

# Biologie rostlinné buňky



**Oddělení  
experimentální  
biologie rostlin**

## 9. Buněčná signalizace (*Cell signalling*)

- ▶ Časové a prostorové aspekty signalizace
- ▶ Dráha přenosu signálu (*signal transduction pathway*)
- ▶ Signál a odezva na něj
- ▶ Buněčné receptory
- ▶ Intracelulární převod signálu
  - ▶ Intracelulární molekulární spínače
  - ▶ Fosforylace a vazba GTP
- ▶ Zesílení signálu
  - ▶ MAP kinásové kaskády
  - ▶ Druhotní přenašeči (*second messengers*)
- ▶ Hormonální regulace
  - ▶ Fytohormonové receptory
  - ▶ Fytohormonové signální dráhy
    - ▶ Cytokininy, etylén, auxiny, gibereliny
    - ▶ Cross-regulace
- ▶ Světelná odezva zprostředkovaná fytochromy



## Buněčná regulace???

- ▶ *Between stimulus and response there is a space. In that space is our power to choose our response. In our response lies our growth and our freedom. Viktor E. Frankl (1985)*
- ▶ Co se děje v **buňce**, když čelí stochastické nebo plánované změně svého prostředí?
  - ▶ Buňka prochází úpravami, které vedou k řadě změn, od udržování homeostázy až po změny ve vývojovém programu.
  - ▶ Reakce a regulační mechanismy na úrovni buňky jsou relativně rychlé, avšak na úrovni rostliny mohou být extrémně pomalé.
- ▶ Mezi běžné reakce **rostlin** patří osmoregulace, regulace turgoru, pohyb chloroplastů, fototaxe, pohyby listů, gravitropismus, klíčení, kvetení, stárnutí, abscise a procesy spojené s obranou rostlin.



# Časové a prostorové aspekty signalizace

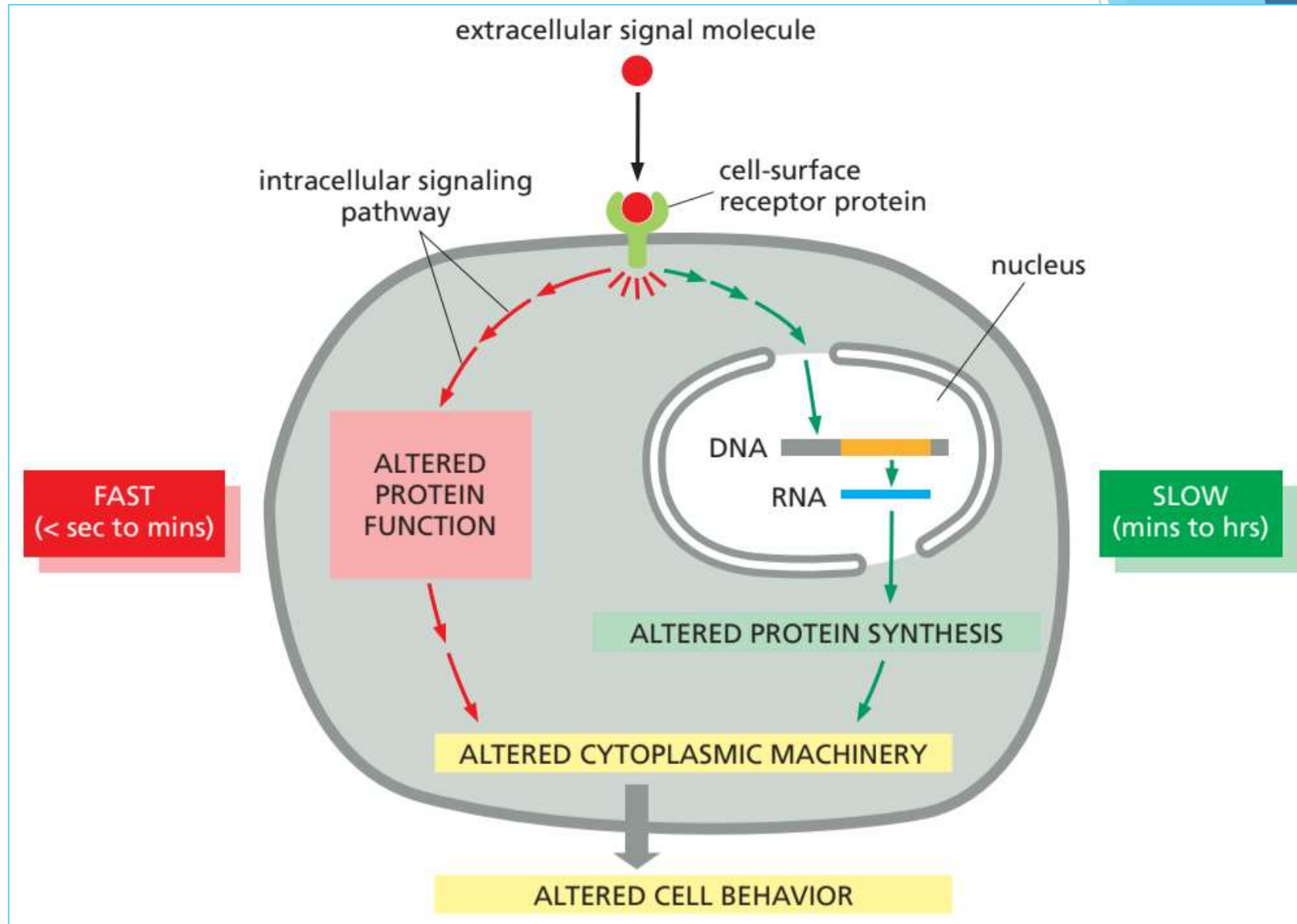


- ▶ Načasování reakcí rostlin na prostředí může být velmi rychlé nebo naopak extrémně pomalé.
- ▶ Reakce rostlin je nejzřetelnější, když sledujeme jejich pohyby...

- ▶ Reakce rostlin se také liší prostorově:
  - ▶ buněčná autonomní reakce
  - ▶ neautonomní reakce

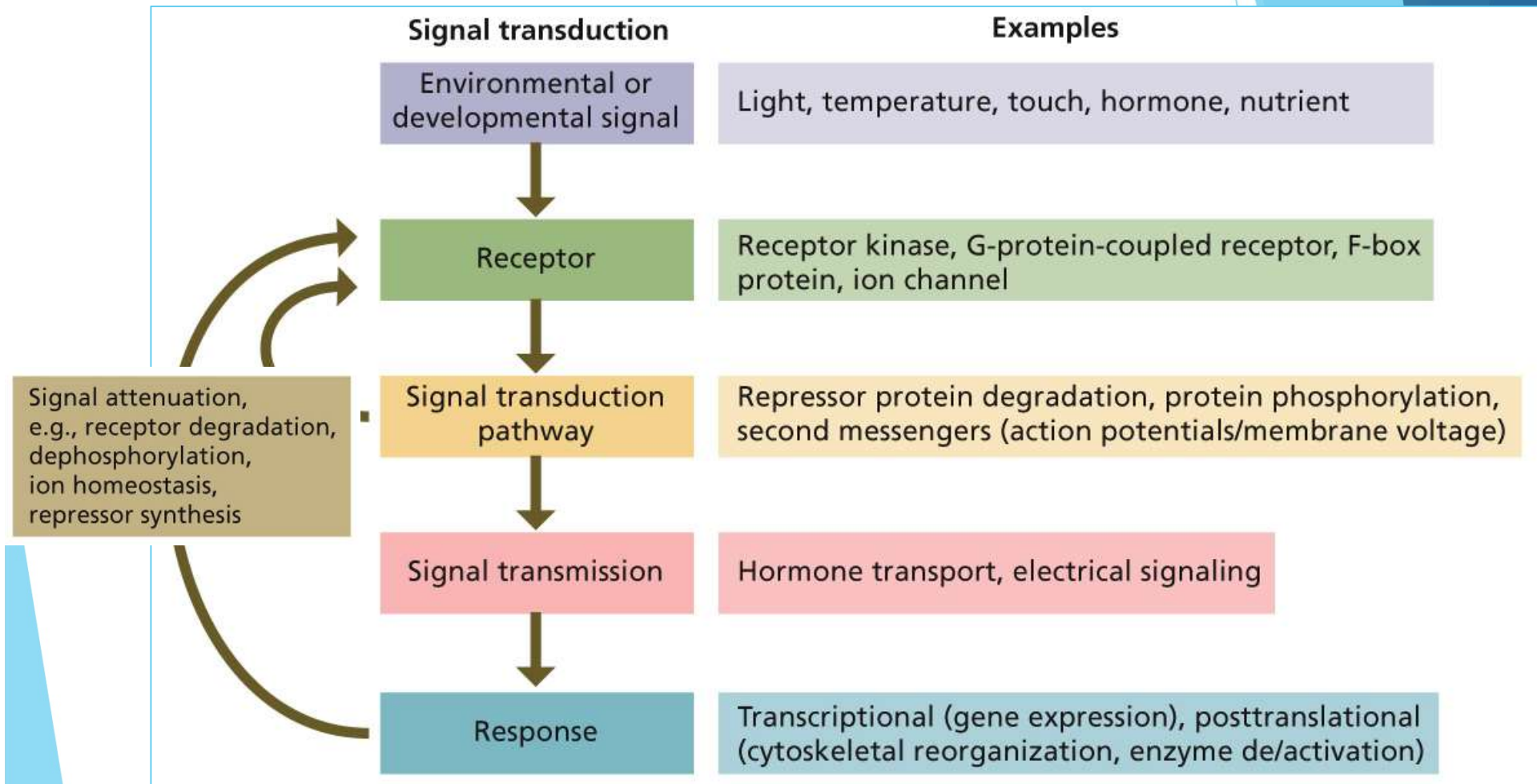


# Pomalé a rychlé reakce na extracelulární signál



# Dráha převodu signálu (*signal transduction pathway*)

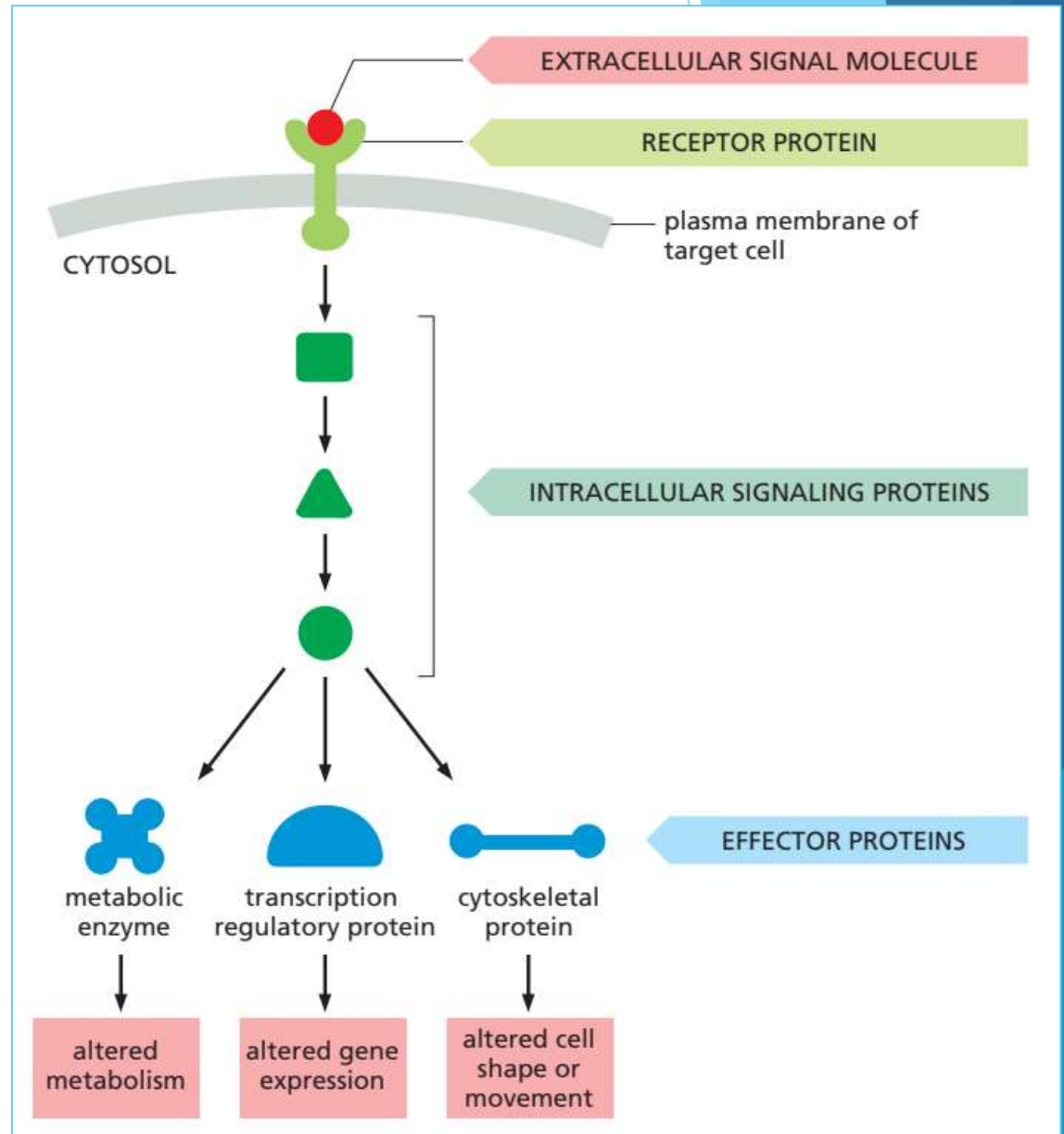
- ▶ Krátkodobé i dlouhodobé fyziologické reakce na vnější a vnitřní signál vznikají transformací (*transdukci*) signálů do mechanistických drah.



- ▶ Souhrn složek zapojených do buněčné signalizace = *signalome*.

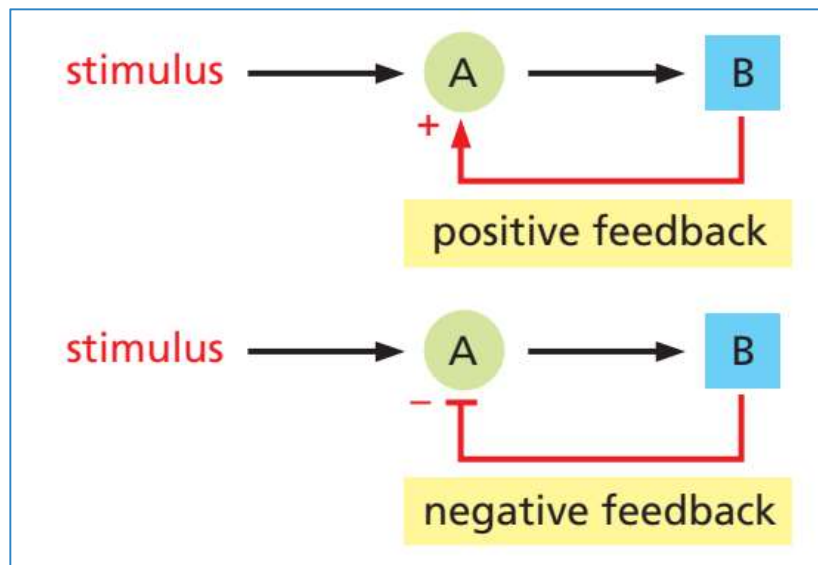
# Dráha převodu signálu (*signal transduction pathway*)

- ▶ 1. Signal (*stimulus*)
- ▶ 2. Receptor
- ▶ 3. Signal transduction
  - ▶ Intracellular signalling
  - ▶ Phosphorylation
  - ▶ GTP binding
- ▶ 4. Signal amplification
  - ▶ MAPK cascades
  - ▶ Secondary messengers
- ▶ 5. Response
  - ▶ Effectors



# 1. Signál a odezva na něj (*stimulus-response coupling*)

- ▶ Stimul může být jakýkoliv environmentální, fyziologický nebo biologický **signál** (např. světlo, gravitace, dotek, teplota, hormony), který vyvolává **změnu v** biofyzikálním, biochemickém, fyziologickém, morfologickém nebo vývojovém **procesu v buňce**.
  - ▶ Stimul nebude mít žádný účinek na buňku, pokud tato buňka nemá vhodný **receptor**.
- ▶ Stimul musí být schopen předat buňce určité množství volné energie, která je větší než *energie tepelného šumu* jinak receptor nebude schopen stimul vnímat.
- ▶ Signály musí být **zesíleny intracelulárně**, aby regulovaly své cílové molekulární mechanismy, pomocí fosforylačních kaskád nebo sekundárních přenašečů.



- ▶ *Pozitivní a negativní zpětná vazba je běžným prvkem v signalizačních systémech.*



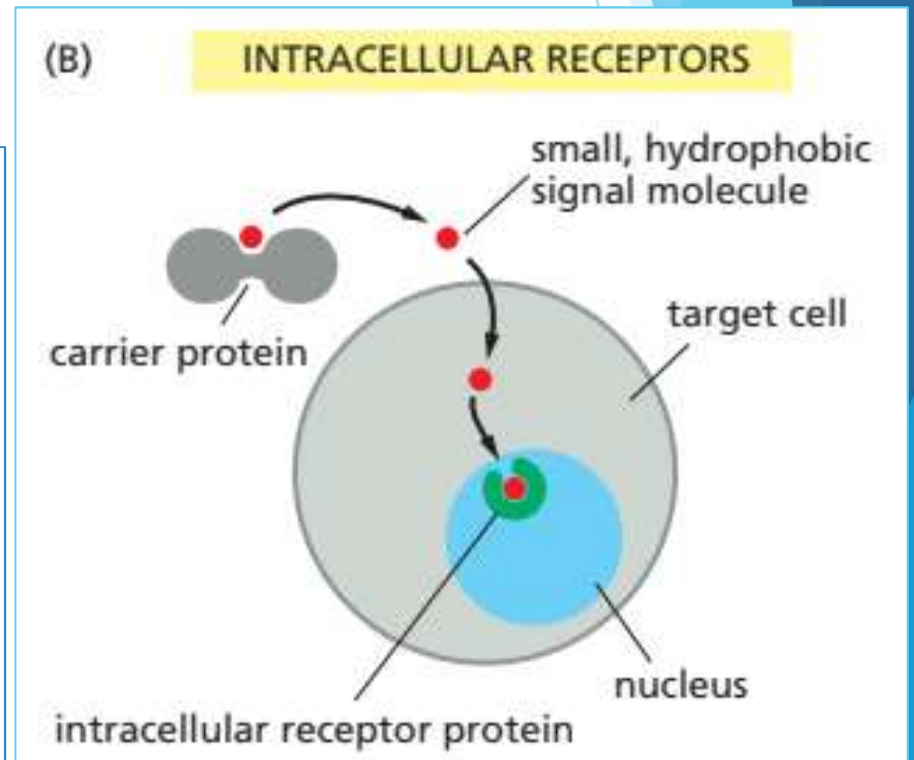
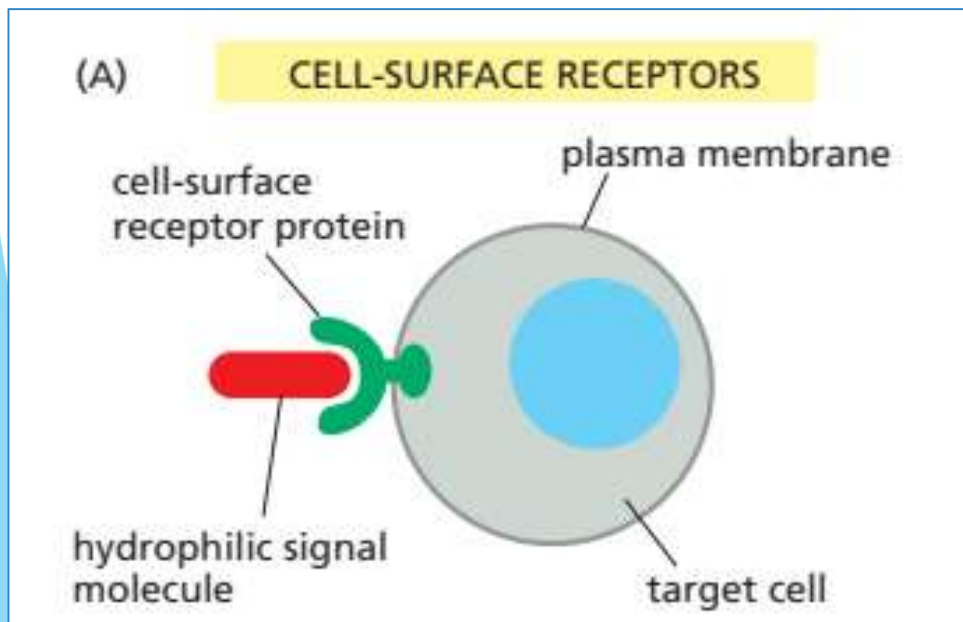
## 2. Buněčné receptory

- ▶ Přítomnost receptorových proteinů poskytuje určitý stupeň selektivity buněk reagujících na stimul.
  - ▶ Schopnost buňky vnímat podnět a reagovat daným způsobem je předurčena genetickým systémem.
- ▶ Receptory jsou přítomny v buňkách bakterií, rostlin, živočichů a hub.

*Vazba extracelulární signální molekuly na*

*(A) buněčné povrchové nebo*

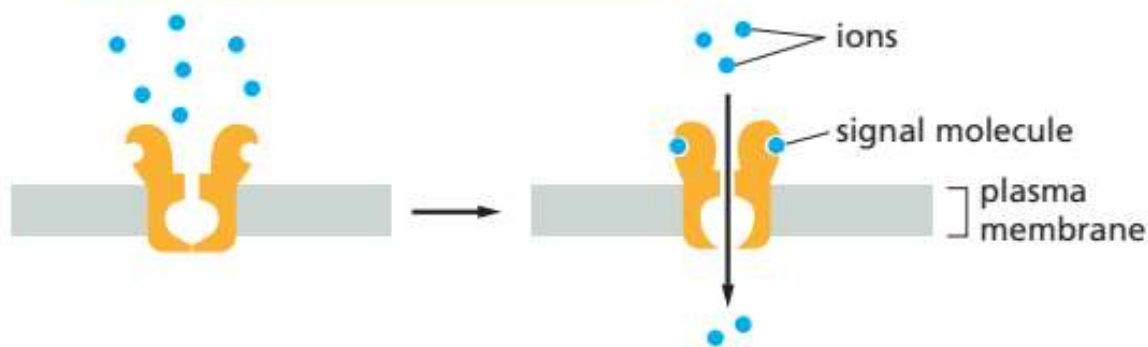
*(B) intracelulární receptory.*



# Tři třídy povrchových buněčných receptorů

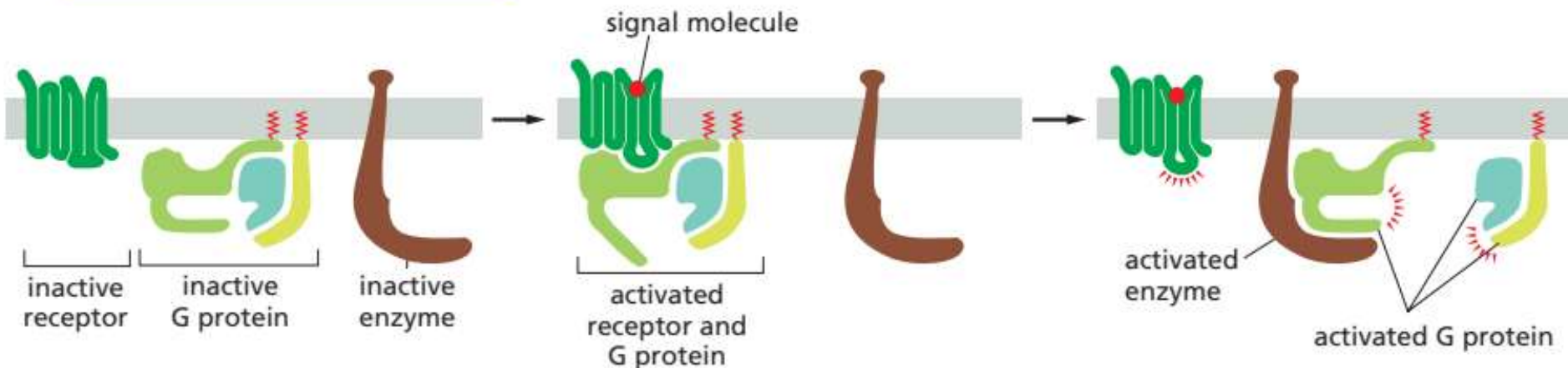
- ▶ U rostlin dosud identifikovány hormonální a jiné chemické receptory (NO, SA)
- ▶ světelné receptory (fytochrom, kryptochrom a fototropin)
- ▶ gravitační receptory...

(A) ION-CHANNEL-COUPLED RECEPTORS



- ▶ např. rhodopsin, zprostředkovává fototaxi a fotofóbní reakce u *Chlamydomonas*; kationty  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  prochází v reakci na světlo.

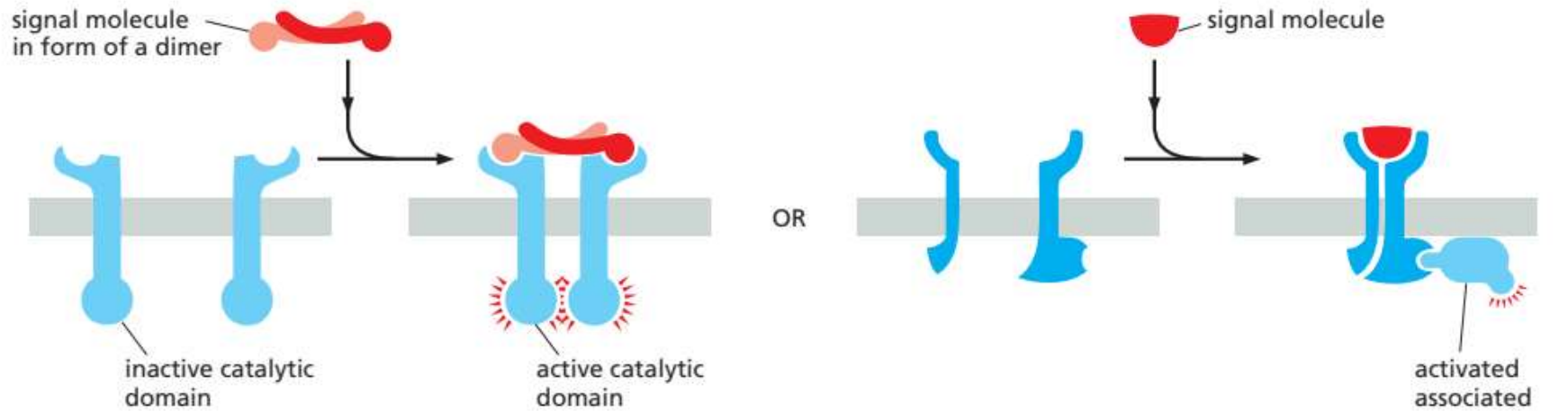
(B) G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS



- ▶ Pouze několik GPCR v rostlinách, hlavně u živočichů

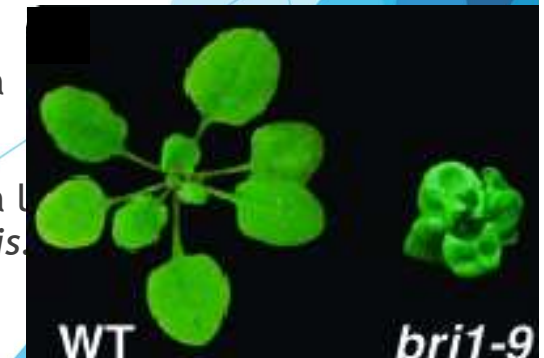
# Enzymově spřažené receptory (*enzyme-coupled r.*)

## (C) ENZYME-COUPLED RECEPTORS



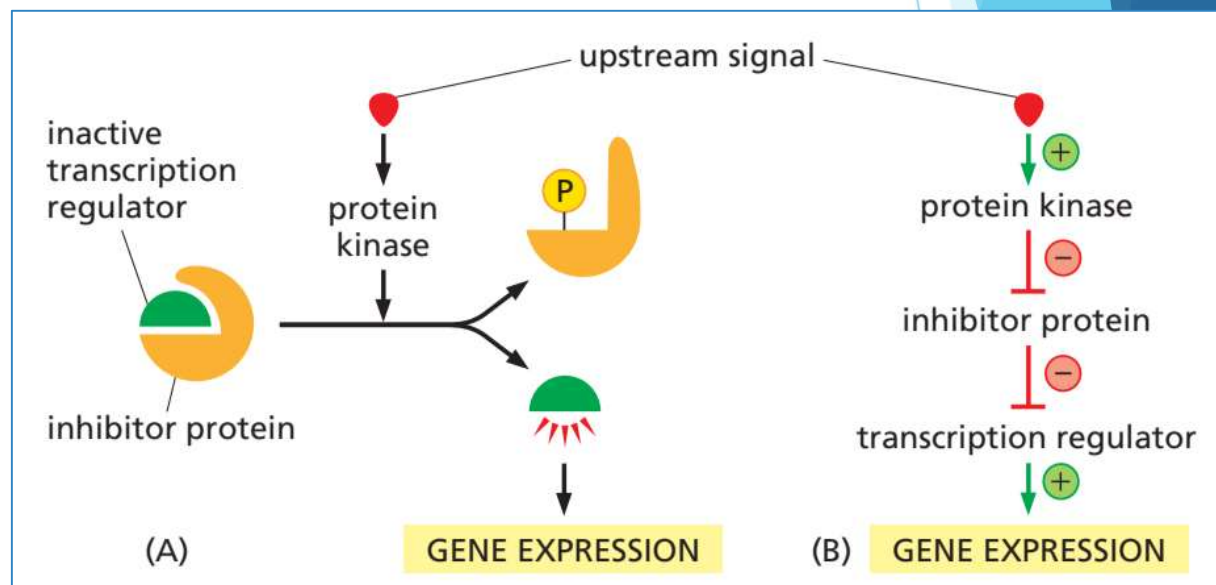
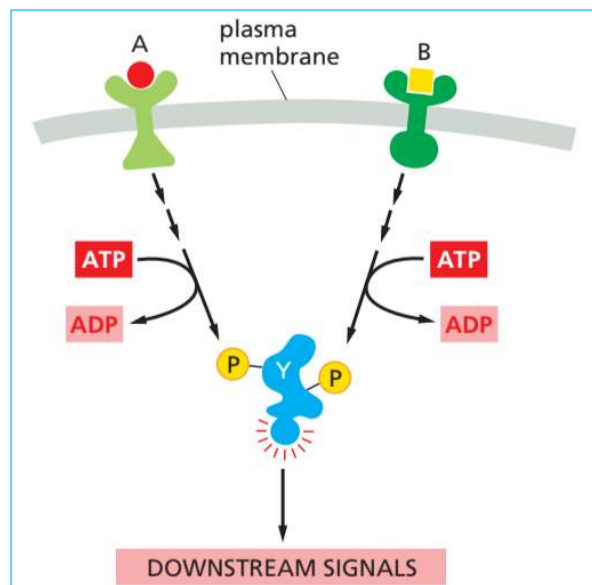
▶ např. fotoreceptor modrého světla (phototropin)

- ▶ Většina receptorů na povrchu rostlinných buněk.
- ▶ Vazba signální molekuly na receptorovou kinázu buněčného povrchu iniciuje *intracelulární signální kaskádu*.
  - ▶ **Receptorová kináza** - protein funguje jako receptor a přenáší tento signál fosforylací jiné molekuly (kináza je enzym, který katalyzuje fosforylaci).
- ▶ Transmembránové receptorové *serin/threoninové kinázy*:
  - ▶ mají typickou serin/threonin kinázovou cytoplazmatickou doménu a extracelulární doménu vázající ligand.
  - ▶ nejhojnější typy mají tandem extracelulárních struktur bohatých na L (leucin rich repetitive repeats LRR kinases), cca 175 v *Arabidopsis*.
  - ▶ např. receptor pro brassinosteroidy (BRI1)



### 3. Intracelulární převod signálu

- ▶ Zpracování signálu může probíhat pomocí **molekulárního spínače** nebo **plynule odstupňované odezvy**.
  - ▶ V nejjednodušším případě buňka je předem naprogramována tak, aby reagovala na jeden podnět jednou odpovědí, jedním spínačem.
  - ▶ Ale mechanismy, buněčné signalizace, jsou složitější a komplikovanější.
  - ▶ Spínače mohou být redundantní, antagonistické, hierarchické nebo sekvenční.
- ▶ **Integrace signálů**
- ▶ **Sekvence dvou inhibičních signálů vytváří pozitivní signál**

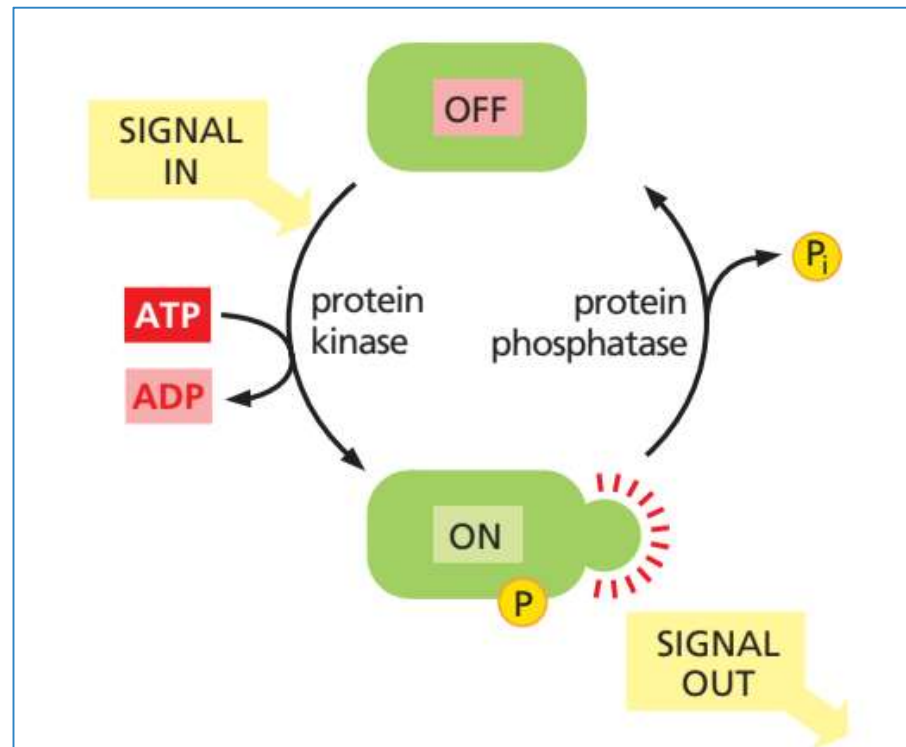


- ▶ Signální dráhy se často překrývají do komplexní signální sítě (*cross regulation*).

# Dva typy intracelulárních signálních proteinů, které fungují jako molekulární spínače:

## ▶ Signalizace fosforylací

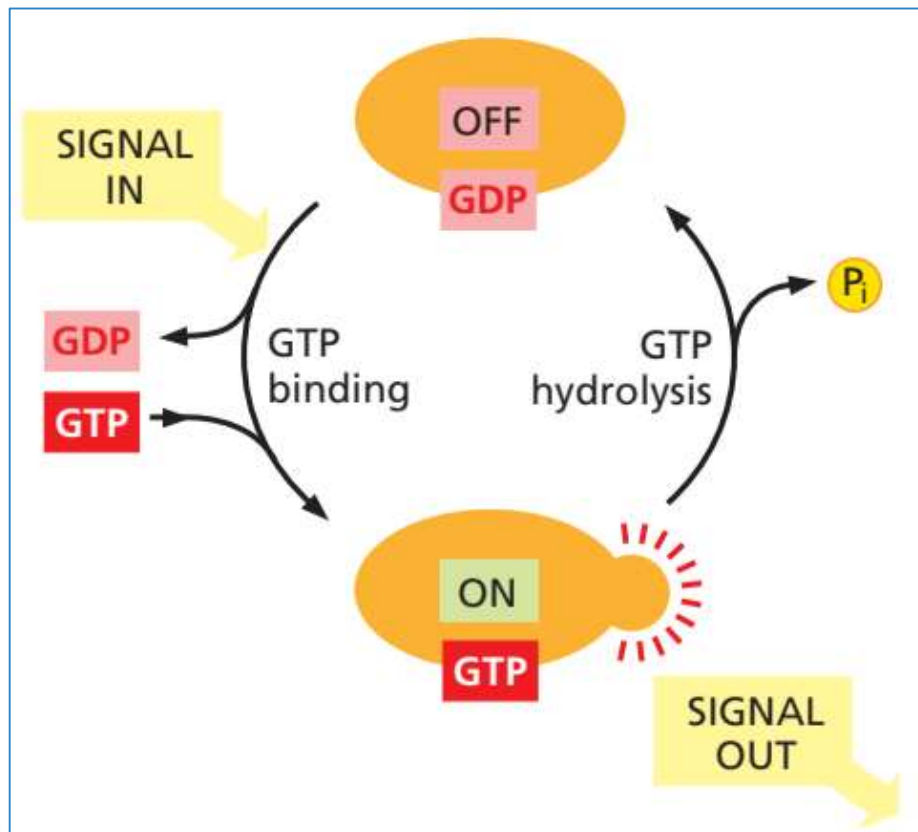
- ▶ *protein kináza* kovalentně připojuje fosfát z ATP k signálnímu proteinu a *protein fosfatáza* jej odstraňuje
- ▶ Mnoho intracelulárních signálních proteinů řízených fosforylací jsou samy protein kinázy a ty jsou často organizovány do *kinázových kaskád*.
- ▶ Mnoho signálních proteinů je aktivováno spíše **defosforylací** než fosforylací!



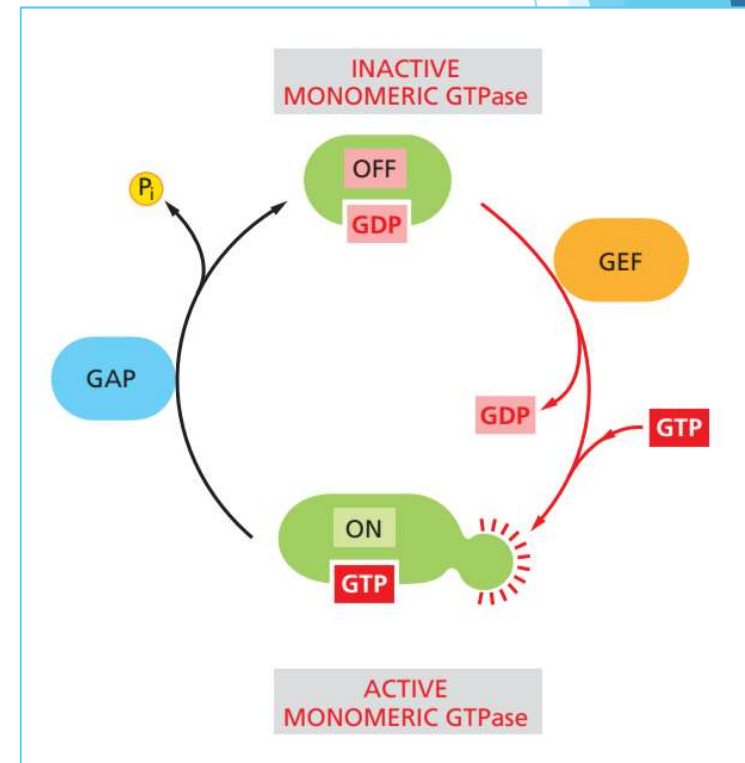
# Dva typy intracelulárních signálních proteinů, které fungují jako molekulární spínače:

## ► Signalizace vazbou GTP

- protein vážící GTP je indukován k výměně svého navázaného GDP za GTP, který aktivuje protein
- protein se pak sám inaktivuje hydrolýzou svého vázaného GTP na GDP

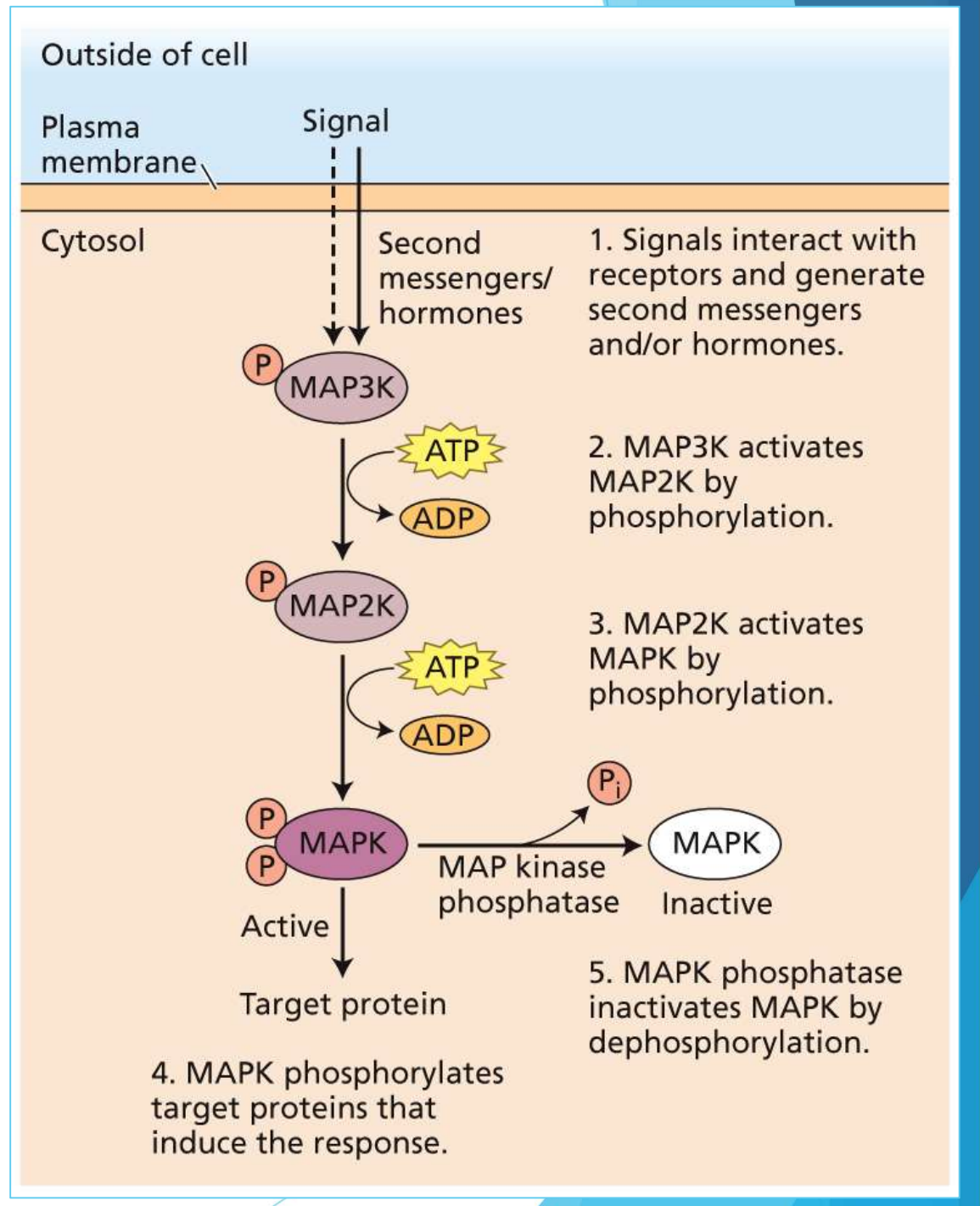


## Regulace GTPázy např. Rab



## 4. Zesílení signálu

- ▶ Signály musí být **amplifikovány** intracelulárně, aby se zabránilo jejich „zředění“ a aby byly schopny regulovat jejich cílové molekuly.
- ▶ **Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways**
  - ▶ konzervované mezi eukaryoty
  - ▶ zesilují signály k dosažení rychlé a masivní reakce na environmentální nebo vývojový podnět
- ▶ MAP kinase (MAPK)
  - ▶ MAP kinase kinase (MAP2K)
  - ▶ MAP kinase kinase kinase (MAP3K)



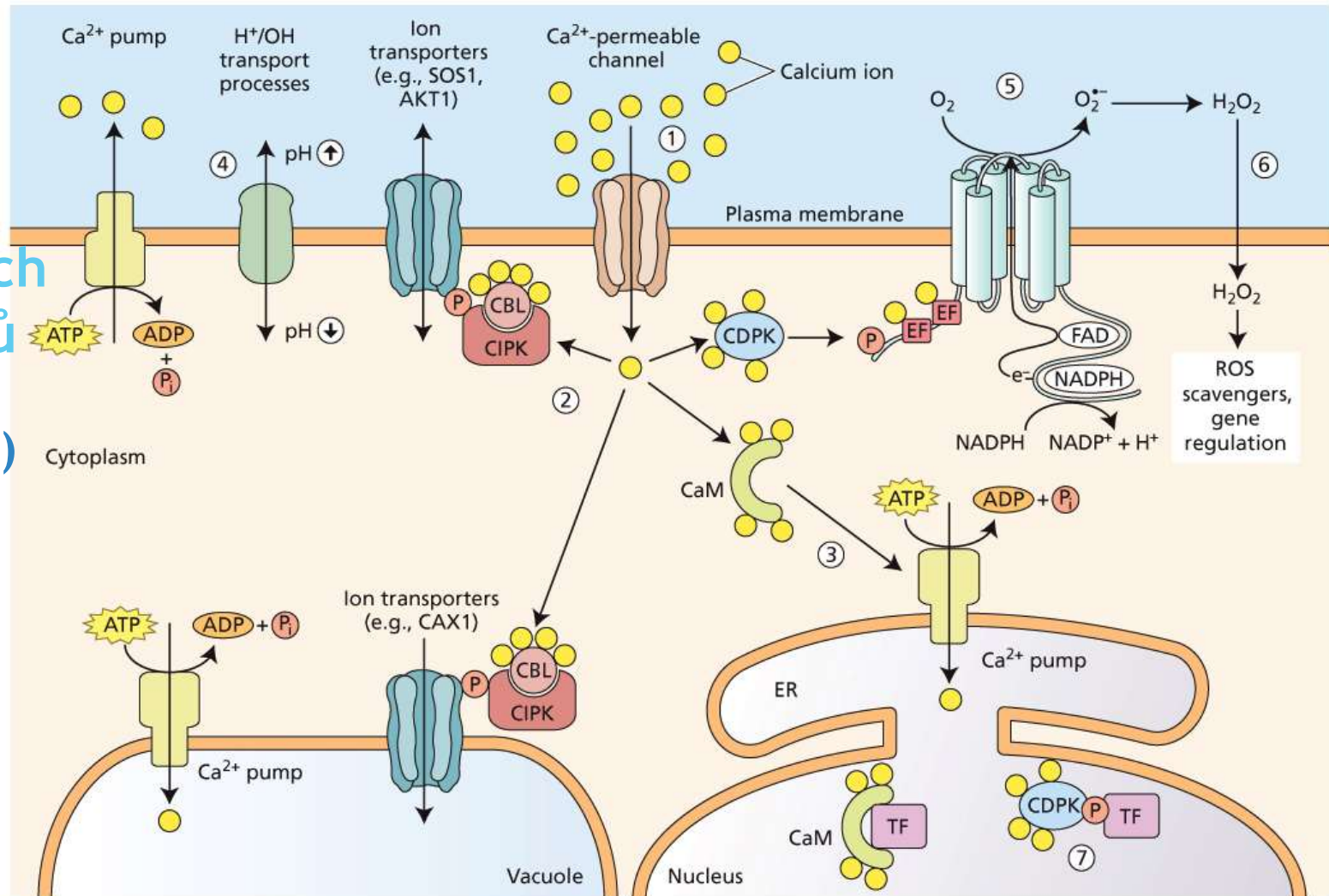
# Zesílení signálů pomocí druhotných přenašečů (second messengers)

## ► Ca<sup>2+</sup>

Nejčastější přenašeč v rostlinách a dalších eukaryotech

pH cytoslu nebo BS

ROS (reactive oxygen species)



1. Signal-induced activation of Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channels leads to an increase in the concentration of free cytosolic Ca<sup>2+</sup>.
2. Activated CBL/CIPK Ca<sup>2+</sup> sensor proteins interact with ion transporters on the plasma membrane and the vacuolar membrane.
3. Activated calmodulin (CaM) stimulates Ca<sup>2+</sup> pumps on the ER.
4. Ca<sup>2+</sup> activation of membrane transporters triggers changes in the intracellular and extracellular pH.

5. Plasma membrane NADPH oxidases are activated by direct binding of Ca<sup>2+</sup> to N-terminal EF-hand Ca<sup>2+</sup> binding domains or by N-terminal phosphorylation by CDPK, promoting the formation of superoxide. Superoxide can dismutate via superoxide dismutase (SOD) to the ROS H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
6. Diffusion of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into the cytosol alters the cellular redox status, which may regulate the activity of transcription factors and change gene expression.
7. Activated CDPK can regulate transcription factors in the nucleus.

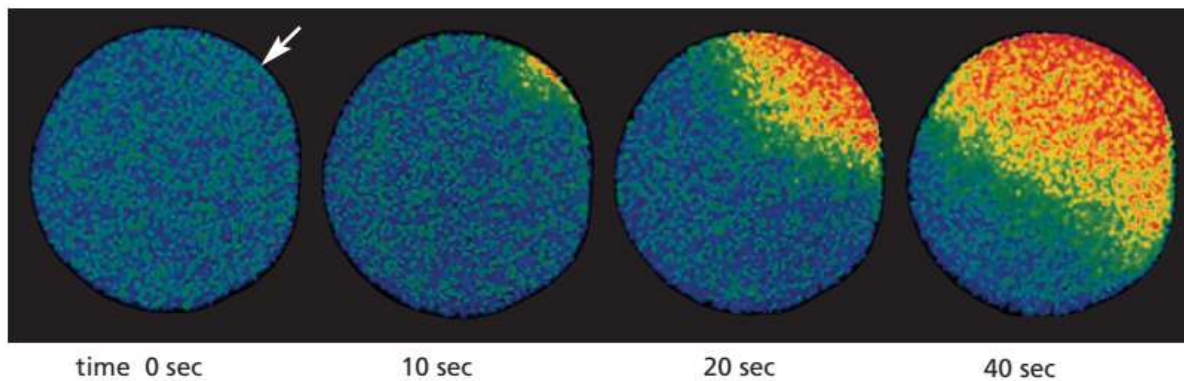


# Zesílení signálů pomocí druhotných přenašečů

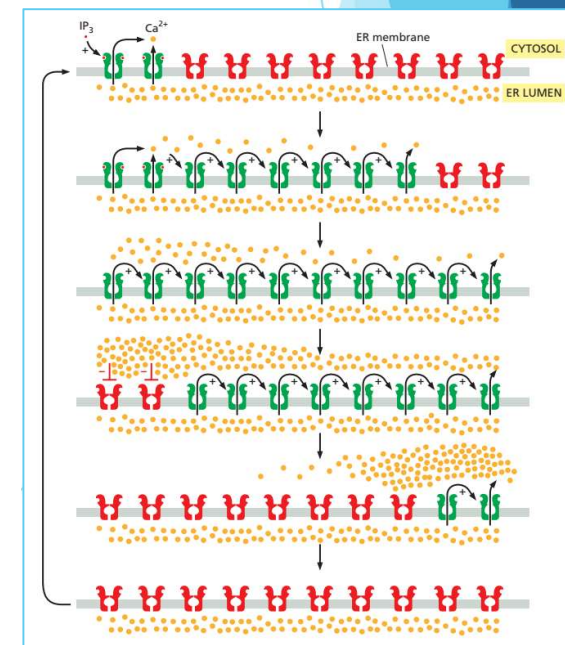
- ▶ Některé intracelulární signální molekuly ( $\text{Ca}^{2+}$  a cyklické nukleotidy cAMP), fungují jako druhotní přenašeči extracelulárního signálu.
- ▶ Některé (cAMP a  $\text{Ca}^{2+}$ ) jsou rozpustné ve vodě a difundují v cytosolu, zatímco jiné, (diacylglycerol) jsou rozpustné v tucích a difundují v PM.
- ▶ Zvyšují koncentraci v reakci na stimul/aktivaci receptoru a difundují od svého zdroje, čímž šíří signál do dalších částí buňky a ovlivňují odezvu v buňce.
  - ▶ Např. nízká koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v buňce (cytotoxin!) vytváří až 10 000 násobný gradient a funguje jako buněčný přepínač ve spojení extracelulárního stimulu s buněčnou odpovědí.
  - ▶ Kontrolní mechanismus v buňce, který vyvolá přechodné 10- až 100-násobné zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  (pod toxickou hladinou) otevřením  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů či spuštěním pupm.

## ▶ *Oscilace $\text{Ca}^{2+}$ při opylování rostlin*

- ▶ Dvojité oplodnění rostliny exprimující  $\text{Ca}^{2+}$  senzor, ukazuje přechodné zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  ve vajíčku, centrální buňce a při fúzi se spermií s vajíčkem.

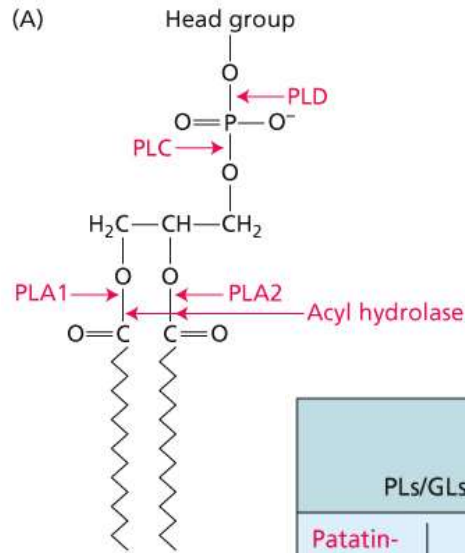


*Pozitivní a negativní zpětná vazba vytváří  $\text{Ca}^{2+}$  vlny a oscilace.*



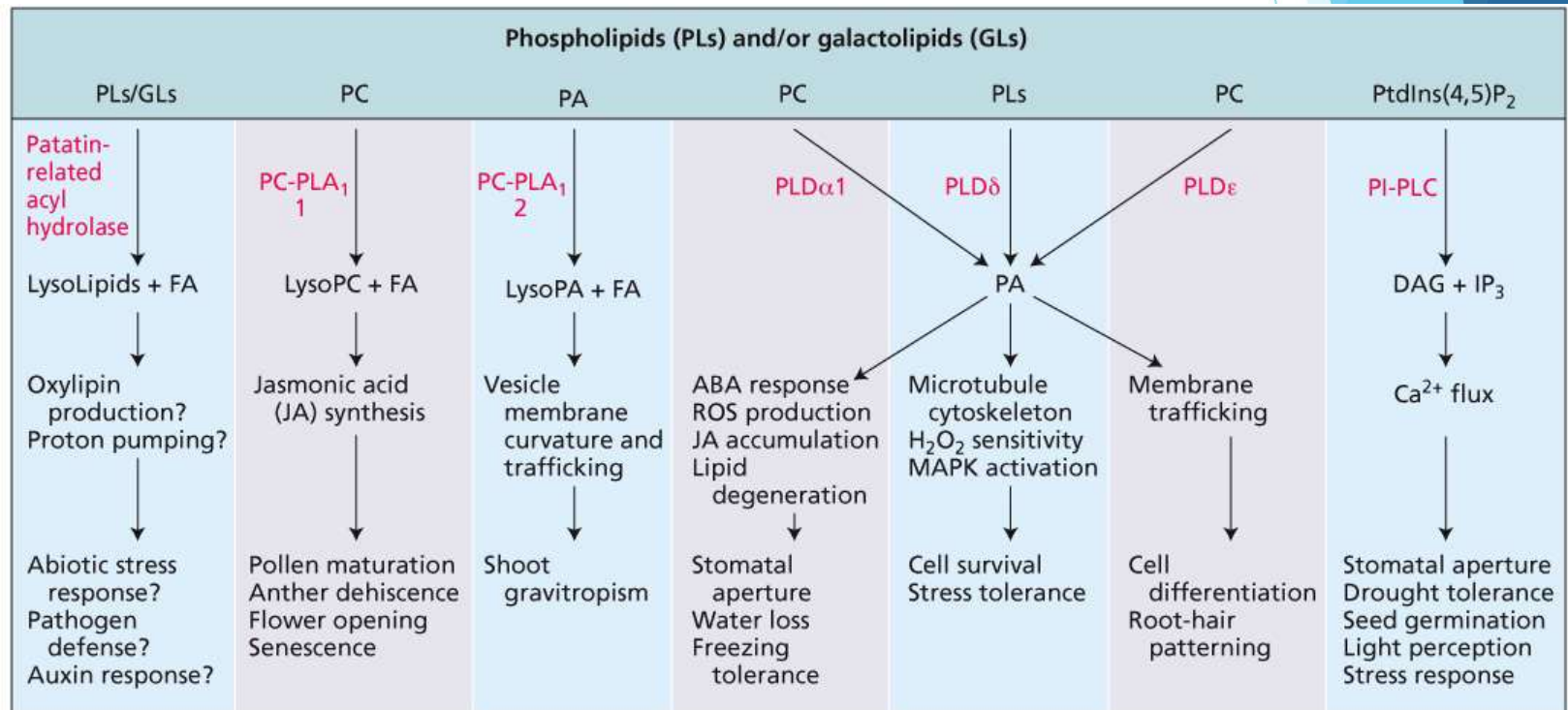
# Modifikované lipidy působí jako druhotní přenašeči

## ► lipidové signální molekuly



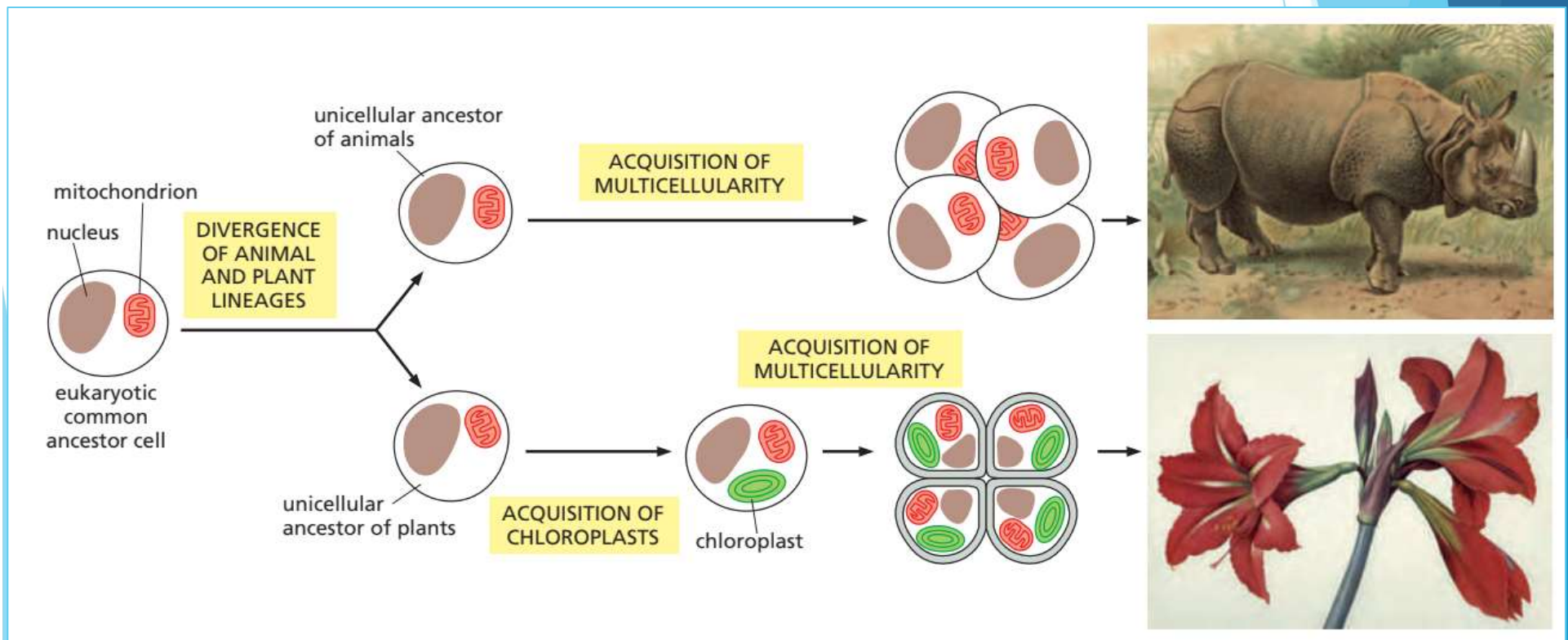
Head group	Lipid	
Choline	PtdCholine	PC
Ethanolamine	PtdEtn	PE
Glycerol	PtdGlycerol	PG
Serine	PtdSerine	PS
Inositol	PtdInositol	PI
Inositolmonophosphate	PtdInsP	PIP
Inositolbisphosphate	PtdInP <sub>2</sub>	PIP <sub>2</sub>
OH	Phosphatidic acid	PA

- Generované enzymy modifikujícími lipidy.
- Způsobují přestavbu buněčných membrán.
- Je obtížné najít jejich signalizační cíle.



# Signalizace v rostlinách

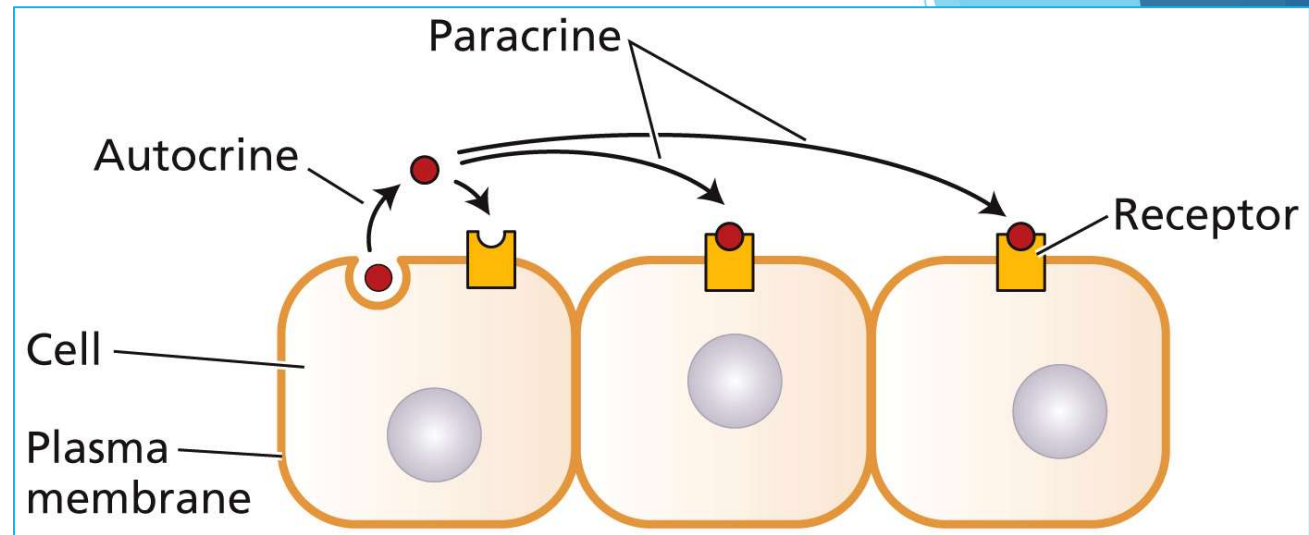
- ▶ Mnohobuněčnost a buněčná komunikace se u rostlin a živočichů vyvíjely nezávisle.
- ▶ Zatímco rostliny i živočichové používají k signalizaci NO, cyklický GMP (cGMP),  $Ca^{2+}$  a GTPázy rodiny Rho, neexistují žádné homology rodiny jaderných receptorů Ras...
- ▶ Podobně se zdá, že rostliny nepoužívají cAMP pro intracelulární signalizaci!



# Přenos signálu a mezibuněčná komunikace

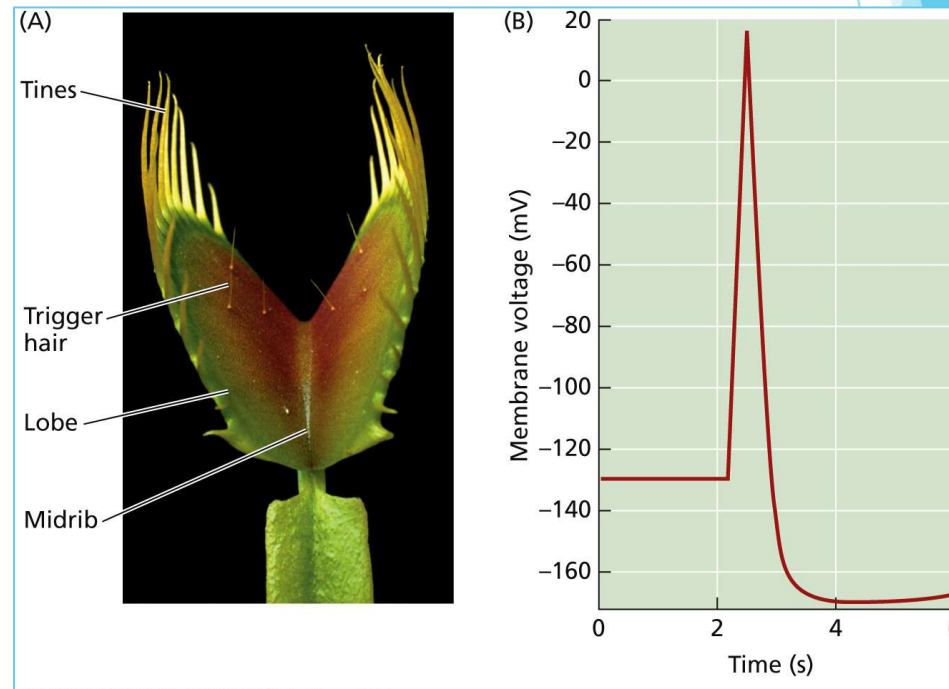
## ▶ Autokrinní vs parakrinní signalizace

- ▶ Např. hormony mohou signalizovat uvnitř buněk, v blízkosti nebo daleko od místa jejich syntézy.



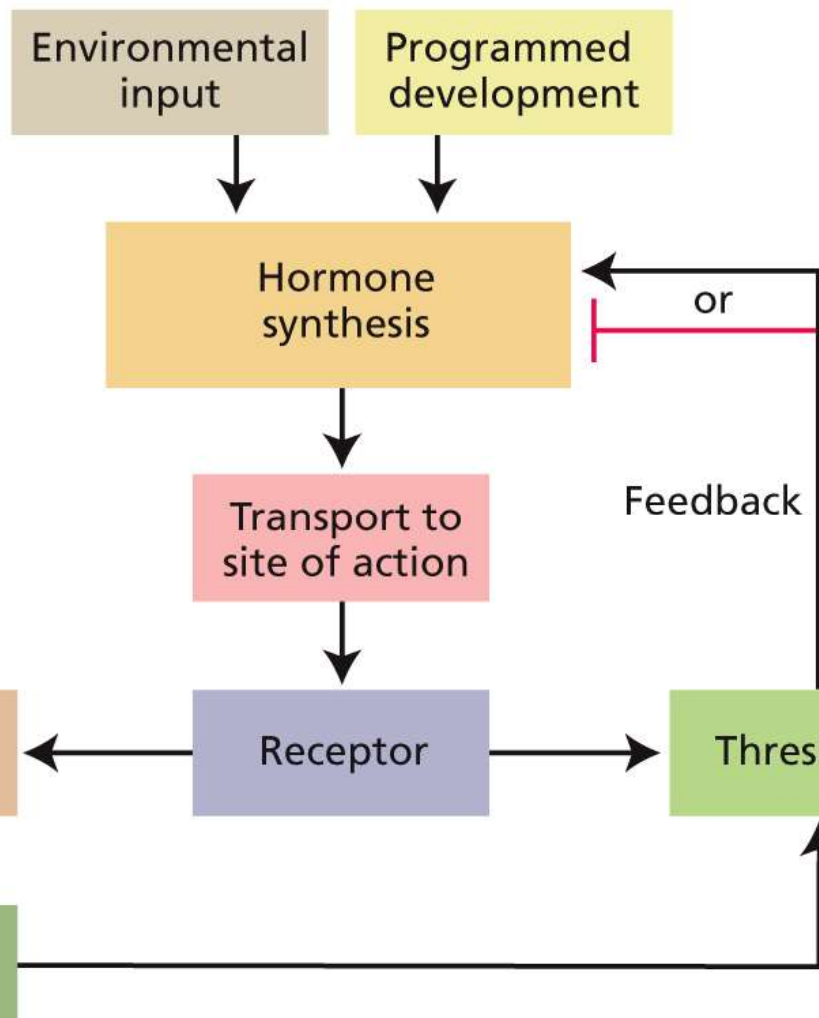
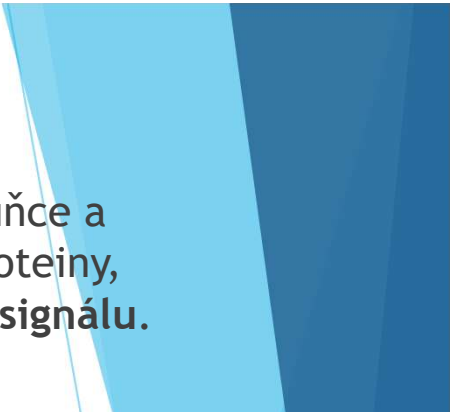
## ▶ Elektrická signalizace

- ▶ Venus flytrap (*Dionaea muscipula*)
- ▶ Rostliny mohou také využívat velmi rychlé elektrické signalizace na dlouhé vzdálenosti,
- ▶ využívající akční potenciály (dosud neznámo jak).



# Obecné schéma hormonální regulace

- ▶ Hormony jsou **chemické signály**, které jsou produkovány v jedné buňce a modulují buněčné procesy v jiné buňce **interakcí** se specifickými proteiny, které fungují jako **receptory** a jsou spojené s buněčným **přenosem signálu**.



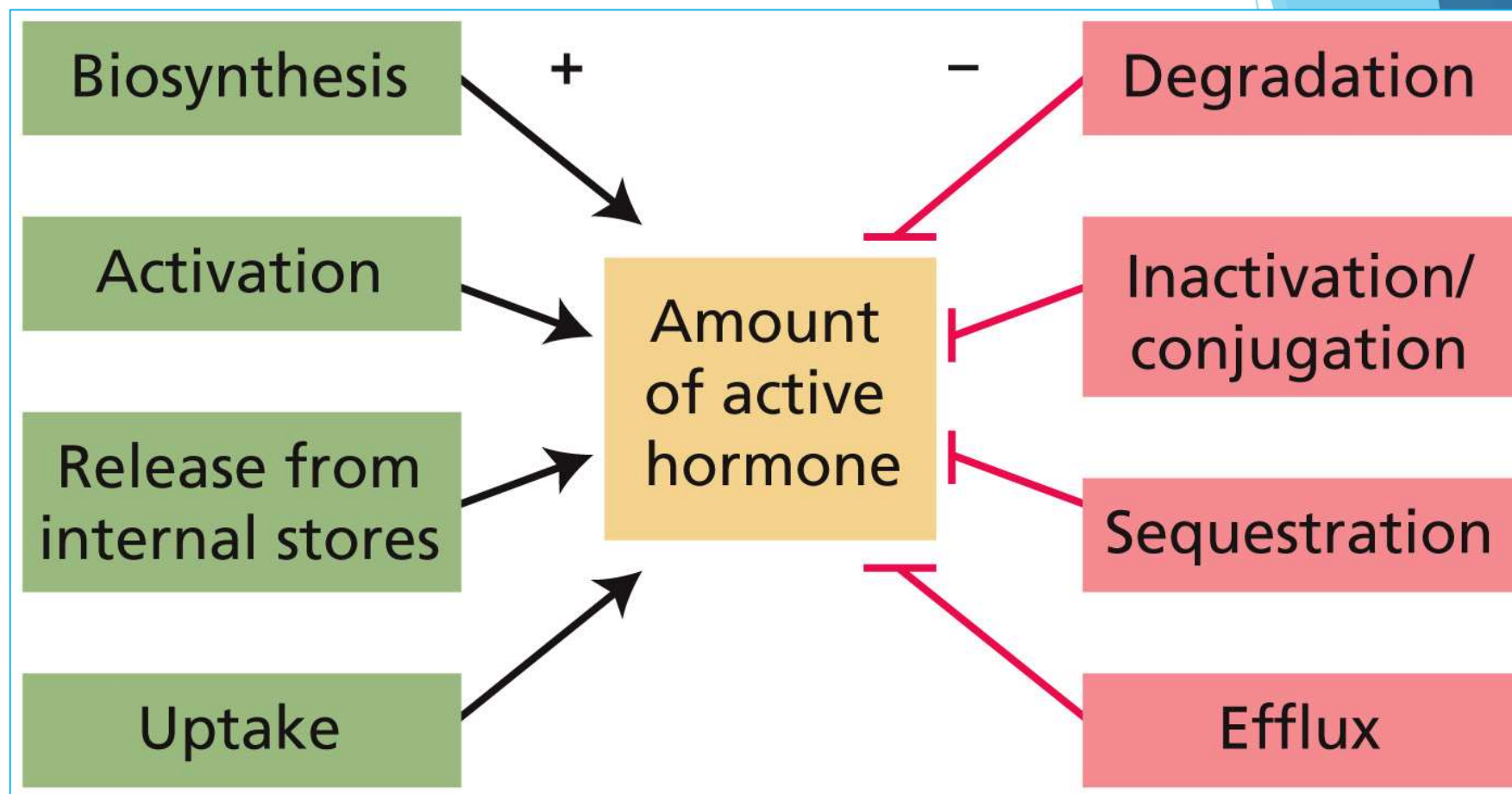
- ▶ *Na rozdíl od drah živočišných hormonů, rostliny obecně využívají **negativní regulátory** (inaktivující represory), které umožňují rychlejší aktivaci následných genů odezvy...*

### Response termination

- Compartmentation/reversible conjugation
- Catabolism
- Efflux



## Homeostatické regulační mechanismy ovlivňující koncentraci hormonů



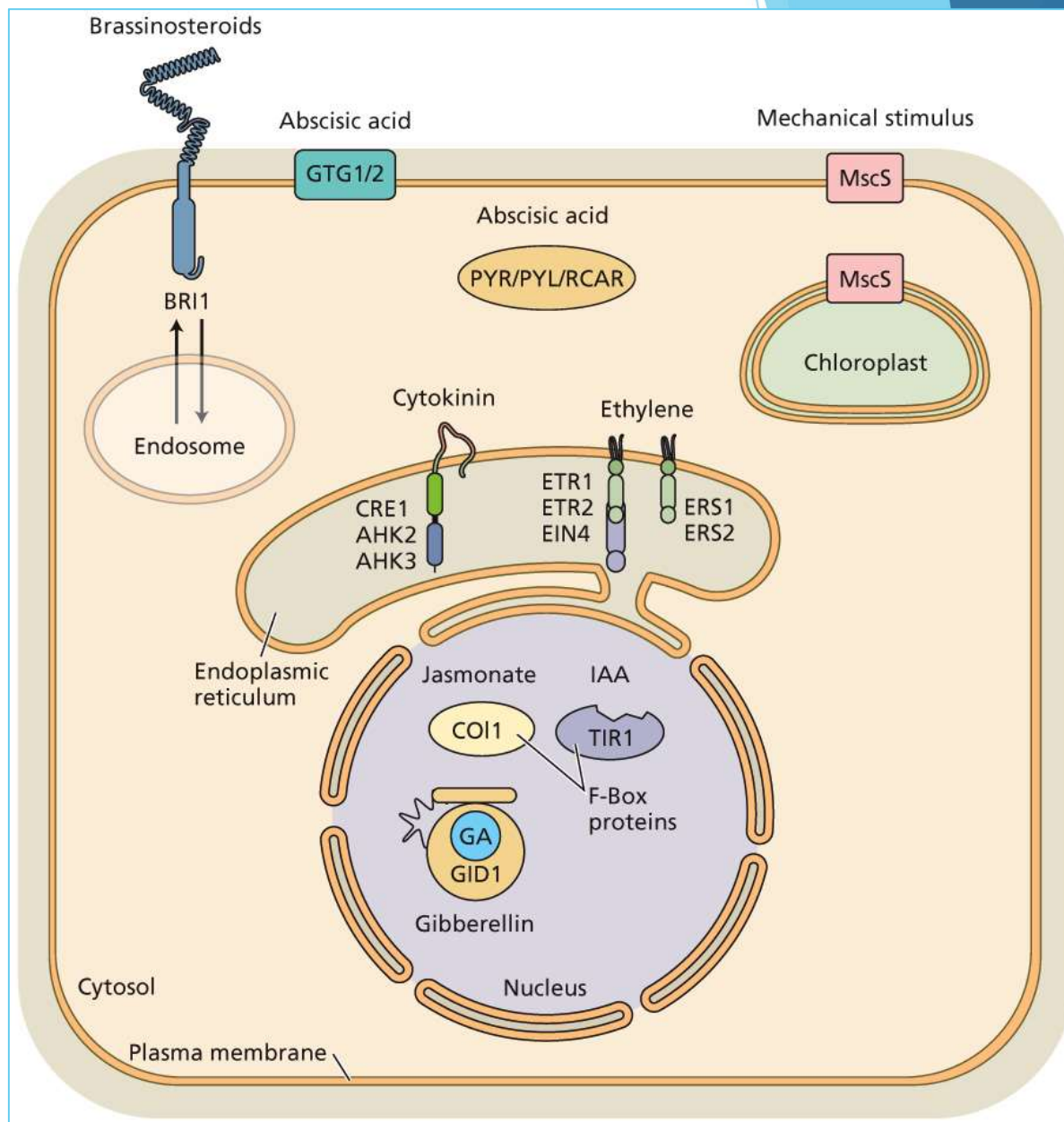
- ▶ Hormony přenáší signály a iniciují fyziologické reakce při **velmi nízké koncentraci**.
- ▶ *Koncentrace hormonů je přísně regulována tak, aby signály produkovaly včasné reakce, aniž by byla ohrožena citlivost na stejný signál v budoucnosti!*

# Primární umístění rostlinných receptorů v buňce

▶ *Fytohormonové receptory:*

- ▶ Brasinosteroidy
- ▶ Cytokininy
- ▶ Etylén
- ▶ Auxiny
- ▶ Gibbereliny
- ▶ Kys. jasmonová
- ▶ Kys. abscisová
  - ▶ Kys. salicylová
  - ▶ Strigolaktone

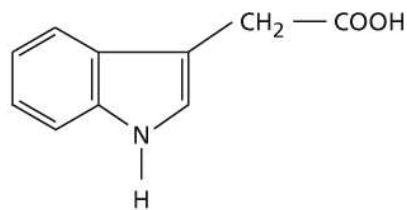
▶ *Mechanosensitive receptors (MscS)*



# Studium fytohormonů:

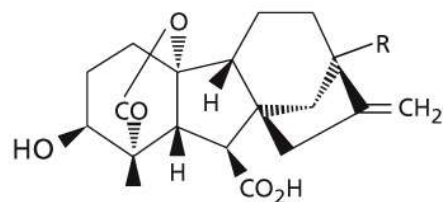
- ▶ Hormony a vývoj rostlin
- ▶ Metabolismus a homeostáza
- ▶ *Hormonální signální dráhy*

(A) Auxins

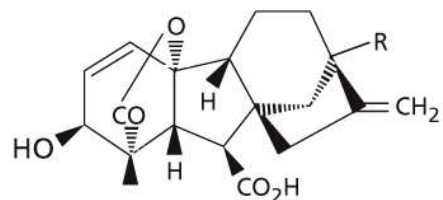


Indole-3-acetic acid (IAA)

(B) Gibberellins

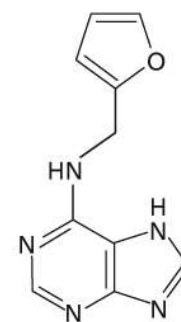


GA<sub>4</sub> R = H  
GA<sub>1</sub> R = OH

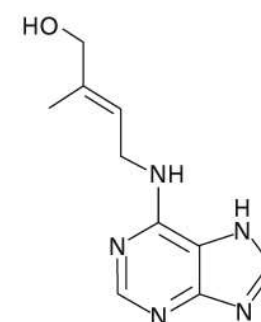


GA<sub>7</sub> R = H  
GA<sub>3</sub> R = OH

(C) Cytokinins

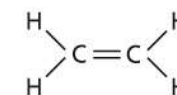


Kinetin

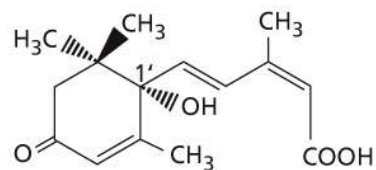


Zeatin

(D) Ethylene

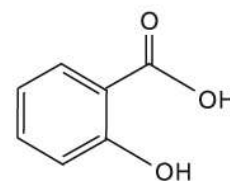


(E) Abscisic acid

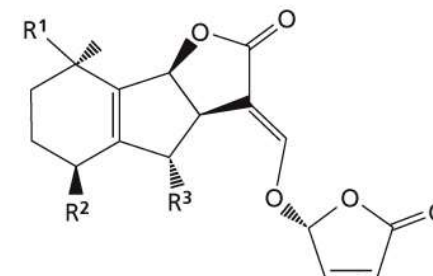


(S)-cis-ABA  
(naturally occurring active form)

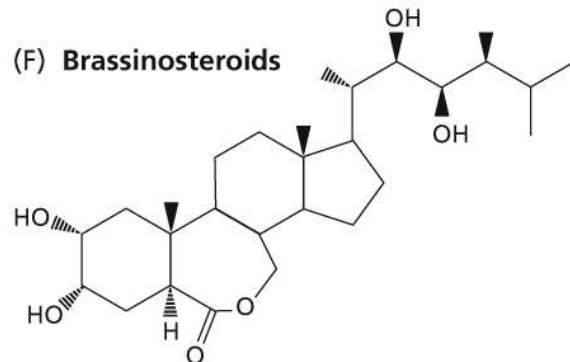
(G) Salicylic acid



(H) Strigolactone

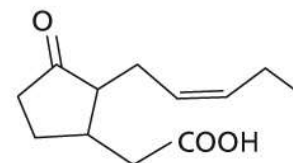


(F) Brassinosteroids



Brassinolide

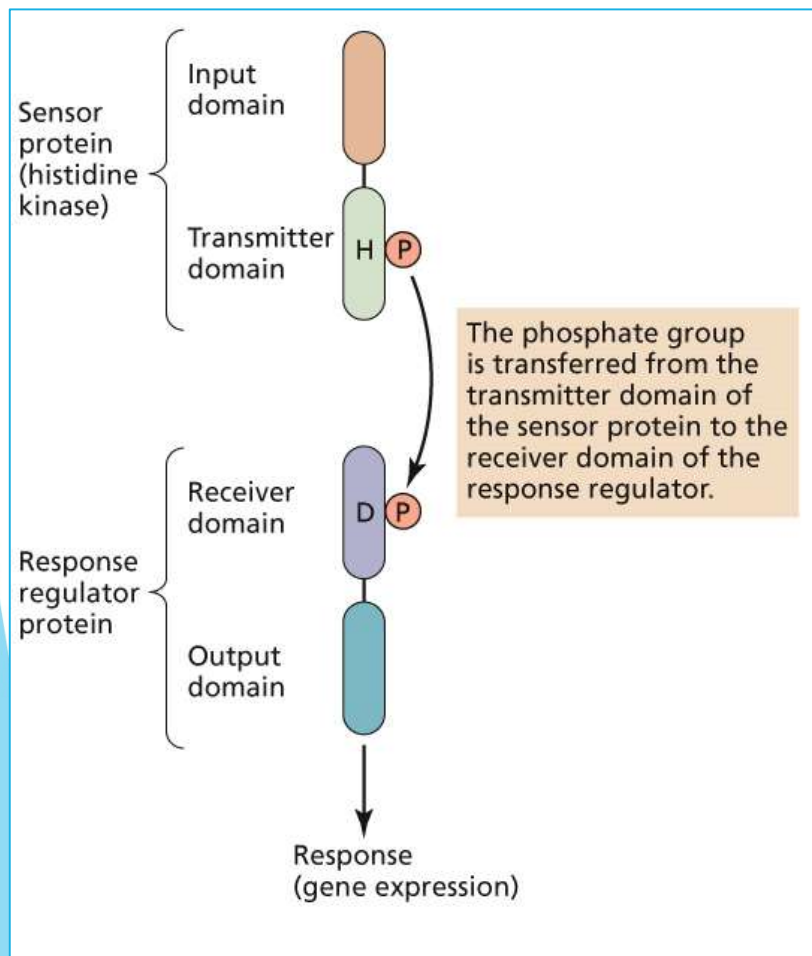
(I) Jasmonic acid





# Model dráhy přenosu signálu cytokininů

## ► Dvousložkové (two-component) signalizační systémy bakterií



## ► Multistep phosphorylate pathways (MSP) in plants

1. The cytokinin receptor CRE1 probably functions as a dimer. Cytokinin binds to the CHASE domain, which resides either in the lumen of the ER or extracellularly. Two other hybrid sensor kinases (AHK2 and AHK3) may also act as cytokinin receptors in Arabidopsis.

### Hybrid sensor: histidine kinase (AHK)

2. Cytokinin binding to these receptors activates their histidine kinase activity. The phosphate is transferred to an aspartate residue (D) on the fused receiver domains.

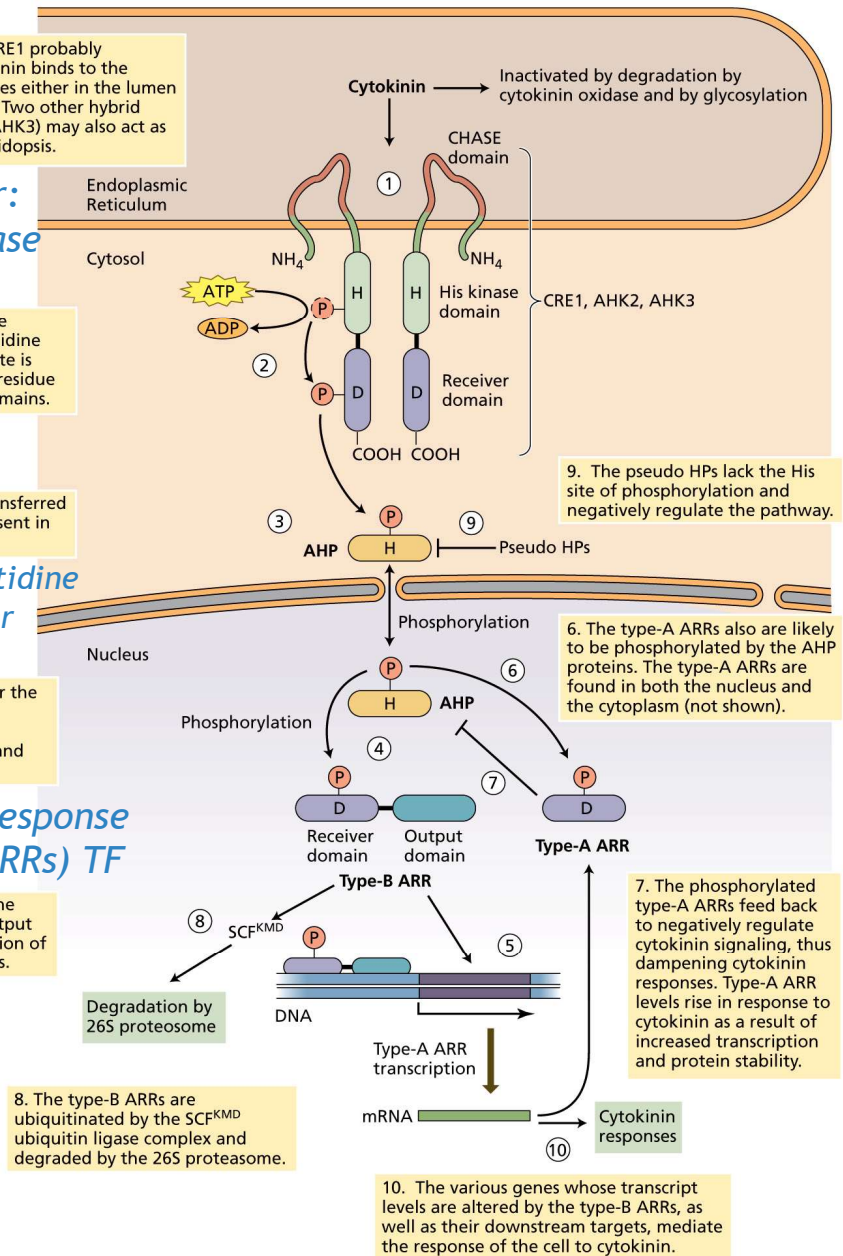
3. The phosphate is then transferred to a conserved histidine present in an AHP protein.

### Arabidopsis histidine phosphotransfer (AHP) proteins

4. The AHP proteins transfer the phosphate to an aspartate residue located within the receiver domain of type-A and type-B ARR.

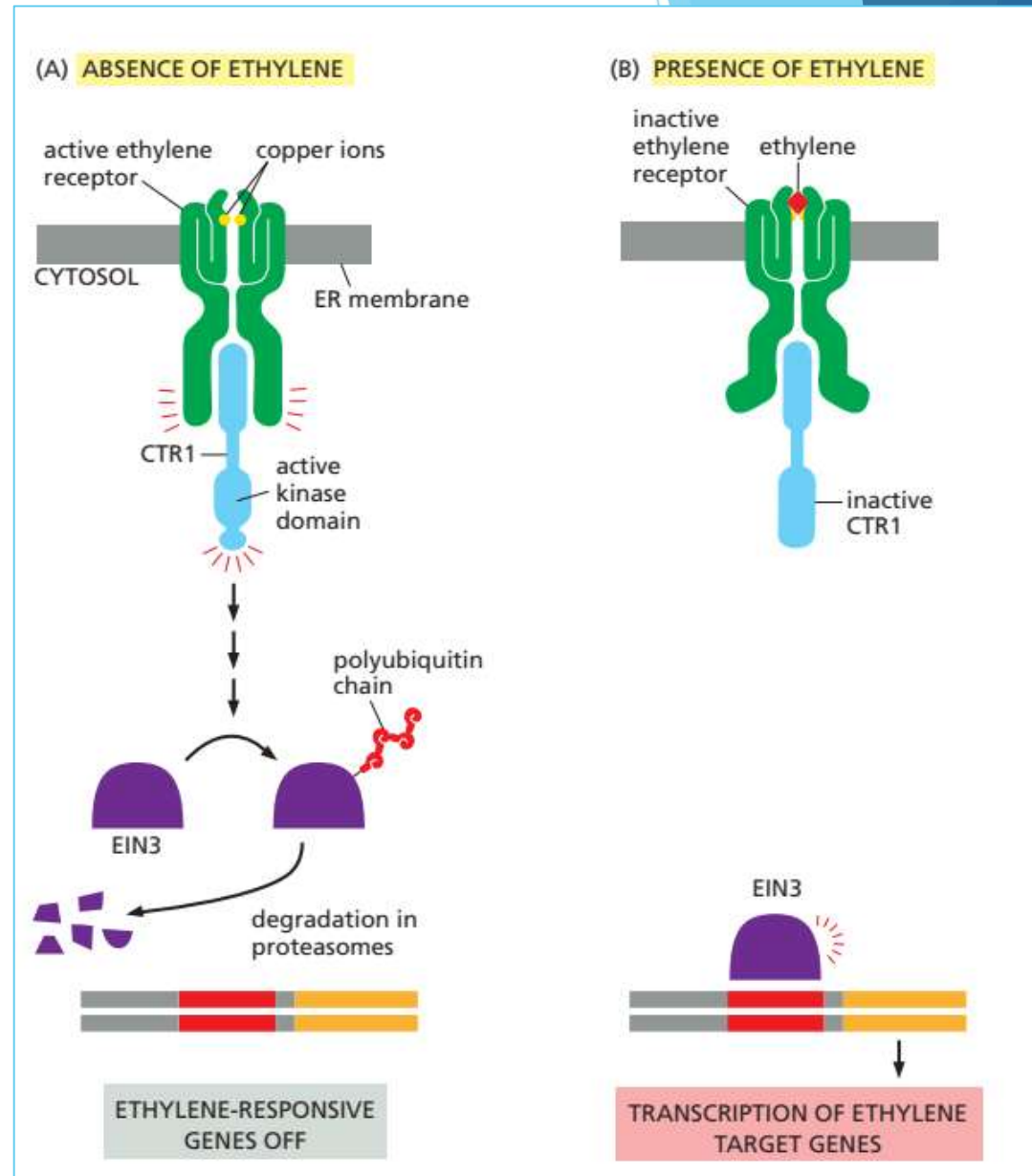
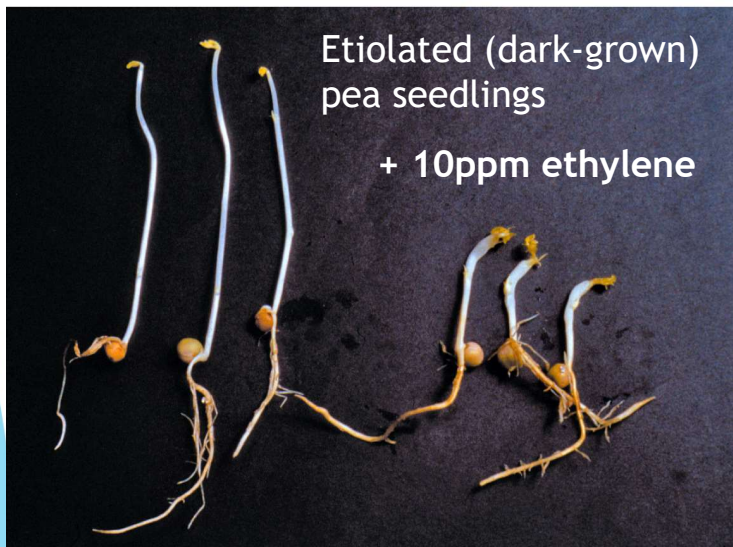
### Arabidopsis response regulators (ARRs) TF

5. The phosphorylation of the type-B ARR activates the output domain to induce transcription of genes encoding type-A ARRs.



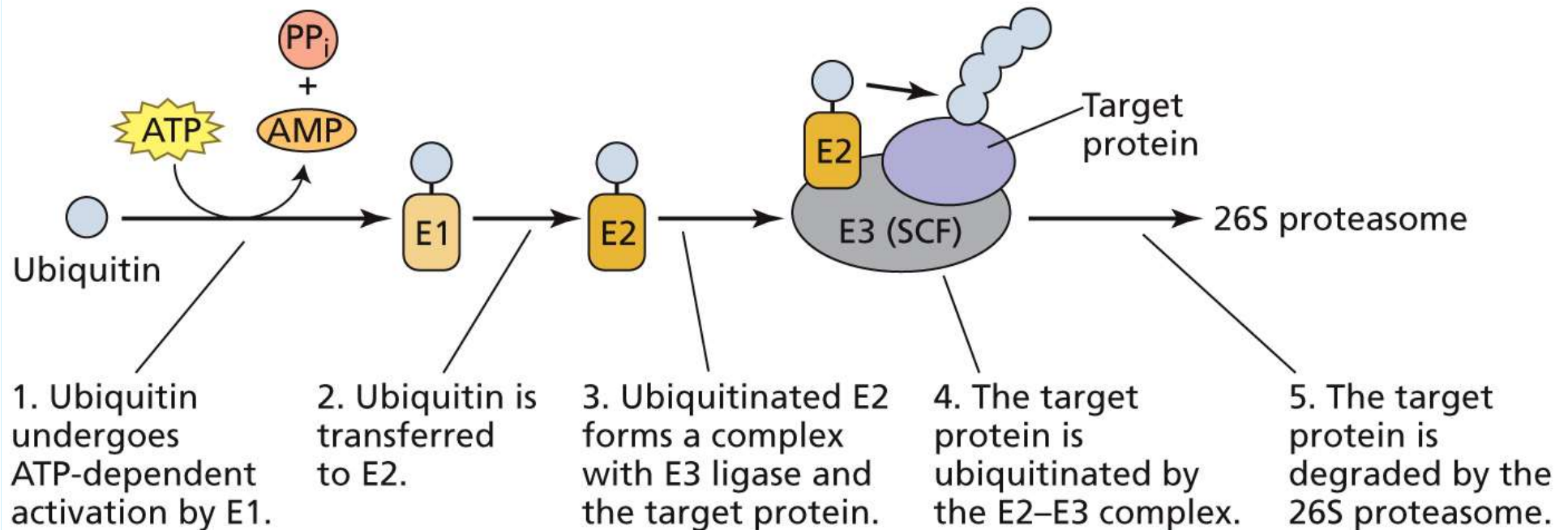
# Etylénová signální dráha

- ▶ Také odvozeno od dvousložkového regulačního systému.
  - ▶ Zahrnuje membránově vázané **senzorové proteiny (ETR1)** a cytosolické regulátory odezvy.
- ▶ V nepřítomnosti etylénu jsou receptory a CTR1 aktivní, což způsobuje ubikvitylaci a destrukci EIN3 (transkripční regulační protein v jádře).
- ▶ Vazba etylénu způsobí, že EIN3 není degradován a aktivuje geny reagující na etylén.



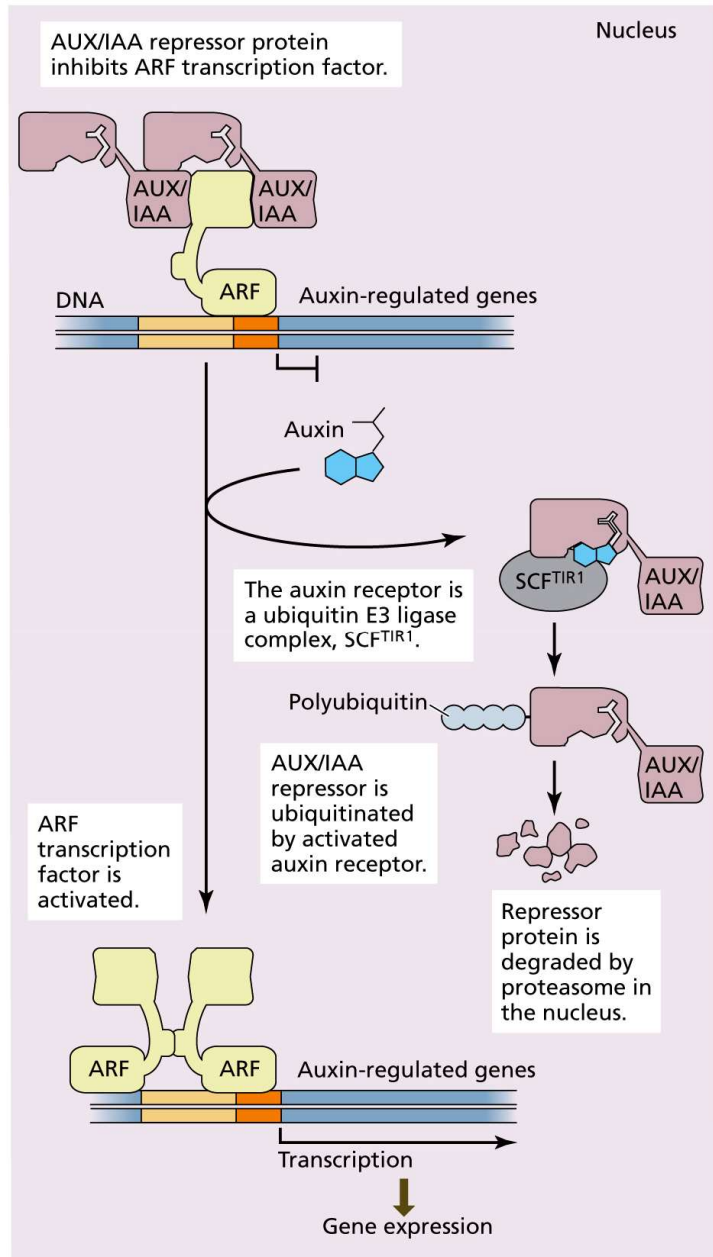
# Signální transdukční dráhy v rostlinách často fungují tak, že inaktivují represorové proteiny

- ▶ **Negativní regulátory** vedou k rychlejší indukci následných genů odezvy.
  - ▶ Rychlost odezvy (např. sucho) je rozhodující pro přežití přisedlé rostliny.
- ▶ Několik mechanismů včetně defosforylace nebo degradace represorového proteinu, např. **ubikvitin-proteazomová dráha (ubiquitin-proteasome pathway)**

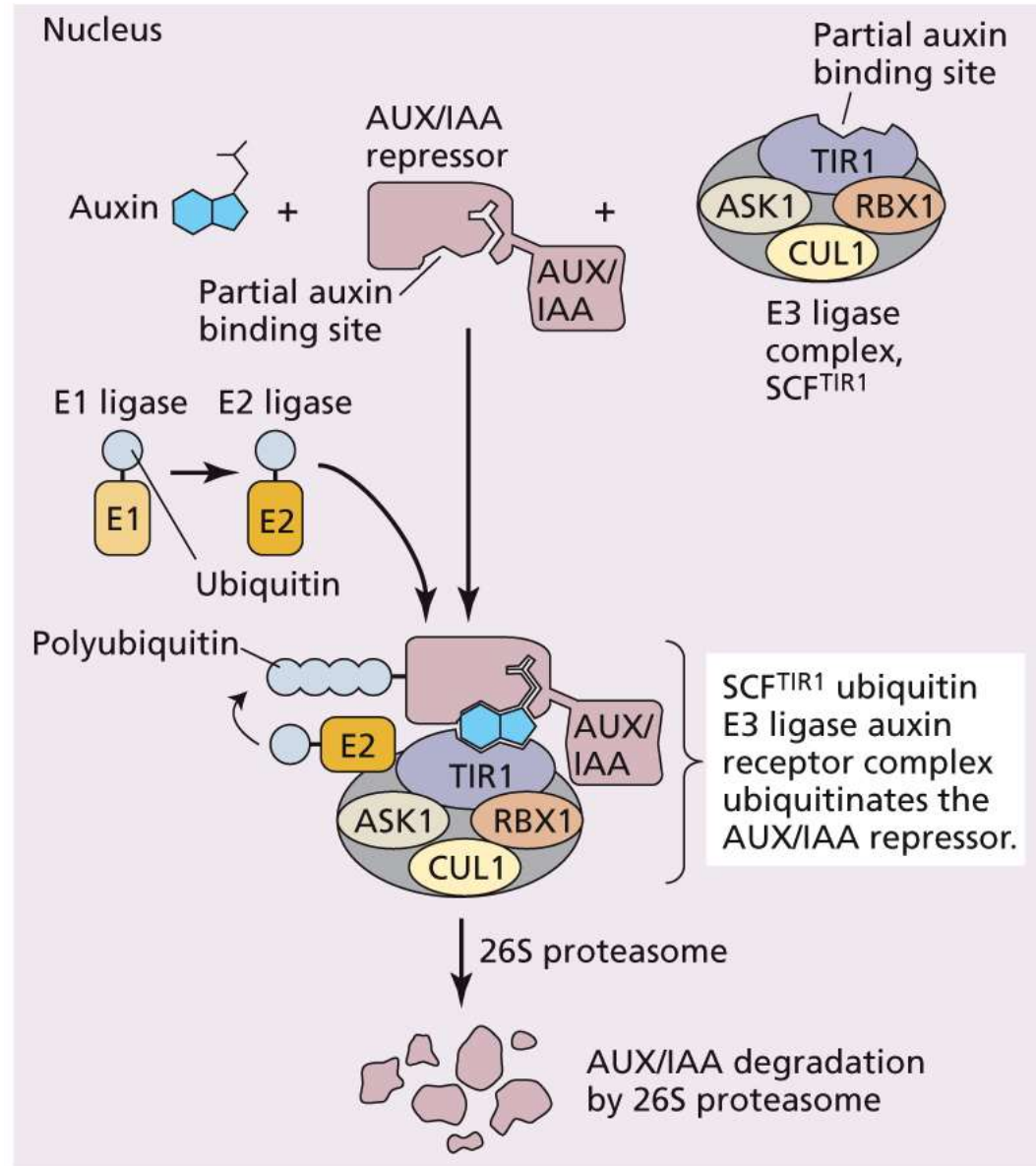


- ▶ Ubiquitin je aktivován E1 (*ubiquitin-activating enzyme*).
- ▶ Rodina velkých proteinových komplexů *S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN1 (Skp1)/Cullin/F-box (SCF) complexes* fungují jako E3 ubiquitin ligázi...

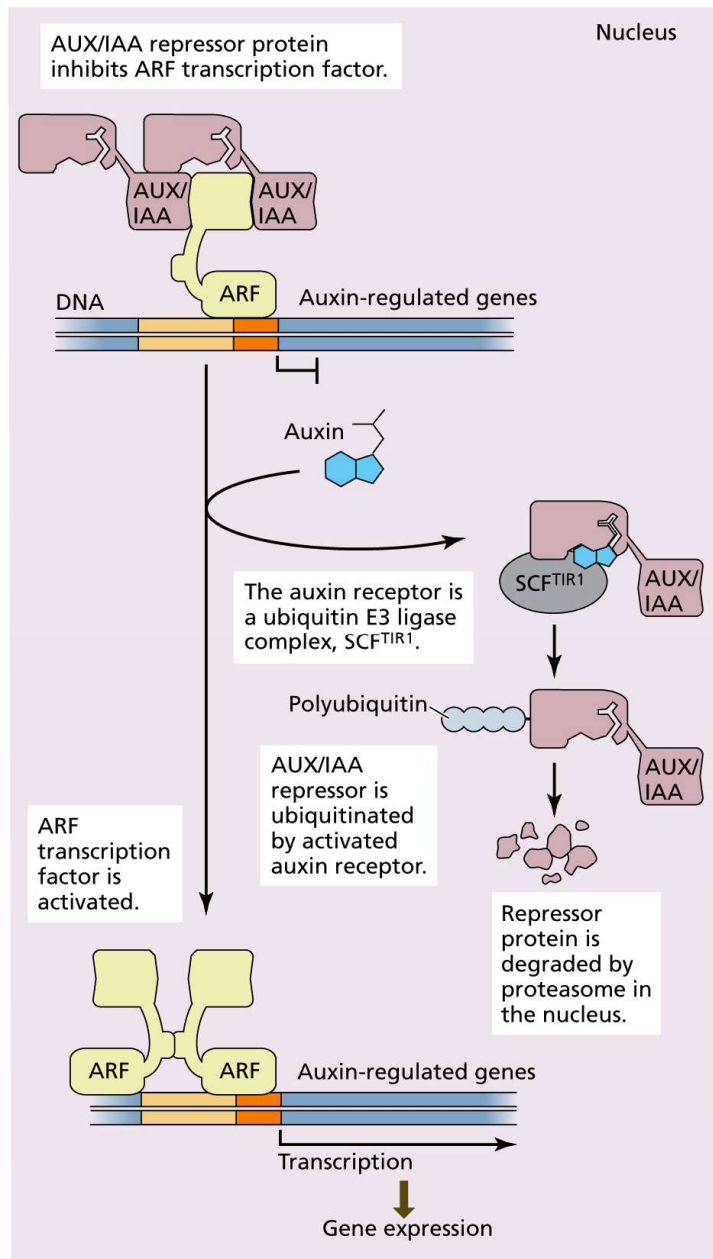
# Auxinové a další receptory jsou součástí SCF komplexu



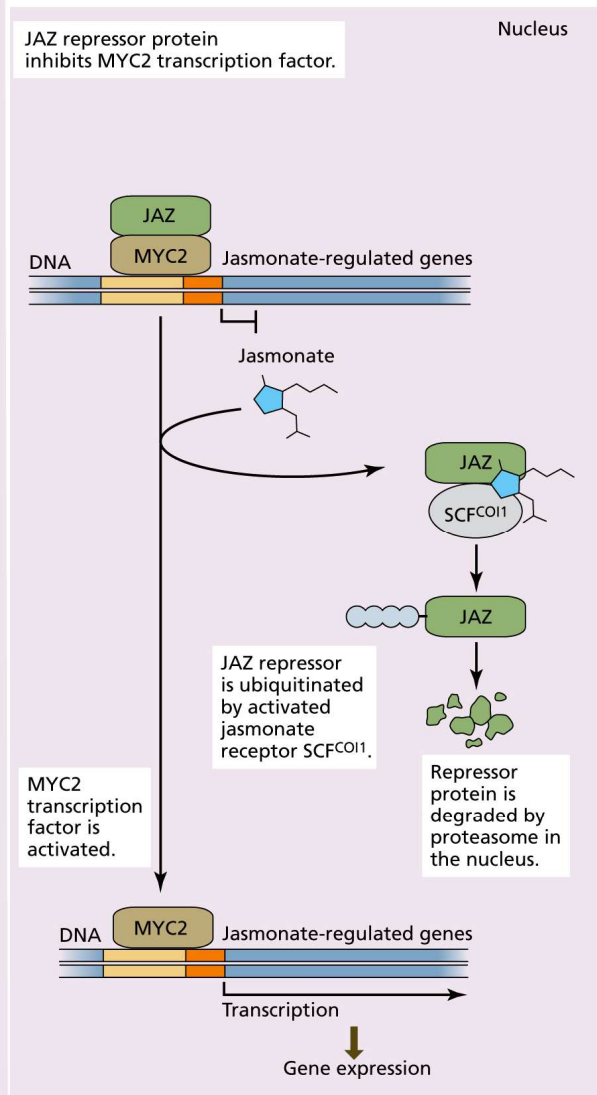
(B) Degradation of the AUX/IAA repressor by the 26S proteasome



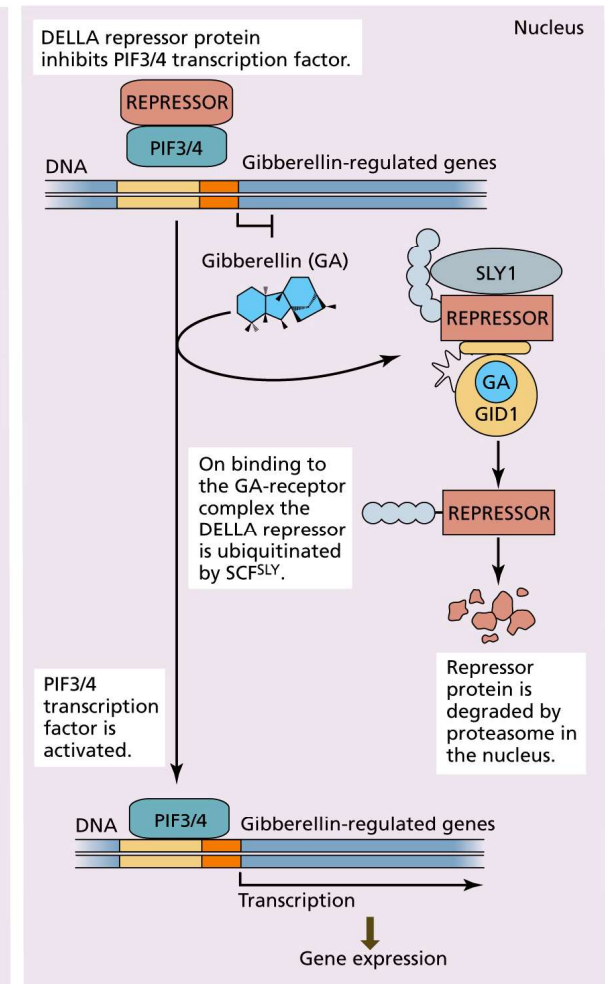
# Auxinové a další receptory jsou součástí SCF komplexu



## Jasmonate response

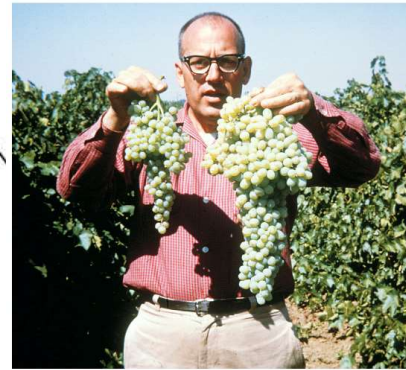
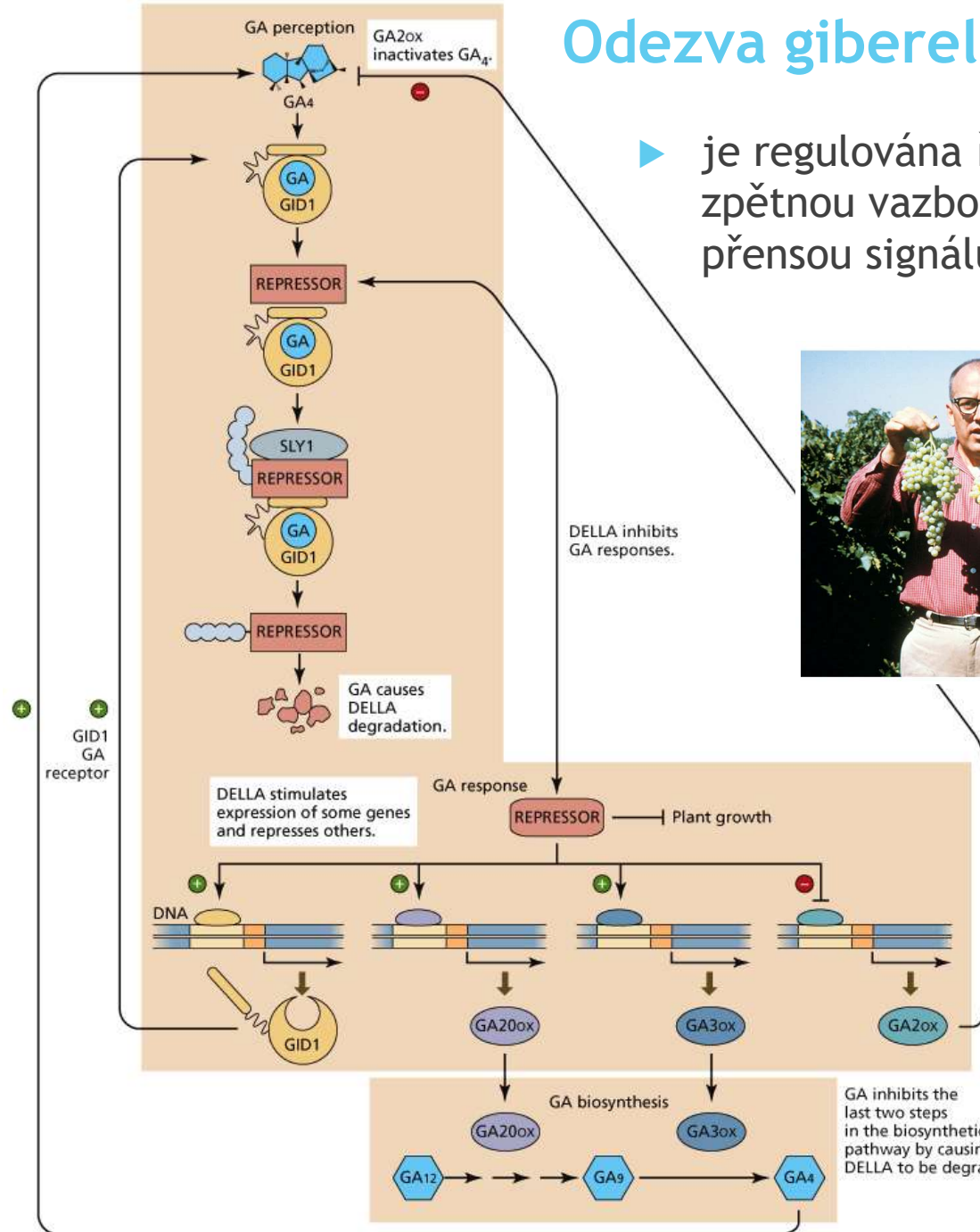


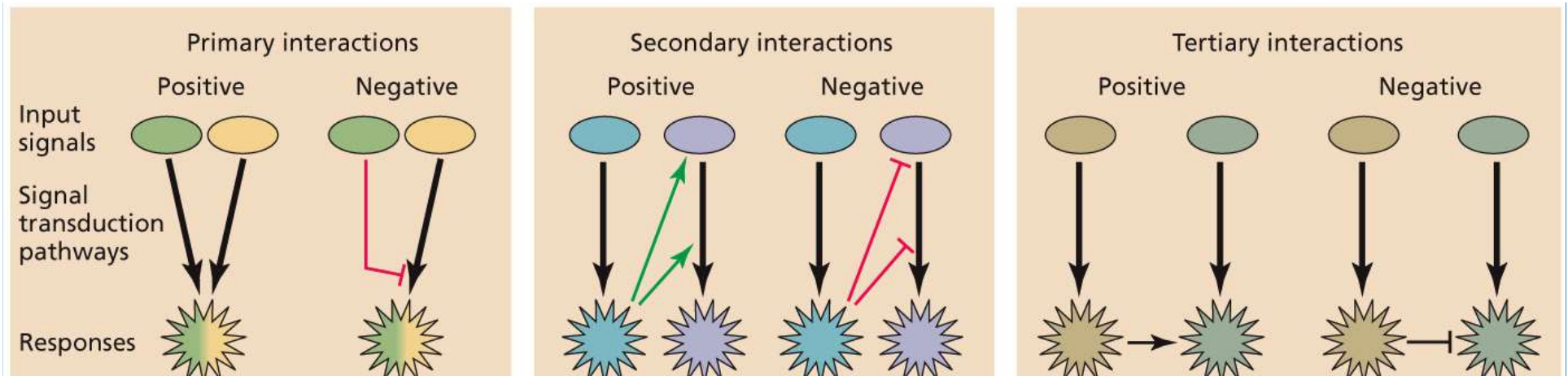
## Gibberellin response



# Odezva giberelinů (GA)

- ▶ je regulována řadou mechanismů se zpětnou vazbou zahrnujících složky jak přenosu signálu GA, tak biosyntézy GA.

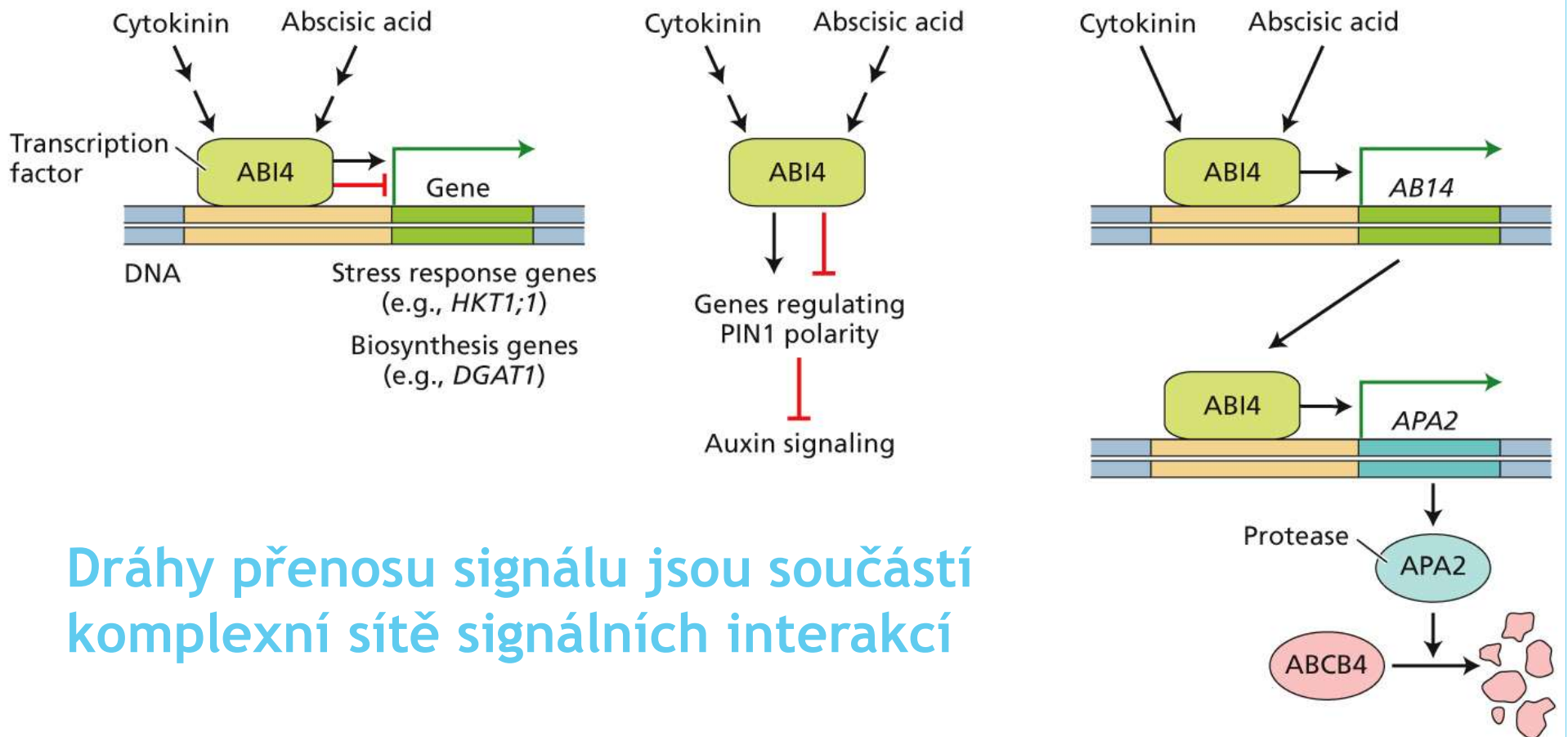




(A) Primary cross-regulation

(B) Secondary cross-regulation

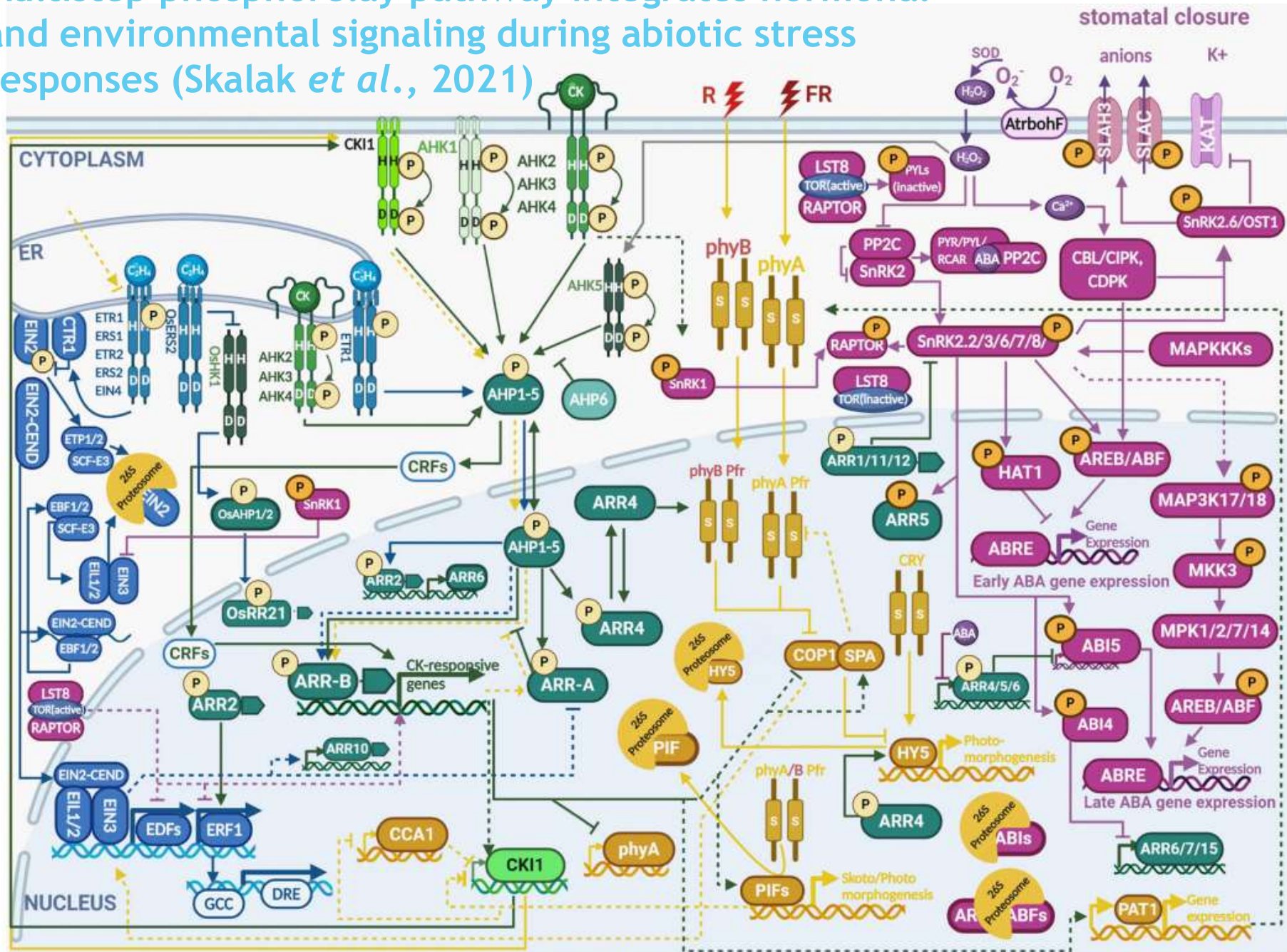
(C) Tertiary cross-regulation



Dráhy přenosu signálu jsou součástí komplexní sítě signálních interakcí

Multistep phosphorelay pathway integrates hormonal and environmental signaling during abiotic stress responses (Skalak *et al.*, 2021)

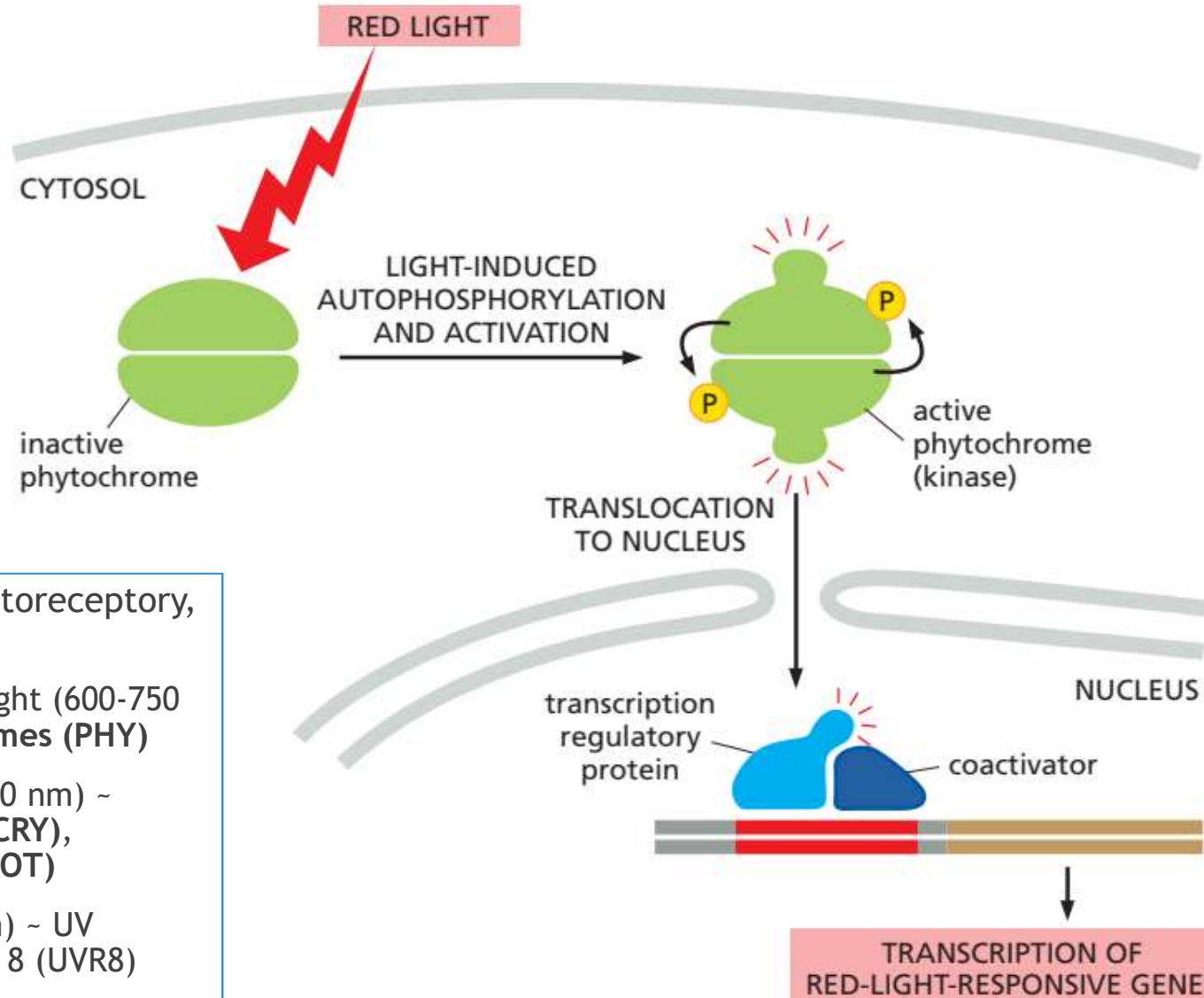
„CROSSTALK“





# Světelná odezva zprostředkovaná fytochromy

- ▶ Sluneční světlo slouží nejen jako zdroj energie pro fotosyntézu, ale také jako signál, který reguluje různé vývojové procesy!



▶ **Phytochromy** jsou fotoreceptory, které absorbují:

- ▶ red and far-red light (600-750 nm) ~ **phytochromes (PHY)**
- ▶ blue light (350-500 nm) ~ **cryptochromes (CRY)**, **phototropins (PHOT)**
- ▶ UV-A (320-400 nm) ~ **UV RESISTANT LOCUS 8 (UVR8)**