouhodobém hladovění). Jeho účinek na [metabolismus](#) by se dal jednoduše popsat jako [katabolický](#), [antianabolický](#) a [diabetogenní](#).

# Hormony

vs.

# Neurotransmitery

Působí prostřednictvím  
**receptorů**

Často shodné struktury

(noradrenalin jako  
neurotransmitter i hormon)

Vznik v endokrinní buňce

Transport krví

Působení na cílové tkáně

Vznik v nervové buňce

Působení z buňky na buňku  
na synapsích

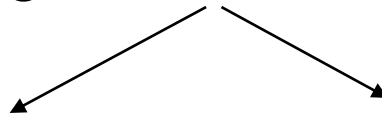


# Transdukce signálu

**Jak buňka převezme informaci nesenou chemickým signálem?**



Reakce signální molekuly s receptorem



## **Membránové receptory**

**Hormony i neurotransmitery**

Proteiny a menší signální molekuly (peptidy, aminokyseliny, biogenní aminy, ikosanoidy)

## **Intracelulární receptory**

**Pouze hormony**

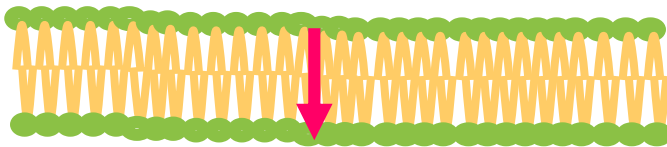
**Nepolární signální molekuly**  
(steroidy, jodtyroniny, retinoáty)

# Membránové a intracelulární receptory

**Polární** signální molekula

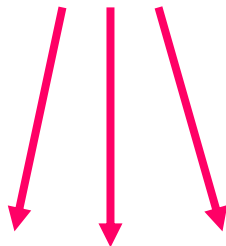
**Nepolární** signální molekula  
navázaná na transportní protein plazmy

1  
**Membránový receptor**



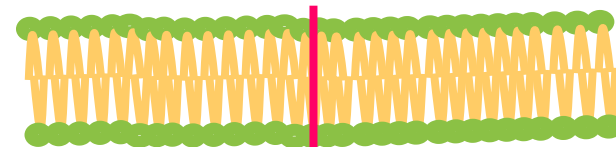
100  
Transdukce signálu

Amplifikace



10 000  
Biologická odpověď  
(rychlý účinek, může  
být následován i  
účinkem pozdějším)

Přenos signální molekuly

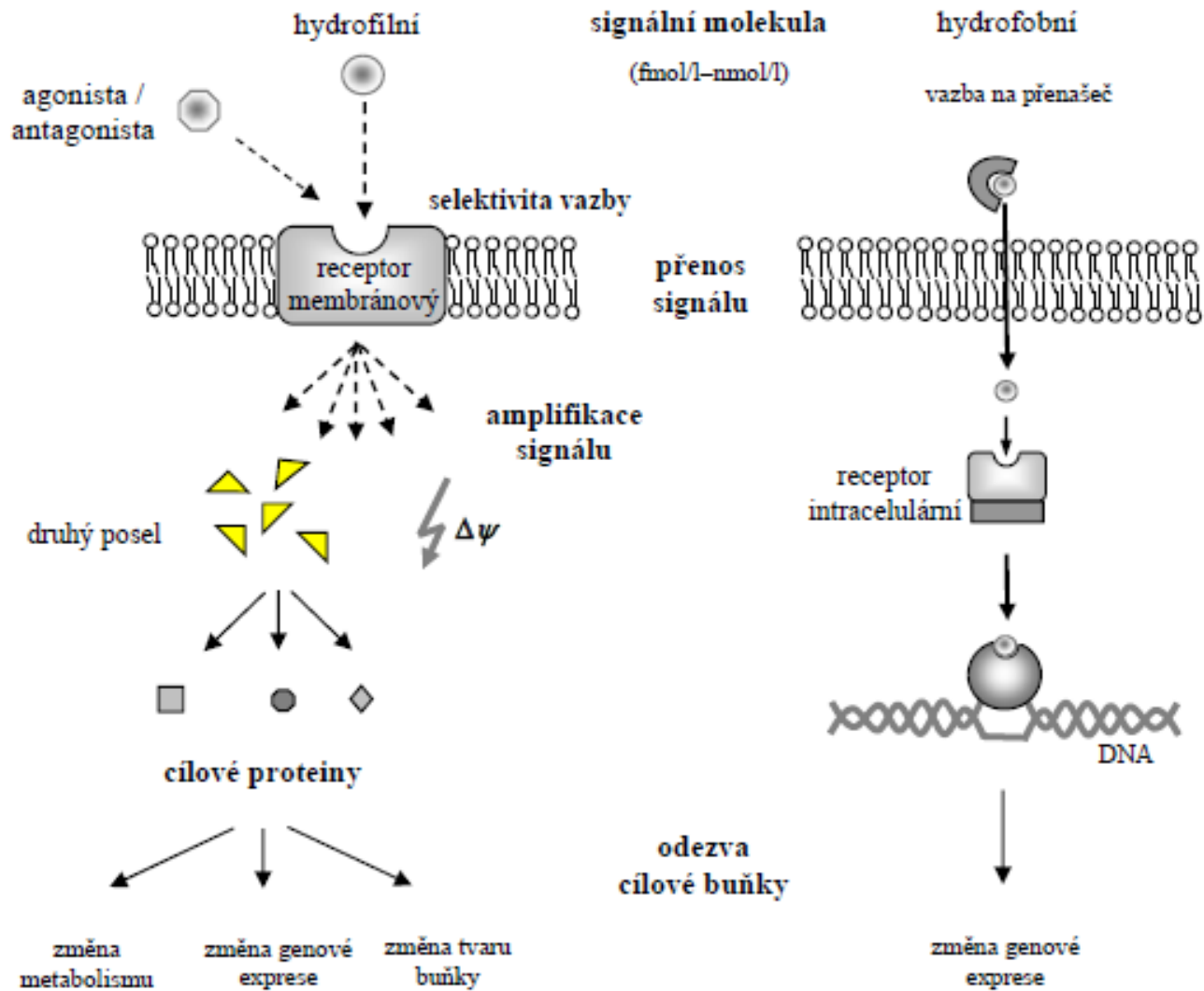


**Intracelulární receptor**

Interakce komplexu hormon- receptor  
s hormonsenzitivním elementem DNA

Biologická odpověď  
(účinek pomalejší)

## Schéma transdukce signálu



**HORMONY**  
 LÁTKY RŮZNÉ CHEMICKÉ POVAHY, S REGULAČNÍ FUNKCÍ VYTVÁŘENÉ V ORGÁNU NEBO ENDOKRINNÍ ŽLÁZE;  
 KRVÍ NEBO LYMFOU JSOU PŘENÁŠENY DO JINÉHO ORGÁNU V TĚLE, KDE SPECIFICKY OVLIVNŮJÍ ZVÝŠENÍ NEBO SNÍŽENÍ FUNKCE DANÉHO ORGÁNU.  
 HORMONY TVOŘÍ NEODDĚLITELNOU SOUČÁST TZV. NEUROHUMORÁLNÍ REGULACE ORGANISMU.

# Princip signalizace

## tvorba signálu

registrace signálu receptorem

na vnějším povrchu buňky

nebo v cytoplasmě/jádře

přenos signálu z receptoru k

efektorům uvnitř buňky

## TRANSDUKCE SIGNÁLU

efektorem může být

transkripční faktor, enzym,

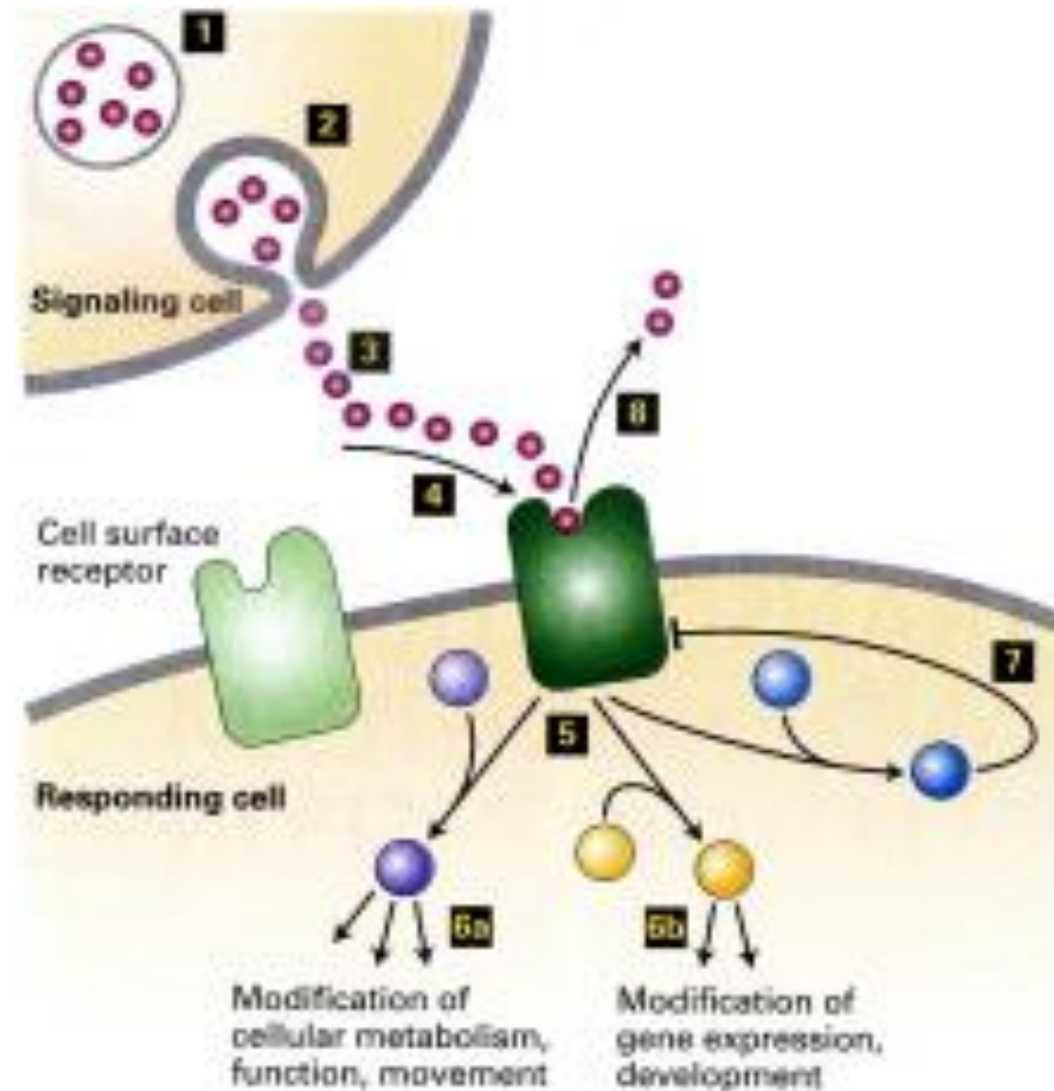
složka cytoskeletu, atd...

schopnost buňky reagovat na

podněty je geneticky určena -

spektrém receptorů, které je

schopna vytvořit



# Typy receptorů

Typ receptoru	Charakter ligandu	Charakteristika receptoru
Membránový	Velké signální molekuly (peptidy a proteiny) Malé, silně hydrofilní molekuly (aminokyseliny a jejich deriváty ad.)	Integrální membránové proteiny
Intracelulární	Menší hydrofobní molekuly (steroidy, deriváty vitamínu D <sub>3</sub> , retinoidy, thyroïdní hormony)	Proteiny v cytoplazmě nebo jádře

## Klasifikace signálních hormonů - podle solubility a lokalisace

1. **Malé lipofilní molekuly**, které difundují přes plasmatickou membránu a **interagují s intracelulárními receptory**
2. **Hydrofilní molekuly**, které se **váží na receptory na buněčném povrchu**
3. **Lipofilní molekuly**, které se **váží na receptory na buněčném povrchu**

## Chemická povaha signálů

proteiny

krátké peptidy

aminokyseliny

nukleotidy

steroidy

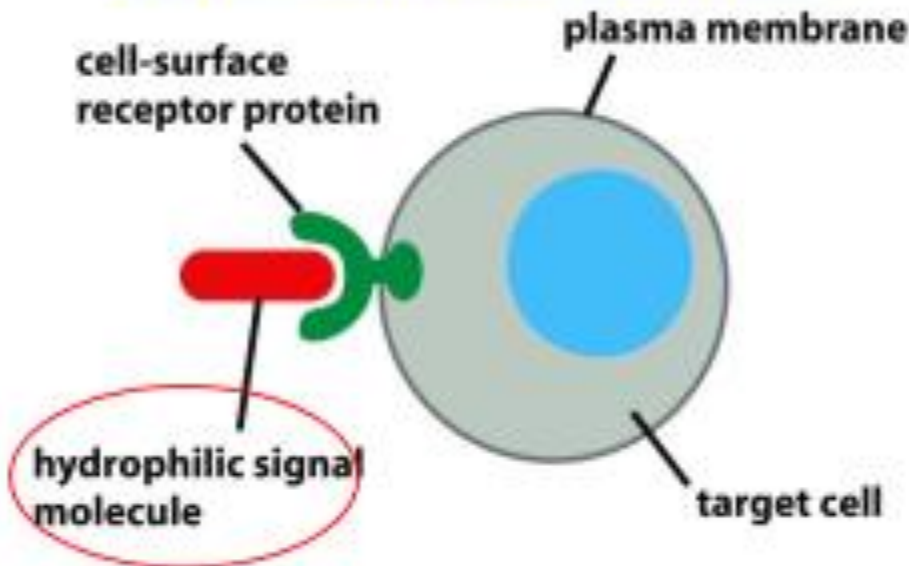
retinoidy

mastné kyseliny a jejich deriváty

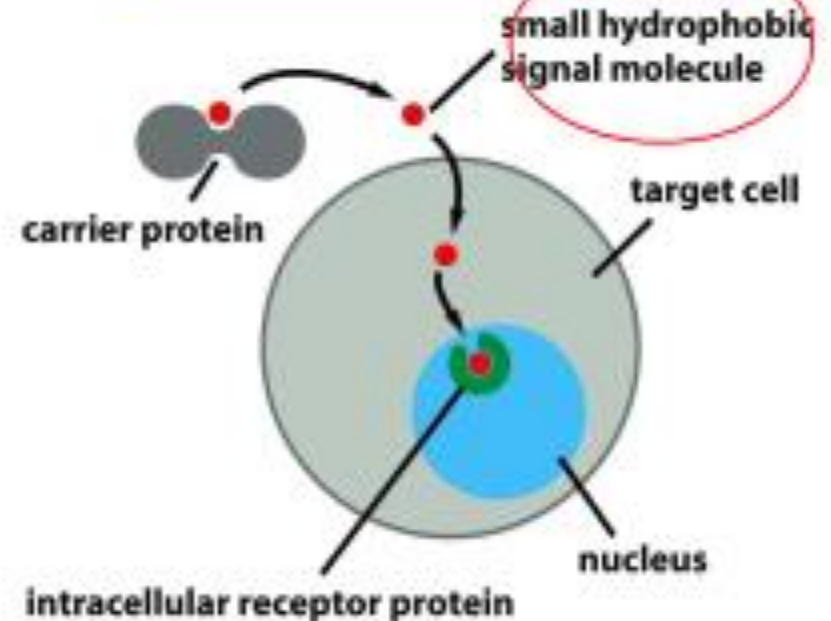
plyny

# O vstupu signální molekuly do buňky rozhoduje její rozpustnost

## CELL-SURFACE RECEPTORS



## INTRACELLULAR RECEPTORS



## 2,3 Hormony vážící se na povrchové receptory

### 2. Ve vodě rozpustné hormony

- nedifundují přes membrány,  
vazba na povrchový receptor

**a) peptidové hormony** (př.  
Insulin, růstové faktory, glucagon)  
velikost od několika AK až proteiny

**b) malé nabitě molekuly** (př.  
epinephrine, histamine)

- odvozené z aminokyselin;  
- fungují jako hormony a  
neurotransmitery,

- často indukují modifikaci aktivity jednoho či více enzymů, které v cílových buňkách už jsou,

- účinek hormonu je téměř okamžitý a obvykle netrvá dlouho,

- mohou navodit i změny genové exprese (trvají hodiny - dny), mohou vyvolat i ireversibilní změny

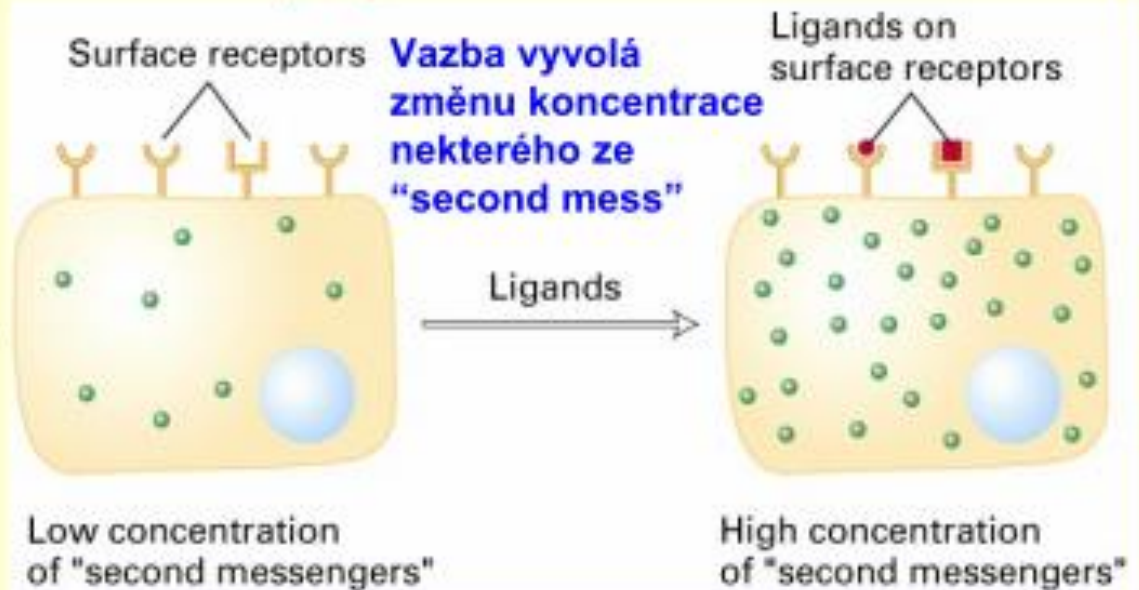
- buněčná diferenciac

- buňky, které produkují peptidové hormony - uskladnění v **sekretorických vesiklech pod plasmatickou membránou**

- stimulace buňky indukuje **exocytosu** peptidových hormonů do okolí buňky

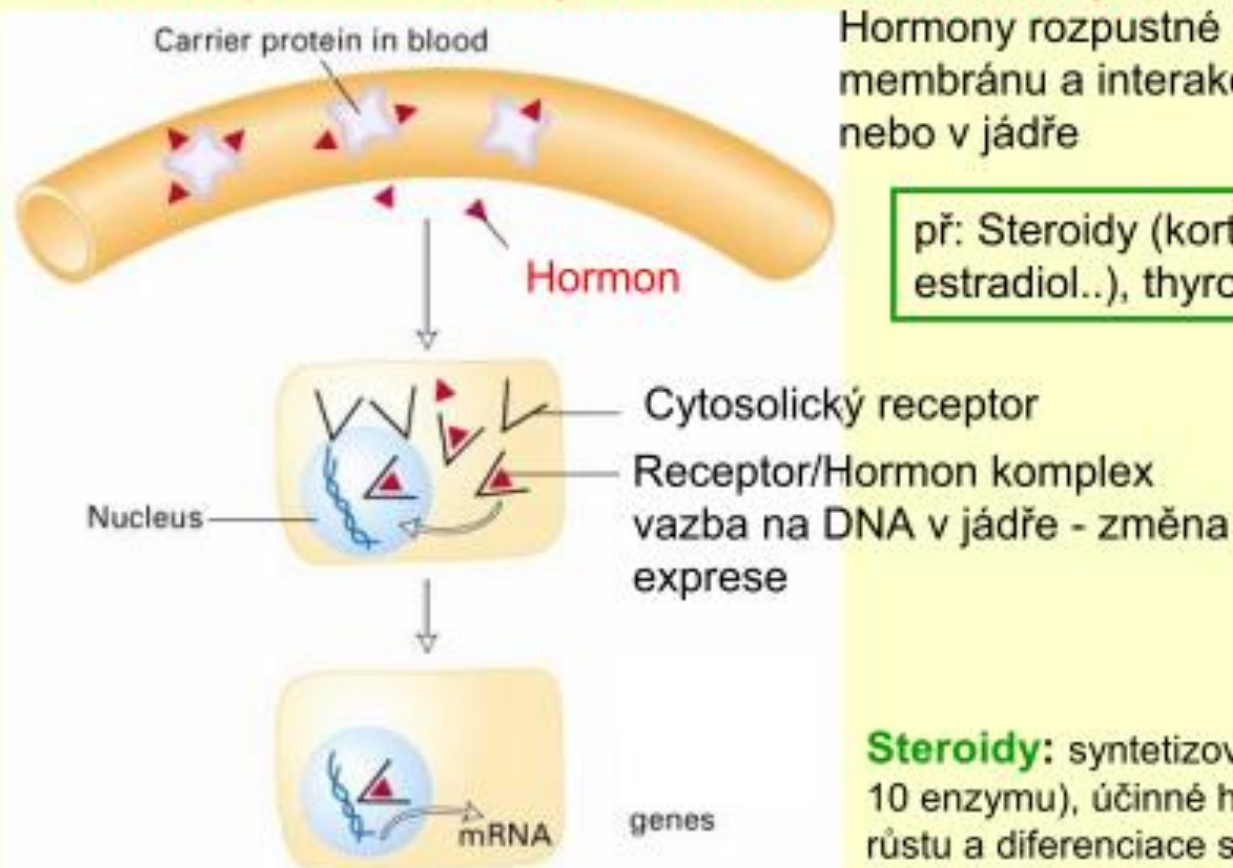
- uvolněné **peptidové hormony** persistují v krvi jen sekundy - minuty, pak jsou degradovány proteasami.

- **katecholaminy** (epinephrine, norepinephrine, dopamine) - rychle inaktivovány různými enzymy nebo "přijaty" specifickými buňkami





## 1. Malé lipofilní molekuly a intracelulární receptory



Hormony rozpustné v lipidech - difuze přes membránu a interakce s receptory v cytosolu nebo v jádře

př: Steroidy (kortisol, progesteron, estradiol..), thyroxine a k. retinová.

**Steroidy:** syntetizovány z cholesterolu (asi 10 enzymu), účinné hodiny - dny, ovlivnění růstu a diferenciacie specifických tkání,

- buňky produkující steroidní hormony - skladují malou zásobu prekursoru hormonu, ale nikoli maturovaný aktivní hormon.
- **po stimulaci konvertují prekursor na aktivní hormon**, který difunduje přes plasmatickou membránu do krve - **stimulace a uvolnění trvá hodiny ⇒ dny**
- tyto hormony špatně rozpustné ve vodě - jsou transportovány krví spolu s nosičovými proteiny, **nejsou rychle degradovány**
- **steroid / receptor komplexy** - regulace transkripce, efekt na stabilitu specifické mRNA

### 3. Lipofilní hormony

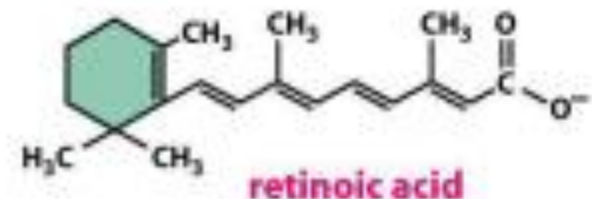
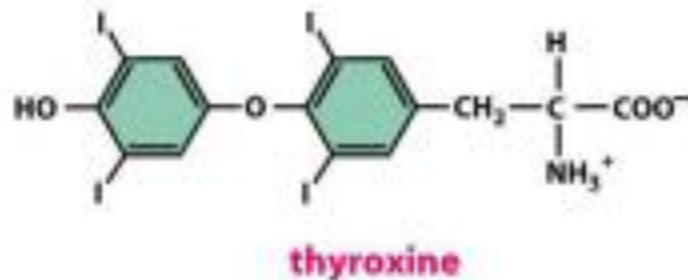
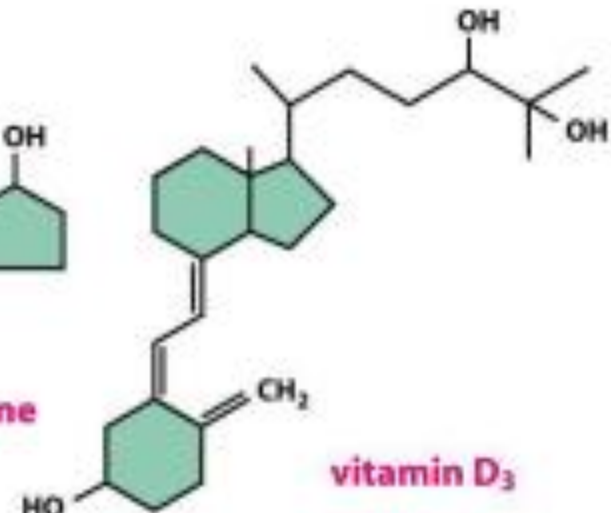
- **prostaglandiny** (~ 16 různých typu v 9 chemických skupinách - PGA - PGI)
- patří do skupiny tzv. **eicosanoidních** hormonů (20 C) syntetizovaných z prekursoru **arachidonátu** (arachidonic acid), vzniká z fosfolipidu a diacyl glycerolu
- parakrinní i autokrinní signalizace, modulace řady odpovědí

### **“Feedback” kontrola hladiny hormonu**

- pozitivní nebo negativní “feedback”
- změna hladiny jednoho hormonu ovlivní hladinu jiných hormonů

# Signalizace zprostředkovaná nitrobuňčnými receptory - ligandy

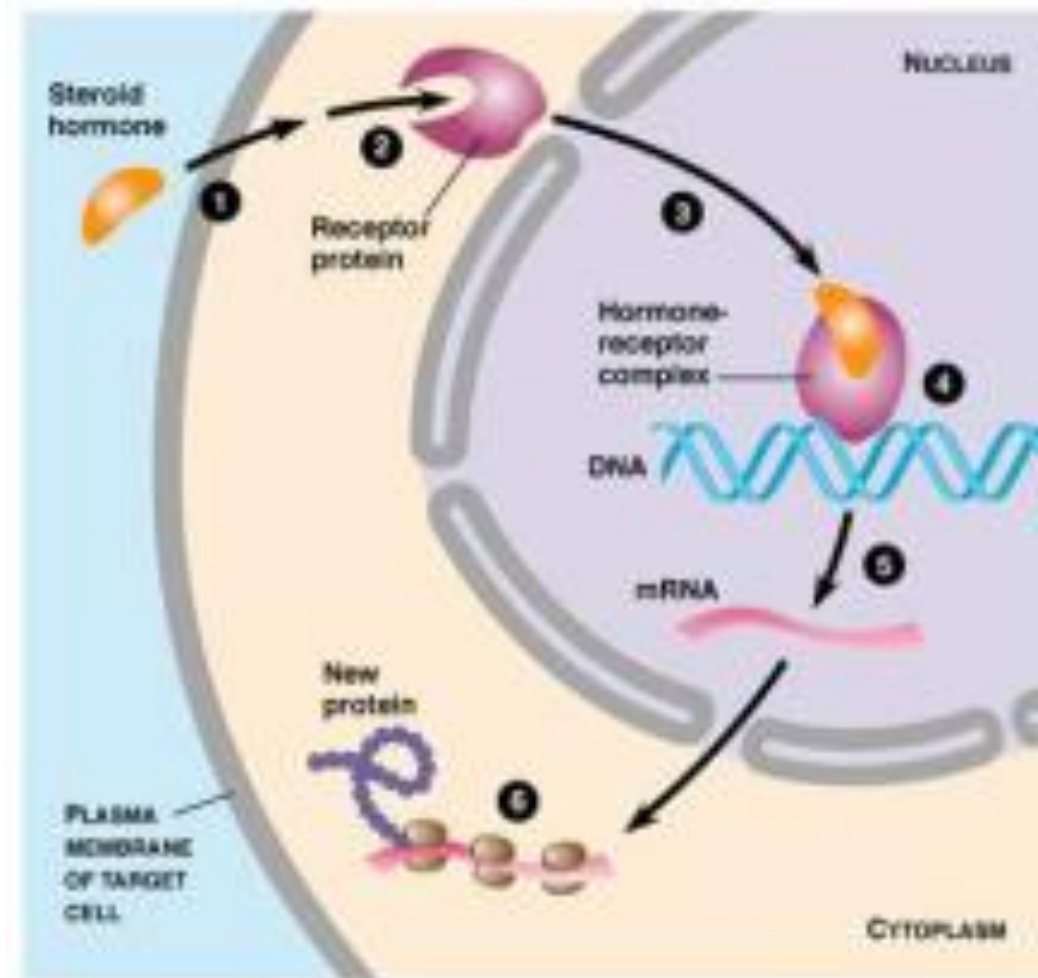
- typickými ligandy jsou **steroidní / tyroidní hormony**
- nízká molekulová hmotnost
- hydrofobní



# Signalizace zprostředkovaná nitrobuněčnými receptory

## Mechanismus účinku:

Malá velikost/lipofilní povaha hormonů - difúze membránou - pevná vazba na nitrobuněčné receptory - konformační změna receptorů - zvýšená afinita ke specifickým sekvencím DNA - regulace transkripce cílových genů

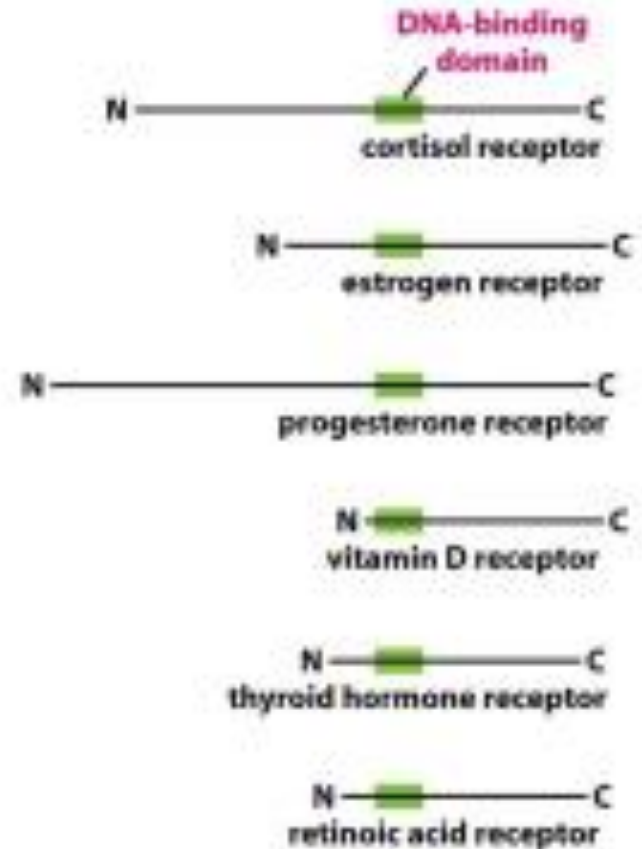
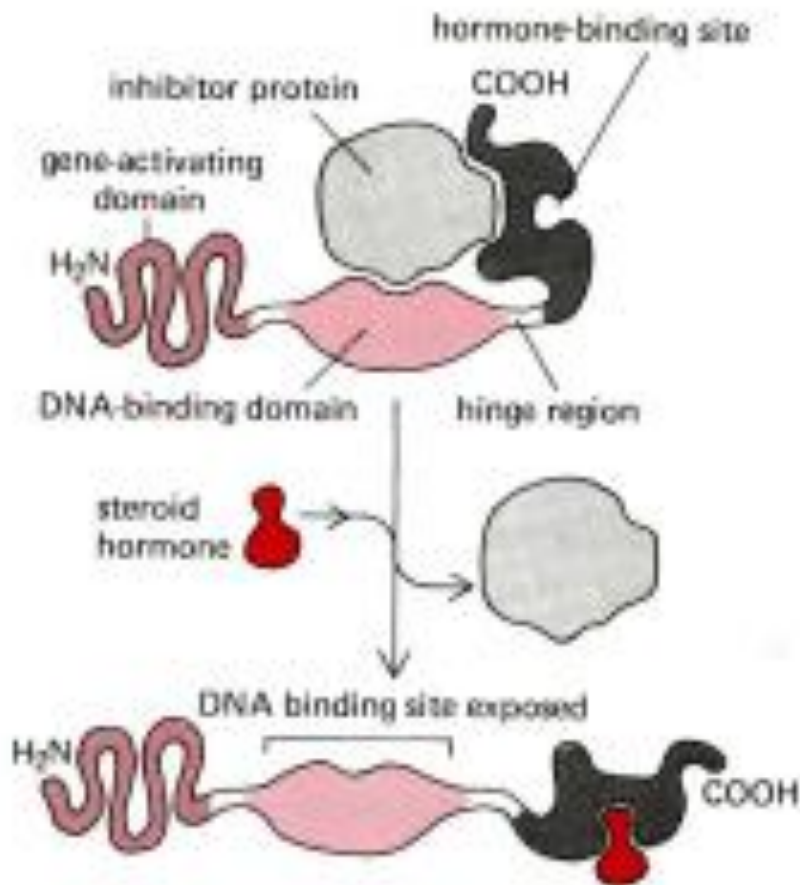


# Struktura nitrobuněčných receptorů

C-konec: doména pro vazbu hormonu

N-konec: doména pro řízení transkripce

Střed molekuly: doména pro vazbu DNA



# Intracelulární receptory

pro steroidní hormony, kalcitriol, jodované tyroniny a retinoáty

Receptory se nachází se v cytoplazmě nebo v jádře

Hormon-receptorové komplexy se vážou na specifická místa DNA a slouží jako transkripční faktory

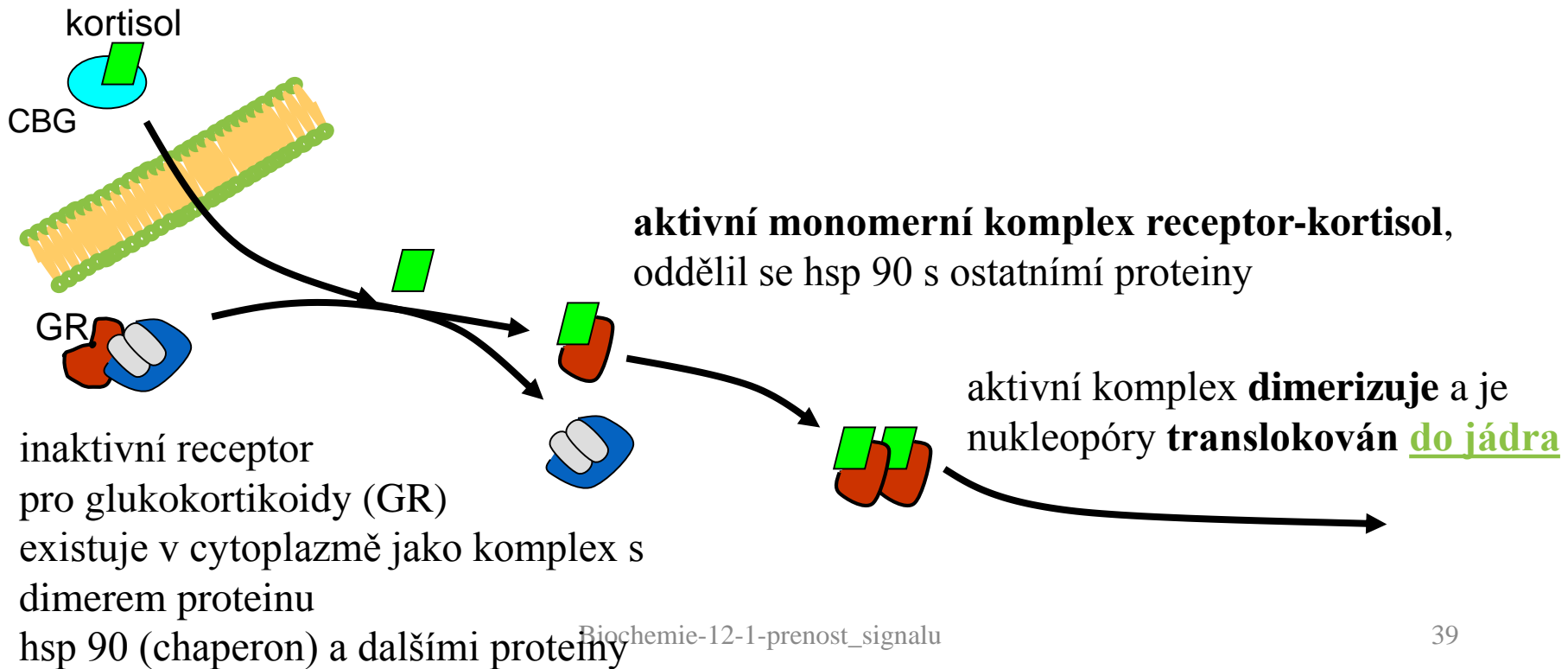
Komplex hormon-receptor se na DNA váže v místě HRE (hormon response element)

Superrodina steroidních a thyroïdních receptorů – rodina strukturně podobných proteinů.

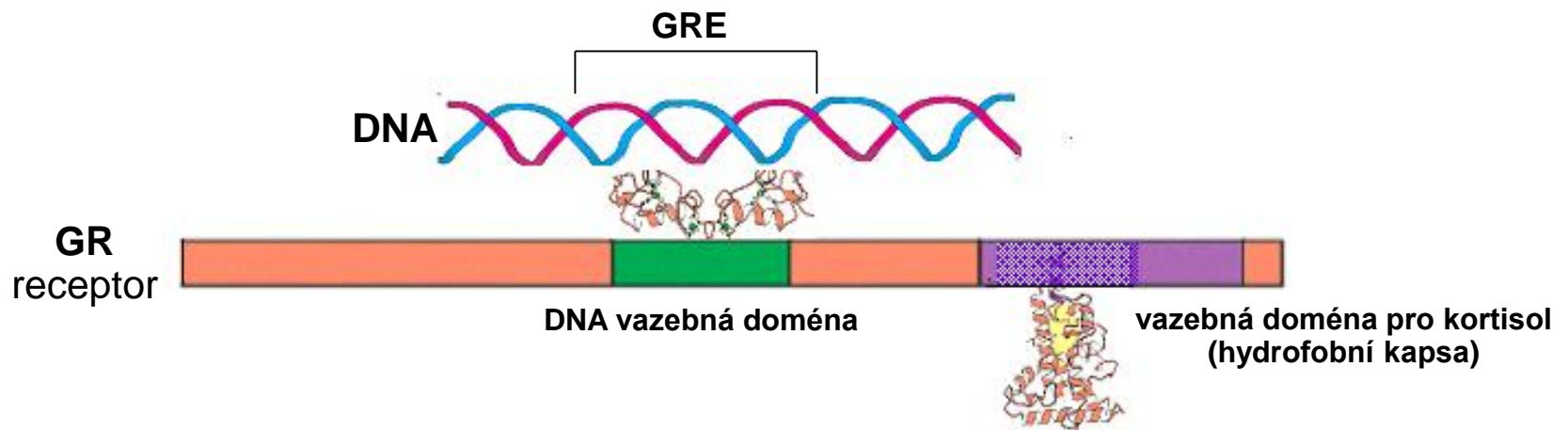
Aktivace transkripce je pomalejší proces, odezva má prodlevu

# Příklad kortisolu (glukokortikoidy GK, jejich receptory GR):

kortisol v extracelulárním prostoru přenášen CBG (corticosteroid-binding globulin)  
hydrofobní molekula hormonu proniká do buňky



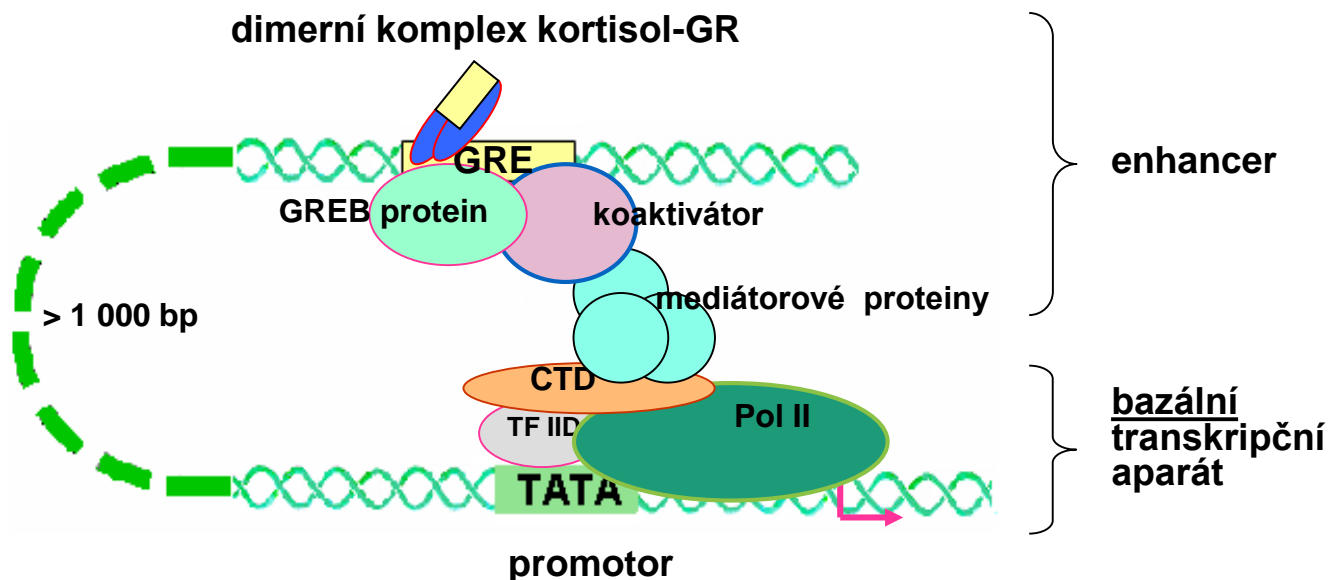
**Dimerní komplex kortisol-receptor se v jádře navazuje na dsDNA v místě specifické sekvence GRE (glucocorticoid response element), tj. na HRE (hormone response element) specifické pro glukokortikoidy.**





## Iniciace transkripce kortisolem

Aktivní komplex kortisol-receptor se **váže na DNA** v místě specifické sekvence **GRE** (glucocorticoid response element, jedné z mnoha HRE – hormone response elements). Samotný komplex hormon-receptor však vazby na DNA a ovlivnění transkripce není schopen. Připojuje se **koaktivátor** a specifické **GREB-proteiny** (glucocorticoid response element-binding proteins). Tento komplex se prostřednictvím **mediátorových proteinů** navazuje na bazální transkripční aparát na promotoru a iniciuje transkripci.



**GR dimer** – intracelulární receptor pro glukokortikoidy (dimer)

**GRE** – glucocorticoid response element

**GREB protein** – GRE binding protein (specifický transkripční faktor)

# II. Signalizace zprostředkovaná povrchovými membránovými receptory

TEST

1. Hydrofilní mimobuněčný signál (ligand, „primary messenger“):

růstový faktor, cytokin, hormon, atd.

2. Povrchový receptor:

převod mimobuněčného ligandu do podoby nitrobuněčného signálu

3. Sekundární přenašeč („secondary messenger“):

nízkomolekulární struktury (cAMP, Ca<sup>2+</sup>, diacylglycerol, zbytek kyseliny fosforečné, atd.)

produkt enzymově katalyzované reakce  
přenos signálu od povrchových receptorů k efektorům

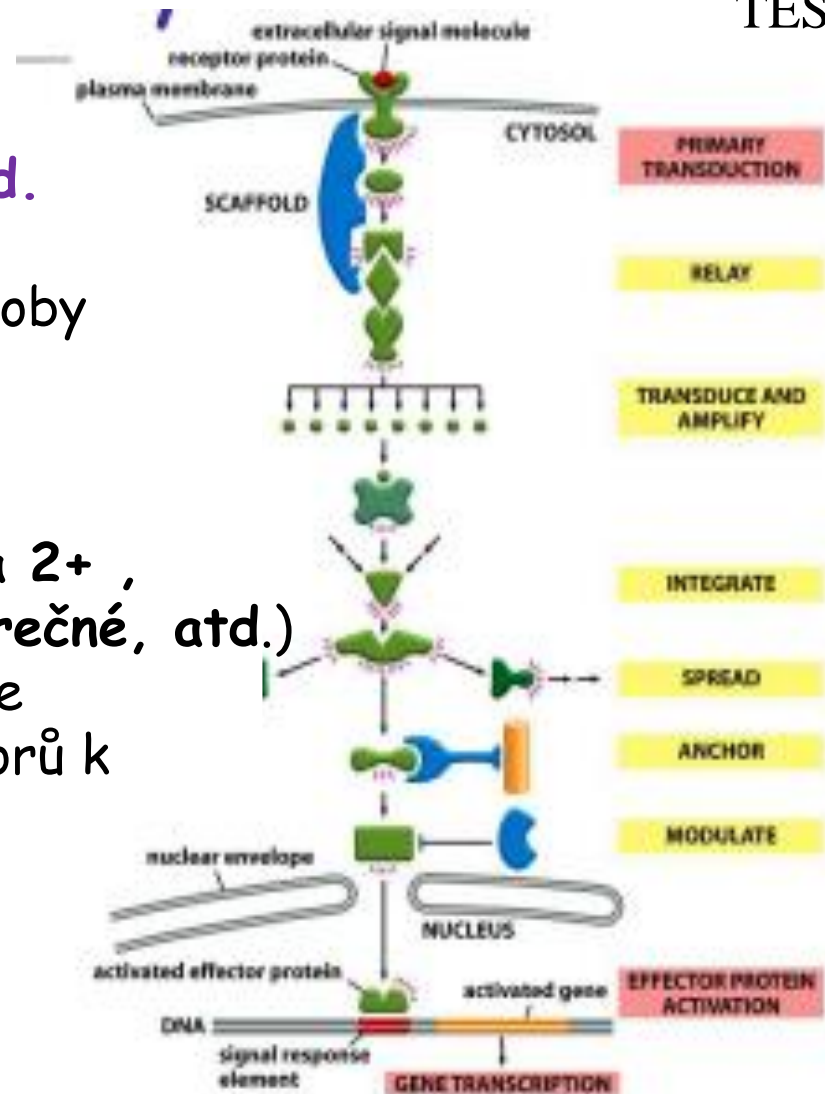
4. Cílová molekula (efektor):

enzym

ložka replikačního aparátu

ložka aparátu pro genovou expresi

ložka cytoskeletu



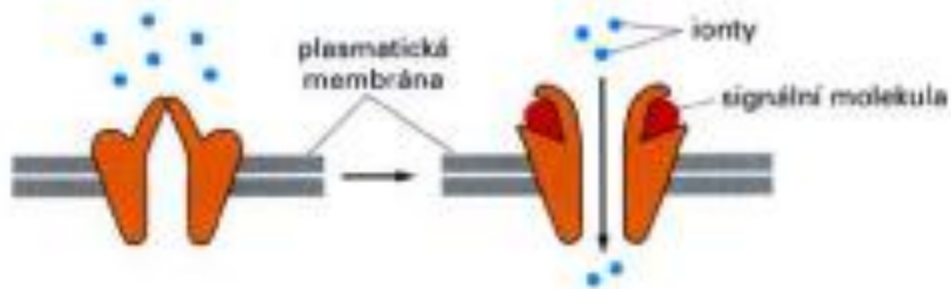
# Hlavní třídy povrchových membránových receptorů

a) spojené s iontových kanálem

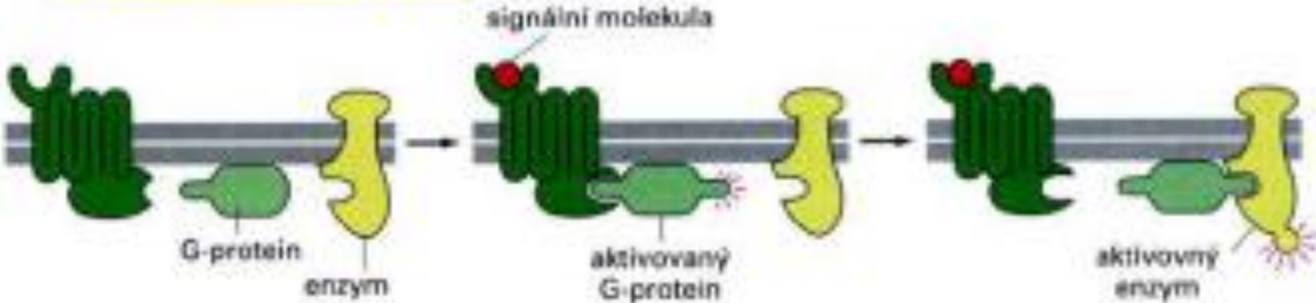
b) vázané s G-proteiny

c) vázané na enzym

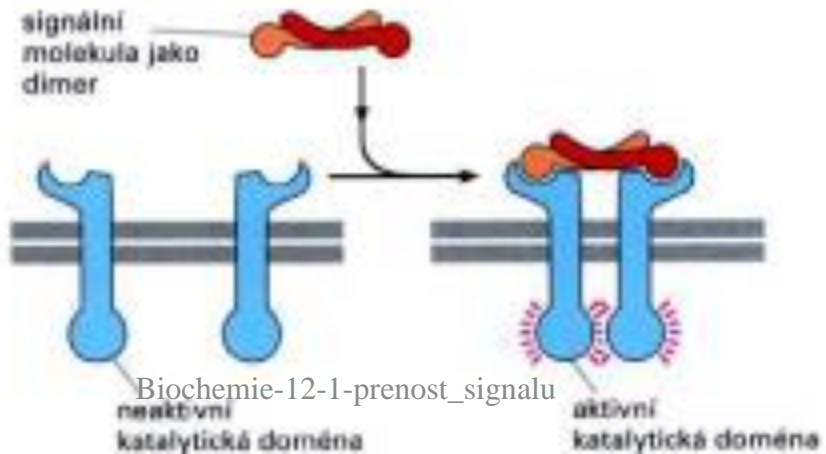
(A) receptory spojené s iontovým kanálem



(B) receptory vázané na G-protein



(C) receptory vázané na enzym



# Hlavní typy membránových/povrchových receptorů

**I. Receptory - iontové kanály** (ROC, ligand-gated channels) jsou pouze receptory pro některé neurotransmitery (iontové kanály ovládané neurotransmitery)

**II. Receptory interagující s G-proteiny** (heterotrimerními)

**III. Receptory vázané na enzym**

**IIIa. Receptory kooperující s nereceptorovými tyrosinkinázami**

(např. JAK) – receptory pro somatotropin (GrH), prolaktin, erythropoetin,

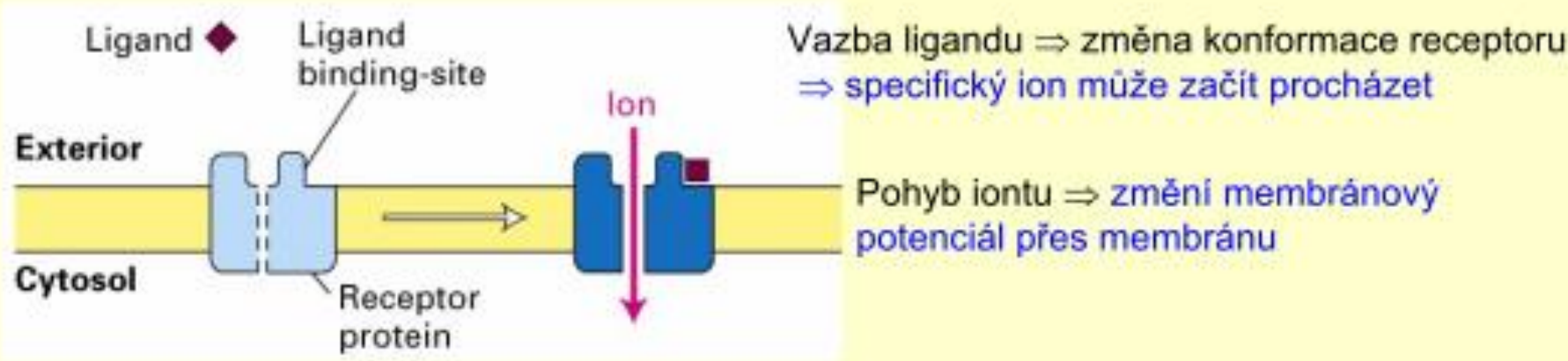
interferony, interleukiny a jiné cytokiny.

**IIIb. Receptory s vlastní katalytickou aktivitou**

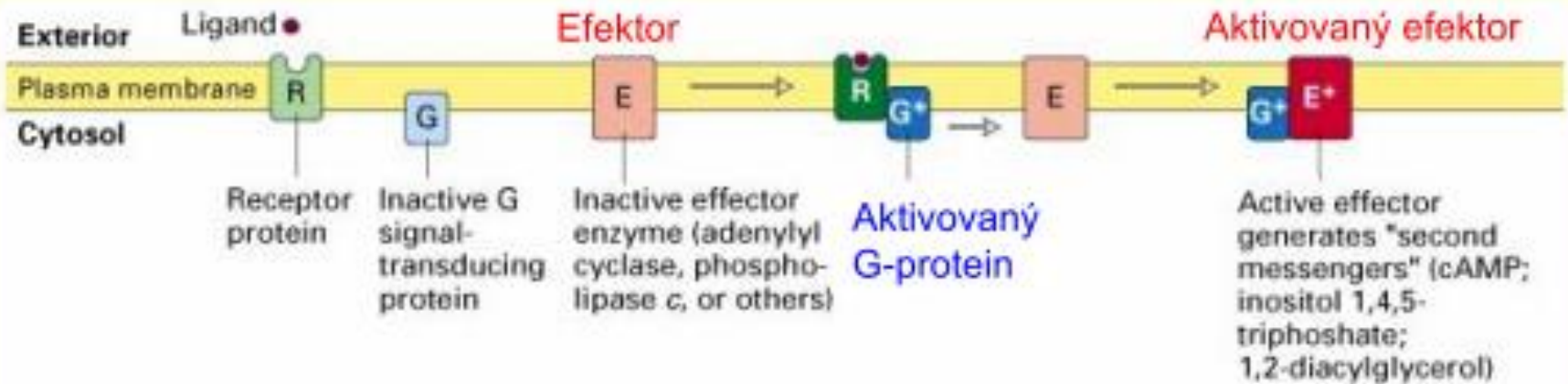
a) **guanylátcyklázovou**

b) **proteinkinázovou**

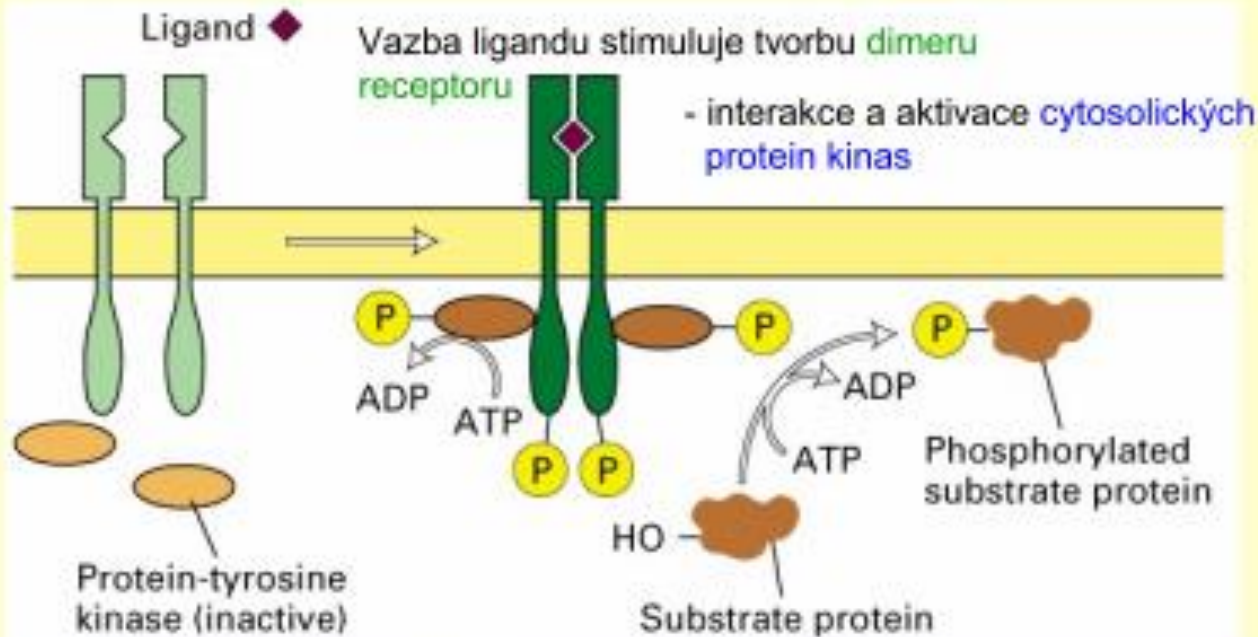
# I. Receptory - iontové kanály (acetylcholin) jsou pouze receptory pro některé neurotransmitery (iontové kanály ovládané neurotransmitery)



# II. Receptory interagující s G-proteiny (epinefrin, glukagon, serotonin)



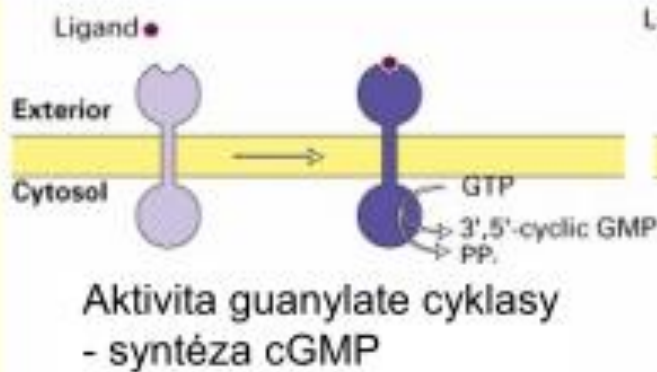
**3. Tyrosine-kinase linked receptors (erythropoietin, interferons) - cytokine-receptor superfamily**



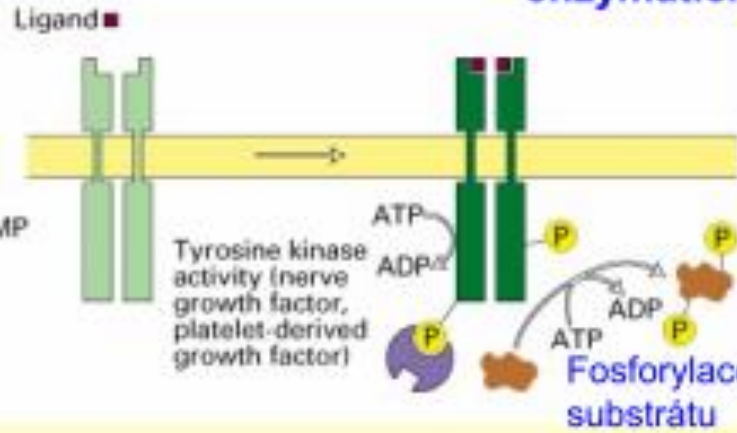
**Receptor nemá enzymatickou aktivitu**

**4. Receptory s vnitřní enzymatickou aktivitou**

**Vazba ligandu - stimuluje enzymatickou aktivitu receptoru**



- Protein-fosfatová aktivita



Protein kinasová aktivita (př. receptory pro insulin, růstové faktory) po dimerisaci vyvolané vazbou ligandu:

**Receptor-tyrosine kinases (RTKs)**

# Neurotransmitery (mediátory)

Komunikace mezi:

- nervovou buňkou a nervovou buňkou
- nervovou buňkou a svalem
- nervovou buňkou a tkání

se uskutečňuje na **synaptických spojích** (synapsích)  
pomocí neurotransmiterů

# Příklady neurotransmiterů

<b>Působení v:</b>	<b>Název</b>	<b>typ</b>	<b>Chemický typ</b>
CNS	glutamát	excitační	aminokyselina
	acetylcholin		Derivát AK
	dopamin		Derivát AK
	serotonin		Derivát AK
	histamin		Derivát AK
	aspartát		aminokyselina
	noradrenalin		Derivát AK
	GABA	inhibiční	Derivát AK
	glycin		aminokyselina
Periferní NS	acetylcholin	excitační	Derivát AK
	noradrenalin		Derivát AK



# Neurotransmitery

Známo více než 30 různých neurotransmiterů (**aminokyseliny**, **biogenní aminy** vzniklé jejich přeměnou, nebo nepříliš velké **peptidy**).

Příklady:

## v centrálním nervovém systému

inhibiční **GABA** (minim. 50 % všech synapsí)

**glycin** (převažuje v míše)

excitační **glutamát** (více než 10 %)

**acetylcholin** (kolem 10 %)

**dopamin** (kolem 1 %, ve striatu 15 %)

**serotonin**

histamin

aspartát

noradrenalin

(méně než 1 %, v hypotalamu 5 %)

adenosin

neuromodulační **endorfiny** a **enkefaliny**,

endozepiny, delta-spánek navozující peptid

ad.

## v periferní části systému

– eferentní neurony

excitační **acetylcholin**

**noradrenalin**

– aferentní primární senzorické

excitační glutamát

(A $\beta$  vlákna, hmatová)

substance P (peptid)

(C a A $\delta$  vlákna, nociceptivní)

# Nervový systém – přenos signálu pomocí neurotransmiterů

Integrace a přenos nervových podnětů prostřednictvím neuronů



**Dráždění nervové buňky** - elektricky, chemicky, mechanicky



nervový podnět (akční potenciál)



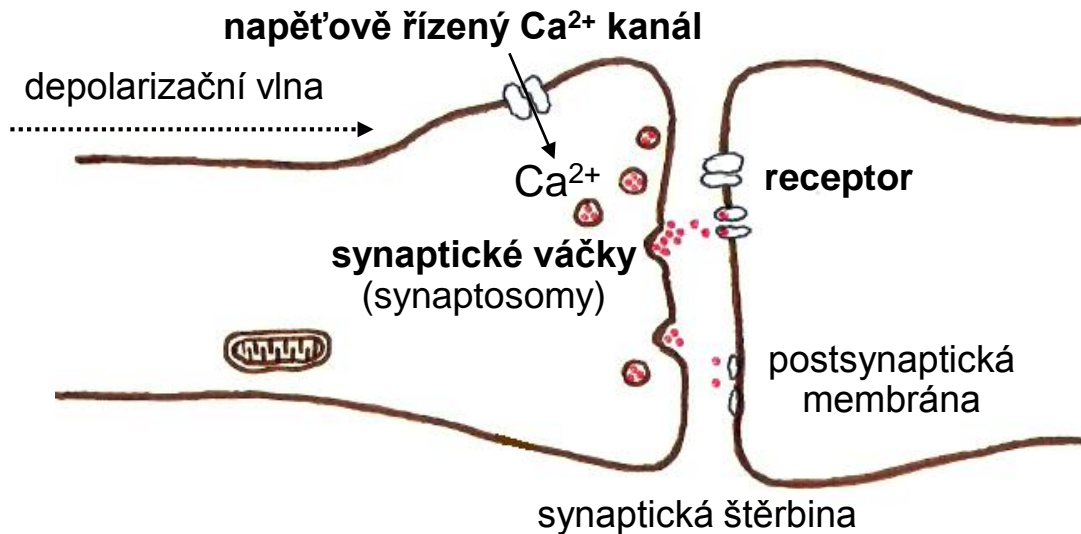
vedení signálu do nervového zakončení



uvolnění synaptického neurotransmiteru

# Synapse – obecné schéma

Neurotransmitery - **chemické signály**, umožňují převod nervového vzruchu mezi neurony nebo mezi neuronem a cílovou buňkou

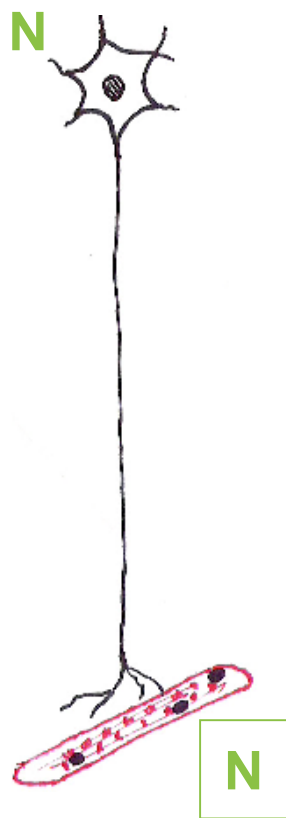


**Neurotransmitery se vážou na membránové receptory:**

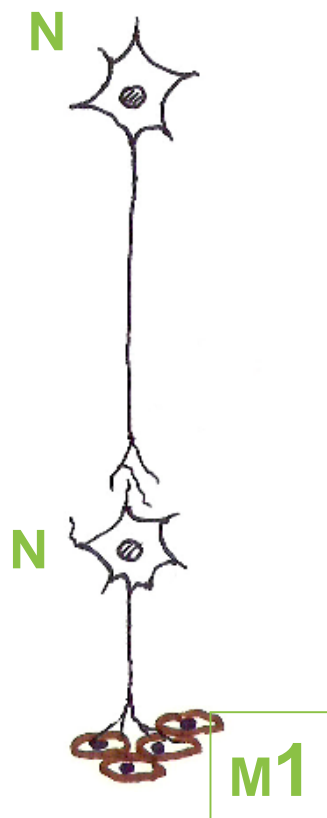
Dva typy receptorů:

- Neurotransmitter se váže k **iontovému kanálu (ionotropní receptor)** → elektrický signál (neuron – neuron, neuron – kosterní sval)
- Neurotransmitter se váže k **membránovému receptoru, který generuje druhého posla (metabotropní receptor)** → chemický signál (např. hladký sval)

# Acetylcholinové (cholinergní) receptory v periferních eferentních neuronech



Rhabdomyocyty  
(**kosterní svaly**)



**Parasympatikem**      **Sympatikem**  
inervované buňky cílových tkání



**N**-nikotinový  
**M**-muskarinový

Postgangliové neurony  
sympatické dráhy jsou  
téměř vždy **adrenergní**

**Adrenergní  
receptory**

# Sekvence dějů

- Po **navázání acetylcholinu** se receptor stává iontovým kanálem pro  $\text{Na}^+$
- $\text{Na}^+$  proudí dovnitř buňky
- buněčná **membrána se depolarizuje** – potenciál se stává kladnějším
- otevírají se **potenciálově závislé iontové kanály pro  $\text{Na}^+$**
- $\text{Na}^+$  proudí těmito kanály do buňky
- potenciál se přechodně mění ke kladným hodnotám (depolarizace)
- současně stoupá vodivost pro  $\text{K}^+$  v opačném směru (repolarizace)

# Membránové receptory neurotransmiterů

**Ionotropní receptory - ligandem řízené iontové kanály (ROC)**, např.

excitační **acetylcholinový nikotinový** - kanál pro  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,  
glutamátový (CNS, některé aferentní sensorické neurony) - kanál pro  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ ,  
inhibiční **receptor GABA A** (CNS) - kanál pro  $\text{Cl}^-$

**Metabotropní receptory aktivující G-proteiny**, např.

protein **G<sub>s</sub>** adrenergní  $\beta 1$  a  $\beta 2$ , receptor GABAB, dopaminový D1,  
protein **G<sub>i</sub>** adrenergní  $\alpha 2$ , dopaminový D3,  
acetylcholinový muskarinový M2 (otvírá též  $\text{K}^+$  kanál),  
protein **G<sub>q</sub>** acetylcholinový muskarinový M1, adrenergní  $\alpha 1$ .

# I. Receptory typu iontových kanálů

Receptory typu iontových kanálů se vyskytují na **synapsích**, jejich ligandy jsou **neurotransmitery**.

Signalizace pomocí těchto receptorů je velmi rychlá (řádově milisekundy), uplatňují se na spojeních nerv-nerv nebo nerv-sval.

Neurotransmitery jsou v klidovém stavu uchovávány ve vezikulách na zakončení axonu a po stimulaci se exocytózou uvolňují. Jejich difuze k receptorům probíhá rychle, protože se jedná o malé molekuly a pohybují se na krátkou vzdálenost. Afinita neurotransmiterů k receptorům je relativně nízká, což umožňuje rychlou disociaci, jakmile jejich koncentrace v synaptické štěrbině poklesne. Toto rychlé ukončení signálu je typické pro systémy vyžadující rychlou odpověď v cílové buňce.

Po navázání neurotransmiteru na receptor dojde k jeho konformační změně, která umožní pronikání iontů kanálkem ve struktuře proteinu. Tok iontů přes kanál mění membránový potenciál. Při influxu kationtů se membrána depolarizuje a dochází k excitaci, při influxu aniontů se membrána hyperpolarizuje, dochází k inhibici přenosu nervového vzruchu.

## Typy iontových kanálů

Excitační	Inhibiční
Acetylcholinový, nikotinového typu ( $\text{Na}^+$ )	GABA <sub>A</sub> ( $\text{Cl}^-$ )
L-Glutamátový a L-aspartátový ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ )	Glycinový ( $\text{Cl}^-$ )**
L-Glutamátový NMDA* ( $\text{Ca}^{2+}$ , vysoce propustný)	

\*agonista N-methyl-D-aspartát;

\*\*tetanus toxin inhibuje uvolňování Gly z presynaptických zakončení, strychnin působí jako blokátor glycinového kanálu

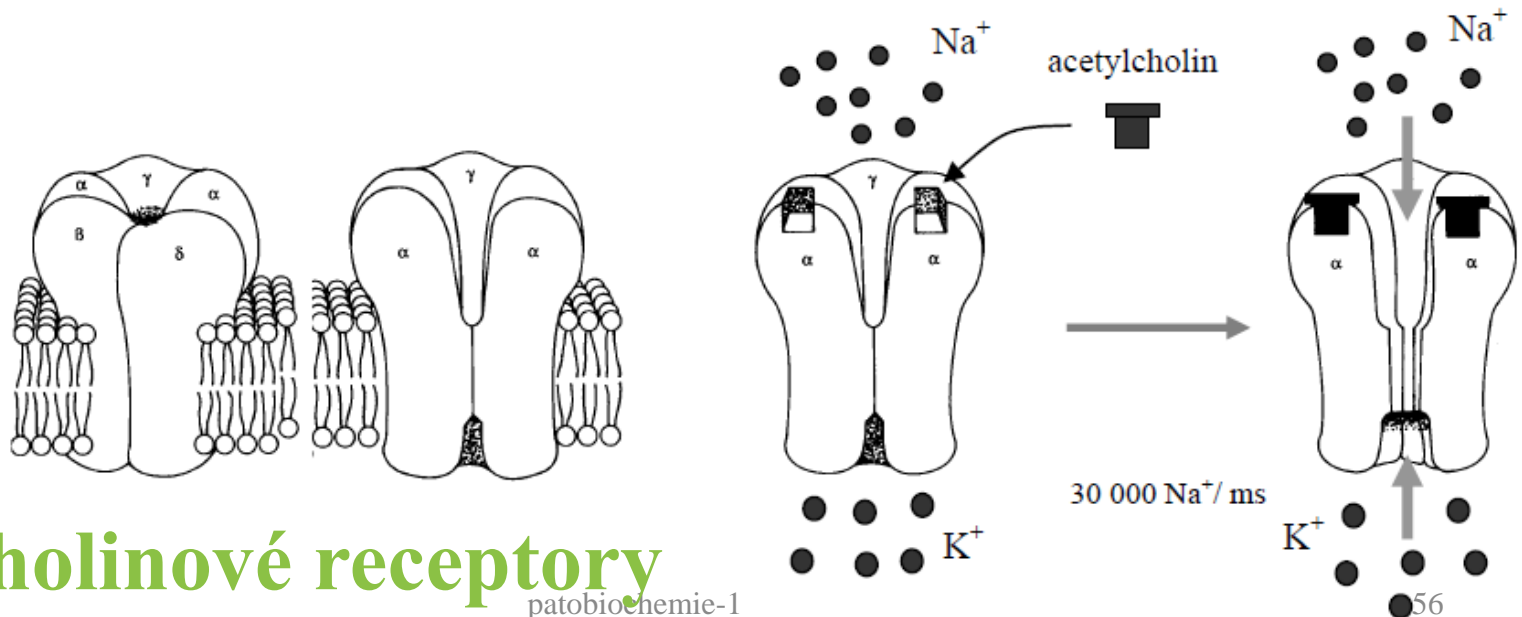
# Receptory hlavních neurotransmiterů

Vyskytuje se **na nervosvalovém spojení kosterního svalu a v dendritech téměř všech periferních eferentních neuronů**. Skládá se z pěti podjednotek (2 $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$  a  $\epsilon$ ) penetrujících membránou.

Acetylcholin je syntetizován v presynaptické oblasti neuronu z acetyl-CoA a cholinu a před uvolněním je skladován ve vezikulách uložených v blízkosti aktivní zóny presynaptické membrány. Membrána má rovněž napěťově řízené Ca<sup>2+</sup>-kanály, které se otevírají, jakmile se na membránu rozšíří akční potenciál. Zvýšená hladina Ca<sup>2+</sup> v zakončení neuronu aktivuje Ca<sup>+</sup>-dependentní proteinkinasu, která fosforyluje synapsin a jiné proteiny, čímž vyvolá fúzi vezikul s plazmatickou presynaptickou membránou a uvolnění acetylcholinu do synaptické štěrbině. **Acetylcholin se váže ke dvěma podjednotkám a, jeho vazba vyvolá změnu konformace a krátkodobý influx sodných iontů do buňky a draselných ven z buňky.**

To způsobí depolarizaci postsynaptické membrány a je-li dosaženo prahové hodnoty, otevírají se potenciálově závislé kanály pro Na<sup>+</sup> a vzniká **akční potenciál**.

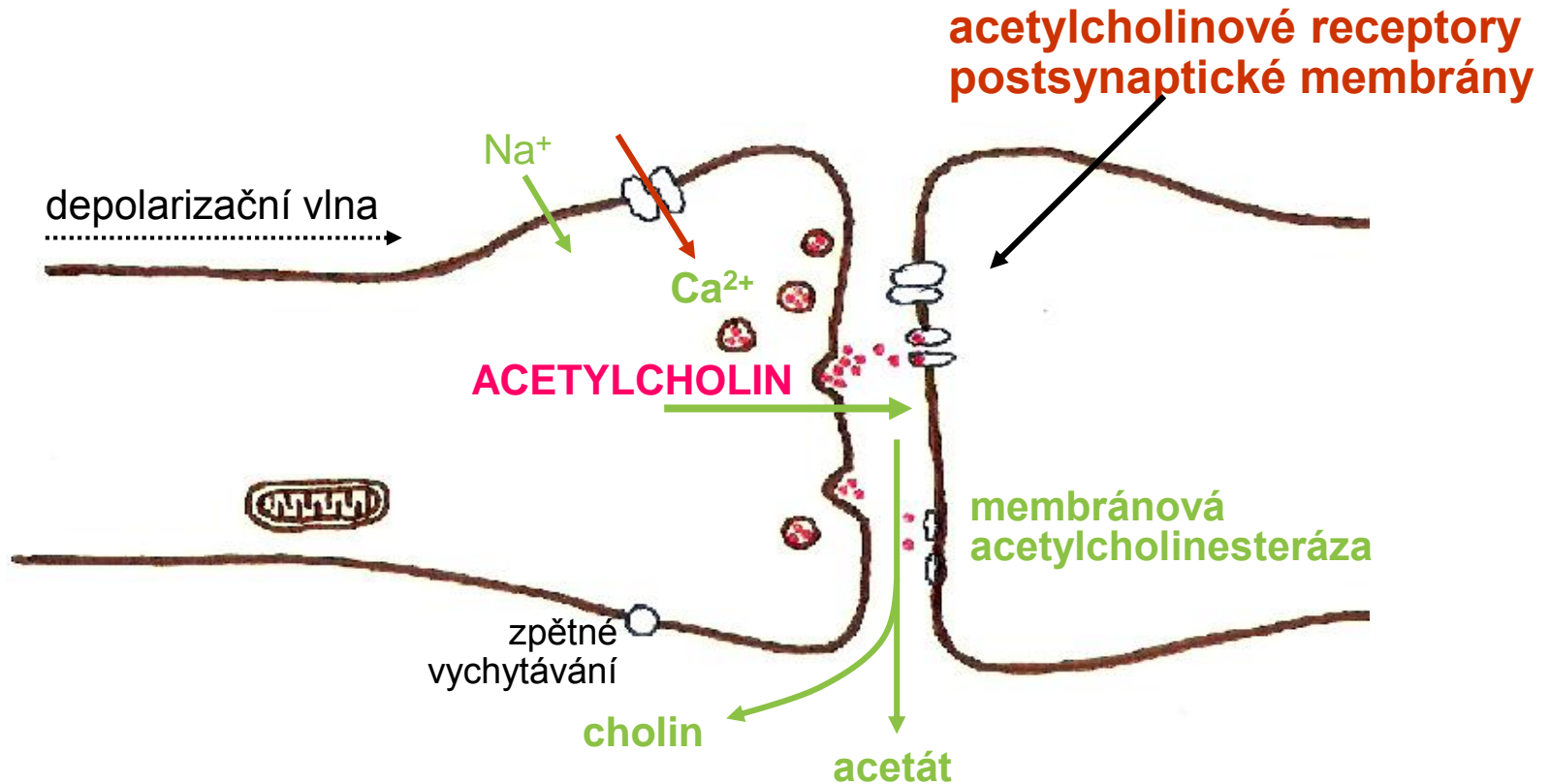
Jakmile sekrece acetylcholinu ustane, jeho koncentrace ve štěrbině poklesne a přestane se vázat na receptory. Acetylcholin je rozložen účinkem **acetylcholinesterasy**, která je vázána na povrchu postsynaptické membrány.



**Acetylcholinové receptory**  
patobiochemie-1



# Cholinergní synapse (mediátor je acetylcholin)



V nervosvalové ploténce jeden nervový vzruch uvolní přibližně 300 váčků, v jednom je asi 40 000 molekul acetylcholinu; koncentrace acetylcholinu v synaptické šterbině vzrůstá až 10 000x. Mediátor je rychle hydrolyzován acetylcholinesterázou.

# Acetylcholinové receptory

**nikotinové a muskarinové.**

## Nikotinové cholinergní receptory

jsou acetylcholinem řízené **kanály pro  $\text{Na}^+/\text{K}^+$**  :

v periferní části nervového systému se nacházejí

- v dendritech téměř všech periferních eferentních neuronů  
(včetně adrenergních), a
- v sarkolemmě buněk kosterních svalů, v nervosvalové ploténce.

## Muskarinové cholinergní receptory

M1-M5

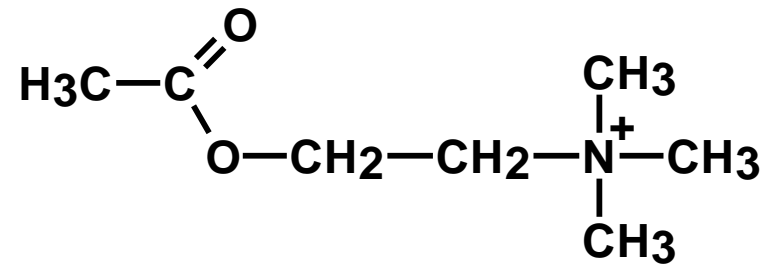
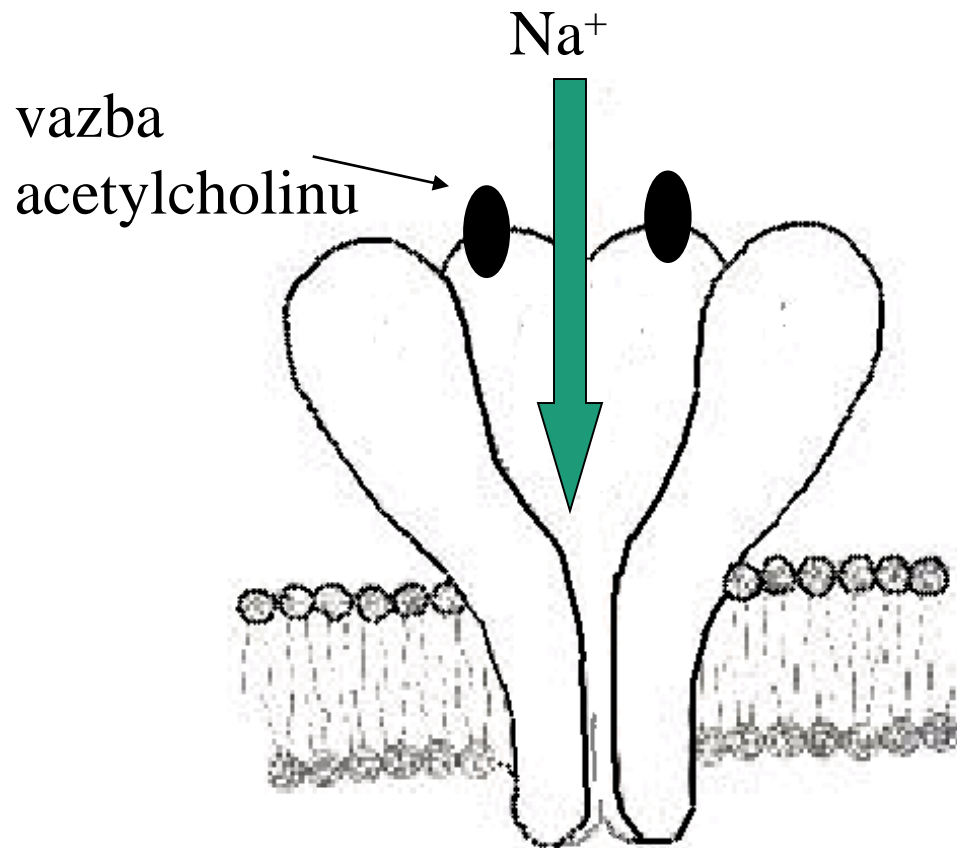
Metabotropní, působí přes G-proteiny (viz dále)

# Receptory hlavních neurotransmiterů

## Acetylcholinové receptory

Receptor	Nikotinový	Muskarinové	
		M <sub>1</sub> , M <sub>3</sub>	M <sub>2</sub>
Mechanismus účinku	Iontový kanál	G <sub>q</sub>	G <sub>i</sub>
Druhý posel		DG + IP <sub>3</sub>	cAMP
Výskyt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• neurony autonomních ganglií,</li> <li>• nervosvalová ploténka,</li> <li>• chromafinní buňky dřeně nadledvin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mozek,</li> <li>• hladký sval,</li> <li>• žlazové buňky</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• myokard,</li> <li>• mozek</li> </ul>
Blok receptoru	tubokurarin	atropin	

# Acetylcholinový receptor nikotinového typu – ionotropní receptor

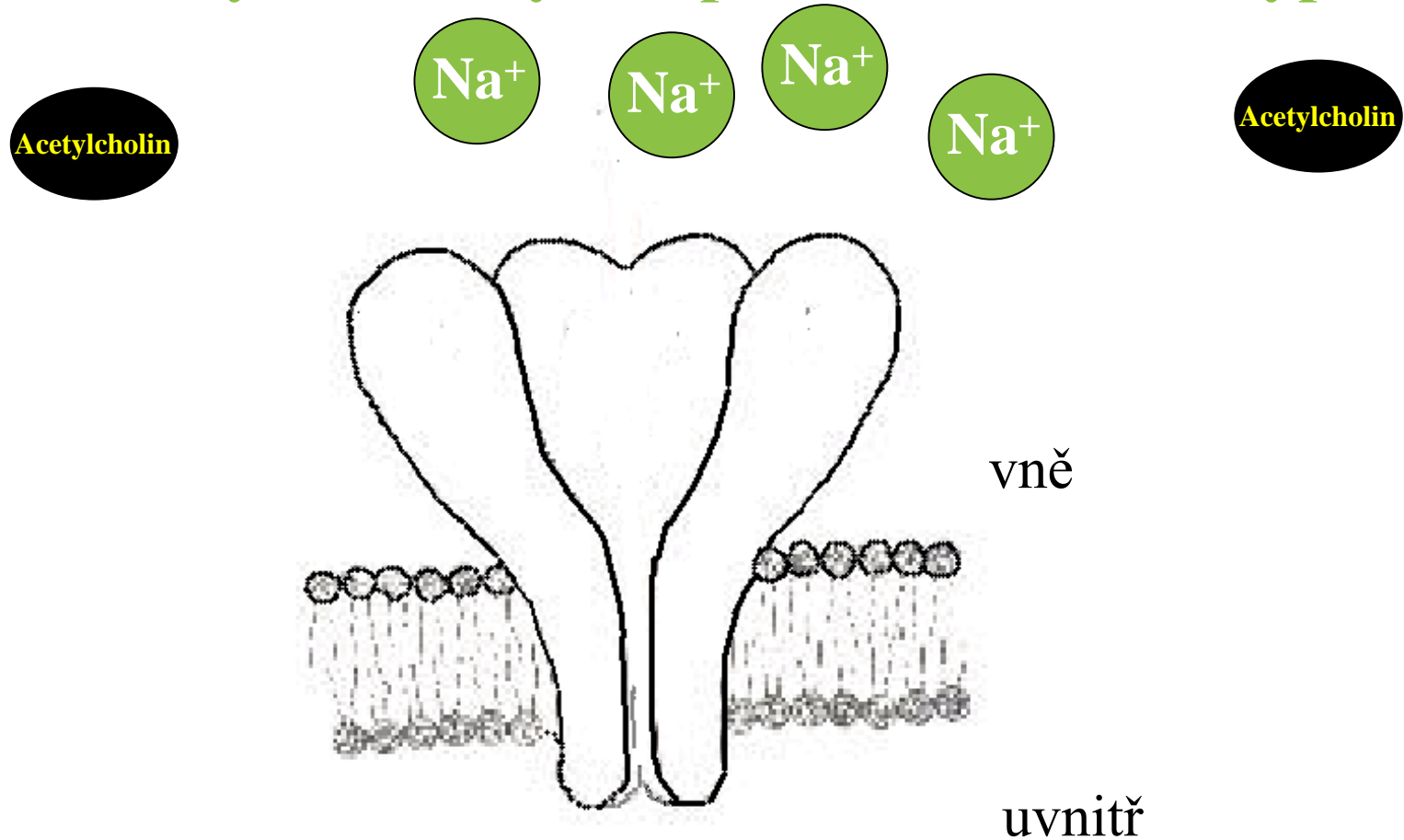


acetylcholin

**TEST**

Výskyt: např. neuromotorická ploténka v buňkách kosterního svalu, zakončení pregangliových neuronů.

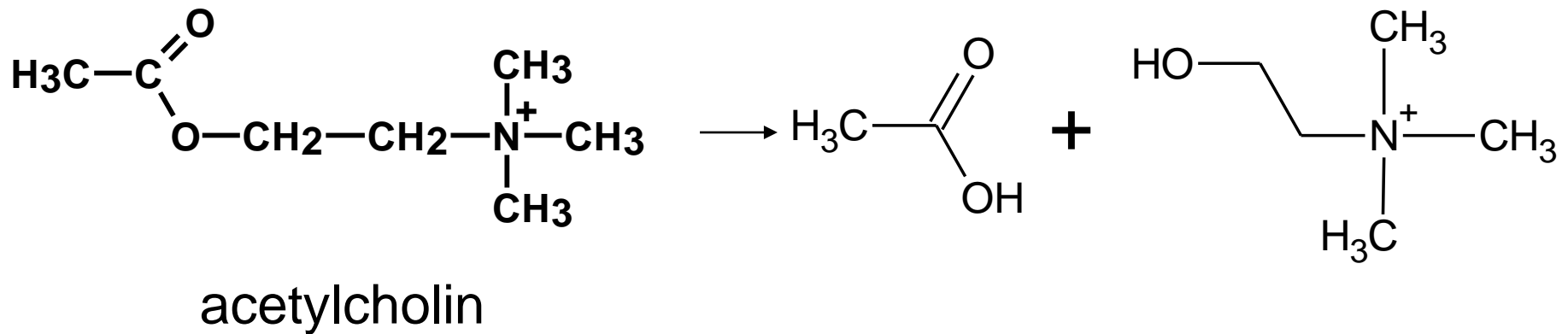
# Acetylcholinový receptor nikotinového typu



- navázání ligandu na receptor otevře kanál pro Na<sup>+</sup> ionty
- Na<sup>+</sup> proudí kanálem po koncentračním spádu

# Degradace acetylcholinu

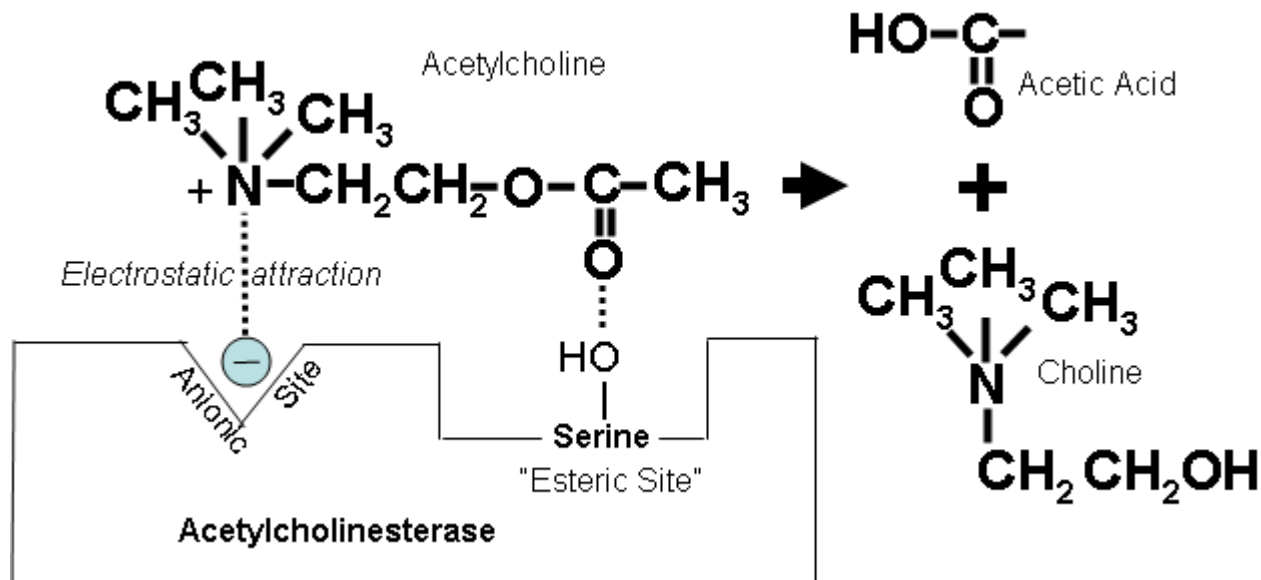
- krátce po navázání na receptor je acetylcholin odbourán
- enzym *acetylcholinesterasa* jej štěpí na cholin a kyselinu octovou



TEST

# Acetylcholinesterasa

- Hydrolýza acetylcholinu na acetát a cholin
- Je serinovou hydrolázou



# Inhibitory acetylcholinesterasy

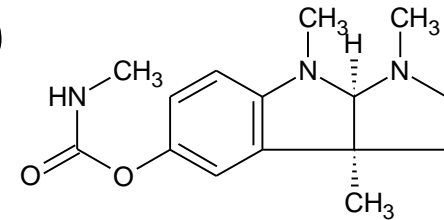
- prodlužují účinek acetylcholinu

**irreversibilní (nevratné)** inhibitory - organofosfáty -  
insekticidy, herbicidy, bojové chemické látky  
*organofosfáty (diisopropylfluorofosfát, soman, sarin)*

**reversibilní (vratné)** inhibitory

používají se jako léčiva- např. při *myastenia gravis*  
(*autoimunitní onemocnění - protilátky*)

karbamáty - (*fyzostigmin, rivastigmin, neostigmin*)



fyzostigmin

**botulotoxin** (*Clostridium botulinum*) inhibuje uvolnění  
acetylcholinu



# Myastenia gravis

Při chorobě *myastenia gravis* produkují T- a B-lymfocyty protilátky proti acetylcholinovým receptorům v kosterním svalu. Protilátky se váží na receptor za vzniku komplexů receptor-protilátka.

Komplexy jsou endocytózou odstraněny z membrány a degradovány v lysosomech. V důsledku toho je funkčnost receptorů reagovat s acetylcholinem snížena. Podávání inhibitorů acetylcholinesterasy napomáhá zvýšit účinky acetylcholinu na buňky s omezeným počtem receptorů.

- T- a B-lymfocyty produkují protilátky proti acetylcholinovým receptorům v kosterním svalu
- Protilátky se vážou na receptor (komplex receptor-protilátka)
- Následuje endocytóza a degradace v lysosomech



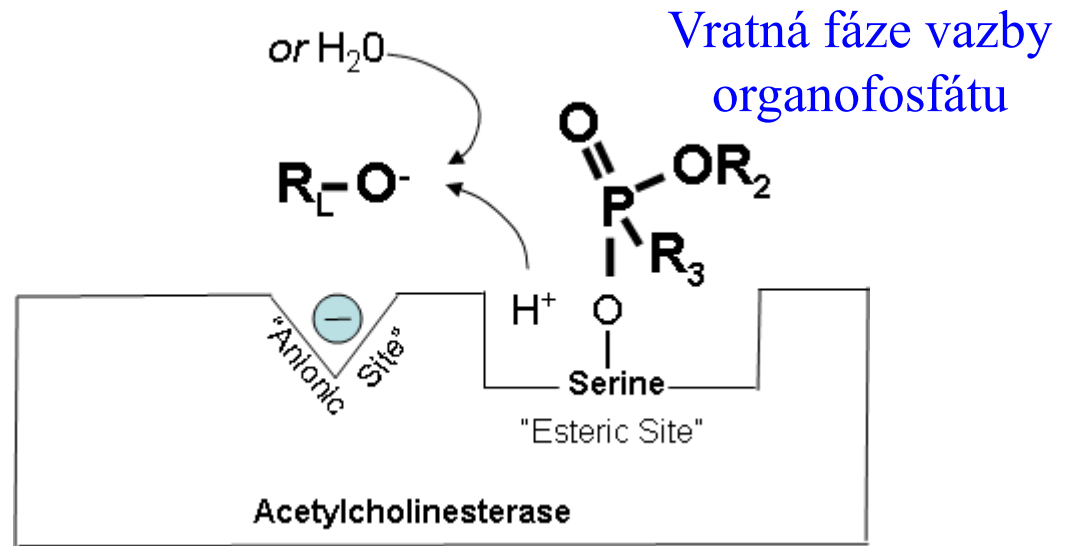
Funkčnost receptorů reagovat s acetylcholinem je  
snížena → svalová slabost

Podávání inhibitorů acetylcholinesterasy

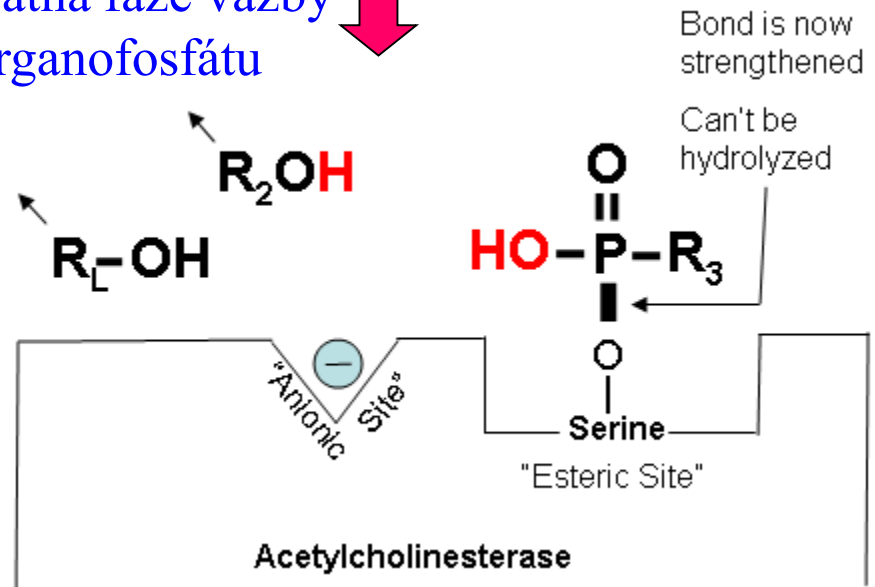
Vazba toxických **organofosfátů** na cholinesterasu probíhá ve dvou fázích:

**reversibilní** ( lze ji ovlivnit reaktivátory)

ireversibilní - vznik kovalentní vazby mezi organofosfátem a enzymem

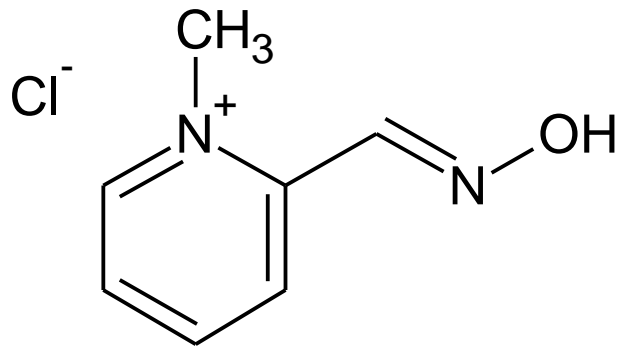


Nevratná fáze vazby organofosfátu

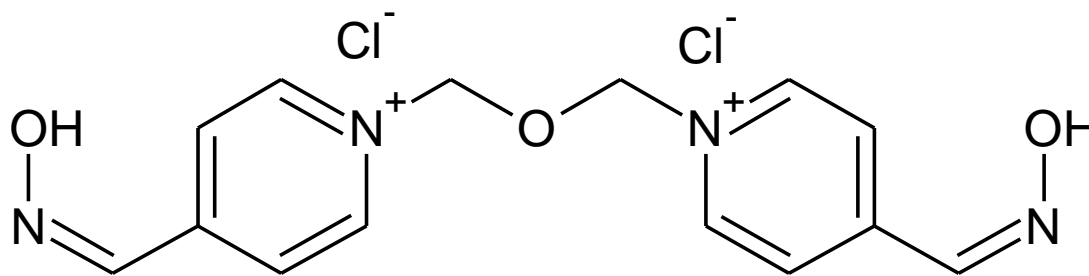


# Reaktivátory acetylcholinesterasy

oximy s pyridinovým heterocyklem

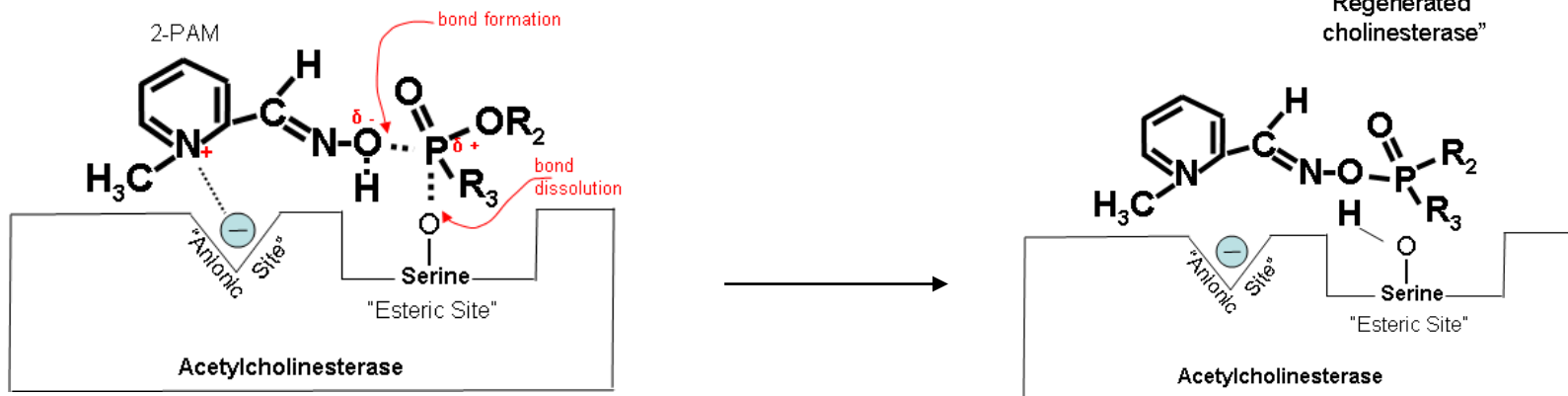


pralidoxim



obidoxim

# Jak reaktivátory fungují



Regenerace acetylcholinesterasy

# Působky reagující s acetylcholinovým receptorem nikotinového typu

**D-Tubokurarin - kompetitivní antagonist** acetylcholinu, zabraňuje otevření ionoforu (depolarizace nenastává) → paralýza kosterních svalů  
pankuronium, vekuronium ad. – myorelaxancia při déle trvajících operacích

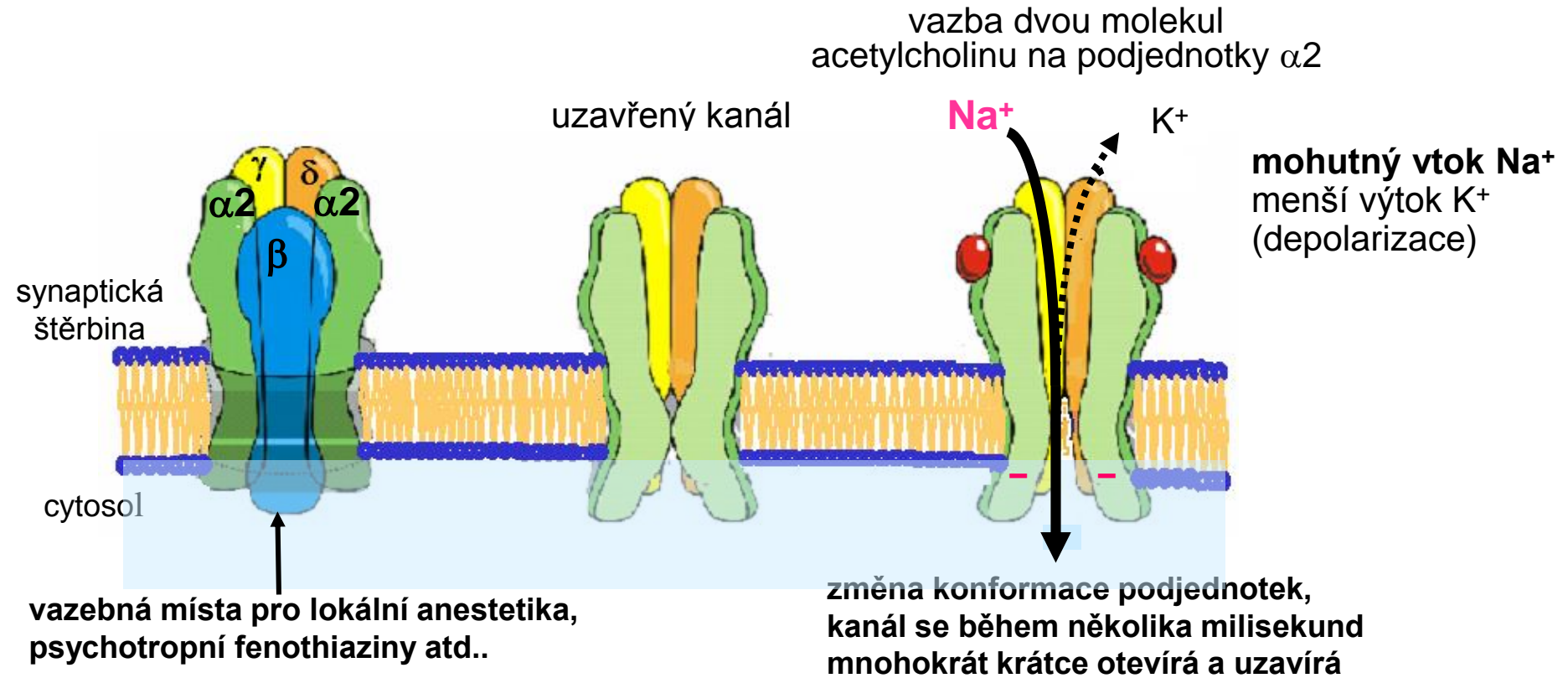
**Sukcynylcholin - agonista**, váže se déle než acetylcholin a depolarizuje. Přetrvávající depolarizace vede ke ztrátě elektrické dráždivosti membrány. Krátkodobé myorelaxans.

**Botulotoxin** – proteinový komplex z *Clostridium botulinum*. Inhibuje uvolnění acetylcholinu z nervového zakončení.

**Nikotin** - váže se na receptory v periferním, vegetativním nervovém systému, který řídí vnitřní orgány. Zde vyvolává zvýšenou aktivitu trávicího traktu: vzestup produkce slin a trávících šťáv a vzestup aktivity hladké svaloviny. Stoupá také produkce potu a může dojít ke stažení zornice.

# Acetylcholinový nikotinový receptor **nikotinového typu**

(např. v nervosvalové ploténce - **Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ionofor**: asymetrický pentamer čtyř typů homologních podjednotek penetrujících membránou.



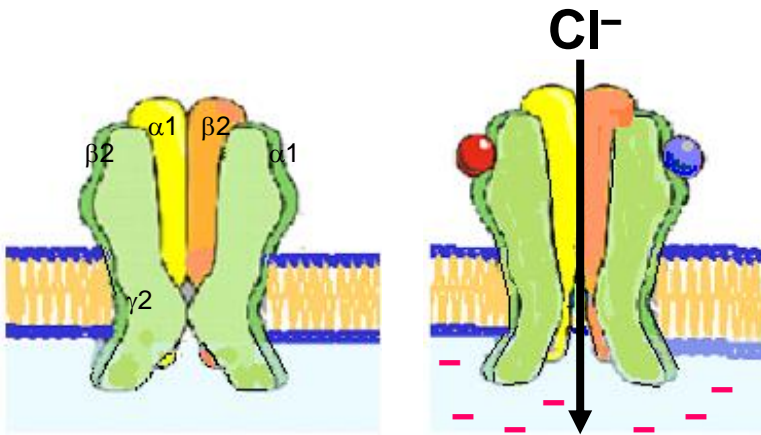
## REKAPITULACE

# Inhibiční GABA<sub>A</sub> receptor

ligandem řízený **chloridový ionofor** (ROC)

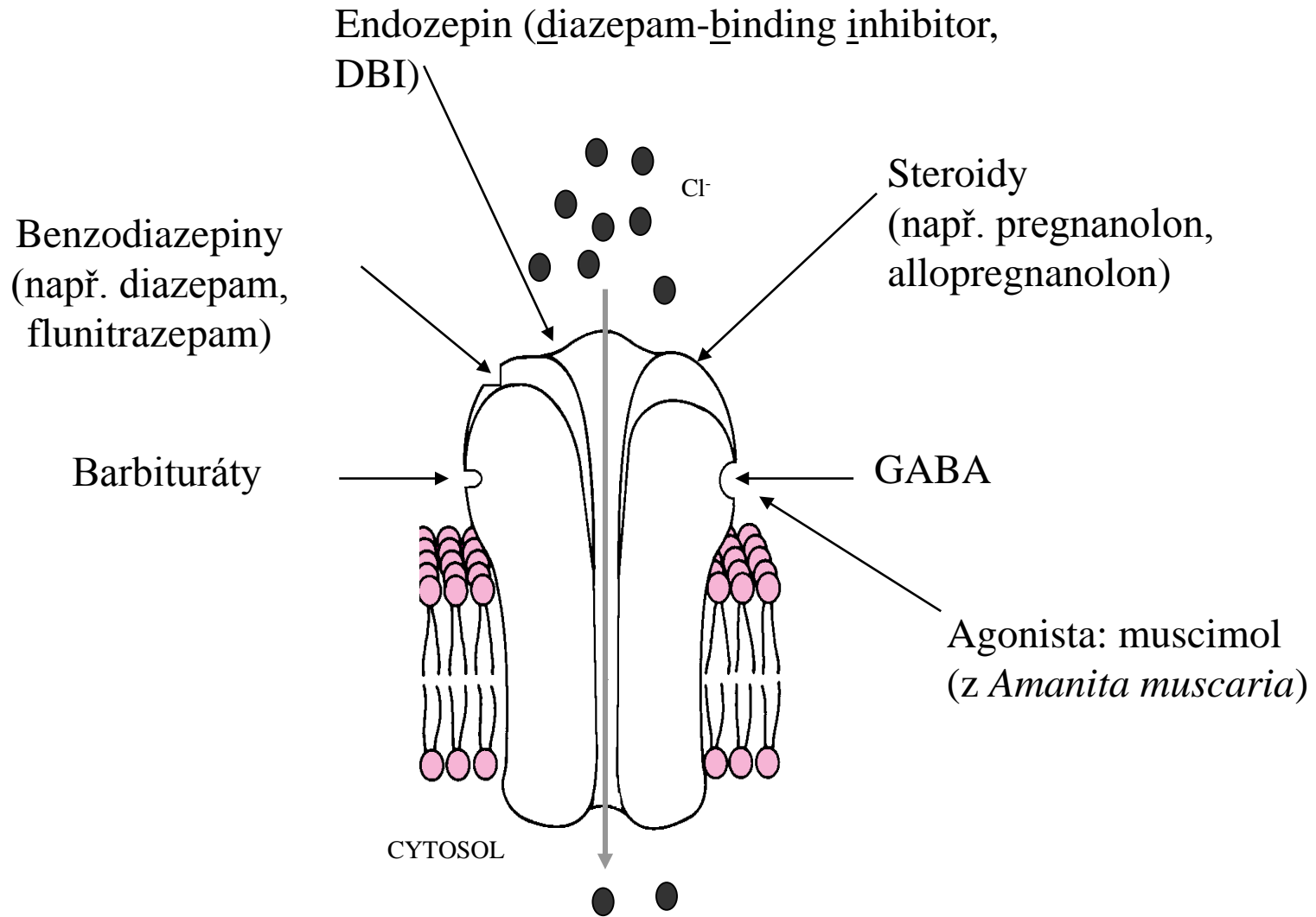
otevřít se interakcí s **γ-aminomáselnou kyselinou (GABA)**.

Vtok iontů Cl<sup>-</sup> vyvolá **hyperpolarizaci** postsynaptické membrány, čímž **znesnadní nebo znemožní vznik akčního potenciálu**.



heteropentamer složený ze tří typů podjednotek

# Další vazebná místa na GABA receptoru





# Další vazebná místa na GABA receptoru

Více než jedenáct **alosterických modulačních míst** pro látky zesilující účín endogenní GABA (zklidnění, omezení úzkosti a myorelaxaci):

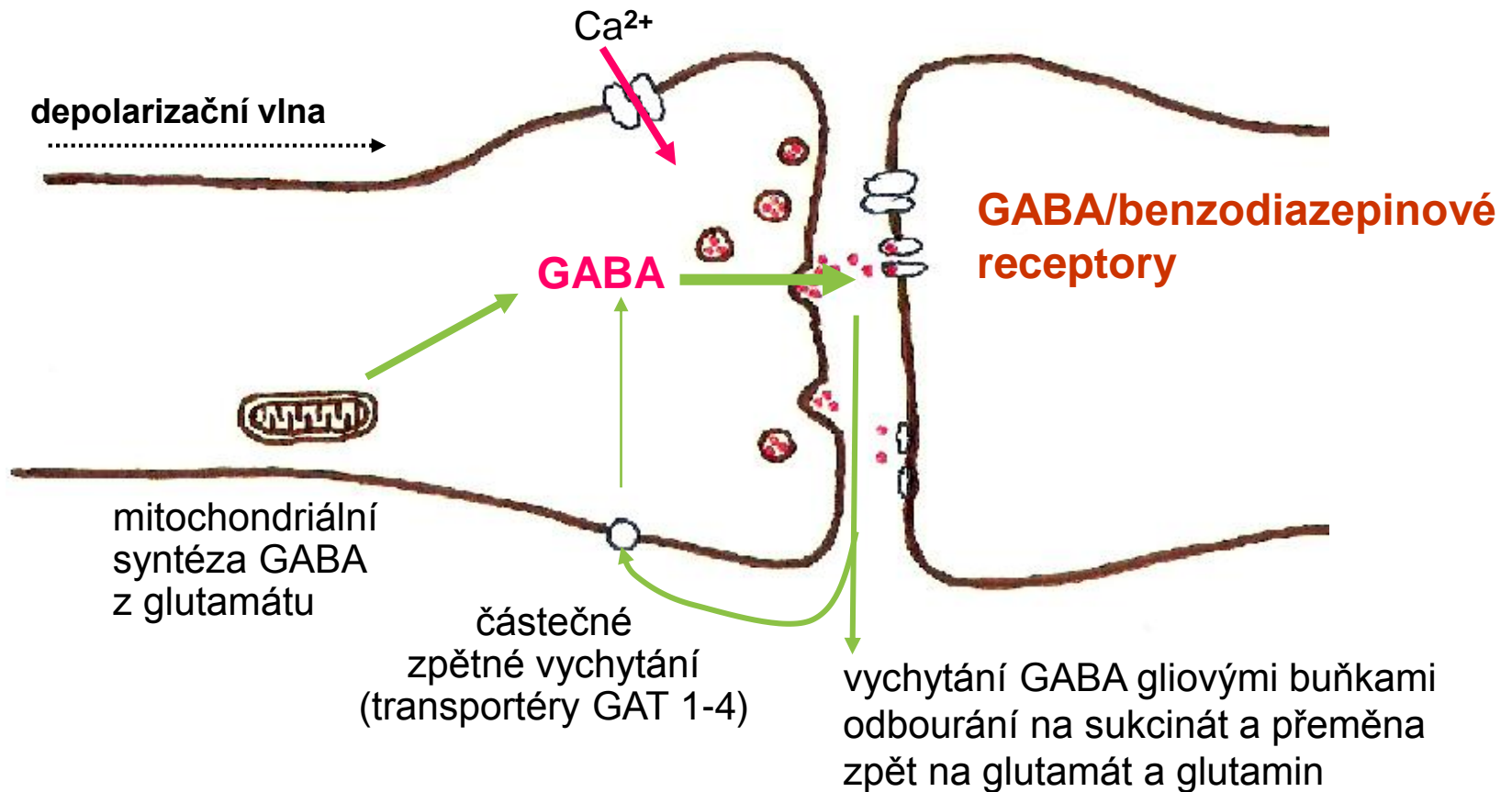
anestetika, ethanol a četná léčiva jako např. benzodiazepiny meprobamat a rovněž různé barbituráty.

Jiné ligandy naopak o benzodiazepinové vazebné místo kompetují nebo účinkují i jako antagonisté GABA (inverzní agonisté),  $\Rightarrow$  vyvolávají neklid a úzkost (např. endogenní peptidy zvané endozepiny).

Podobnou funkci jako GABA v mozku má v mozkovém kmenu a míše **glycin**. Inhibiční účinek glycinergních synapsí blokuje alkaloid strychnin, známý křečový jed.

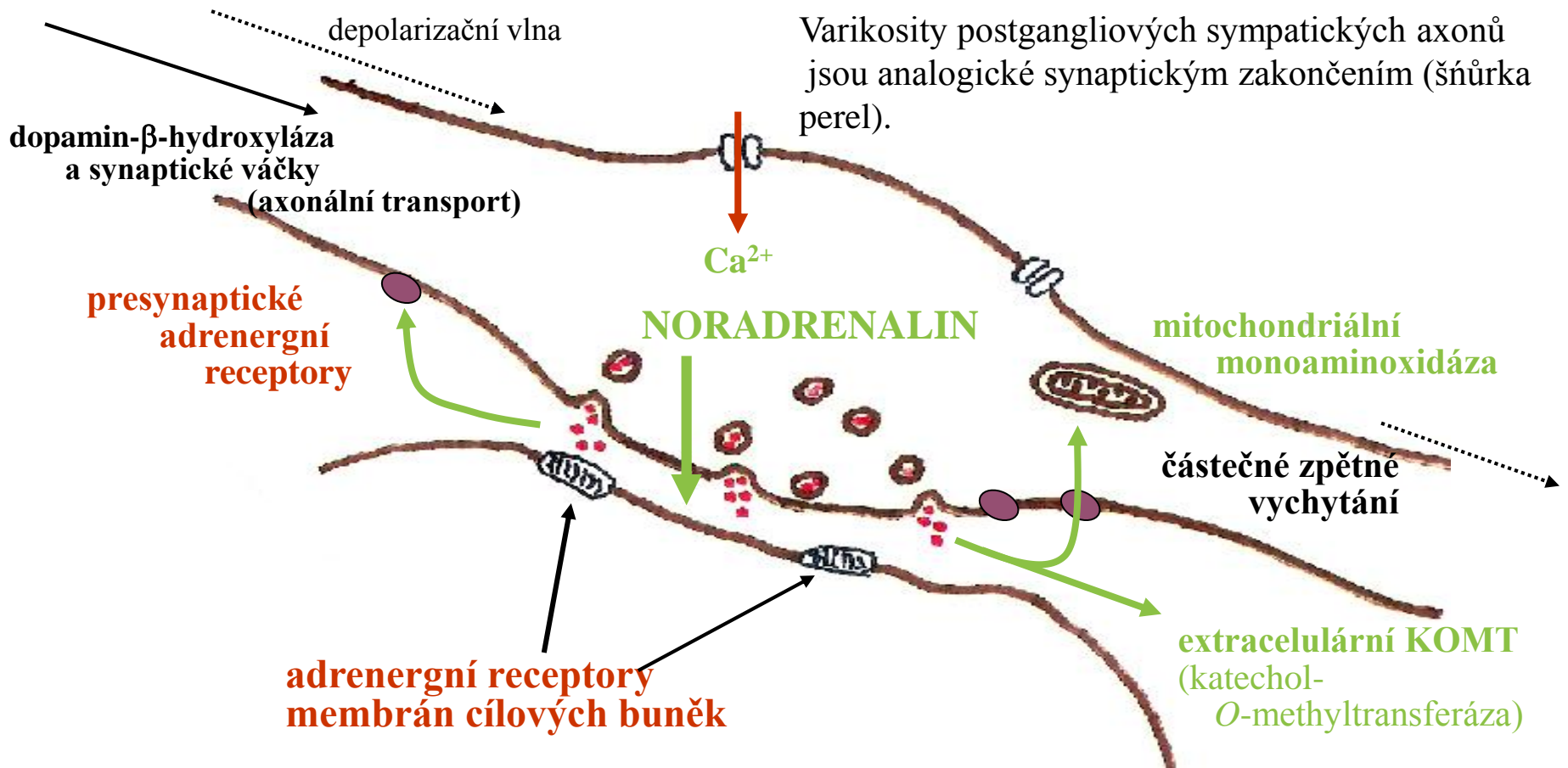
# Inhibiční gabaerní synapse

**$\gamma$ -Aminomáselná kyselina (GABA)** je hlavním inhibičním neurotransmiterem v CNS. Gabaerní synapse představují kolem 60 % všech synapsí v mozku.



# Adrenergní synapse

Neurotransmitterem naprosté většiny postgangliových sympatických neuronů je **noradrenalin**. Na některých nervech může působit i adrenalin.



**Adrenergí receptory jsou metabotropní, spolupracují s G-proteiny a produkují druhé posly (viz dále)**

# Muskarinové cholinergní receptory (jsou metabotropní)

Typ	Princip účinku	Výskyt
M <sub>1</sub>	G <sub>q</sub>	ve vegetativních gangliích, CNS, b.exokrinních žláz
M <sub>2</sub>	G <sub>i</sub>	v srdci, otevírá K <sup>+</sup> -kanály
M <sub>3</sub>	G <sub>q</sub>	v hladkém svalu
M <sub>4</sub>	G <sub>i</sub>	CNS
M <sub>5</sub>	G <sub>q</sub>	CNS

Alkaloid **atropin** je na muskarinových receptorech antagonistou, brání vazbě acetylcholinu.

## II. Receptory interagující s heterotrimerními G-proteiny

### Společné strukturní rysy RECEPTORU:

Všechny mají **sedm  $\alpha$ -helikálních úseků**, které jsou hydrofobní, pronikají membránou a spojují extra- a intracelulární klíčky.

Několik minut

**Neurotransmitery**

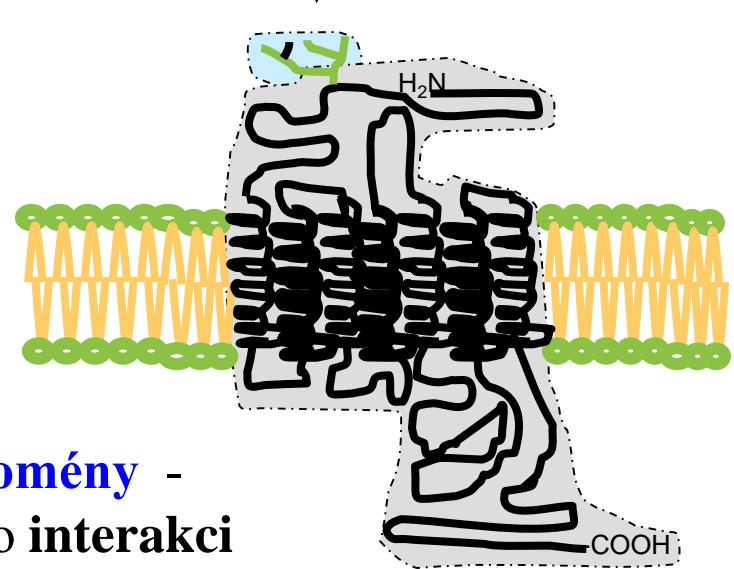
**Hormony**

Agonista-ligand vyvola transdukcii signálu

Antagonista- zabrání

**Intracelulární domény** - vazebné místo pro interakci s G-proteinem **jediného určitého typu.**

**Vazebné místo pro agonistu** (přítomna i vazebná místa pro antagonisty)



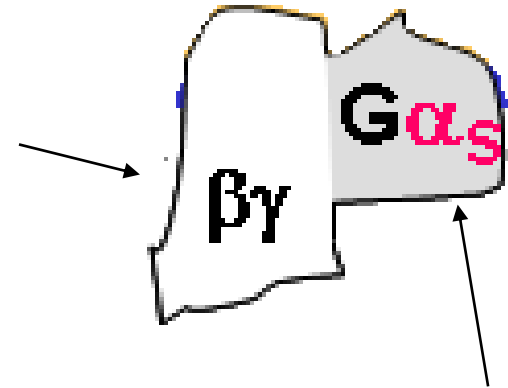
# Heterotrimerní G-proteiny

## Proteiny vázající GDP nebo GTP

většinou volně navázané na cytoplazmatickou membránu – mohou se pohybovat podél jejího vnitřního povrchu.

Podjednotky  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ .

Podjednotky  $G\beta$  a  $G\gamma$  jsou hydrofobní a nespecifické.

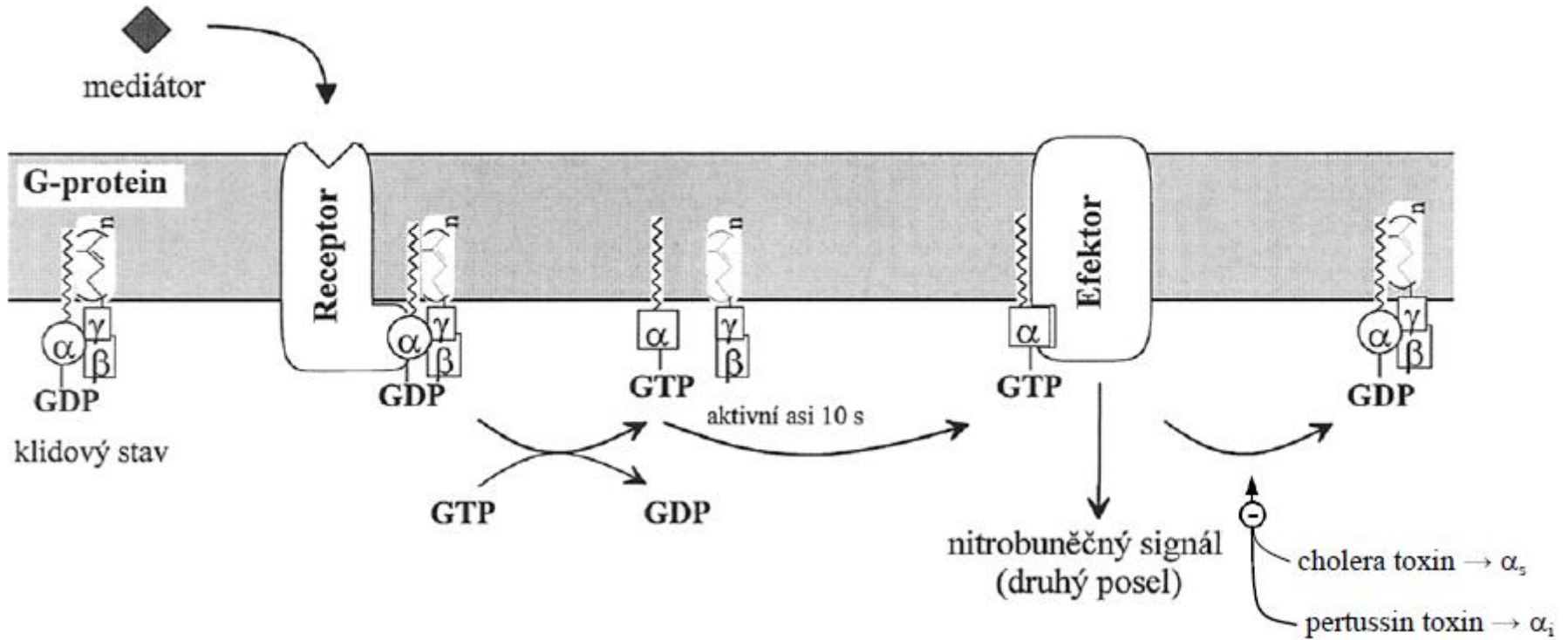


**Podjednotky  $G\alpha$**  jsou největší, vážou GDP nebo GTP a jsou specifické pro každý typ mechanismu transdukce.

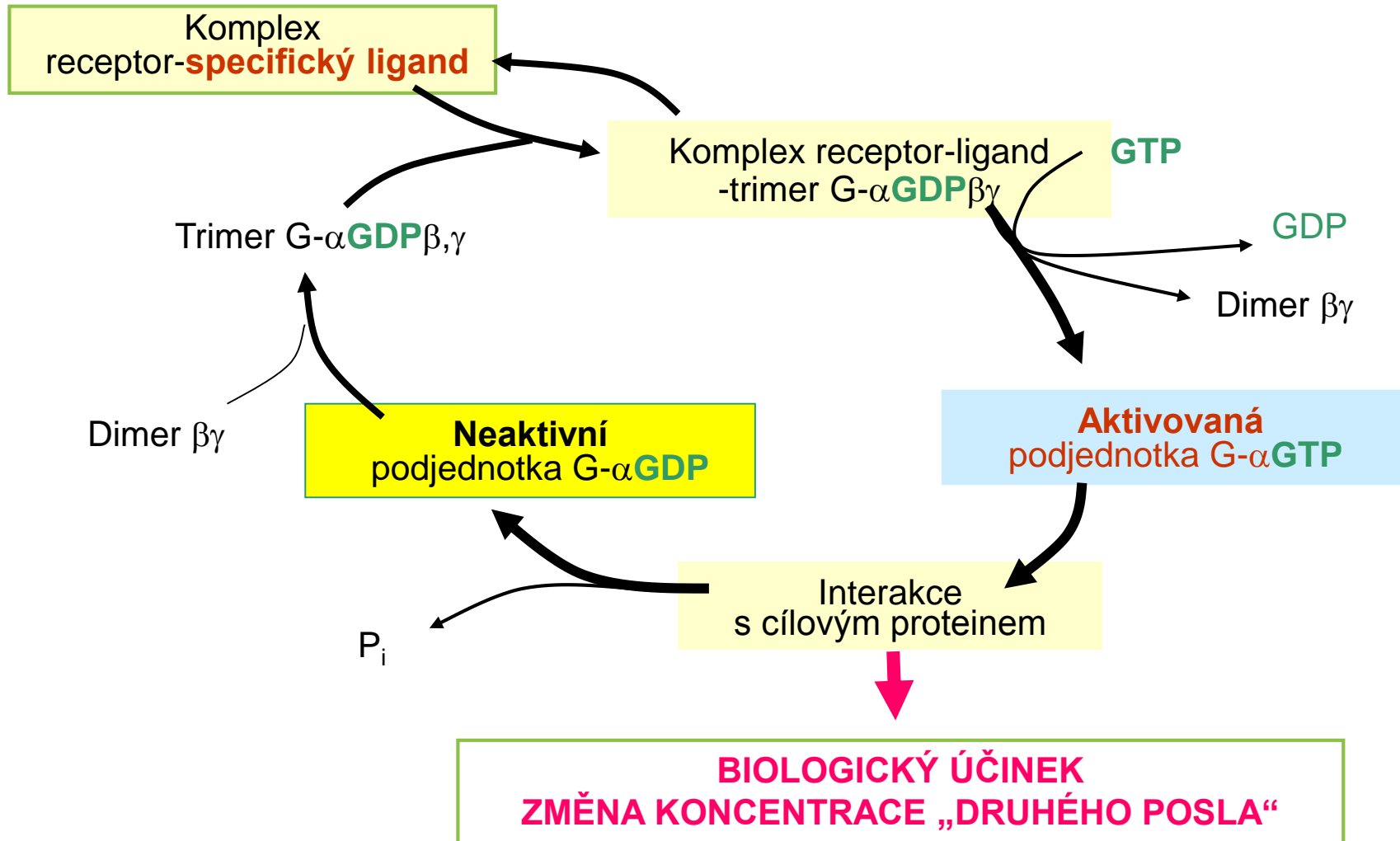
Identifikováno více než 20 druhů různých  $G\alpha$  podjednotek.

# Receptor působící prostřednictvím G-proteinů

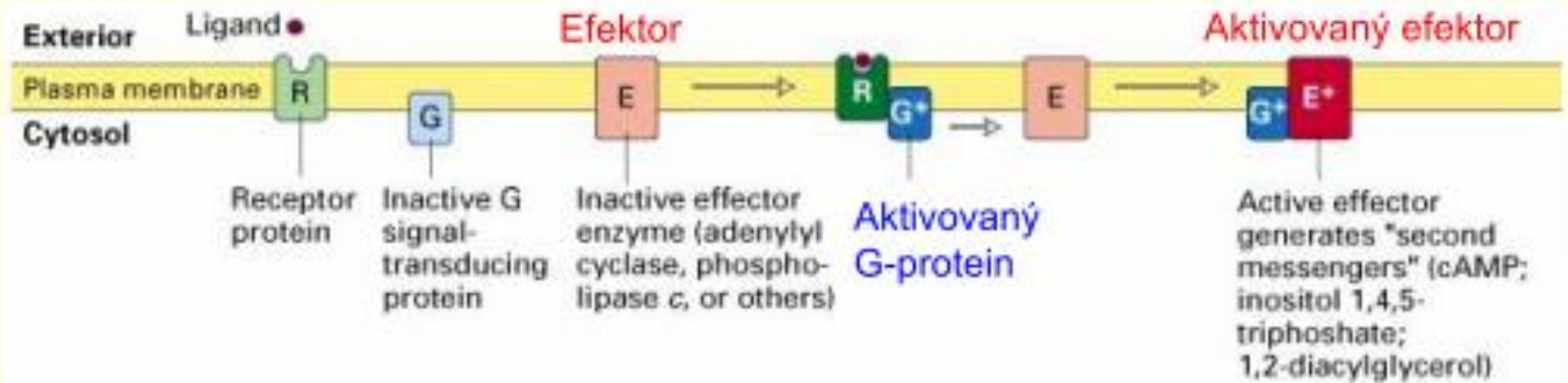
(odezva – několik minut, neurotransmitery i hormony)



# Cyklus aktivace heterotrimerních G-proteinů interakcí s komplexem receptor-specifický ligand







TEST

**Efektor**

**druhý posel**

1. Stimulace adenylátcyklázy (cAMP, Ca<sup>2+</sup>)
2. Inhibice adenylátcyklázy (cAMP, K<sup>+</sup>)
3. Stimulace fosfolipázy C (DG+IP3, Ca<sup>2+</sup>)
4. stimulace fosfodiesterázy štěpící cGMP

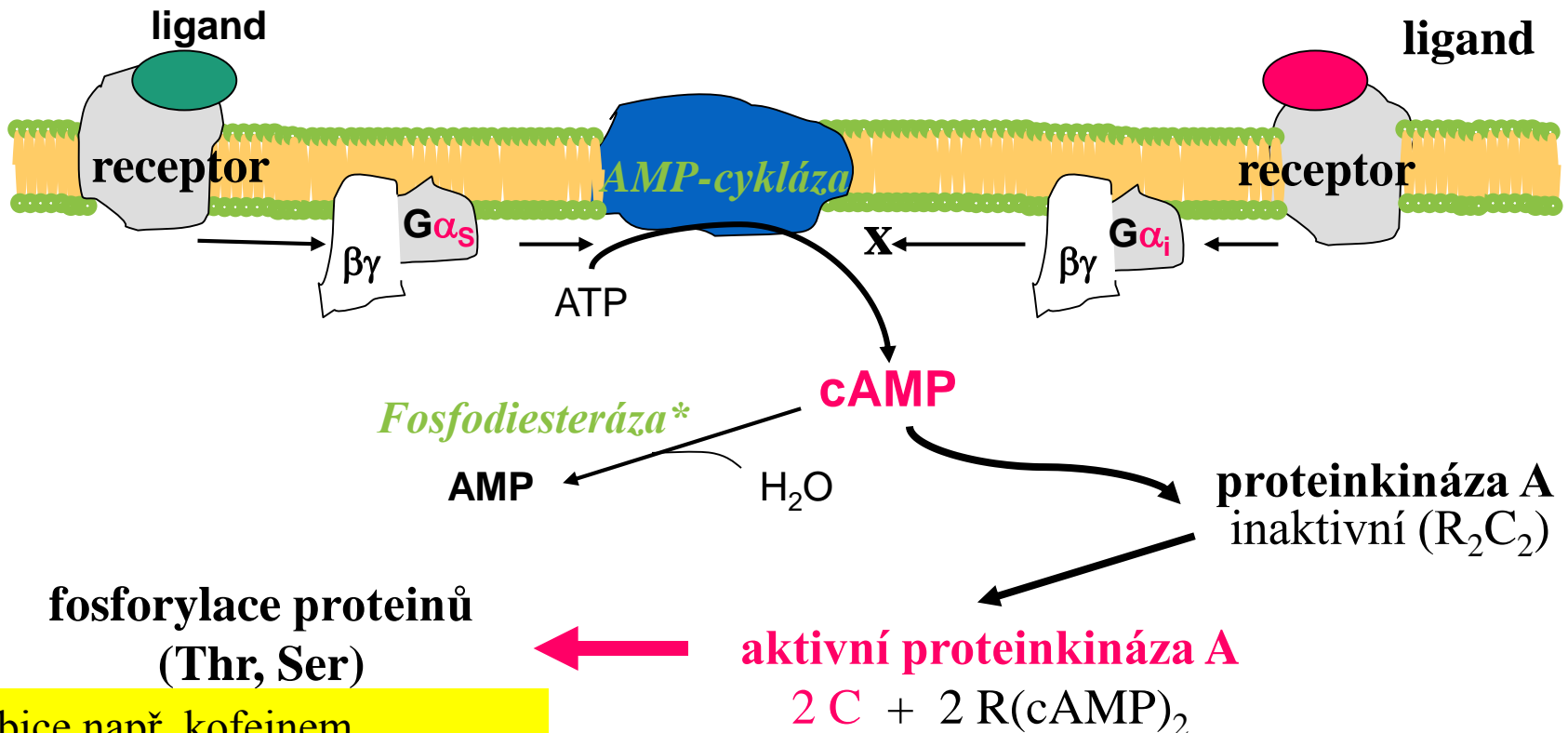
# Vybrané typy G-proteinů

Typ podjednotky $G\alpha$	Příklady aktivujícího receptoru	Účinek aktivovaného $G\alpha$ na cílový protein (nitrobuněčný signál)
$G\alpha_s$ (stimulační)	glukagon parathyrin $\beta$ -adrenergní	stimulace Adenylátcyklázy (cAMP, Ca <sup>2+</sup> )
$G\alpha_i$ (inhibiční)	somatostatin $\alpha_2$ -adrenergní	inhibice adenylátcyklázy (cAMP, K <sup>+</sup> )
$G\alpha_q$ (aktivující PI kaskádu)	vazopresinový V1 endotelinové ETA,B acetylcholinový M1 $\alpha_1$ -adrenergní	stimulace fosfolipázy C (DG+IP3, Ca <sup>2+</sup> )
$G\alpha_t$ (inhibiční) (transducin)	rodopsin patobiochemie-1	stimulace fosfodiesterázy štěpící cGMP

# Receptory aktivující $G_s$ a $G_i$ stimulují nebo inhibují adenylátcyklázu

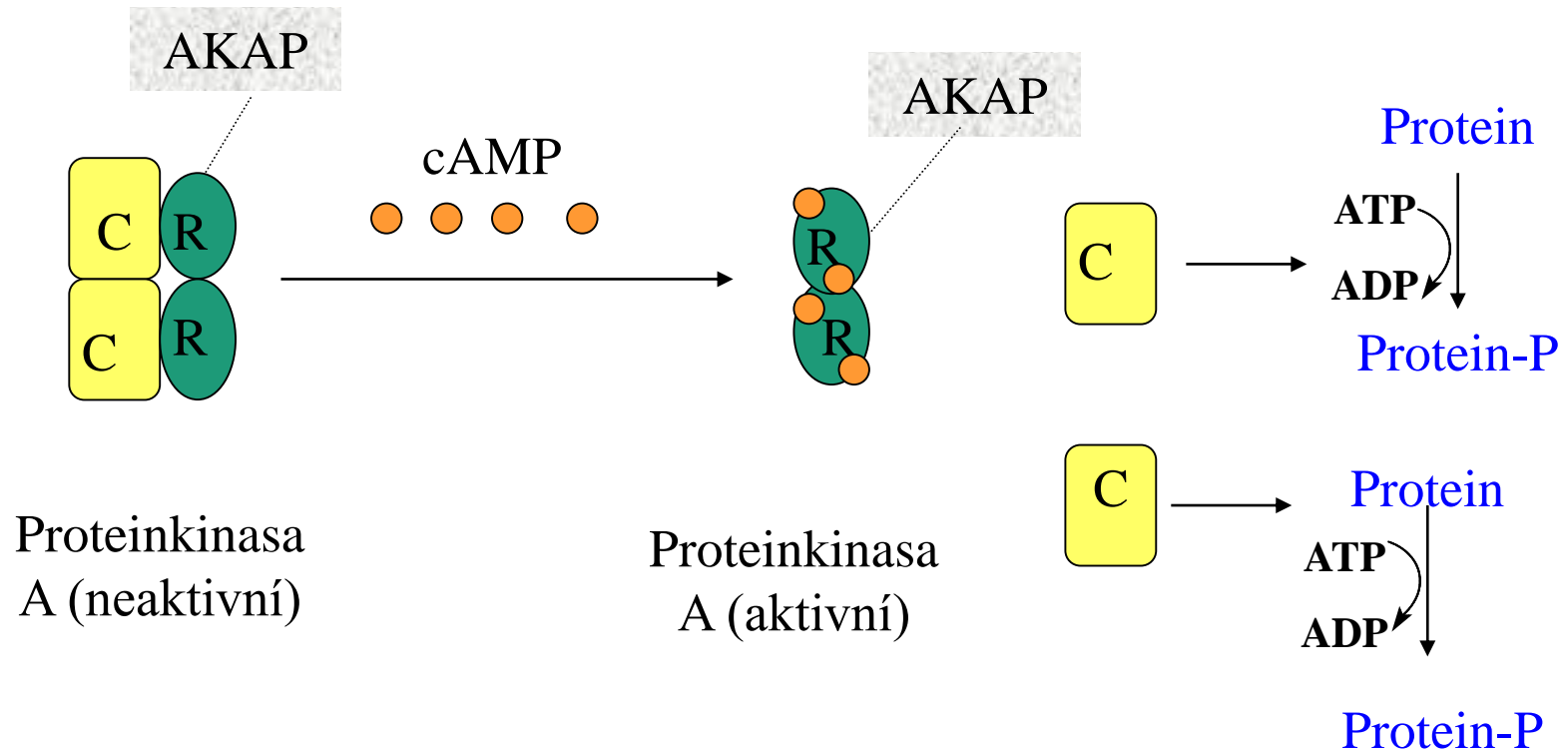
*Adenylátcykláza* - membránový enzym katalyzující reakci  
 $ATP \rightarrow cAMP + PP_i$ ;

**cAMP je druhým poslem.**



Inhibice např. kofeinem,  
 theofylinem  
 (METHYLYXANTINY)

# Účinky cAMP v buňkách



## Fosforylace proteinů.

V cytoplasmě - nejčastěji metabolické enzymy (rychlá odpověď)

V jádře – fosforylace genově specifického **transkripčního faktoru CREB (cAMP response element-binding protein)** (pomalejší odpověď)

**cAMP** vykazuje v buňce řadu rozdílných účinků.

Jedním z nejvýznamnějších účinků je **aktivace proteinkinasy A**, která následně fosforyluje řadu metabolických enzymů. Účinky kináz mohou být směřovány k fosforylaci právě určitých proteinů. K tomu slouží specifické proteiny vážící se ke kinázám. V případě proteinkinasy A se jedná o tzv. AKAPs (A kinase anchoring proteins), které slouží jako podpůrná struktura a lokalizují pozici proteinkinasy A poblíž určitého substrátu, který má být fosforylován a zároveň je tak omezena jejich samovolná aktivita.

**Proteinkinasa A** je heterotetramerní molekula, která se skládá ze dvou regulačních podjednotek a dvou katalytických podjednotek. V inaktivním stavu jsou podjednotky k sobě vázány. cAMP se váže na regulační podjednotky a vyvolává jejich oddělení od katalytických podjednotek, které se tak stávají aktivní a katalyzují přenos fosfátu z ATP na serinové nebo threoninové zbytky cílových proteinů. Katalytická podjednotka proteinkinasy A také vstupuje do jádra a fosforyluje genově specifické transkripční faktory nazývané CREB (cyclic AMP response element-binding protein). CREB se váže na cAMP-responsivní element v nefosforylovaném stavu a je slabým aktivátorem transkripce. Po fosforylaci proteinkinásou A se na CREB váže koaktivátor CBP (CREB-binding protein) a je vyvoláno zesílení transkripce.

Některé **bakteriální toxiny** modifikují účinek G-proteinů. Cholera je infekční střevní onemocnění projevující se těžkými, život ohrožujícími průjmy. Průjem je vyvolán enterotoxinem, který produkují bakterie *Vibrio cholera*. Choleratoxin je bílkovina, která svým účinkem inhibuje GTPasovou aktivitu  $\alpha$ s podjednotky Gs proteinu. Modifikovaná  $\alpha$ s podjednotka je tak „zmrazena“ v aktivním stavu a produkuje kontinuálně cAMP. Účinkem cAMP je aktivní kanál pro Cl<sup>-</sup> v membráně střevní buňky a jeho účinkem jsou secernovány chloridové ionty a voda do lumen střeva. Inhibiční G-protein je cílem působení pertusis toxinu produkovaného při černém kašli bakterií *Bordetella pertusis*. Výsledkem je inaktivace Gi proteinu a nadprodukce cAMP.

Kromě aktivace proteinkinasy A a fosforylace proteinů se cAMP nebo cGMP mohou navazovat na iontové kanály a ovlivňovat jejich propustnost. Tyto pochody se uplatňují zejména při aktivaci čichových a vizuálních vjemů.

# Lokalizace účinku cAMP do specifické části buňky

## **Proteiny AKAPs (A kinase anchoring proteins)**

Proteiny vážící se k proteinkinase A, směřují její účinek k určitému substrátu z mnoha možných.

Podobné proteiny ovlivňují také specifické účinky fosfatáz, fosfodiesteráz ad.

# Příklady hormonů působících prostřednictvím aktivace PKA

Hormon	Místo účinku
CRH	Adenohypofýza
TSH	Thyroidní folikuly
LH	Leydigovy b. varlete, žluté tělísko
FSH	Folikulární b. ovaria, sertoliho b. varlete
ACTH	Kůra nadledvin
ADH	B. distálního tubulu ledvin
PGI <sub>2</sub>	Trombocyty
Adrenalin, noradrenalin	$\beta$ - receptory v mnoha buňkách
glukagon	játra

**Adrenergní receptor** čili adrenoreceptor je označení pro skupinu receptorů spřažených s **G-proteinem**. Na tyto receptory se vážou různé katecholaminy, jako je zejména **noradrenalin a adrenalin**

**Funkce adrenergních receptorů jsou velmi různé a liší se podle konkrétního typu adrenergního receptoru.**

- **Alfa-adrenoreceptory**: obecně zvýšená glykogenolýza v játrech, zvýšená glukoneogeneze, relaxace hladkého svalstva ve střevech;<sup>[2]</sup>
  - $\alpha_1$  receptory – po přijetí signálu dochází v cílové buňce k IP3/DAG signalizační kaskádě;<sup>[3]</sup>
  - $\alpha_2$  receptory – po přijetí signálu dochází v cílové buňce k inhibici syntézy cAMP;<sup>[3]</sup>
- **beta-adrenoreceptory**: obecně zvýšená svalová glykogenolýza a jaterní glukoneogeneze a glykogenolýza, mobilizace zásobního tuku, zrychlení srdeční frekvence a prohloubení stahu;<sup>[2]</sup>
  - $\beta_1, \beta_2, \beta_3$  adrenoreceptory – po přijetí signálu dochází v cílové buňce k zvýšené produkci cAMP.<sup>1</sup>

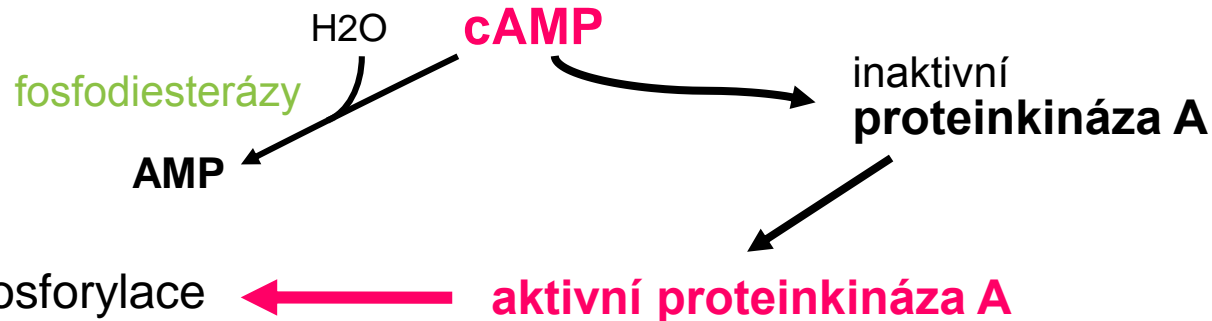
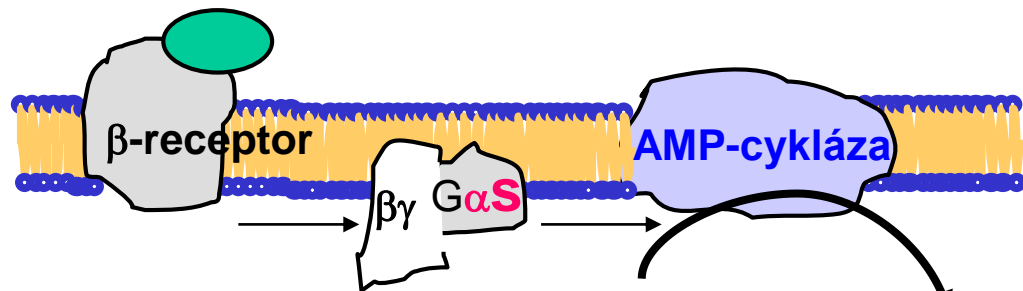


# Adrenergní receptory

Receptor	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$
G-protein	Gq	Gi	Gs	
Druhý posel	DG + IP <sub>3</sub>	cAMP ↓	cAMP ↑	
Příklady výskytu	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hladké svalstvo GIT (sfinktery) a cév kůže (kontrakce)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• adrenergní a cholinergní nervové zakončení (inhibice uvolnění přenašeče)</li> <li>• pankreas (inhibice exokrinní sekrece)</li> <li>• trombocyty (agregace)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• myokard (zvýšení síly a frekvence stahů)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hladké svalstvo dělohy, bronchů (relaxace)</li> <li>• hladké svalstvo GIT (peristaltika)</li> <li>• pankreas (aktivace exokrinní sekrece)</li> </ul>

# β-Adrenergní receptory

noradrenalin / adrenalin



$\beta_1$	$\beta_2$
<b>Gs</b>	
<b>cAMP ↑</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• myokard (zvýšení síly a frekvence stahů)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hladké svalstvo dělohy, bronchů (relaxace)</li> <li>• hladké svalstvo GIT (peristaltika)</li> <li>• pankreas (aktivace exokrinní sekrece)</li> </ul>

## Typické projevy stimulace receptorů

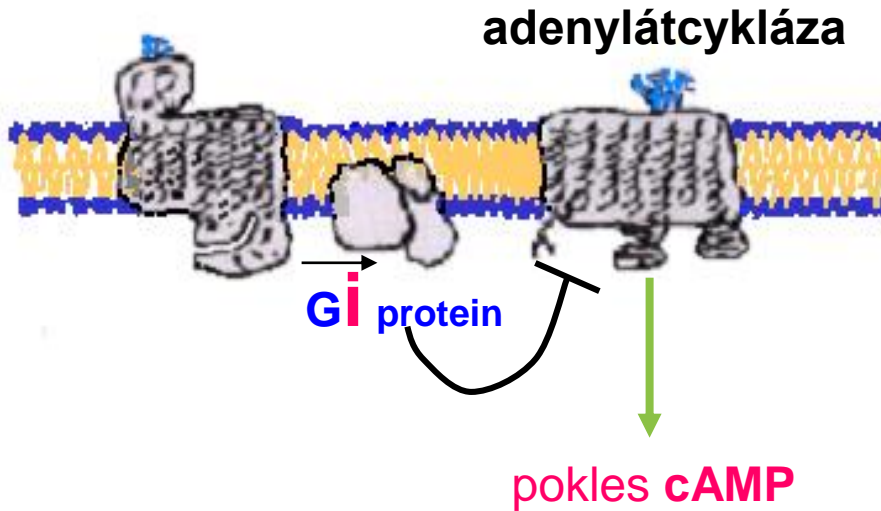
**β<sub>1</sub>** – tachykardie, inotropní účinek na myokard,

**β<sub>2</sub>** – bronchodilatace, vazodilatace v oblasti bronchiálního kmene,

**β<sub>3</sub>** – termogeneze, mobilizace tukových rezerv.

# Adrenergní receptory $\alpha_2$ a $\alpha_1$

## $\alpha_2$ -receptory



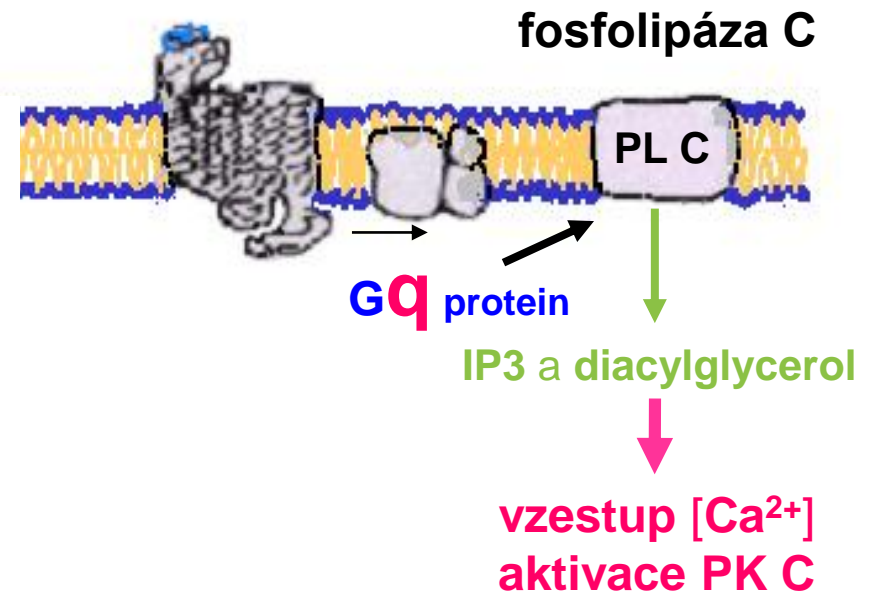
Typické projevy adrenergní

$\alpha_2$ -stimulace:

snížení exokrinní sekrece

$\alpha_1$	$\alpha_2$
Gq	Gi
DG + IP <sub>3</sub>	cAMP ↓

## $\alpha_1$ -receptory



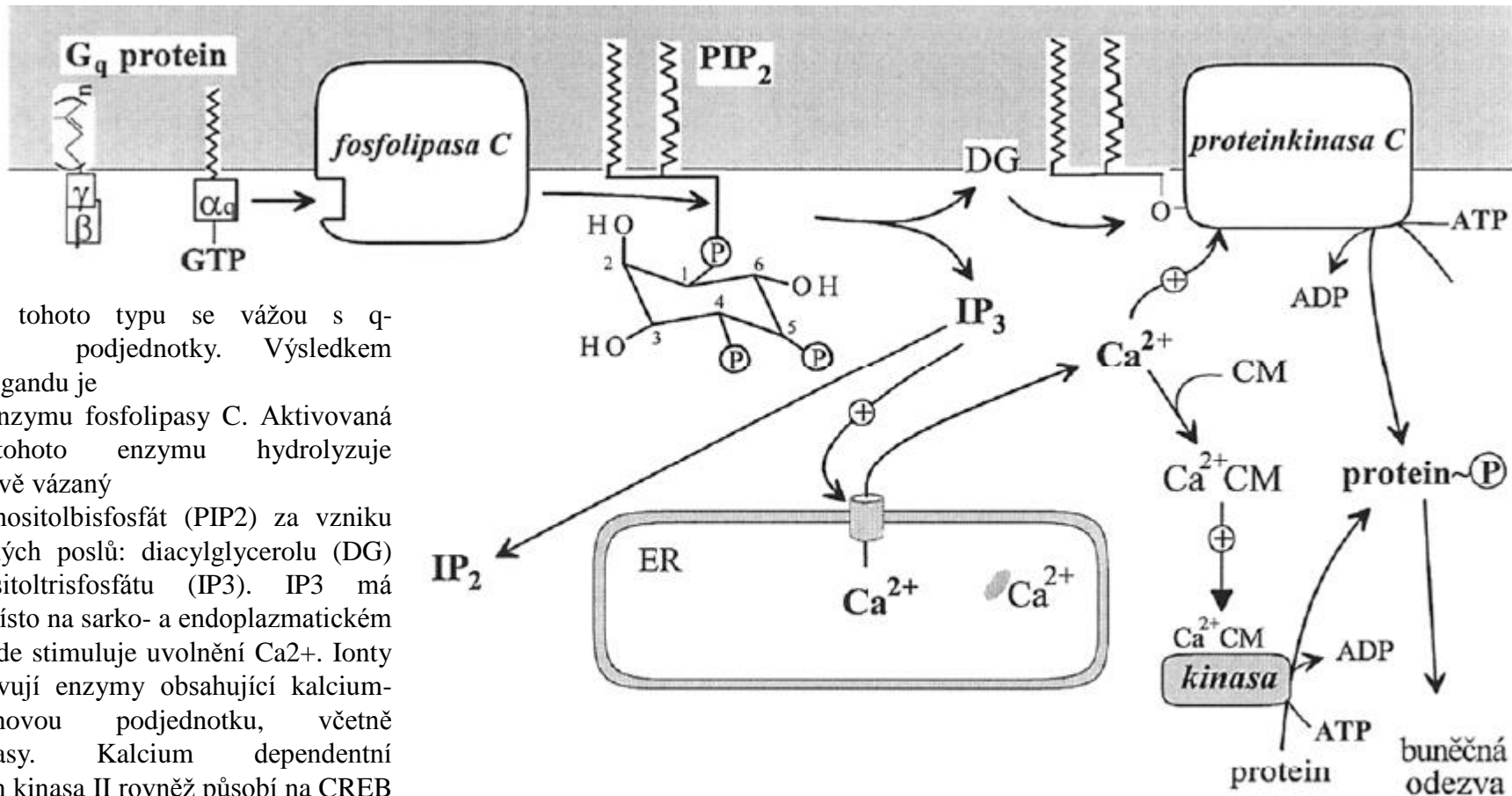
$\alpha_1$ -stimulace:

vazokonstrikce

bronchokonstrikce

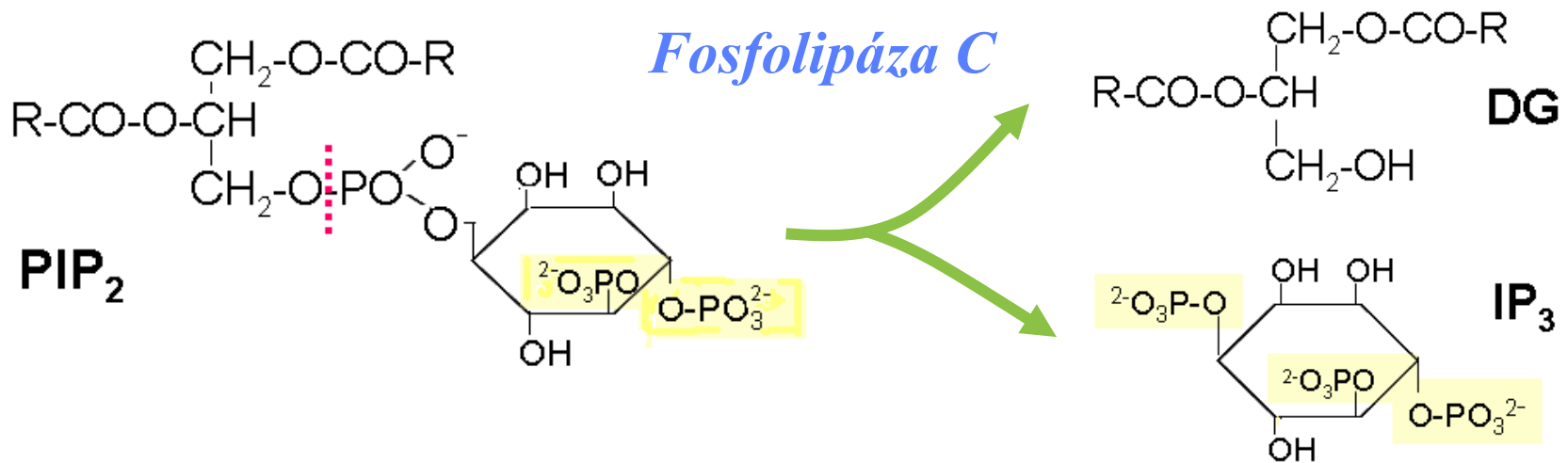
snížená motilita GIT

# Receptory aktivující $G_q$ protein stimulují fosfolipázu C a spouštějí fosfatidylinositolovou kaskádu



Receptory tohoto typu se vážou s  $q$ -isoformou podjednotky. Výsledkem navázání ligandu je aktivace enzymu fosfolipasy C. Aktivovaná forma tohoto enzymu hydrolyzuje membránově vázaný fosfatidylinositolbisfosfát ( $PIP_2$ ) za vzniku dvou druhých posílů: diacylglycerolu (DG) a 1,4,5-inositoltrisfosfátu ( $IP_3$ ).  $IP_3$  má vazebné místo na sarko- a endoplazmatickém retikulu, kde stimuluje uvolnění  $Ca^{2+}$ . Ionty  $Ca^{2+}$  aktivují enzymy obsahující kalcium-kalmodulinovou podjednotku, včetně proteinkinasy. Kalcium dependentní kalmodulin kinasa II rovněž působí na CREB v jádře. DG, který zůstává v membráně, aktivuje proteinkinasa C, která rozšiřuje odpověď fosforylací cílových proteinů.

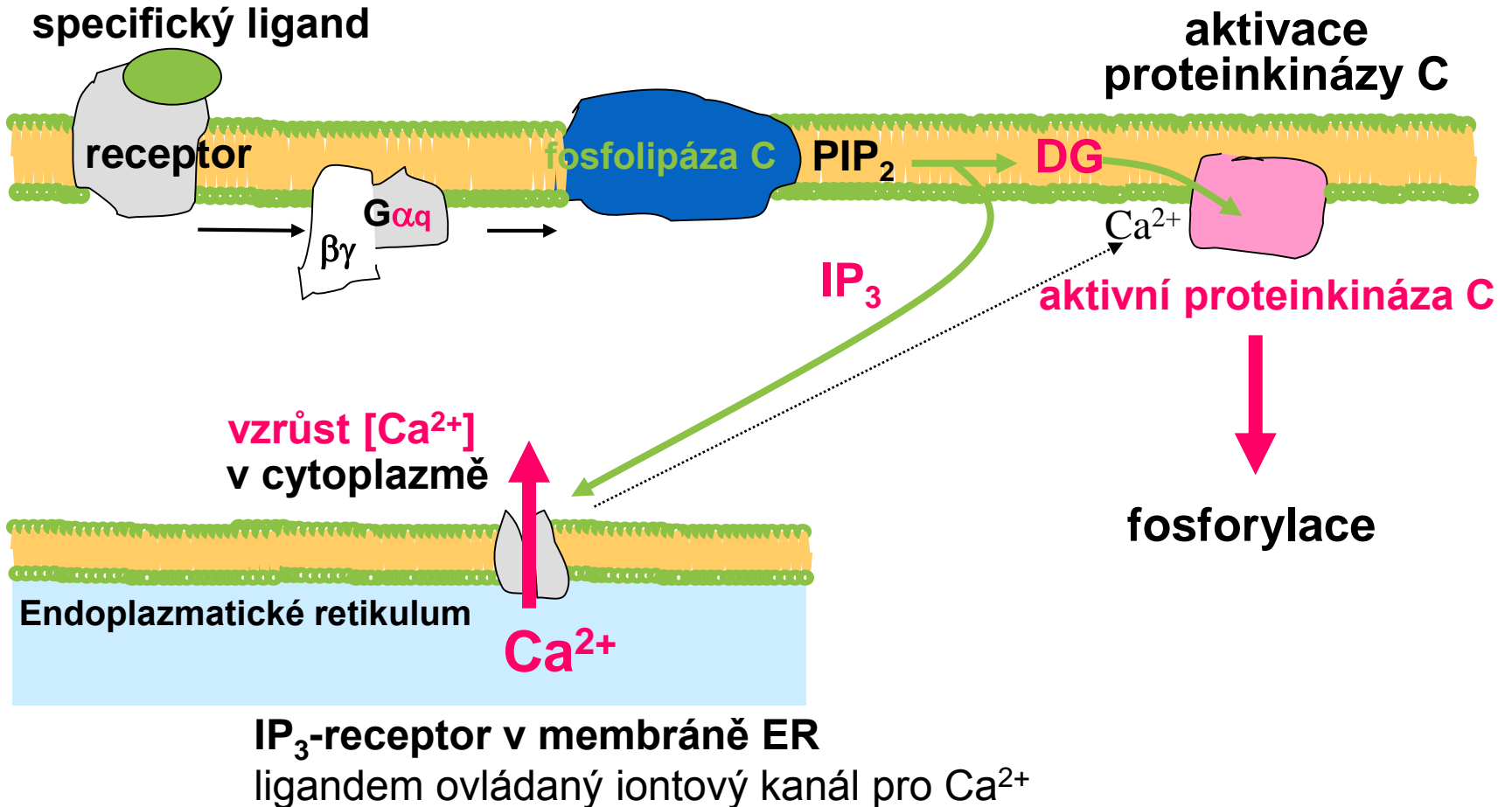
# Receptory aktivující $G_q$ protein stimuluji fosfolipázu C a spouštějí fosfatidylinositolovou kaskádu



**Oba** produkty jsou sekundární „poslové“:

Inositol-1,4,5-trisfosfát otevírá kanál pro  $Ca^{2+}$  v membráně ER, diacylglycerol aktivuje membránovou proteinkinázu C.

# Fosfatidylinositolová kaskáda



# Regulace metabolismu změnami cytoplasmatické koncentrace $\text{Ca}^{2+}$

- Bazální koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě  $\sim 1 \cdot 10^{-7}$  mol/l
- Zvýšení koncentrace na  $\sim 1 \cdot 10^{-6}$  rychle a účinně aktivuje různé buněčné pochody
- zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  může nastat

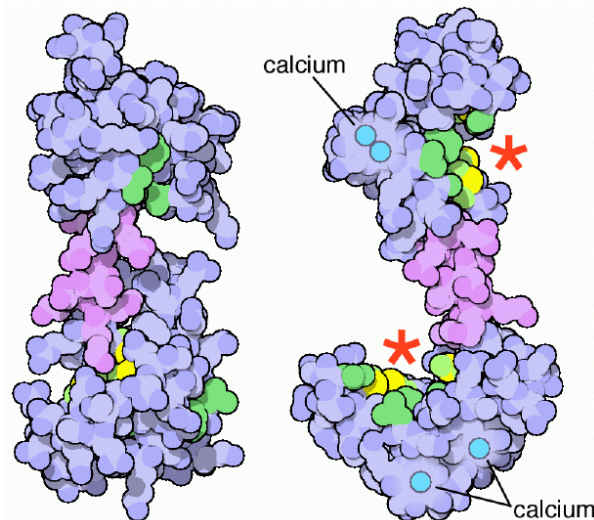
bud' influxem  $\text{Ca}^{2+}$  přes cytoplasmatickou membránu (viz např. kontrakce hladkého svalu)

nebo uvolněním z intracelulárních zásob (ER, mitochondrie) např.  $\text{IP}_3$  závislý kanál pro  $\text{Ca}^{2+}$  v ER, nebo ryanodinové kanály v kosterním a srdečním svalu

# Regulační bílkovina kalmodulin

Zvýšení hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  aktivuje řadu na  $\text{Ca}^{2+}$ -závislých proteinů, které tvoří rodinu malých na kalcium závislých proteinů.

Nejvýznamější je **kalmodulin**. Je přítomen téměř ve všech buňkách.



Vazba  $\text{Ca}^{2+}$  na kalmodulin (4 vazebná místa) mění jeho konformaci a aktivuje jeho interakci s dalšími proteiny, např. kinasami, fosfatasami ad.

Některé Ca-kalmodulin-dependentní kinasy jsou vysoce specifické, jiné mají širokou substrátovou specifitu.



# Příklady hormonů působících prostřednictvím aktivace fosfatidylinositolového systému a PKC

Hormon	Místo účinku
TRH	Adenohypofýza
GnRH	Adenohypofýza
TSH	Thyroidní folikuly
Angiotensin II/III	Kůra nadledvin (zona glomerulosa)
Adrenalin	$\alpha_1$ - receptory

# III. Receptory s enzymovou aktivitou

## III. A) Receptory s guanylátcyklasovou aktivitou

Po navázání ligandu přeměňují GTP na cGMP

cGMP je druhým poslem

Aktivuje proteinkinasu G

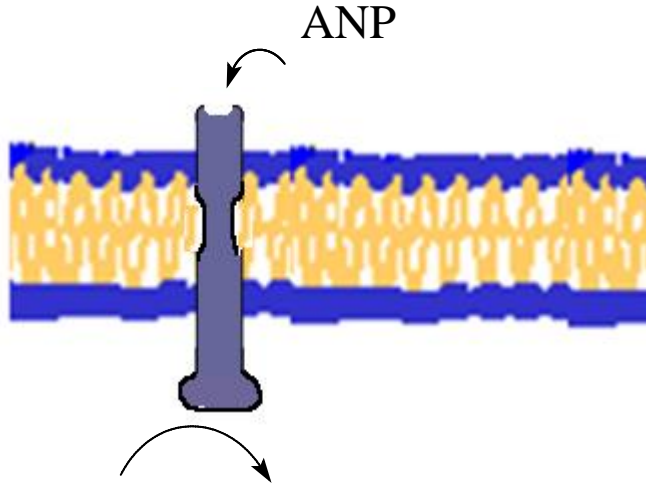
Dva druhy receptorů:

- membránový
- cytoplazmatický

cGMP může být rovněž druhým poslem. Na rozdíl od adenylátcyklasy, guanylátcyklasa není aktivována G-proteiny.

Rozlišují se dva typy guanylátcyklasy: membránově vázané enzymy, které jsou aktivovány přímo extracelulárními ligandy a rozpustné enzymy v cytoplazmě, které reagují na malé difuzibilní molekuly. Oba typy guanylátcyklasy se nacházejí v buňkách hladkého svalu cév.

# Membránové receptory s guanylátcyklosovou aktivitou



Receptory pro ANP

Přítomny hlavně v hladkém svalu cév a v ledvinách

ANP je secernováno myocyty atria v reakci na zvýšení objemu nebo tlaku krve



*fosfodiesteráza*

**GMP**



**proteinkináza G**  
inaktivní

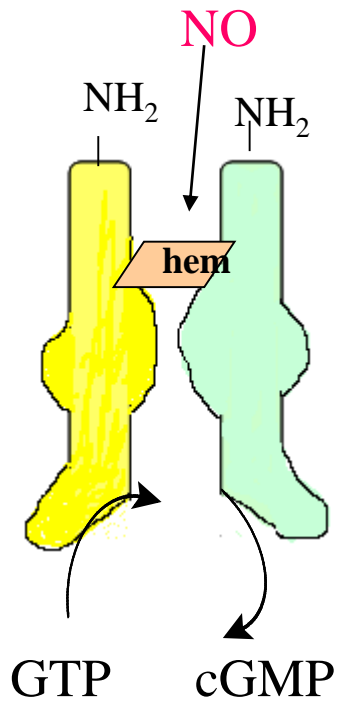
**aktivní proteinkináza G (PKG)**

**fosforylace proteinů**

Membránově vázaný enzym je receptorem pro natriuretické peptidy (ANP, BNP, urodilatin). Receptor má extracelulární doménu pro vazbu ligandu, jednoduchý transmembránový helix a intracelulární guanylátcyklosovou doménu. Guanylátcyklosová aktivita je zahájena navázáním ANP na extracelulární doménu. Podobně jako cAMP i cGMP působí prostřednictvím aktivace proteinkinasy.

Tato kinasa se dle konvence označuje proteinkinasa G. Receptory natriuretických peptidů jsou přítomny v hladkém svalu cév, v ledvinách a dalších tkáních. ANP je secernováno myocyty atria v reakci na zvýšení objemu nebo tlaku krve v pravé síni a vyvolá relaxaci vaskulatury, čímž se sníží celkový periferní odpor a zlepší lokální průtok krve. V ledvinách dilataje aferentní a zužuje eferentní glomerulární arteriolu a relaxuje mesangiální buňky. Tak zvyšuje tlak v kapilárách glomerulů, zvyšuje glomerulární filtraci a zvyšuje tak exkreci sodíku a vody.

# Cytoplazmatické receptory s guanylátcyklasovou aktivitou

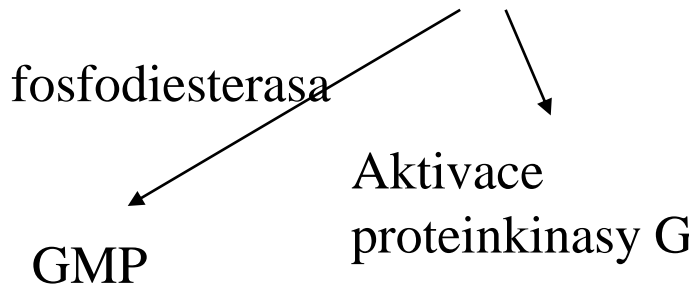


Receptor je dimerní a váže hem

NO se váže na hem, jeho vazba zvyšuje katalytickou aktivitu guanylátcyklasy

NO je generováno účinkem nitroxidsyntasy (NOS)

NO snadno prochází membránami , může být generováno i jinými buňkami a do cílové buňky proniknout difuzí



Rozpustná guanylátcyklasa

Rozpustná guanylátcyklasa se nachází v cytoplasmě mnoha buněk. Je to dimerní molekula, obsahující hem. Váže NO, který vyvolává v její struktuře konformační změny a zvyšuje její enzymovou aktivitu. NO je syntetizován nitroxidsynthasou (NOS) z argininu. Vzniká v organismu také z některých exogenních sloučenin, tzv. donorů NO, např. nitroglycerinu, nitroprusidu. cGMP je degradováno několika typy rozpustných nebo membránově vázaných cGMP fosfodiesteras. Inhibitory cGMP fosfodiesteras vedou též ke zvýšení cGMP a prodloužení relaxace hladké svaloviny

# Proteinkinasa G

cGMP sensitivní proteinkinasa G

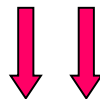
Rozšířena v mnoha tkáních

Fosforyluje různé proteiny (enzymy, transportní proteiny ad.)

## Účinek PKG v hladkém svalu

Fosforylace proteinů:

- inaktivace proteinů podporujících uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z ER  $\Rightarrow \downarrow \text{Ca}^{2+}$
- aktivace MLC fosfatasy  $\Rightarrow$  potlačení interakce aktin-myosin
- snížení aktivity  $\text{K}^+$ -kanálů, které podporují hyperpolarizaci  $\Rightarrow$  snížení influxu  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky



Relaxace hladkého svalu

# Význam NO/cGMP signalizace v hladkém svalu cév

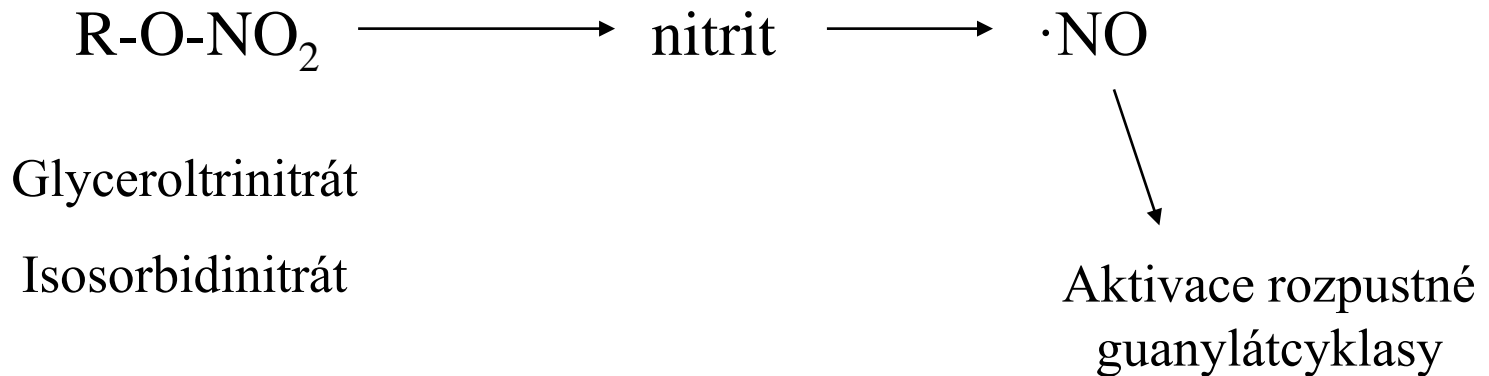
cGMP je klíčový druhý posel pro indukci relaxace hladkých svalů cév

⇒ vasodilatace a zvýšený průtok krve

NO je produkován v endotelových buňkách nitroxidsyntasou z argininu (aktivace např. acetylcholinem) a difunduje do přilehlých buněk hladkého svalu



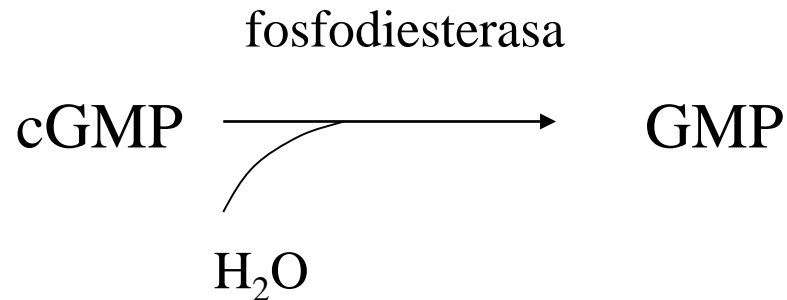
# Léky typu organických nitrátů jsou zdrojem exogenního NO



## Terapie anginy pectoris

Vasodilatační účinek na arterie uvolní koronární spasmus a normalizuje prokrvení

# Inhibice fosfodiesterasy potencuje účinek NO



Existuje více typů fosfodiesteras, v závislosti na typu buněk.

Lék sildenafil (Viagra) působí jako selektivní inhibitor fosfodiesterasy 5 (PDE5), která je vysoce exprimována v hladkém svalstvu cév. Viagra podporuje účinek NO $\cdot$ , uvolňující se během sexuální stimulace tím, že inhibuje PDE5 a zvyšuje hladinu cGMP v *corpora cavernosa*.

Výsledkem je relaxace hladké cévní svaloviny a přívod krve do *corpora cavernosa*.

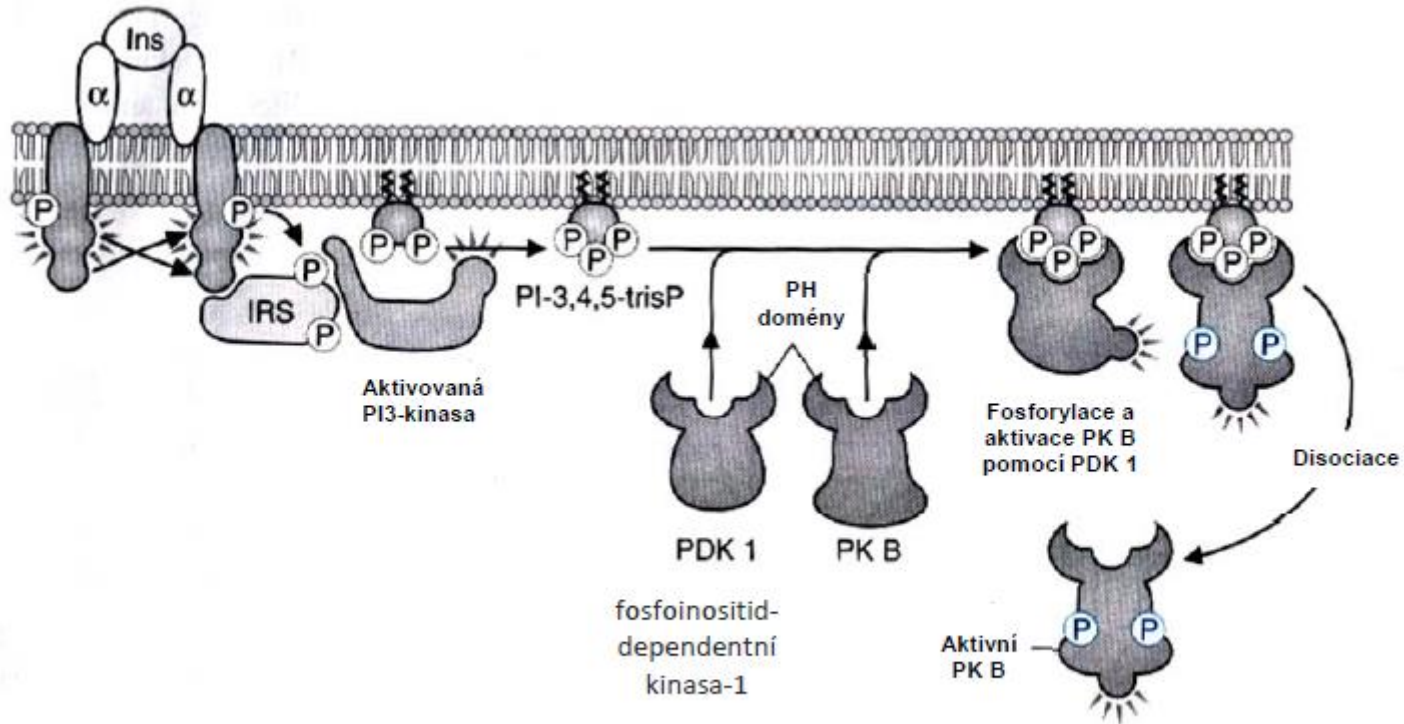


# III. B) Receptory s tyrosinkinázovou aktivitou

## Společné rysy

- Po navázání působku na receptor dochází ke konformační změně
- aktivuje se tyrosinkinázová aktivita receptoru
- dochází k autofosforylaci tyrosinů receptoru, případně dalších proteinů (IRS)
- na fosforylovaný receptor a substráty fosforylované receptorem se váží další proteiny, tzv. adaptorové molekuly
- adaptorové proteiny se vážou k fosfotyrosinovým zbytkům pomocí SH2 domén (Src homology 2 domain).
- adaptorové proteiny reagují s dalšími molekulami a signál je dále přenášen kaskádou fosforylačních/defosforylačních reakcí, výměnou guaninových nukleotidů, změnami konformací atd.

Rodina membránových receptorů s tyroxinkinasovou aktivitou je tvořena receptory **pro růstové faktory a inzulin**. Růstové faktory stimulují mitosu, buněčnou diferenciaci, migraci buněk a apoptózu. Inzulin stimuluje využití živin. Společným znakem receptorů je intracelulární tyrosinkinasová doména.



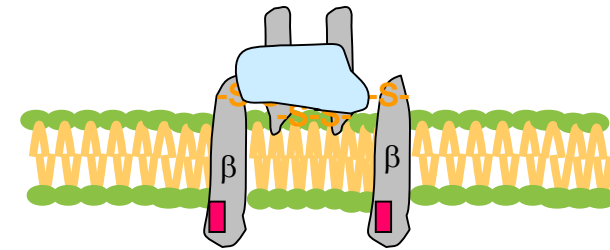
Do podrodiny receptorů s tyrosinkinasovou aktivitou patří dále např. IGF-1 (insulin-like growth factor-1) receptor; EGF (epidermal growth factor) receptor; PDGF (platelet-derived growth factor) receptor.

# Insulinový receptor

## Dimerní struktura

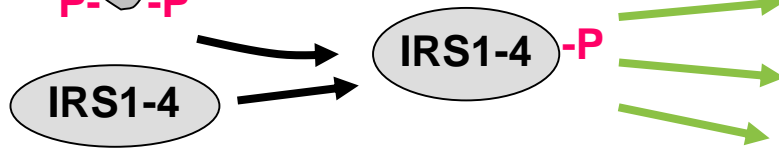
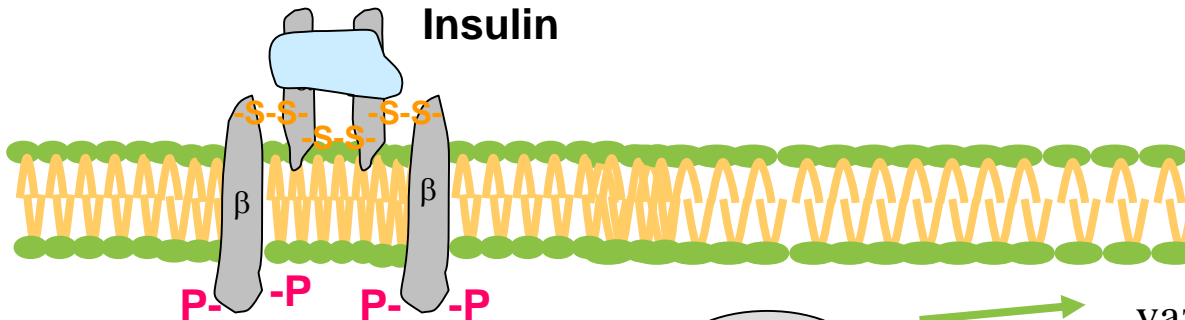
Vazebné místo pro insulin na  $\alpha$ -podjednotkách

Tyrosinkinázová aktivita na  $\beta$ -podjednotkách

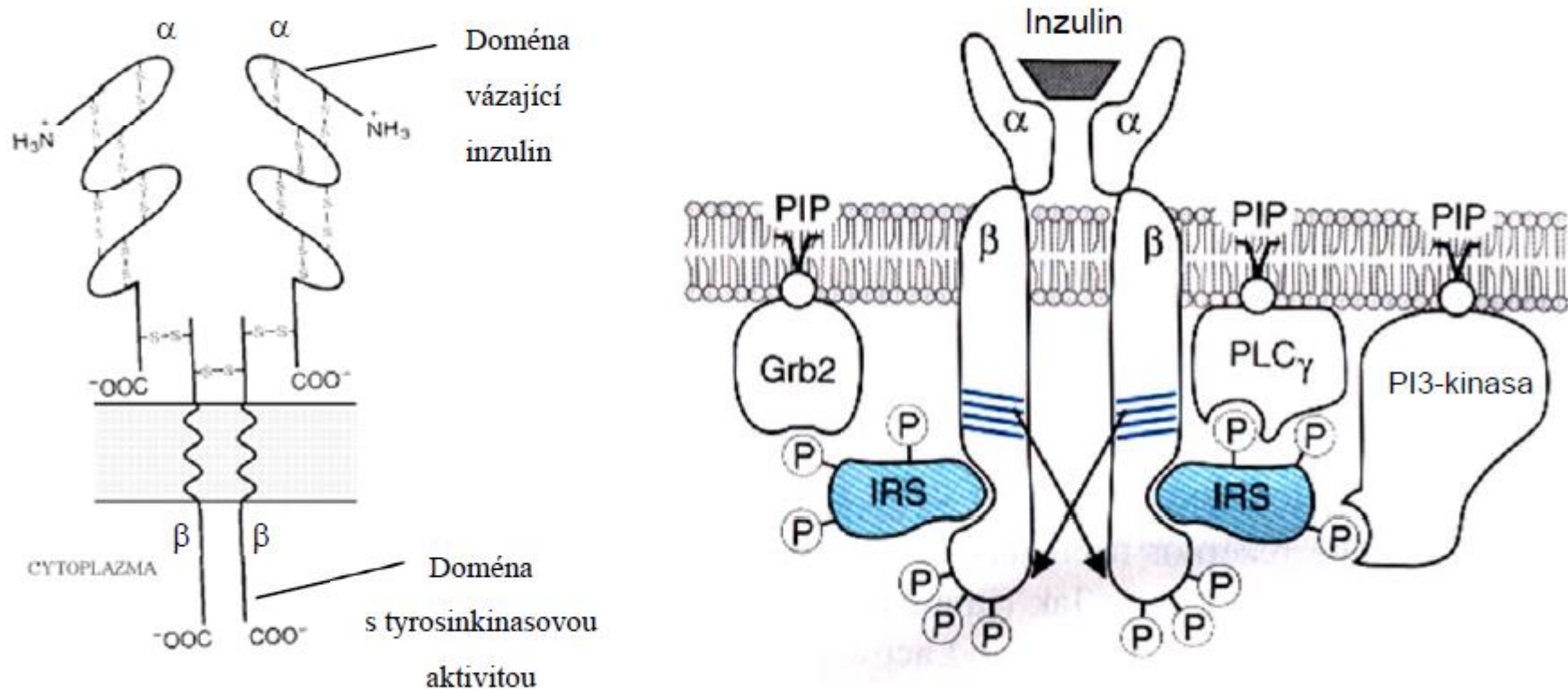


Po vazbě insulínu na receptor dochází k internalizaci komplexu hormon receptor, receptory jsou částečně recyklovány

Navázání insulínu na receptor → tyrosinkinázová aktivita autofosforylace  $\beta$ -podjednotek a **fosforylace proteinů IRS 1-4** (insulin receptor substrates 1-4)



vazba PI-3-kinázy na membránu  
aktivace fosfoproteinfosfatázy-1  
aktivace Ras – exprese genů



## Inzulinový receptor

Inzulinový receptor je přítomen v membránách ve formě dimeru. Každý monomer se skládá z extracelulární podjednotky  $\alpha$  a podjednotky  $\beta$ , která je integrována membránovou bílkovinou. Podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  jsou spojeny disulfidovou vazbou a disulfidová vazba je i mezi oběma monomery. Vazebná místa pro inzulin jsou na  $\alpha$  podjednotkách. Podjednotky  $\beta$  obsahují domény s vlastní tyrosinkinasovou aktivitou. Po navázání inzulinu se  $\beta$  podjednotky vzájemně fosforylují.

Aktivovaný fosforylovaný receptor váže proteiny nazývané **IRS** (inzulin receptor substrate, označují se též jako adapterové proteiny) a fosforyluje je na několika místech (fosforylace na cca 20 tyrosinových zbytcích).

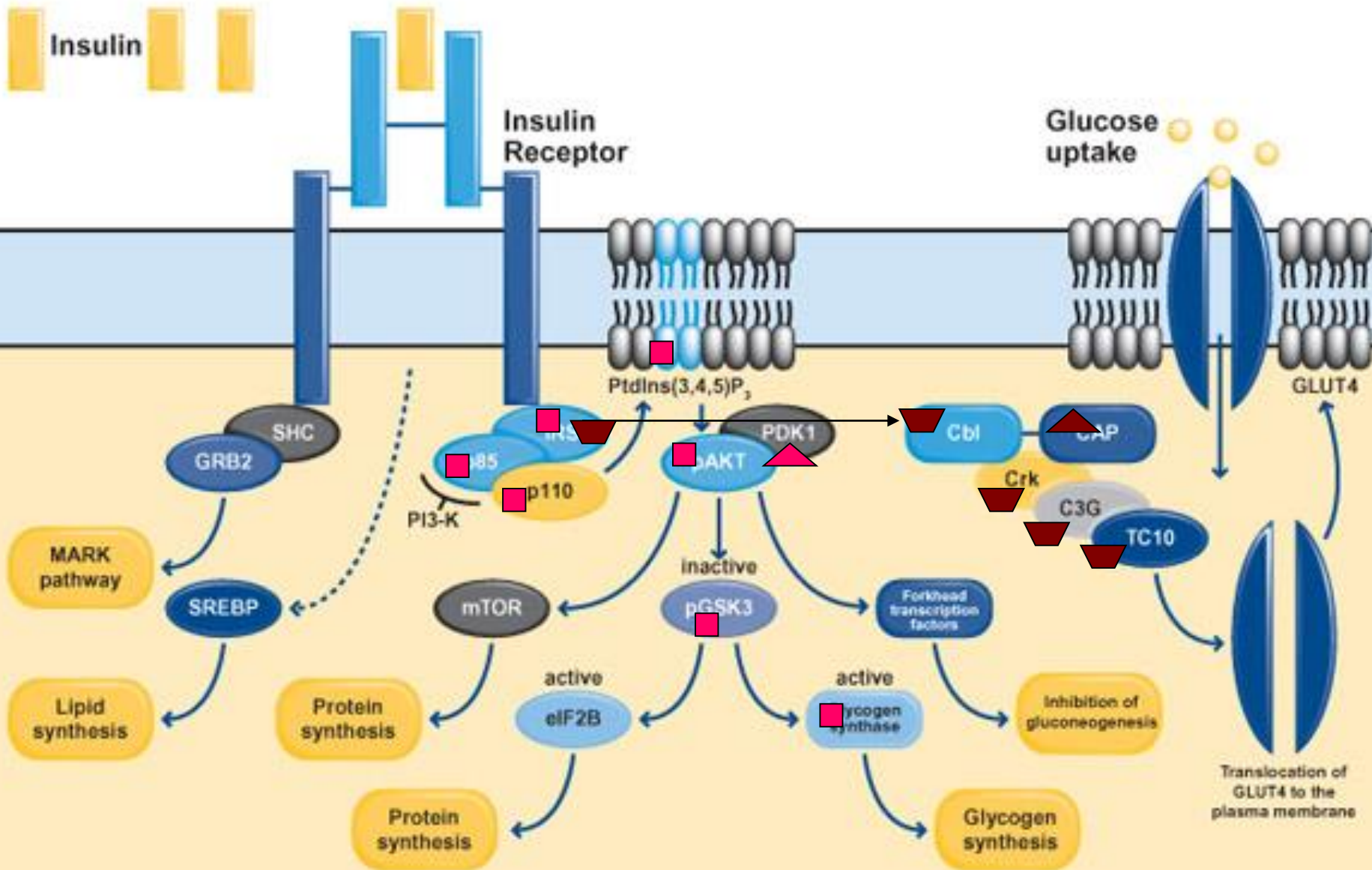
Tím se na IRS aktivují vazebná místa pro různé proteiny, které jsou zapojeny do zprostředkování různých účinků inzulínu. Proteiny se napojují na vazebná místa na IRS a tím se aktivují. Většina proteinů se váže na tato místa pomocí specializovaných SH2 domén (src homology). Na jedno z míst se **váže protein Grb2 (growth factor receptor-bound protein)**, který je připojen k membráně pomocí fosfolipidové kotvy. Prostřednictvím Grb2 je aktivován membránově vázaný G-protein Ras. Ras na rozdíl od heterotrimerních G-proteinů je monomerním.

Podobně jako alfa podjednotka

heterotrimerního G-proteinu existuje v neaktivní GDP a aktivní GTP formě. Aktivací prostřednictvím Grb2 se zvýší počet aktivních Ras-GTP molekul, které aktivují proteinkinasy a vyvolají Ras a MAP (mitogen activated protein) signální kaskády. Výsledkem je fosforylace proteinů v cytoplazmě a jádře, kde jsou tak regulovány transkripční faktory.

V jiném fosfotyrosinovém místě IRS se váže PI-3 kinasa, čímž je aktivována. Fosforyluje inositolové fosfolipidy v membráně v pozici 3. Např. konvertuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát. Aktivované fosfolipidy pak působí jako druzí poslové a podílí se na aktivaci dalších proteinů. Patří mezi ně proteinkinasy B a C, které zprostředkovávají řadu dalších účinků inzulínu v buňce. Jedním z účinků je expozice transportérů GLUT ve svalech a adipocytech do membrány.

# Některé signální dráhy insulínu



Substráty insulinového receptoru IRS1-4 jsou **adaptorové proteiny**. Jsou-li komplexem insulin-receptor fosforylovány, navazují se na další proteiny a aktivují je tak.

## **Příklady mechanismu účinku insulinového receptoru**

### **Syntéza glykogenu**

**Fosforylace IRS aktivuje regulační podjednotku PI-3 kinázy**

**Katalytická podjednotka PI-3 kinázy fosforyluje PIP<sub>2</sub> na PIP<sub>3</sub>**

**PIP<sub>3</sub> aktivuje proteinkinázu B (AKT)  
Aktivaci PKB (AKT) napomáhá PDK**

**Aktivovaná AKT difunduje do cytoplazmy a fosforyluje (inaktivuje) glykogensyntáza kinázu**

**Syntéza glykogenu je aktivována (aktivní je defosforylovaná forma glykogensyntázy)**

### **Translokace glukosových transportérů**

**Insulinový receptor fosforyluje CbI (IRS)**

**Komplex CbI-CAP se translokuje do lipidového raftu v membráně**

**CbI reaguje s adaptorovým proteinem Crk**

**Crk asociován s C3G**

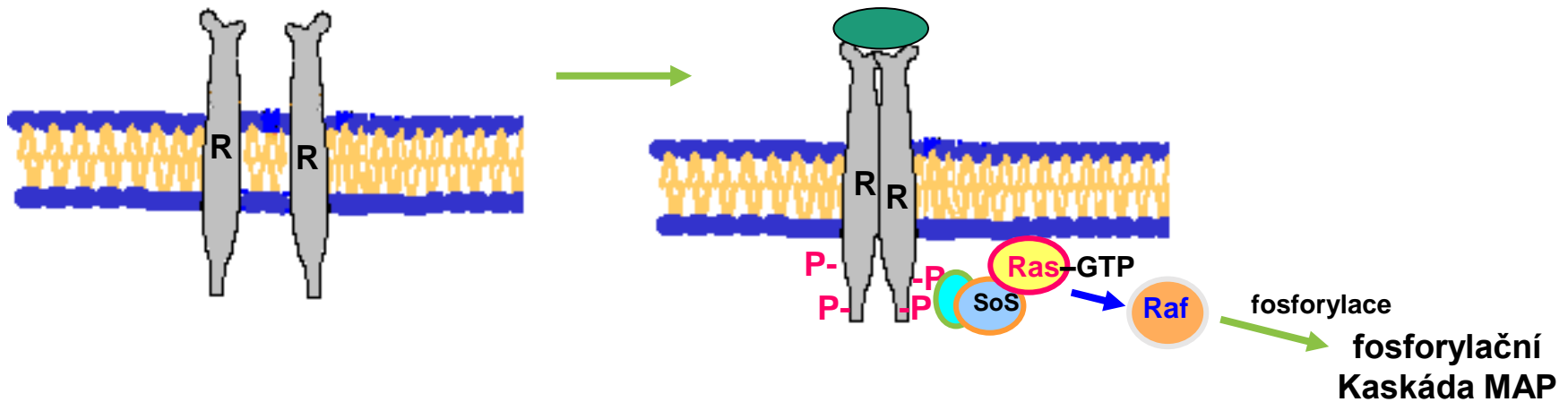
**C3G aktivuje TC10 (G-protein)**

**Aktivuje translokaci transportérů do plasmatické membrány**

# Receptor pro epidermální růstový faktor EGF

Receptor s tyrosinkinasovou aktivitou

Po navázání ligandu dochází k dimerizaci receptorů



Tím se aktivuje tyrosinkinasová aktivita v cytoplazmatické doméně.

Autofosforylace receptoru

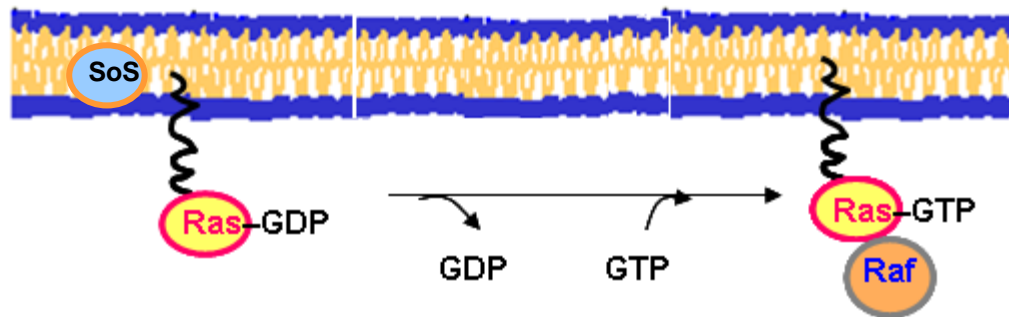
Na fosforylovaná místa se váží adapterové proteiny Grb2 (SH-2 domény).

Prostřednictvím proteinu SOS je aktivován G-protein Ras → aktivace MAP-kinasové kaskády (Ras/MAP-kaskáda)



# Ras je monomerní G-protein (strukturní analog $\alpha$ -podjednotky)

Monomerní G-protein - váže GTP a současně má GTPasovou aktivitu. Aktivuje se vazbou GTP místo GDP



Aktivace Ras - klíčový krok při přenosu signálu.

Inaktivní Ras-GDP přechází na aktivní Ras-GTP, který aktivuje další člen dráhy.

Inaktivace Ras - následná hydrolýza GTP pomocí proteinů aktivujících GTPasovou aktivitu G-proteinu

# Superrodina Ras proteinů

5 rodin: Ras, Rho, Arf, Rab, Ran

Zakotveny k lipidové membráně pomocí lipidových kotev (myristoyl, farnesyl)

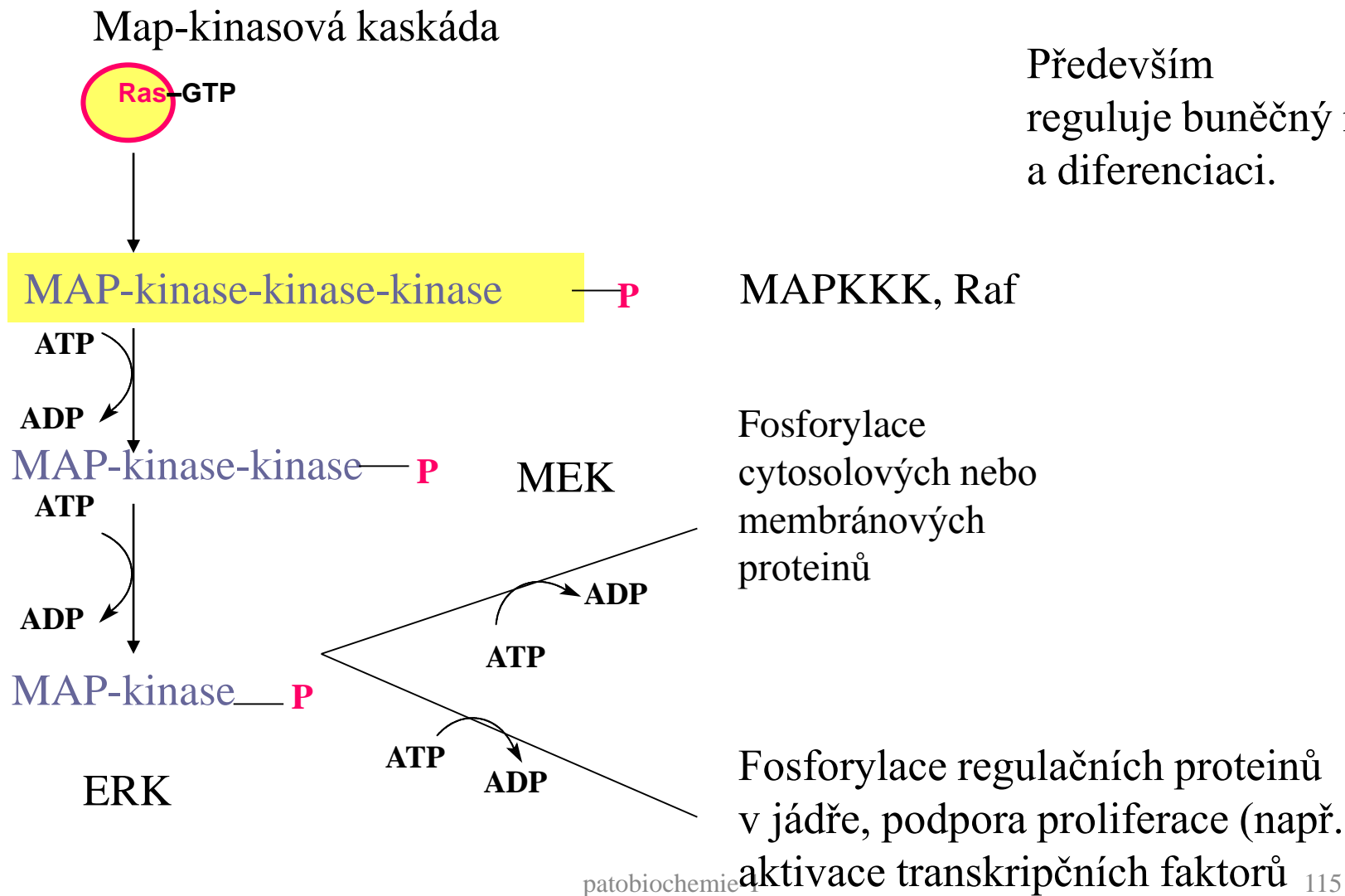
Monomerní G-proteiny, které hrají důležitou roli při regulaci růstu, morfogeneze, buněčné motility, cytokineze apod.

Mutace v genech Ras navozují patologickou proliferaci a antiapoptózu. Mutace Ras se vyskytují asi u 30 % všech lidských karcinomů.

# MAP-kinázová signální dráha (Mitogen activated protein kinase)

Popsány 3 systémy, nejznámější ERK.

Především  
reguluje buněčný růst  
a diferenciaci.



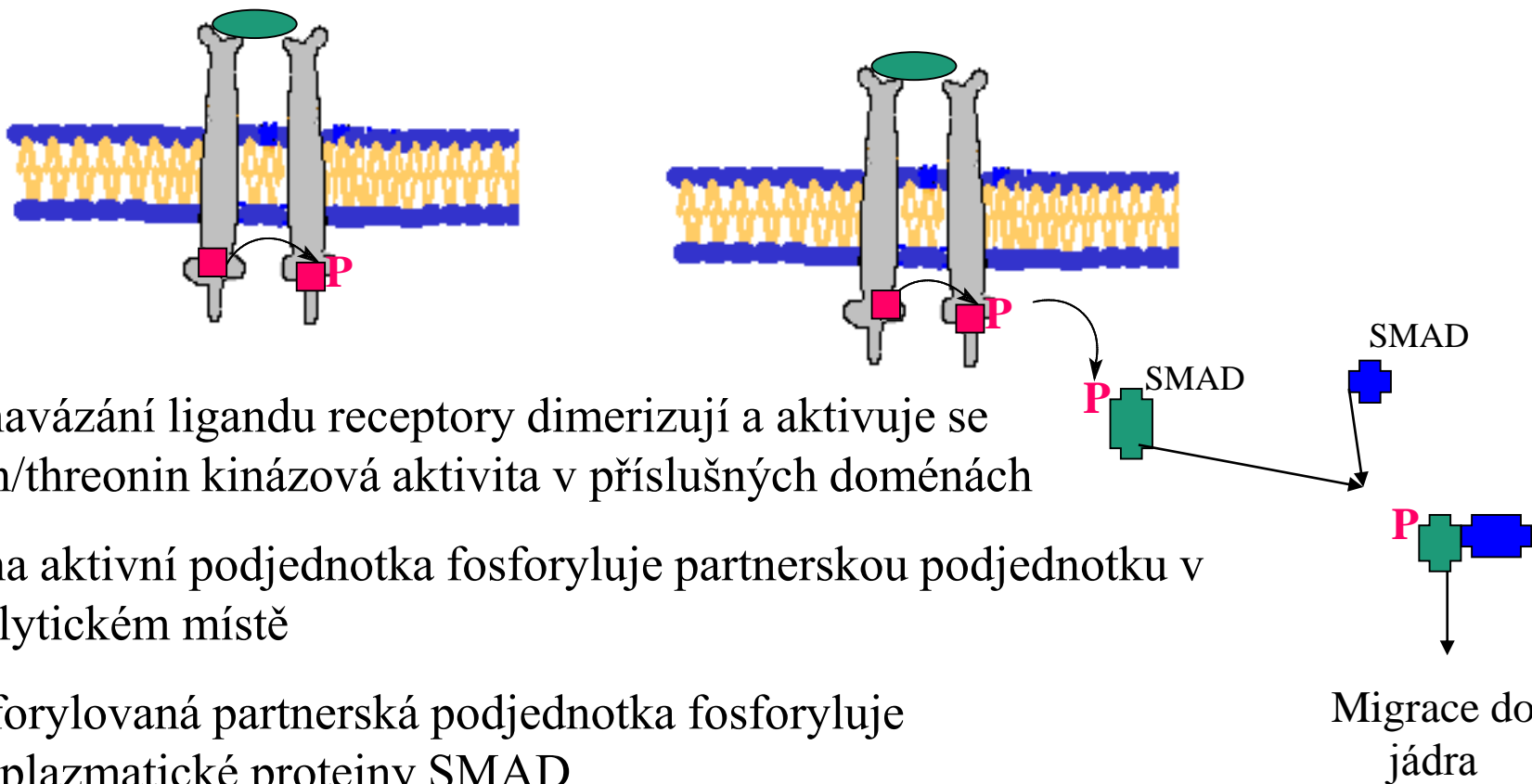
# Mitogeny - růstové faktory podporující proliferaci

Příklady mitogenů:

Zkratka	Název	Funkce
PDGF	Růstový faktor odvozený z destiček	mitogen pro buňky pojivové tkáně a nediferencovanou neuroglii
EGF	Epidermální růstový faktor	mitogen řady buněk ektodermálního a mesodermálního původu
FGF-2	Fibroblastový růstový faktor 2	Mitogen pro řadu buněk jako fibroblasty, endotelové buňky, myoblasty; indukuje embryonální mesoderm
IL-2	Interleukin 2	Mitogen pro T-lymfocyty

# Receptory se serin/threonin kinázovou aktivitou

Ligandem je např. transformující růstový faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )



Po navázání ligandu receptory dimerizují a aktivuje se serin/threonin kinázová aktivita v příslušných doménách

Jedna aktivní podjednotka fosforyluje partnerskou podjednotku v katalytickém místě

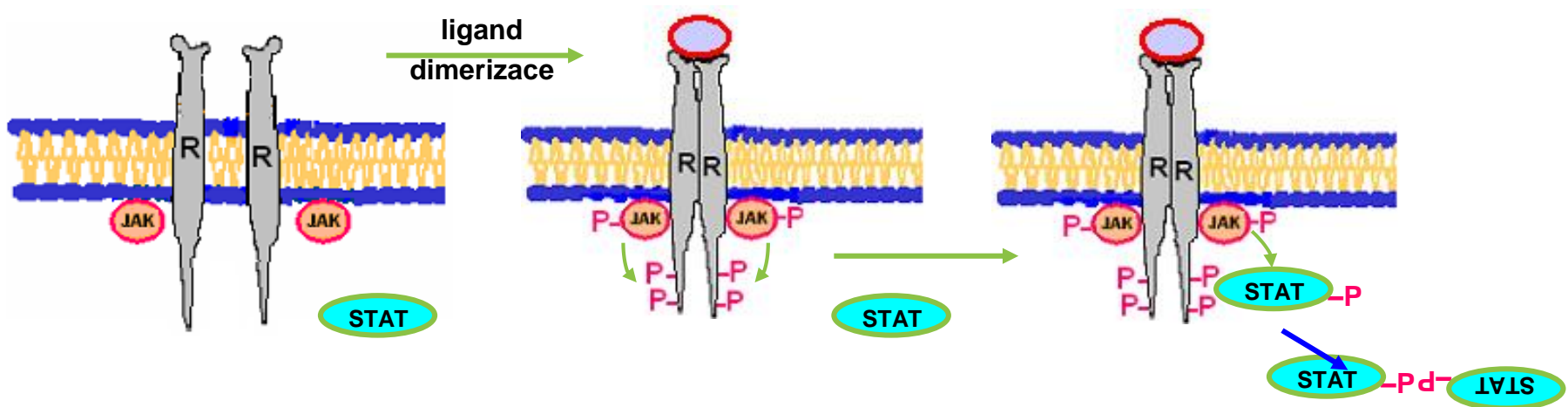
Fosforylovaná partnerská podjednotka fosforyluje cytoplazmatické proteiny SMAD

Proteiny SMAD se fosforylací aktivují a vytváří dimery s dalšími SMAD proteiny

Translokace do jádra, kde interagují s dalšími regulačními proteiny

# IV. Receptory aktivující nereceptorové tyrosinkinázy

JAK-STAT receptory (Janus Kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription)



Receptor nemá kinasovou aktivitu, ale je asociován s tyrosinkinásou JAK.

Po navázání ligandu receptory dimerizují (homodimery nebo heterodimery)

Aktivované JAKs fosforylují tyrosinové zbytky na receptoru.

Na fosforylovaná místa se vážou adaptorové proteiny STAT (pomocí SH2 domény)

STAT jsou fosforylovány a dimerizují.

Dimery STAT translokují do jádra, kde působí jako transkripční faktory

# JAK-STAT receptory – rodina receptorů pro \*cytokiny (např.interferony, interleukiny)

Různorodé účinky cytokinů jsou způsobeny existencí velkého množství STAT proteinů

Receptory pro různé cytokiny vážou různé STAT, které vytváří heterodimery v různých kombinacích

Tak je umožněno, že různé cytokiny ovlivňují různé geny

Receptory kooperující s JAK-STAT mají také prolaktin, erythropoetin ad.

\*Cytokiny – malé signální proteiny, účastníci se významně imunitní odpovědi. Jsou produkovány buňkami imunitního systému (makrofágy, T-lymfocyty atd.) a jsou schopné navodit například rychlé dělení a diferenciaci určitých typů buněk, které se účastní boje proti patogenům a další rysy imunitní obrany

# Regulace membránových receptorů

Regulace změnou počtu receptorů  
(down regulace, up regulace)

Regulace vlastnosti  
receptoru (desenzitizace)

## Př.: desenzitizace $\beta$ - adrenergního receptoru

Po navázání ligandu na receptor se aktivuje BARK ( $\beta$ -adrenergní receptor kinasa)

V cytoplazmatické části receptorové molekuly dochází k fosforylaci

Na fosforylované místo se váže bílkovina arrestin, který inhibuje schopnost aktivovat G-protein



## Přehled receptorů nejvýznamnějších neurotransmiterů

### Cholinergní synapse

Receptor	Nikotinový	Muskarinové	
Mechanismus účinku	Iontový kanál	M <sub>1</sub> , M <sub>3</sub> , M <sub>5</sub> G <sub>q</sub>	M <sub>2</sub> , M <sub>4</sub> G <sub>i</sub>
Druhý posel	-	DG + IP <sub>3</sub>	cAMP
Výskyt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• neurony autonomních ganglií,</li> <li>• nervosvalová ploténka,</li> <li>• chromafinní buňky dřene nadledvin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mozek,</li> <li>• hladký sval,</li> <li>• žlazové buňky</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• myokard,</li> <li>• mozek</li> </ul>
Blok receptoru	tubokurarin	atropin	

# Receptory nejvýznamnějších neurotransmiterů

Iontové kanály (ROC)	Receptory kooperující s G-proteiny		
	Gs (vzestup cAMP)	Gi (pokles cAMP)	Gq (vzestup IP3 /DG)
<u>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup></u> – acetylcholinový nikotinový	–	acetylcholinové muskarinové M2,4	acetylcholinové <b>muskarinové M1,3,5</b>
–	<b>adrenergní β1,β2,β3</b>	<b>adrenergní α2</b>	<b>adrenergní α1</b>
<u>Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup></u> – glutamátové ionofory	–	glutamátové mGluR skupiny II a III	glutamátové mGluR skupiny I
–	dopaminové D1,5	dopaminové D3,4	dopaminové D2
– serotoninový 5-HT3	serotoninové 5-HT4,6	serotoninový 5-HT1	serotoninové 5-HT2
–	histaminový H2	histaminové H3,4	histaminový H1
–	–	–	tachykininový NK1 pro substanci P
<u>Cl<sup>-</sup></u> – GABAA – glycinový	GABAB (metabotropní)	–	–

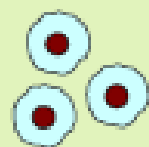
## Adrenergní synapse

Receptor	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$
G-protein	$G_q$	$G_i$	$G_s$	
Druhý posel	DG + IP <sub>3</sub>	cAMP	cAMP	
Příklady výskytu	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hladké svalstvo GIT (sfinktery) a cév kůže (kontrakce)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• adrenergní a cholinergní nervové zakončení (inhibice uvolnění přenašeče)</li> <li>• pankreas (inhibice exokrinní sekrece)</li> <li>• trombocyty (agregace)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• myokard (zvýšení síly a frekvence stahů)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hladké svalstvo dělohy, bronchů (relaxace)</li> <li>• hladké svalstvo GIT (peristaltika)</li> <li>• pankreas (aktivace exokrinní sekrece)</li> </ul>

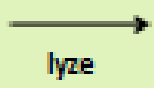
## Působení neurotransmiterů v autonomním nervovém systému

Systém	Parasympatikus		Sympatikus		
	Acetylcholin		Acetylcholin		Noradrenalin
Mediátor	Acetylcholin		Acetylcholin		Noradrenalin
Receptor	nikotinový	muskarinový	nikotinový	muskarinový	$\beta_1, \beta_2, \alpha_2, \alpha_1$
Lokalizace	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dendrity neuronů ganglií</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• membrány cílových buněk</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• chromafinní buňky dřeně nadledvin</li> <li>• dendrity neuronů ganglií</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• potní žlázy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• membrány cílových buněk</li> </ul>

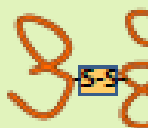
## PŘÍPRAVA VZORKU



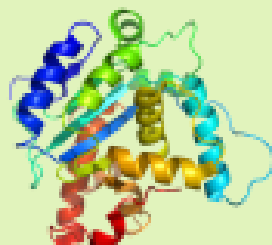
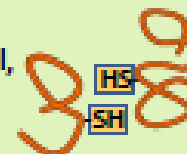
buňky,  
tkáň



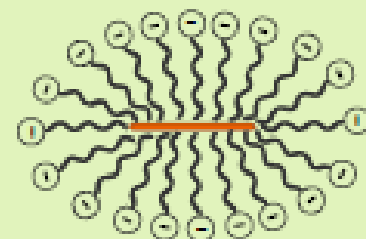
lyze



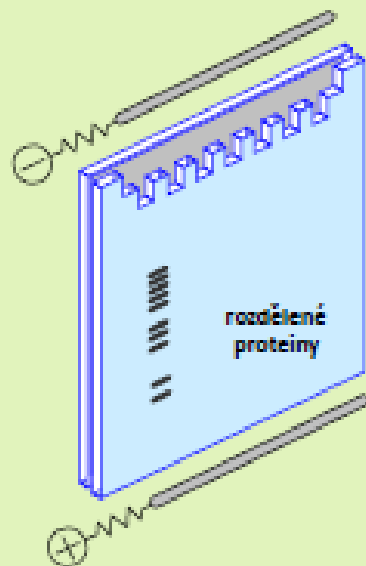
redukční činidlo  
(např.  $\beta$ -merkaptoethanol,  
dithiotreitol)



SDS  
tepelná denaturace v  
přítomnosti SDS

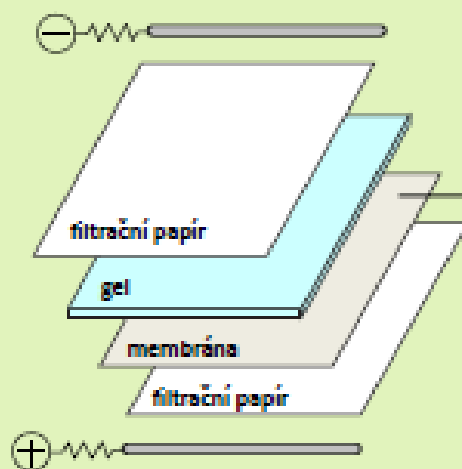


## SDS-PAGE



rozdělené  
proteiny

## TRANSFER PROTEINŮ NA MEMBRÁNU



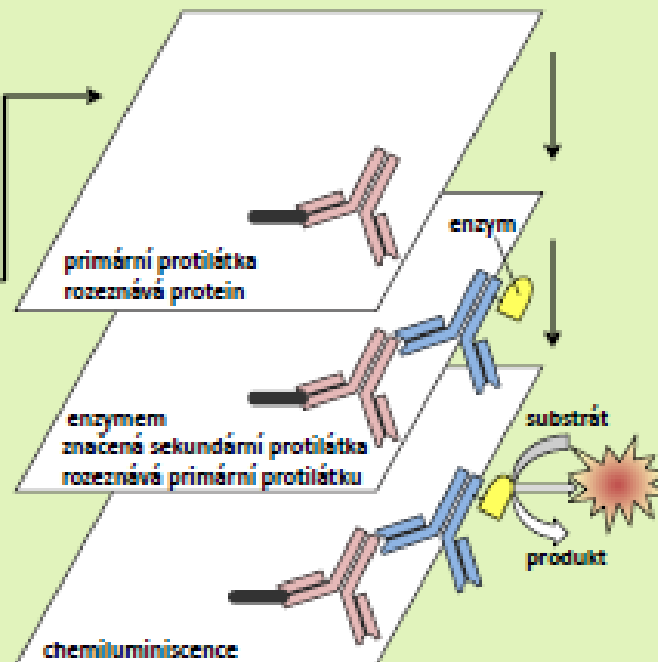
filtrační papír

gel

membrána

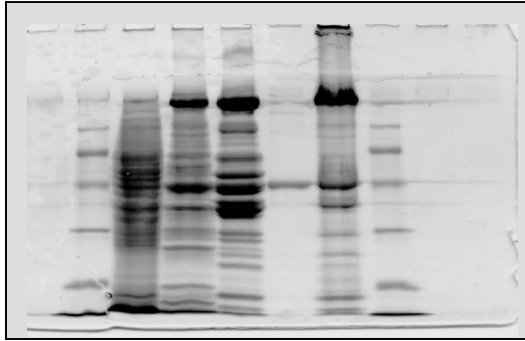
filtrační papír

## IMUNODETEKCE



# Imunodetekce konkrétního proteinu

Proteinová elektroforéza (SDS-PAGE)



Přenos proteinů z gelu na membránu

= Western blot



Detekce proteinu protilátkami

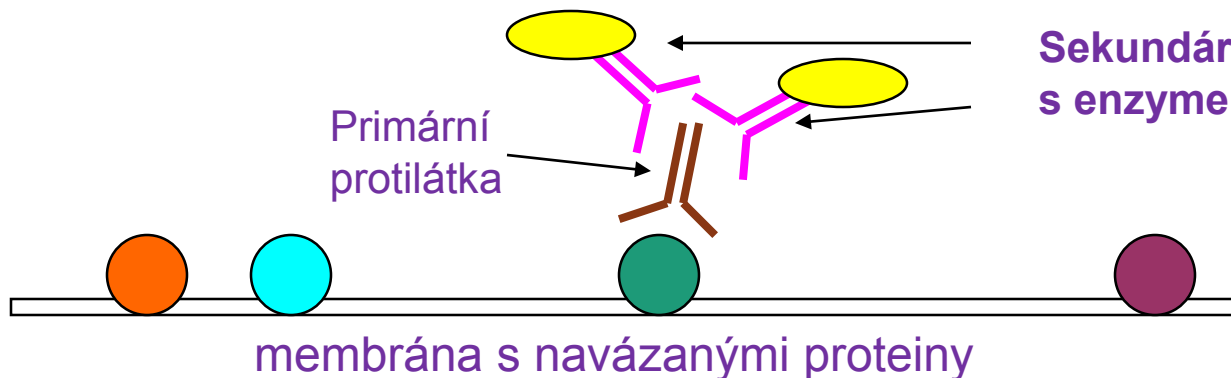
(**primární** = rozeznává detekovaný protein  
**sekundární** = rozeznává protilátky z určitého organismu)



W. blot



Vizualizace pomocí barevné reakce, fluorescence či chemiluminiscence

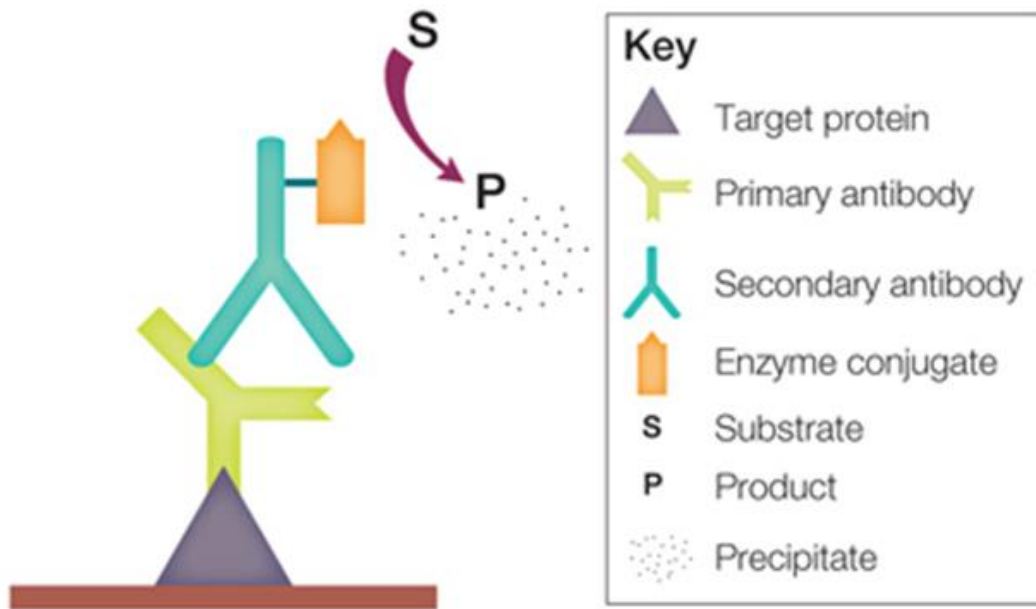


# Cvičení č. 1: *Imunochemická detekce proteinu p53 na nitrocelulosoové membráně (dot blot)*

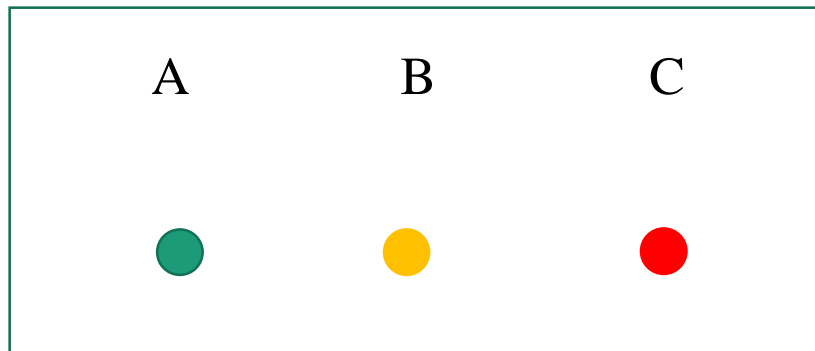
**Dot blot** je zjednodušenou alternativou k western blotu a slouží pro detekci a identifikaci proteinů. Na rozdíl od western blotu nedochází k elektroforetické separaci, nelze tedy určit velikost cílového proteinu, můžeme však přítomnost daného proteinu potvrdit – v našem případě p53. Kapka vzorku je nanesena přímo na nitrocelulosoovou membránu, kde je následně protein zájmu imunochemicky detekován.

Principem imunochemické detekce je využití reakce **antigen-protilátka**. **Antigeny** jsou látky, které organismus rozpoznává jako cizorodé. Jejich přítomnost stimuluje tvorbu protilátek. Každý antigen obsahuje **antigenní determinanty (epitopy)** tvořené 5-8 aminokyselinami. Schopnost protilátek rozlišovat i malé rozdíly epitopů je základem specifity imunitních reakcí.

Protilátky jsou charakterizovány **afinitou – síla vazby protilátky s jednou vazebnou determinantou antigenu**, **aviditou – síla vazby mezi protilátkou a celou molekulou antigenu** (většina antigenů je multivalentních, tzn. má více vazebných determinant pro různé protilátky) a **specifitou** – protilátky jeví minimální interferenci s látkami, pro které není protilátka určena. Protilátky mohou být polyklonální či monoklonální.



### *Analýza neznámého vzorku*



Vzorky

Wild type p53  
 Mutantní p53  
 Voda











# Hormonální systém

## Hormony

- látky s výraznými regulačními účinky, řídí, indukují, potlačují enzymy
- K cílovým orgánům krví a tkáňovým mokem, mízou
- Buňka musí mít receptor na příjem hormonu (působí jen na určité orgány a tkáně), jeden signál může spustit více reakcí, různé buňky odpovídají různě, na buňku působí více hormonů

Hormony jsou endogenní, telu vlastní látky produkované specializovanými bunkami a jimi vylučované do okolí.

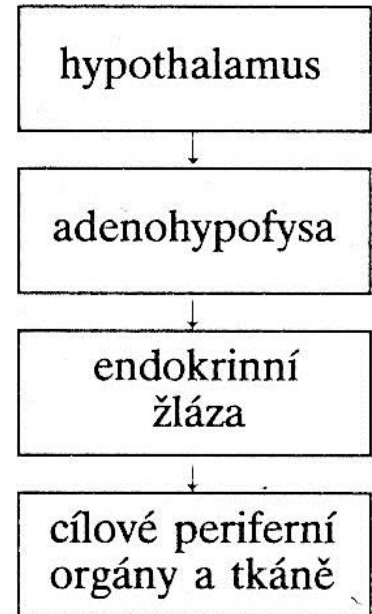
Parahormony, tkánové hormony – nejsou tvoreny specializovanými bunkami – histamin, kininy, prostaglandiny

# Neurohormonální regulace

- Systém hormonální regulace, spojen s nervovým systémem, CNS ovlivňuje (hypofýza), proto neurohormonální regulace
- Adenohypofýza (přední lalok hypofýzy) + hypotalamus – regulují, kontrolují činnost hormonů

Hypotalamus pod vlivem vyšších mozkových center produkuje hypotalamické faktory (stimulační = liberiny, inhibiční = statiny), krví jdou do adenohypofýzy, ovlivňují vylučování tropních hormonů z adenohypofýzy, ty ovlivňují žlázy s vnitřní sekrecí

- Hormonální regulace relativně pomalá regulace (sekundy až dny), nervová regulace rychlá



# Typy hormonů

## Chemické typy endokrinních hormonů:

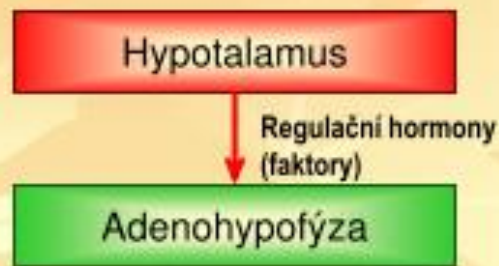
- Peptidy, bílkoviny (hypofýza, slinivka břišní, příštítná tělíska, tkáňové hormony)
- Deriváty tyrosinu (dřeň nadledvin, štítná žláza)
- Steroidy (kůra nadledvin a pohlavní žlázy)
- Lokální mediátory, parakrinní hormony, tkáňové hormony - histamin, serotonin, oxid dusný, epidermální růstový faktor, sekretin, erythropoetin

### Podle chemické povahy

- Peptidy
- Nízkomolekulární hormony odvozené od modifikovaných AMK
- Steroidy
- prostanoidy

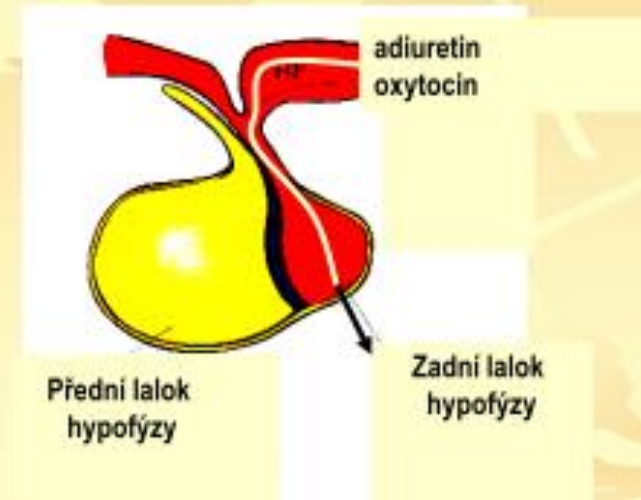
# Endokrinní systémy

- Hypotalamus
- Hypofýza
- Štítná žláza
- Příštítná tělíska
- Kůra nadledvin
- Dřeň nadledvin
- Gonády

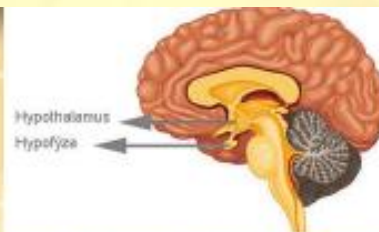


- zesilují
  - zeslabují
- } produkci adenohypofýzy

V hypothalamu se produkují i hormony, které cestují stopkou hypofýzy do zadního laloku, ze kterého se vylučují - **adiuretin** (reguluje vodní hospodářství) a **oxitocin** (reguluje stahy děložního svalstva)



## Hypotalamus



**Příčiny poruch:** tumor, trauma, kongenitální změny, poruchy prokrvení

- **hypotalamický hypopituitarismus** = snížení všech hormonů hypofýzy, kromě prolaktinu
  - porucha sexuálního vyžívání, případně porucha spermatogeneze a menstruačního cyklu
  - snížená odpověď na zátěž (stres)
  - hypotyreóza
  - poruchy růstu
  - galactorhea (nadbytek PRL)
  - diabetes insipidus
- **hypotalamická hypotyreóza**
- **Kallmanův syndrom** (izolovaný deficit gonadotropinů a GHRH)



# Hypofýza - zadní lalok

## ■ ADH

- řízení osmolality, metabolismus vody (zpětná resorpce volné vody)
- řízení krevního tlaku (vazokonstrikce)
- stimuluje činnost Na/K pumpy

Poruchy: SIADH, diabetes insipidus

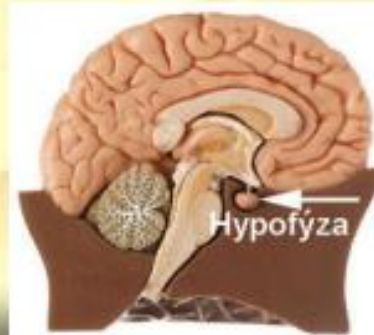
## ■ Oxytocin

- vyvolává kontrakce dělohy na konci gravidity
- po porodu způsobuje ejekci mléka (kontrakcí vývodů mléčných žláz)
- pravděpodobně má vliv na vývoj mateřského chování u všech savců včetně člověka
- vliv na chování ve stresu

Poruchy: nebyly popsány

# Hypofýza - přední lalok

- hormony přímo řídící cílovou tkáň: STH, PRL
- hormony glandotropní (řídí sekreci cílových žláz): ACTH, TSH, FSH, LH

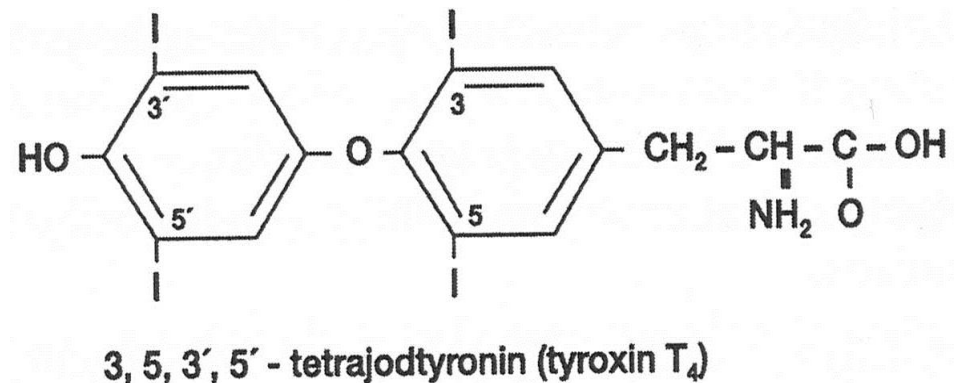
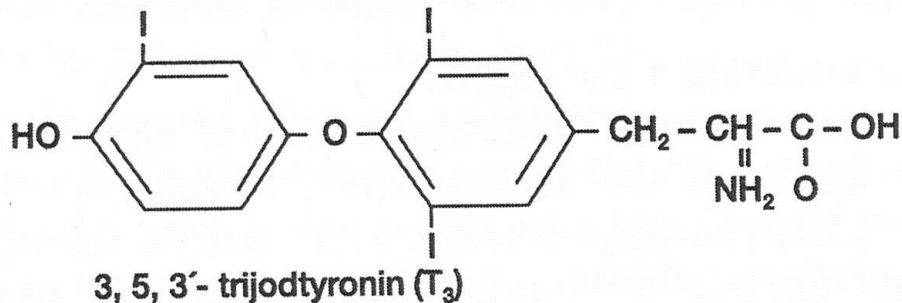


# Štítná žláza(1,2) a příštítná tělíska(3)

1. **Thyroxin (tetrajodthyronin)** – růst a vývoj mladého organismu, nedostatkem kretenismus. Povzbuzuje látkovou přeměnu živin, podporuje tvorbu oxidoreduktas.
2. **Kalcitonin** – 32 AMK snižuje hladinu vápníku v krvi, podporuje ukládání v kostech, význam hlavně při růstu a v těhotenství
3. **Parathormon** – 84 AMK, vplyvování Ca a P z kostí, zvyšuje hladinu Ca a P v krvi

## Hormony štítné žlázy

- jsou peptidové povahy, ale navázaný iont jodu mění jejich chemické vlastnosti
  - tvoří se jako součást velké proteinové molekuly thyreoglobulinu
  - uchovávání extracelulárně ve folikulech v podobě thyreoglobulinu, uvolňování podle potřeby
  - transport ve vazbě na bílkoviny (specifické i albumin)
  - receptory v buněčném jádře
  - po vazbě na receptor spouští transkripci DNA



# Slinivka břišní - pankreas

Žláza s vnitřní (Langerhansenovy ostrůvky – endokrinní fce) a vnější sekrecí (trávicí enzymy)

4. Inzulín – 21 AMK – regulátor metabolismu sacharidů a bílkovin – podporuje vstřebávání glukosy do buněk, oxidaci glukosy. Nedostatek cukrovka – vysoká koncentrace cukru v krvi.
5. Glukagon – 29 AMK – antagonist inzulínu, opačné účinky. Podporuje rozklad glykogenu v játrech a ve svalech, zvýšení množství v krvi.

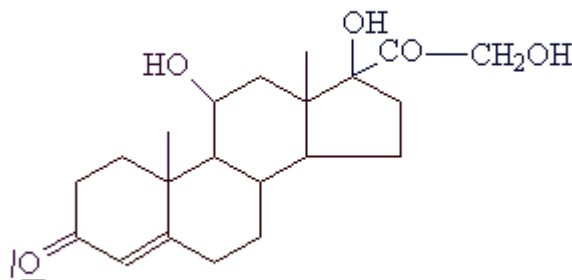
# Kůra nadledvin

Mnoho hormonů - kortikoidy, steroidní povahy, různý význam

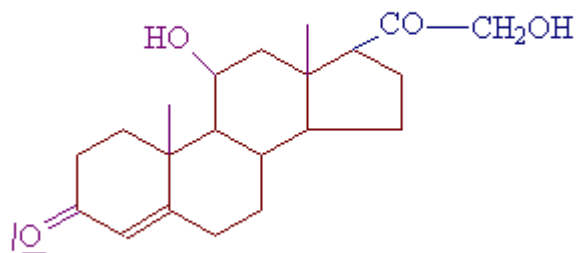
6. Glukokortikoidy regulují katabolické děje, rozklad bílkovin, tuků, využití energie. Například kortisol – katabolický hormon, význam při zátěži a hladovění.

7. Mineralokortikoidy – hospodaření s vodou a minerály. Například aldosteron.

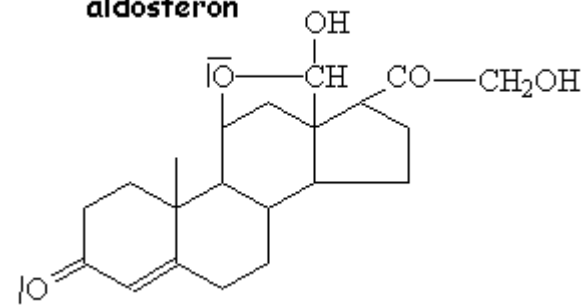
kortisol



kortikosteron



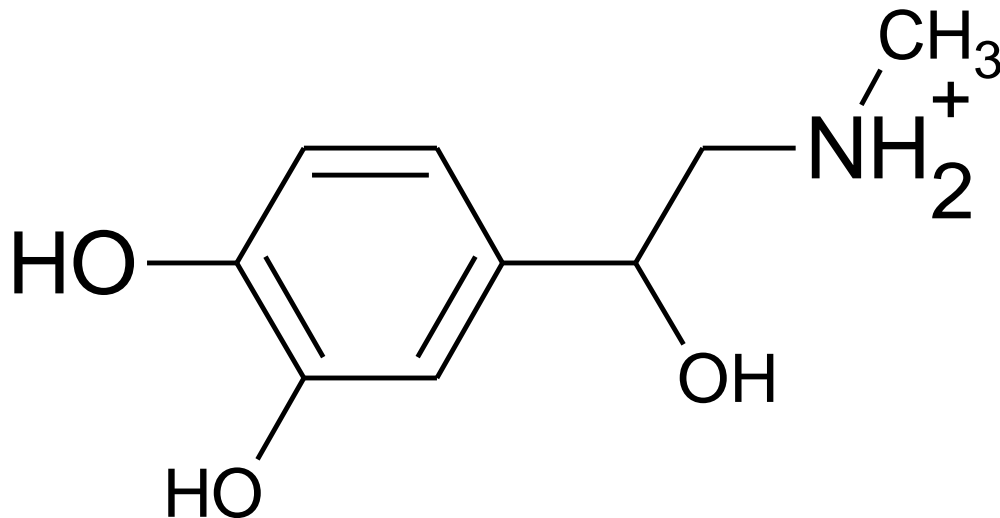
aldosteron



# Dřeň nadledvin

Více hormonů (např. noradrenalin), z tyrosinu

8. Adrenalin – podpora odbourávání glykogenu v játrech a svalech, zvyšuje hladinu glukosy v krvi, zvyšuje krevní tlak. Vyplavování při námaze a vzrušení.

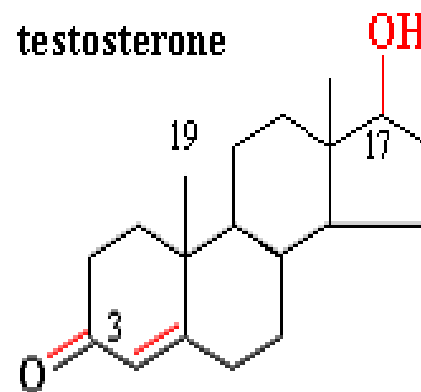
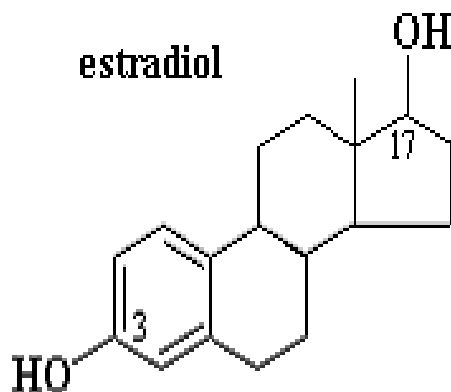
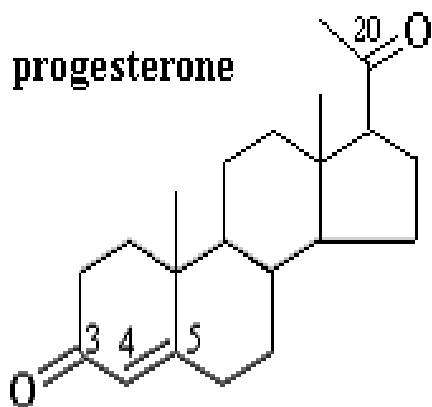


# Pohlavní žlázy

Steroidní látky, varlata a vaječníky (v těhotenství placenta – např. chorioganodotropin – těhotenské testy)

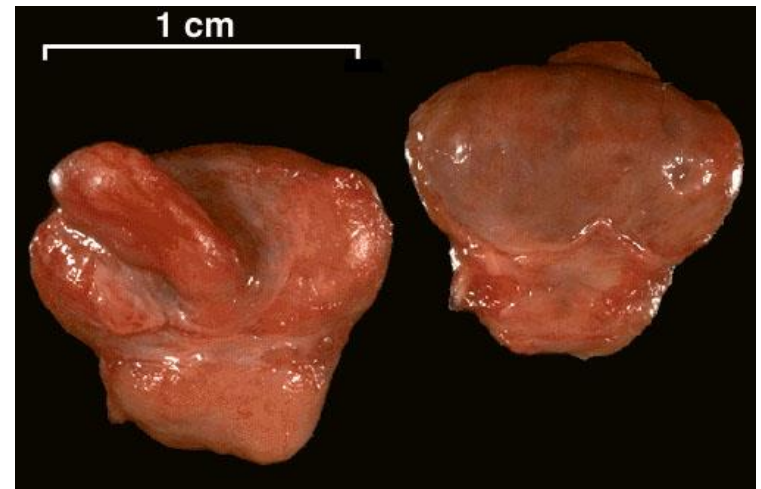
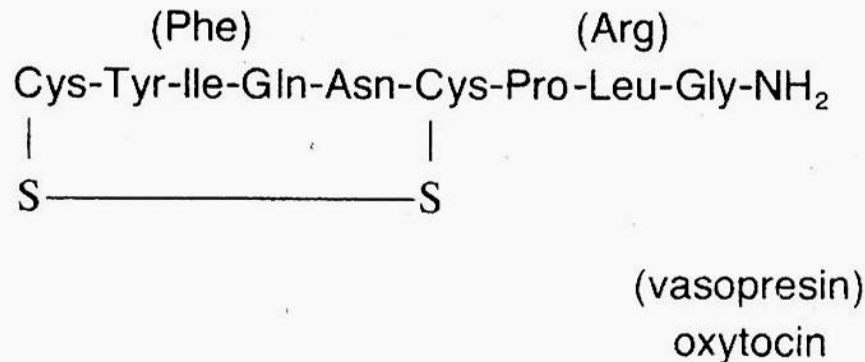
9. Testosteron – funkce pohlavních orgánů, vznik sekundárních pohlavních znaků, tvorba spermií, syntéza bílkovin
10. Estrogeny – průběh menstruace, vývoj pohlavních orgánů, distribuce podkožního tuku – vaječníky, placenta
11. Progesteron – těhotenství - vaječníky, placenta

Imunochemické stanovení koncentrace hCG v krvi nebo moči se uplatňuje především v diagnostice těhotenství a sledování jeho průběhu. Již několik dní po oplodnění dochází ke zvýšení koncentrace hCG v krvi matky natolik, že toto zvýšení lze stanovit. HCG je nezbytný pro udržení žlutého tělíska v prvních 4 až 6 týdnech těhotenství a tedy i pro úspěšný průběh těhotenství. Abnormálně nízké hodnoty koncentrace hCG signalizují zvýšenou pravděpodobnost spontánního potratu. Naopak zvýšené hodnoty koncentrace hCG signalizují vícečetné těhotenství.

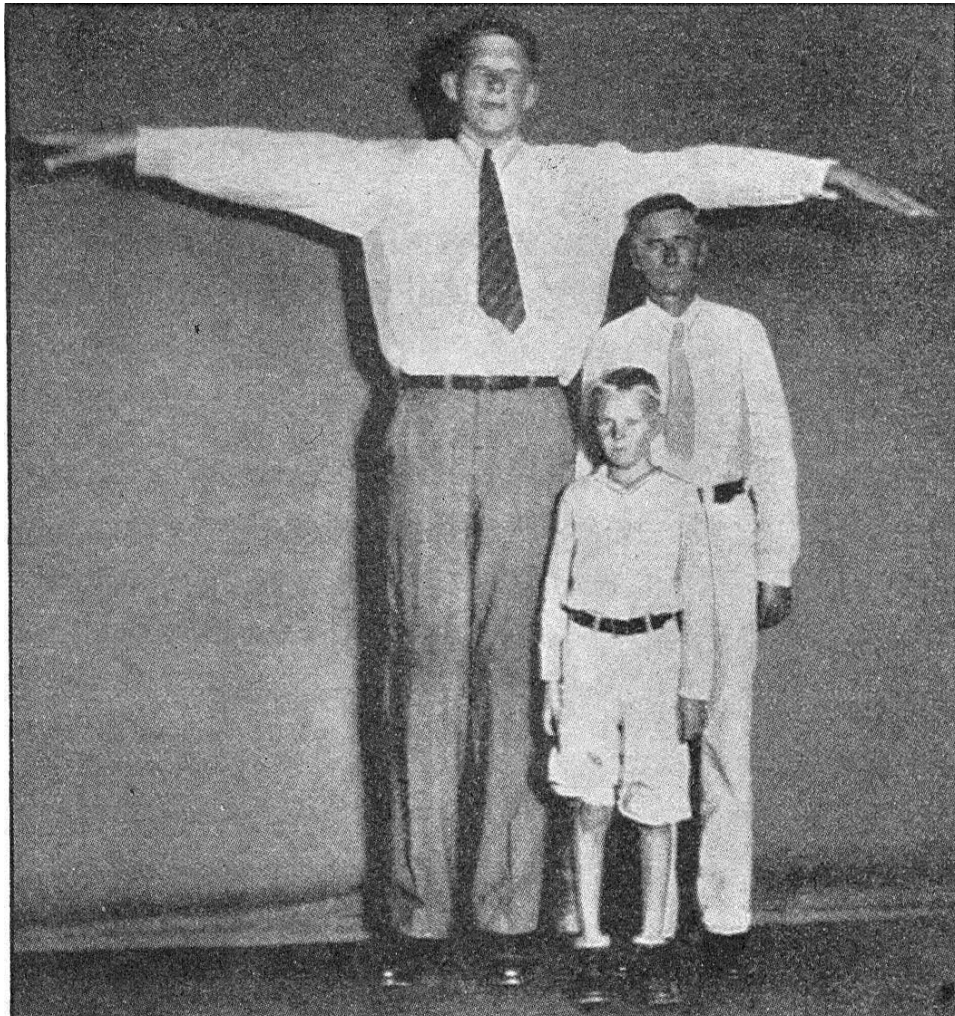


# Neurohypofýza – zadní lalok podvěšku mozkového

- 12. Oxytocin - 9 AMK – kontrakce hladkého svalstva dělohy při porodu a koitu, činnost mléčných žláz
- 13. Antidiuretický hormon, vasopresin – 9 AMK – resorpce vody z moči, zvyšuje krevní tlak. Vyplavování podporuje horko, útlum alkoholem a chladem



# Adenohypofýza



Hypofysární gigantismus. Třináctiletý obr se svým otcem a 9letým bratrem. (Behrens a Barr, Endocrinology, 1932, str. 120.)

Přední lalok, dirigent hormonů, podléhá hypotalamu ( vylučuje hypotalamické faktory – bílkoviny, transportovány do adenohypofýzy)

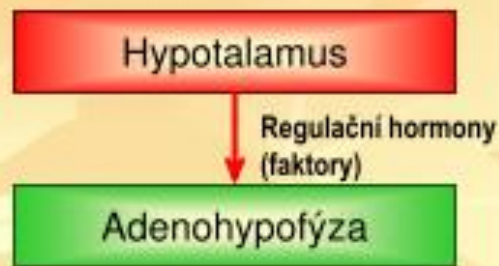
14. Tropní hormony – řídí ostatní žlázy, např.

kortikotropin ( 39 AMK - *H-S-Y-S-M-E-H-F-R-W-G-K-P-V-G-K-P-V-G-K-K-R-R-P-V-K-V-Y-P-N-G-A-E-D-E-S-A-E-A-F-P-L-E-F-OH* ),

gonadotropiny (90 až 120 AMK)

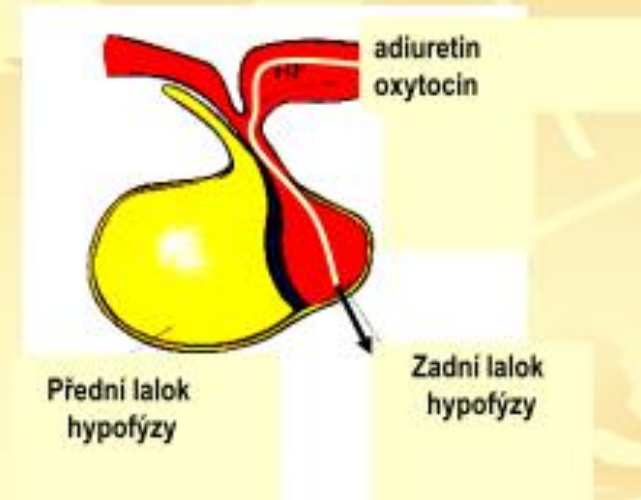
15. Somatotropin (191 AMK) – tvorba bílkovin, dříve růstový hormon



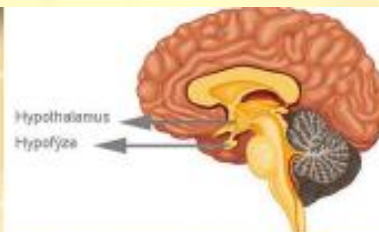


- zesilují
  - zeslabují
- } produkci adenohypofýzy

V hypotalamu se produkují i hormony, které cestují stopkou hypofýzy do zadního laloku, ze kterého se vylučují - **adiuretin** (reguluje vodní hospodářství) a **oxitocin** (reguluje stahy děložního svalstva)



## Hypotalamus



**Příčiny poruch:** tumor, trauma, kongenitální změny, poruchy prokrvení

- **hypotalamický hypopituitarismus** = snížení všech hormonů hypofýzy, kromě prolaktinu
  - porucha sexuálního vyžívání, případně porucha spermatogeneze a menstruačního cyklu
  - snížená odpověď na zátěž (stres)
  - hypotyreóza
  - poruchy růstu
  - galactorhea (nadbytek PRL)
  - diabetes insipidus
- **hypotalamická hypotyreóza**
- **Kallmanův syndrom** (izolovaný deficit gonadotropinů a GHRH)

# Hypofýza - zadní lalok

## ■ ADH

- řízení osmolality, metabolismus vody (zpětná resorpce volné vody)
- řízení krevního tlaku (vazokonstrikce)
- stimuluje činnost Na/K pumpy

Poruchy: SIADH, diabetes insipidus

## ■ Oxytocin

- vyvolává kontrakce dělohy na konci gravidity
- po porodu způsobuje ejekci mléka (kontrakcí vývodů mléčných žláz)
- pravděpodobně má vliv na vývoj mateřského chování u všech savců včetně člověka
- vliv na chování ve stresu

Poruchy: nebyly popsány

# Hypofýza - přední lalok

- hormony přímo řídící cílovou tkáň: STH, PRL
- hormony glandotropní (řídí sekreci cílových žláz): ACTH, TSH, FSH, LH

