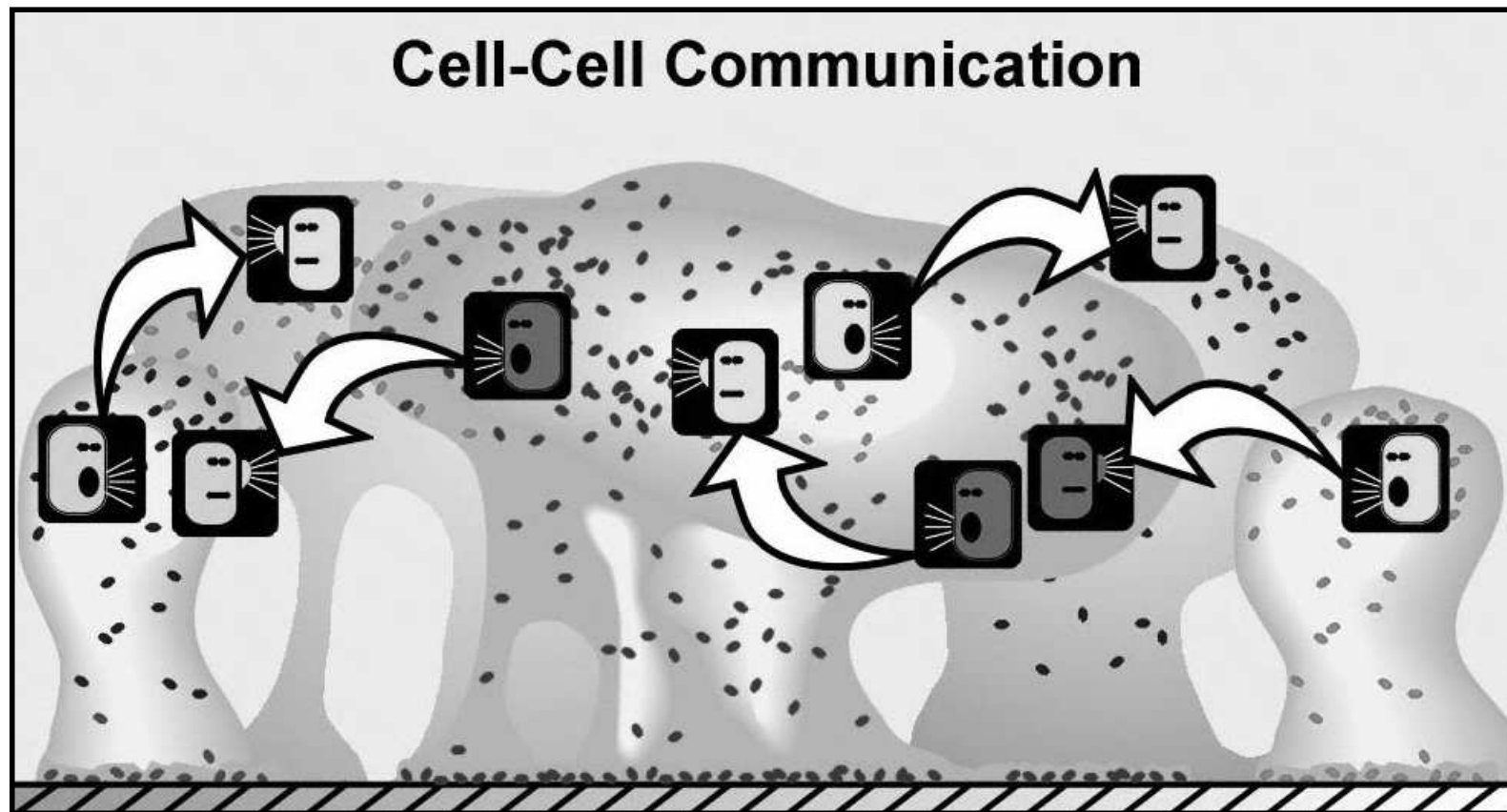


# Signalizace mezi buňkami



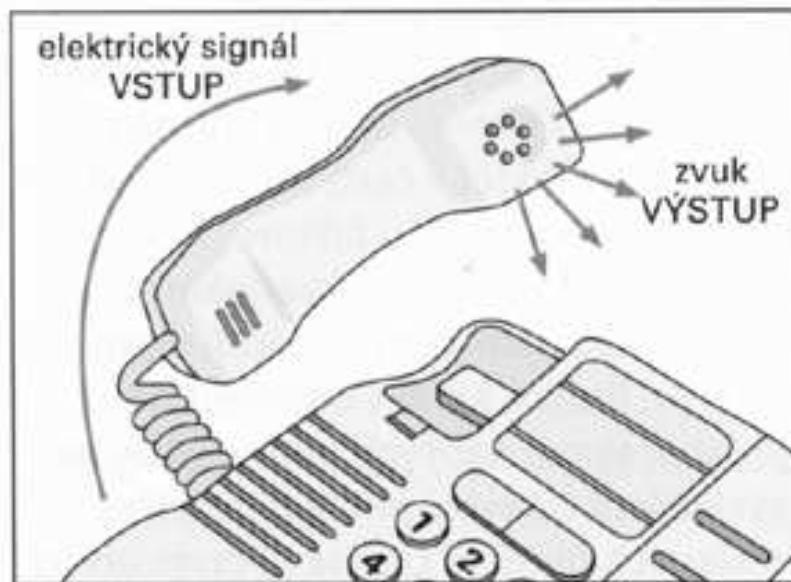
# Co musí buňka vnímat?

- přítomnost živin/růstových faktorů
- přítomnost toxických látek
- přítomnost signálů produkovaných okolními buňkami (podmínka správného růstu, vývoje celého mnohobuněčného organismu - koordinace)

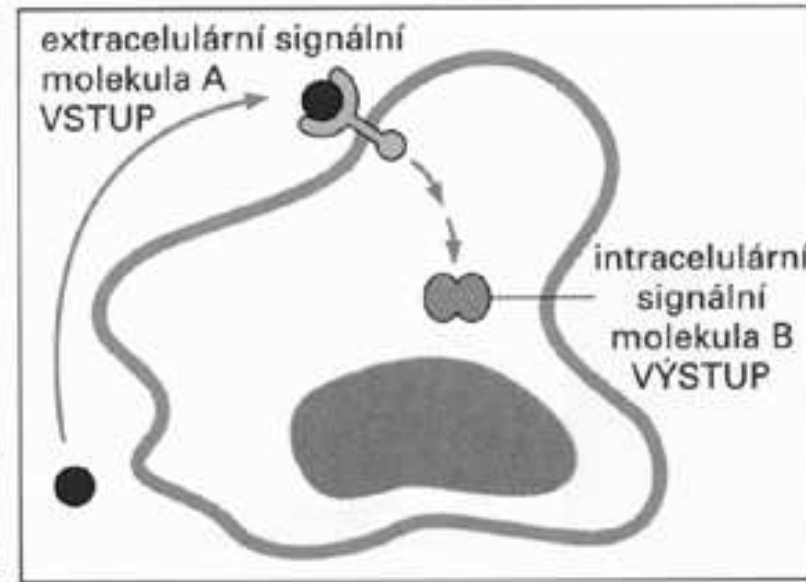
Signál je receptorem zachycen buď na vnějším povrchu buňky nebo v cytoplazmě

# Princip signalizace

- úlohu signálů zajišťují speciální molekuly
- pro jejich detekci jsou buňky vybaveny příslušnými receptory

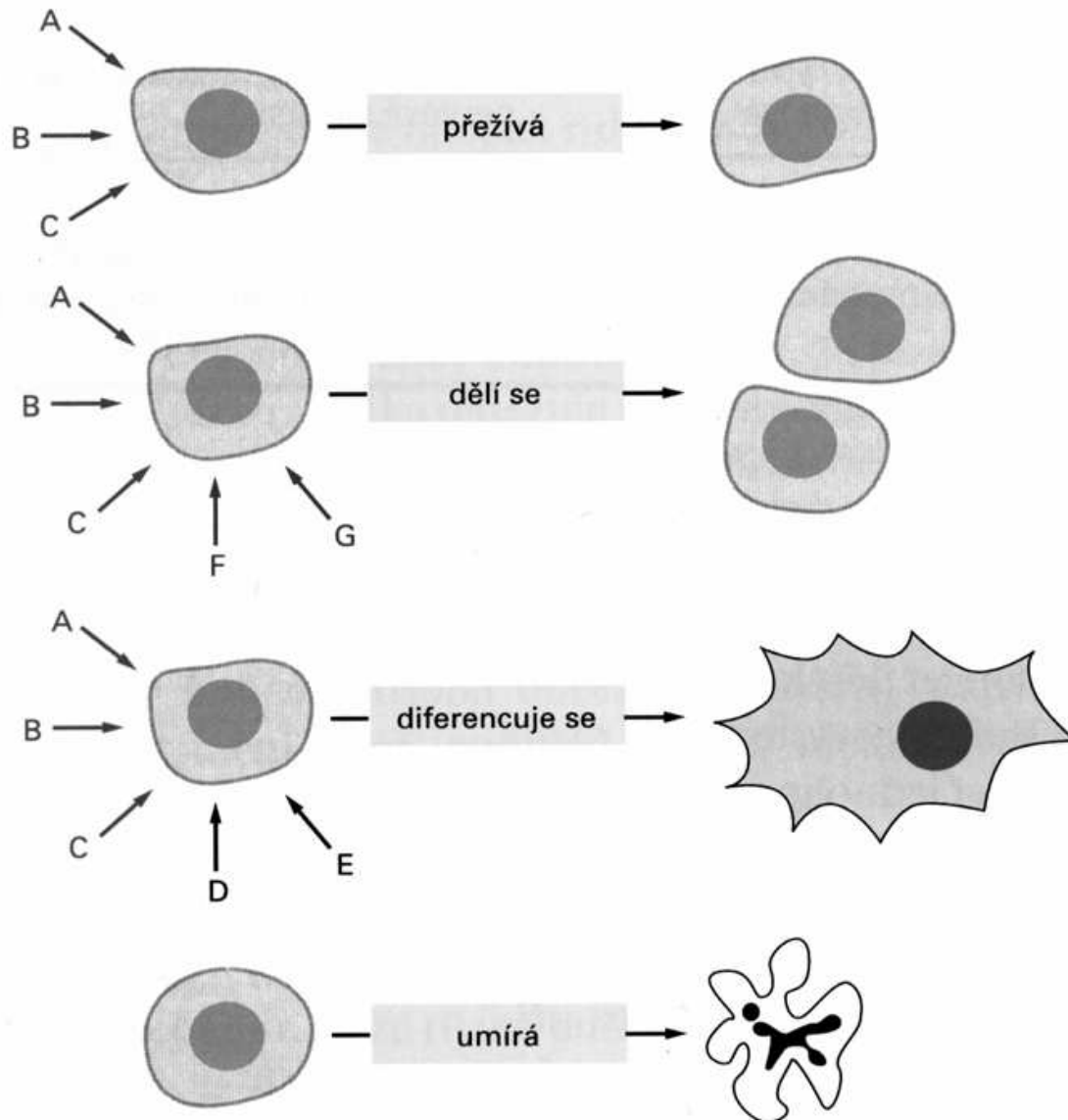


(A)



(B)

# Buňka je běžně vystavena mnoha signálům zároveň



každá buňka disponuje sadou receptorů, které určují na jaké signály bude reagovat

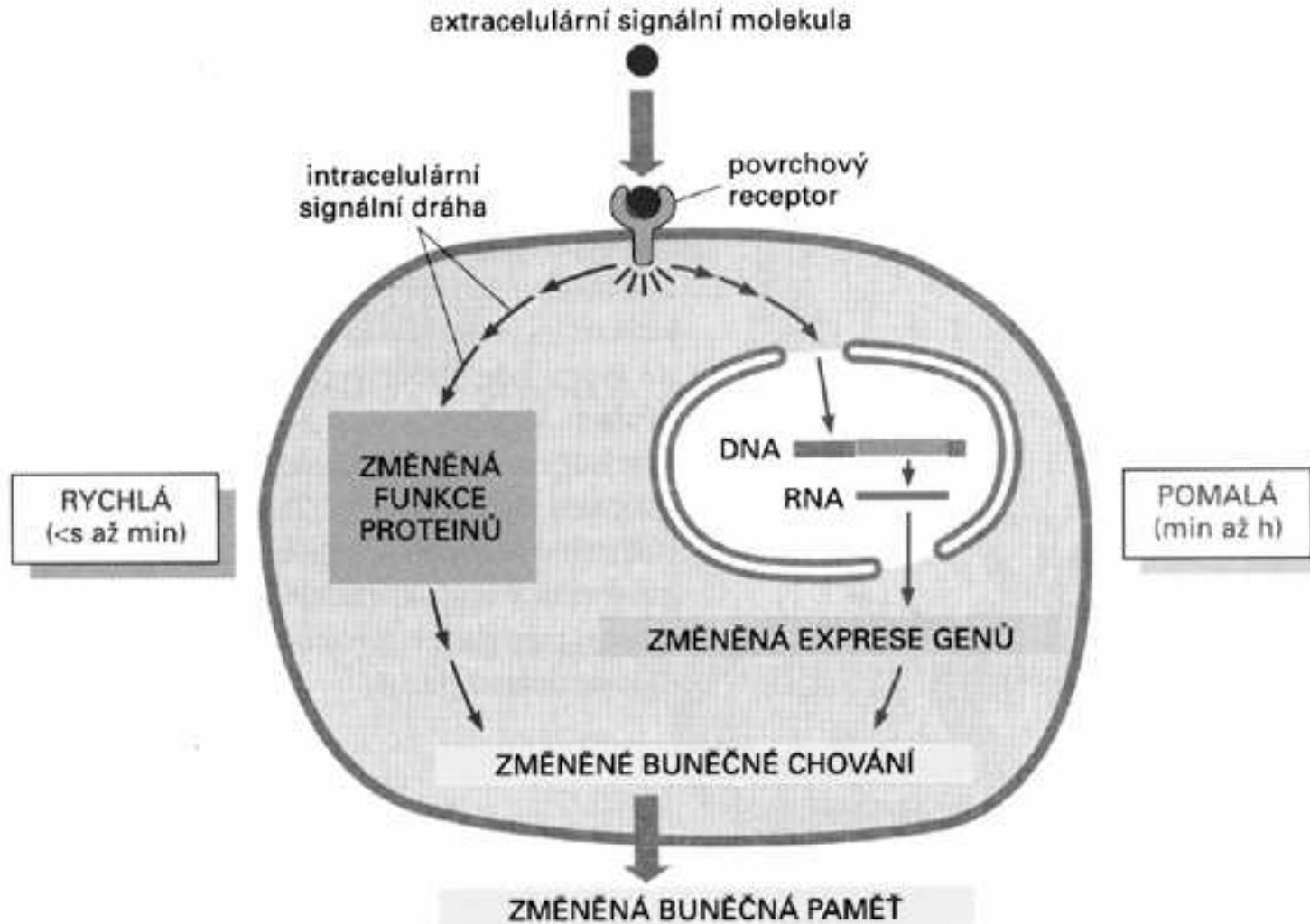
zelená šipka: přežití  
červená šipka: dělení  
černá šipka: diferenciaci

## Uvnitř buňky přítomnost komplexu signál-receptor vyvolá specifickou odpověď

- změnu genové exprese
- změnu aktivity metabolických enzymů
- změnu konfigurace cytoskeletonu
- změnu permeability membrány pro ionty
- aktivaci syntézy DNA
- smrt buňky

**Zastavení buněčné odpovědi je  
podmíněno degradací nebo  
inaktivací signální molekuly**

# Rozdělení signálních drah podle rychlosti reakce



## 3 fáze zpracování signálu

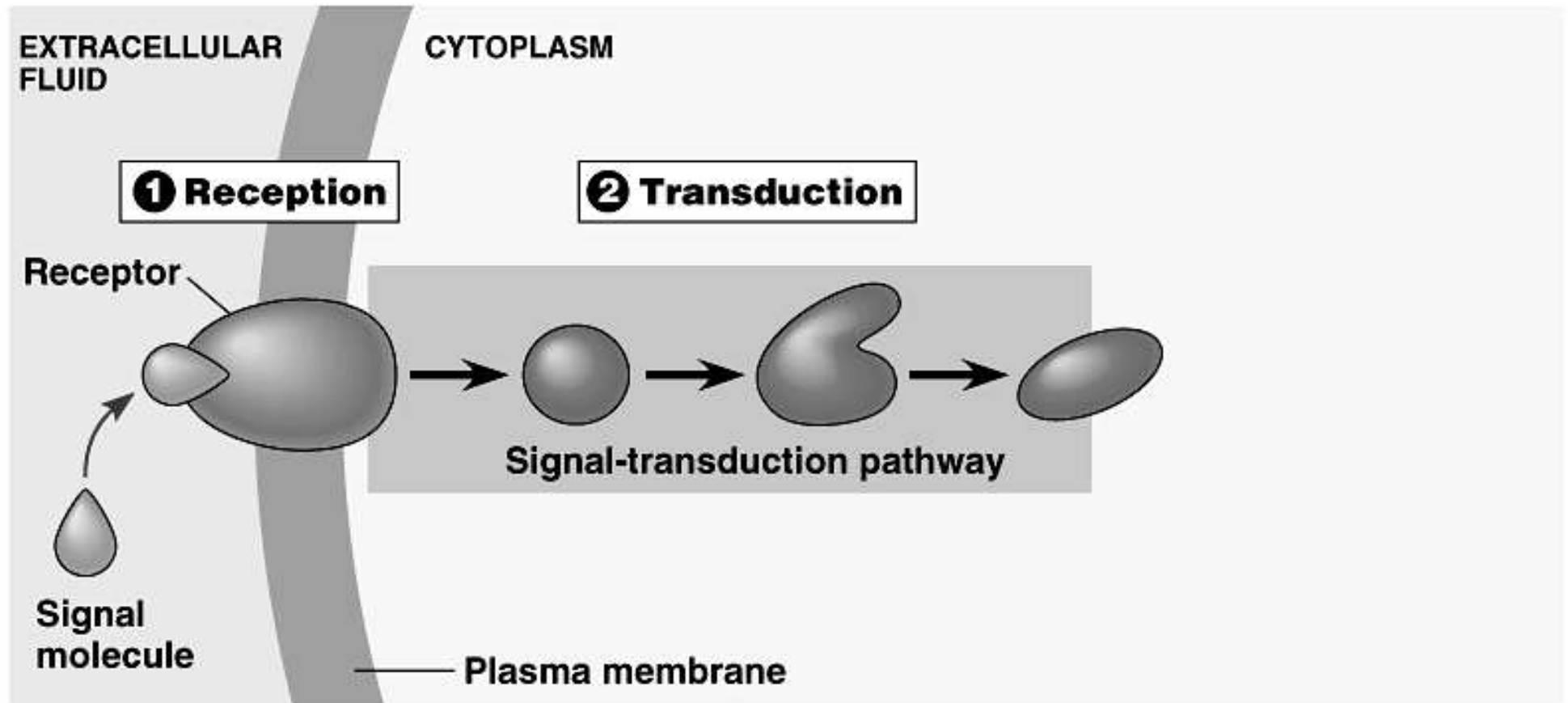
1. Přijetí signálu a jeho konverze do „srozumitelné“ podoby





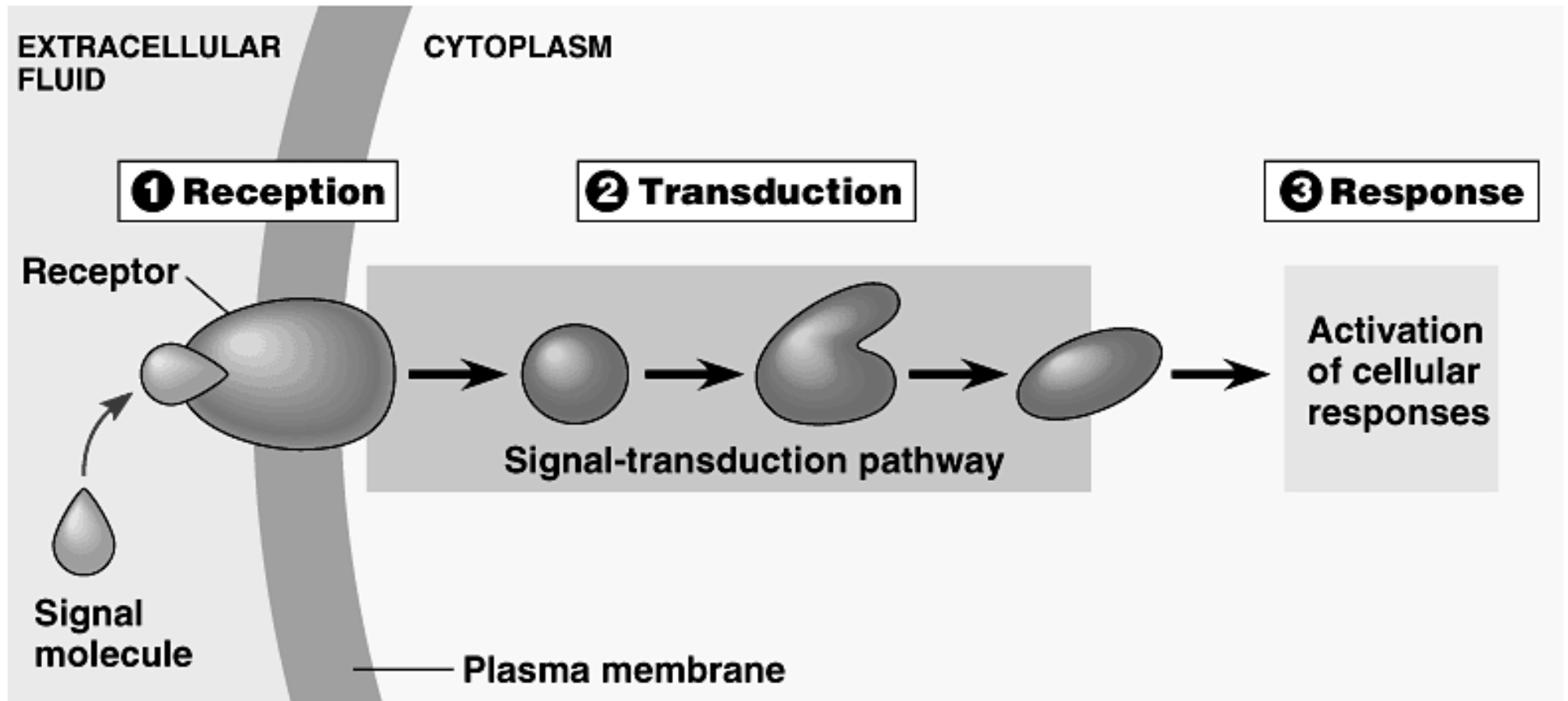
# 3 fáze zpracování signálu

## 2. Přenos signálu buňkou



# 3 fáze zpracování signálu

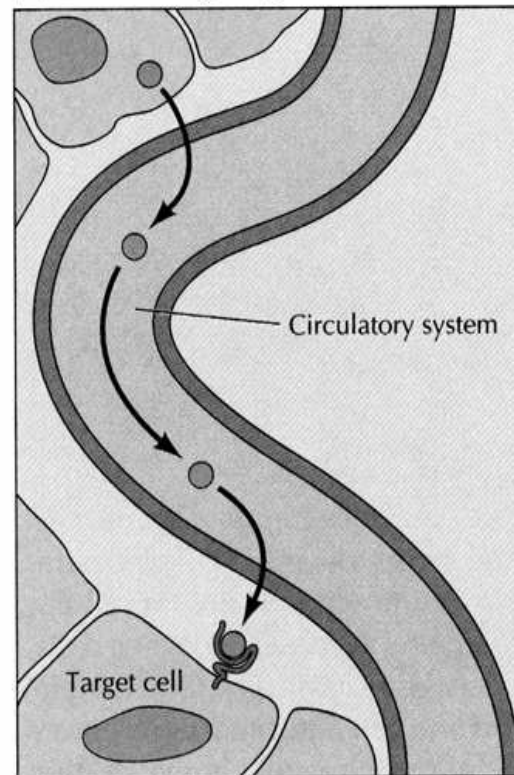
## 3. Buněčná odpověď



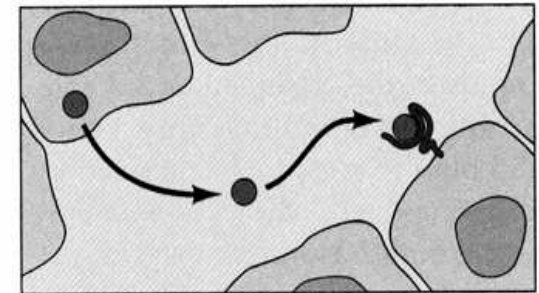
# Rozdělení signálů živočišných buněk podle dosahu

- endokrinní (velká vzdálenost, krevní tok, difúze)
- parakrinní (do mimobuněčných tekutin, lokální účinek)
- synaptické (neurony)
- přímý kontakt signální molekula je ukotvena v membráně a zároveň vystavena receptoru cílové buňky)
- autokrinní (buňka produkční je zároveň buňkou cílovou)

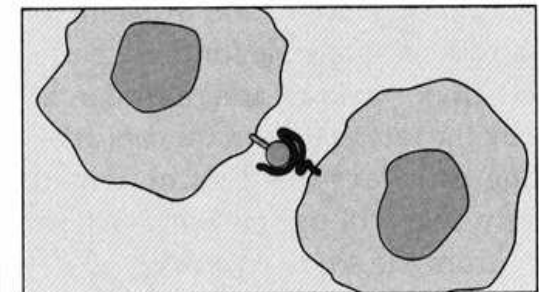
(A) Endocrine signaling



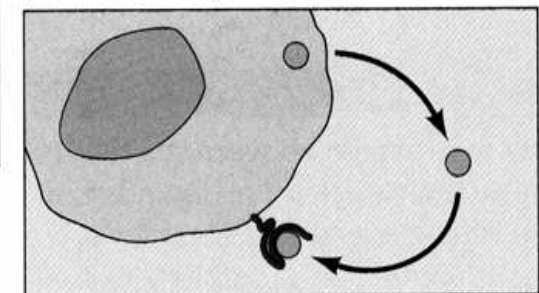
(B) Paracrine signaling



(C) Direct cell-to-cell signaling

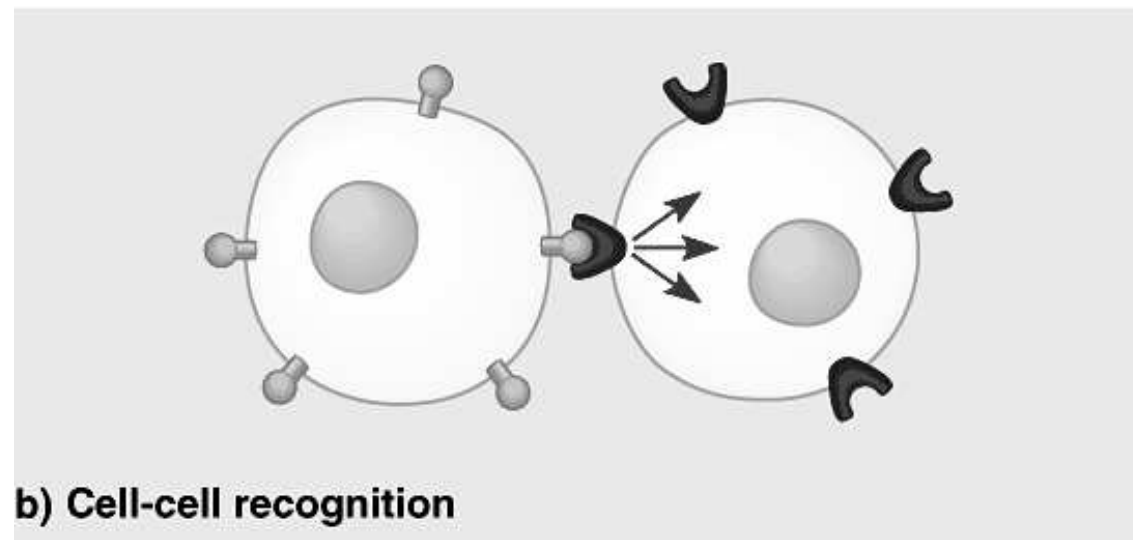
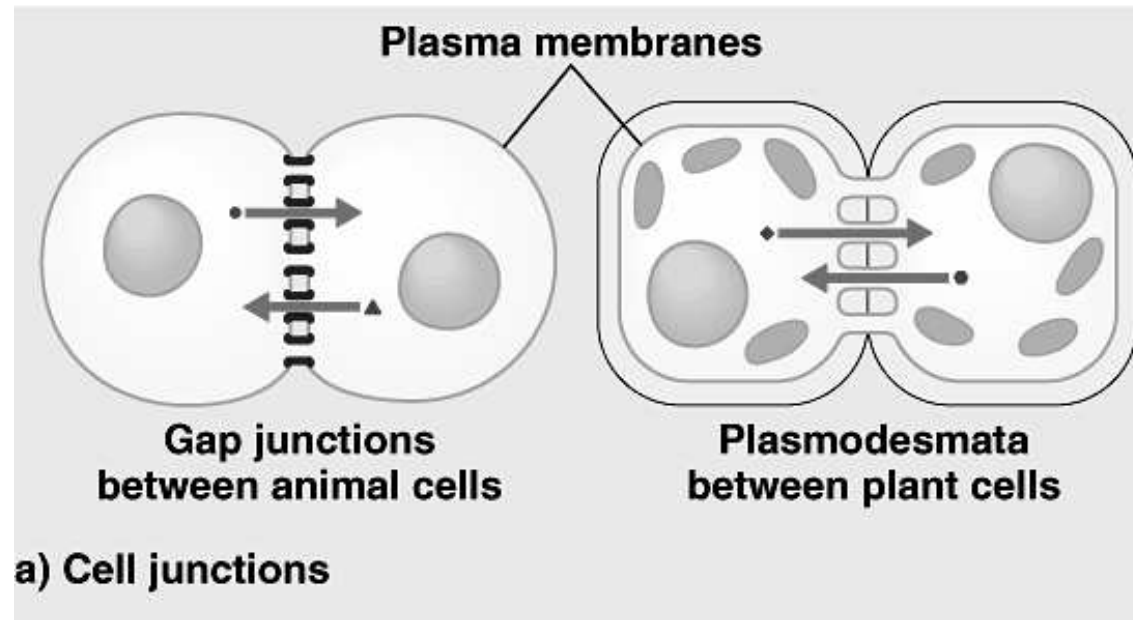


(D) Autocrine signaling



## Figure 11.4 Communication by direct contact

Některé buňky využívají přímé propojení se sousedními buňkami



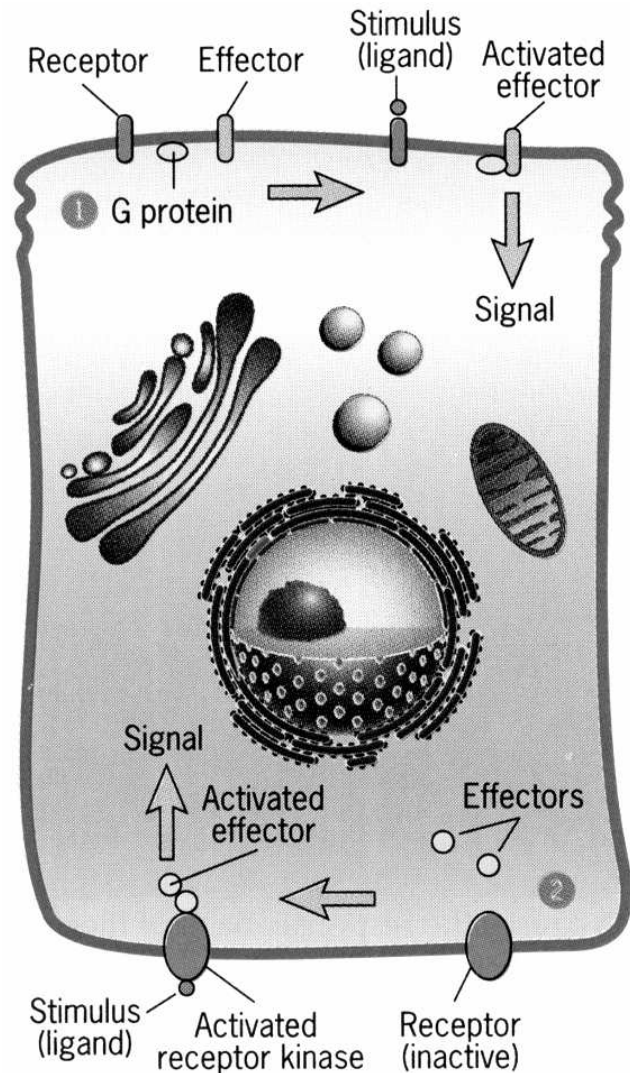
# Typy signálů

- proteiny
- peptidy
- aminokyseliny
- nukleotidy
- steroidy
- mastné kyseliny a jejich deriváty
- plyny

# Význam rozpustnosti signální molekuly

## 1. Hydrofilní signály

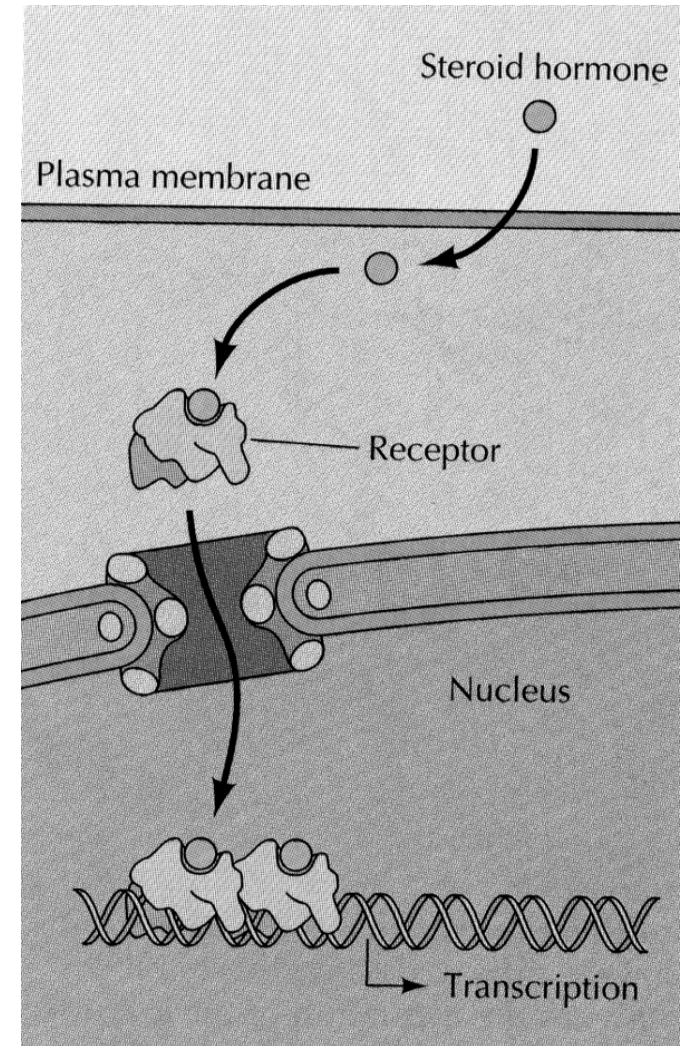
- neprocházejí plazmatickou membránou
- vážou se na povrchové receptory
- z krve se odstraňují během několika minut
- zprostředkovávají krátkodobé odpovědi



# Význam rozpustnosti signální molekuly

## 2. Lipofilní signály

- v krvi se pohybují prostřednictvím nosičů
- volně procházejí plazmatickou membránou
- vážou se na cytoplazmatické nebo jaderné receptory
- v krvi perzistují hodiny až dny
- zprostředkovávají dlouhodobé odpovědi (výjimka prostaglandiny)



# Parakrinní signály

- rychle zpracovány (absorbce, enzymatické rozložení, imobilizace v matrix)
- krvi se neobjevují
- daný signál zároveň obdrží řada sousedících buněk v dané oblasti

Příklady parakrinních signálů:

## 1. histamin

- uchováván v nitrobuněčných vezikulech buněk konektivní tkáně
- vyplavuje se v případě poranění nebo infekce
- vyvolává dilataci krevních vlásečnic
- usnadňuje přístup proteinů séra a makrofágů
- přitahuje eosinofilní granulocyty, které enzymaticky histamin odstraňují

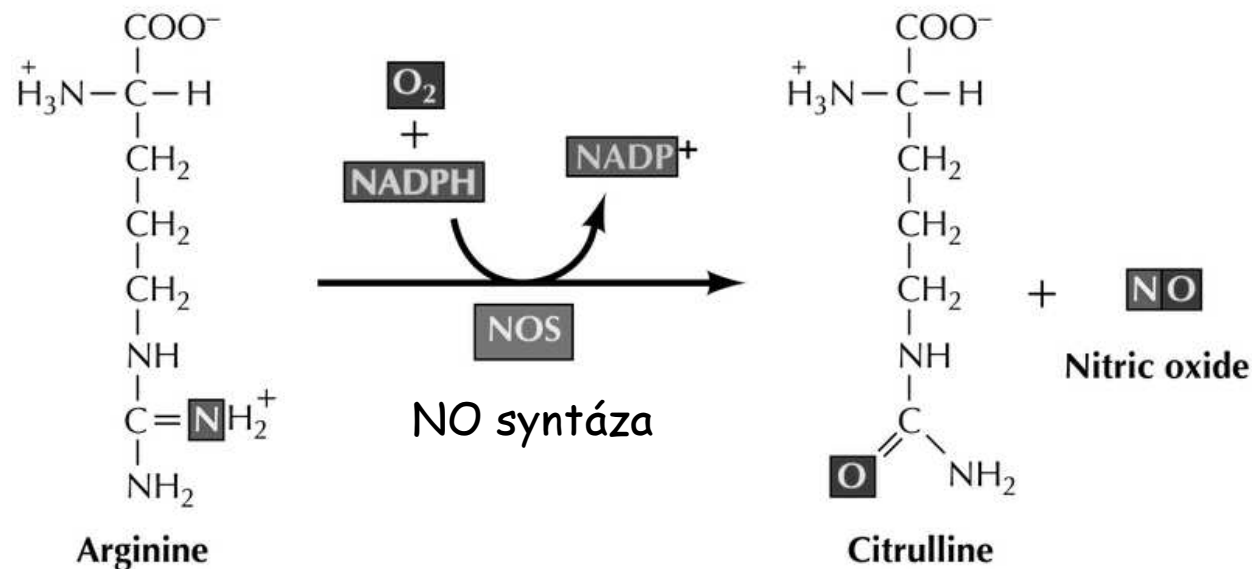


## 2. Fibronektin

- po sekreci imobilizován v mimobuněčném prostoru v podobě sítě
- dlouhodobý lokální účinek

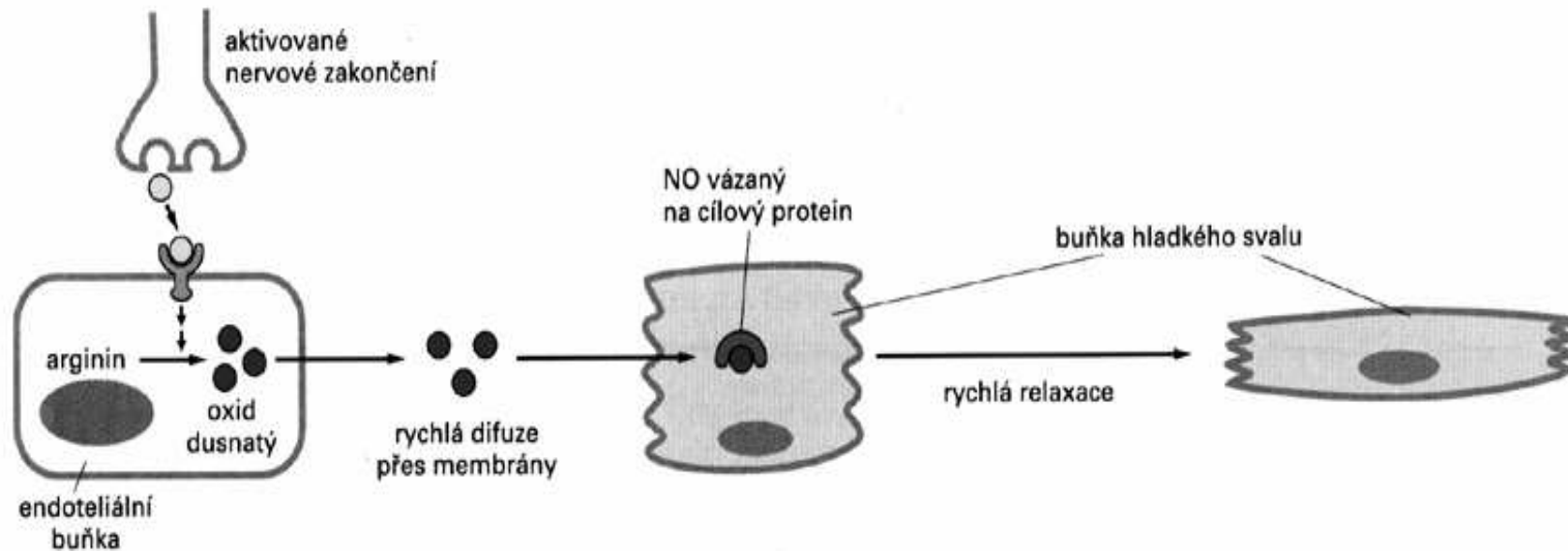
### 3. Oxid dusnatý

- hlavní parakrinní signál nervového, imunitního a oběhového systému
- volně prochází membránami a ovlivňuje aktivitu enzymů
- v buňkách vzniká z argininu - jen lokální a krátkodobý účinek - rozklad na dusitany a dusičnany



## Úloha oxidu dusnatého při uvolňování hladkého svalu v cévní stěně

- acetylcholin uvolňovaný v nervových zakončeních vyvolá vznik a uvolnění NO z endoteliálních buněk cév
- NO difunduje z endoteliálních buněk do sousedních buněk hladkého svalu, který ovlivňuje průchodnost cév
- uvolněním svalu se průchodnost cév zvyšuje



## Výhody signalizace NO:

- rychlost (sekundy, minuty)
- **nitroglycerin:** v těle se mění na NO - uvolnění krevních cév - snížení zatížení srdce (**lék na anginu pectoris**)
- obvyklým cílem NO je také **guanylát cykláza** - tvorba cGMP - zásah do signálních drah

## Synaptické signály

- typické pro spojení neuron-neuron, neuron-svalová buňka
- hydrofilní povaha - účast povrchových receptorů
- podíl na regulaci permeability membrány

## Další signální molekuly

Peptidové hormony a růstové faktory: desítky až stovky AK

- neuropeptidy - enkefaliny a endorfiny fungují zároveň jako signály na synapsích i jako signály pro vzdálené buňky
- inzulin, glukagon, růstový hormon, prolaktin

Polypeptidové růstové faktory: vyšší molekulová hmotnost

- nervový růstový faktor (NGF), epidermální růstový faktor (EGF), růstový faktor krevních destiček (platelet-derived growth factor PDGF)
- cytokiny

Lipidové signály

- eicosanoidy: prostaglandiny, tromboxany, leukotrieny (deriváty kyseliny arachidonové)

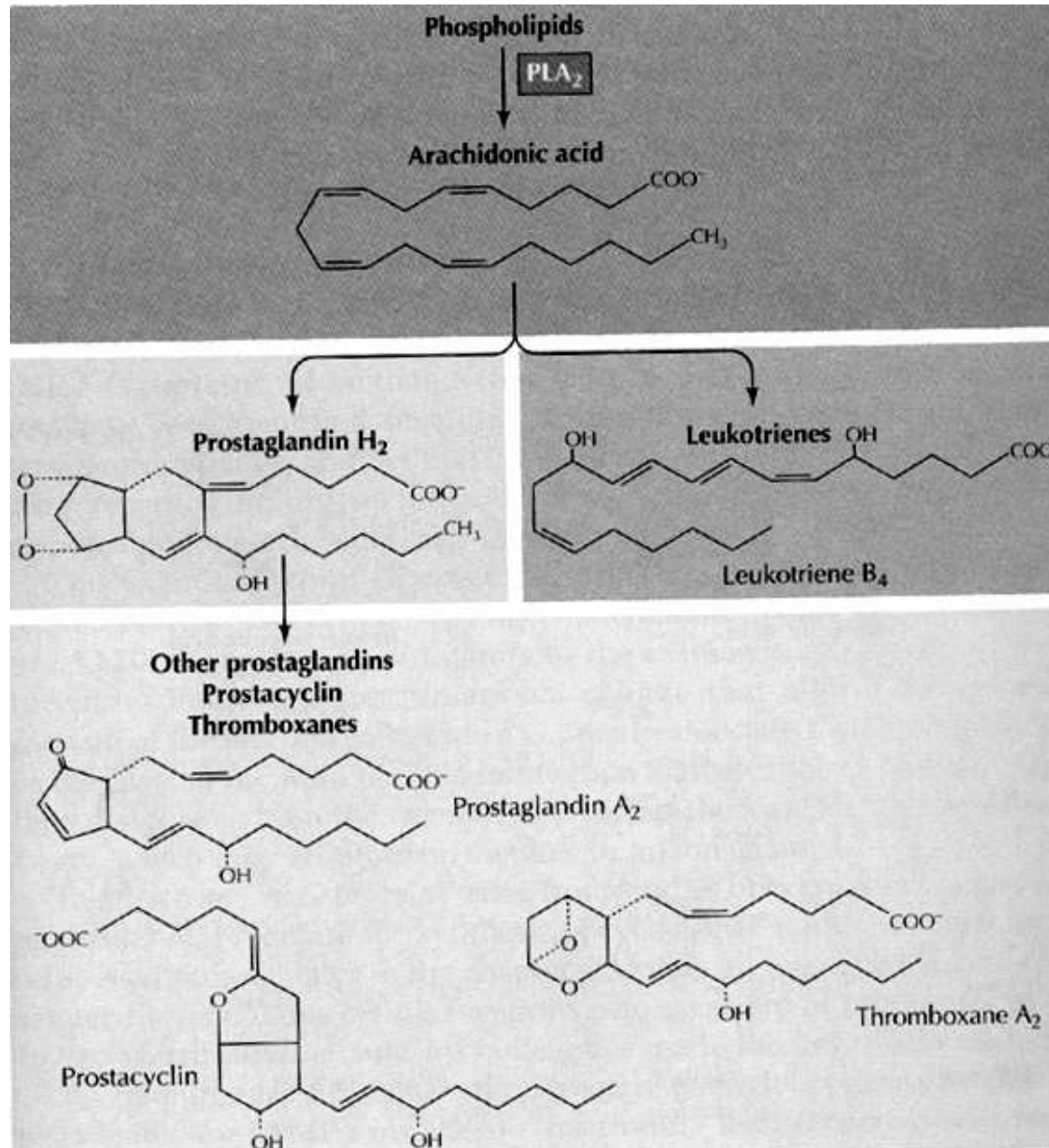
Rostlinné hormony

- auxiny, gibereliny, cytokininy, kys. abscisová, etylen

Tabulka 15-1 Některé příklady signálních molekul

Signální molekula	Původ	Chemická podstata	Některé účinky
<b>Hormony</b>			
<i>Adrenalin</i>	nadledvina	derivát tyrosinu	zvyšuje krevní tlak, zrychluje tep srdce a metabolismus.
<i>Kortisol</i>	nadledvina	steroid (derivát cholesterolu)	ovlivňuje metabolismus proteinů, sacharidů a lipidů v mnoha tkáních
<i>Estradiol</i>	vaječník	steroid (derivát cholesterolu)	indukuje a udržuje sekundární samičí pohlavní znaky
<i>Glukagon</i>	$\alpha$ -buňky slinivky břišní	peptid	stimuluje syntézu glukosy, odbourání glykogenu a odbourání lipidů například v jaterních a tukových buňkách
<i>Insulin</i>	$\beta$ -buňky slinivky břišní	protein	stimuluje příjem glukosy, syntézu proteinů a syntézu lipidů například v jaterních buňkách
<i>Testosteron</i>	varlata	steroid (derivát cholesterolu)	indukuje a udržuje sekundární samčí pohlavní znaky
<i>Thyroidní hormon (thyroxin)</i>	štítná žláza	derivát tyrosinu	stimuluje metabolismus řady buněčných typů
<b>Lokální mediátory</b>			
<i>Epidermální růstový faktor (EGF)</i>	různé buňky	protein	stimuluje epidermální buňky a řadu jiných buněk k proliferaci.
<i>Růstový faktor krevních destiček (PDGF)</i>	různé buňky včetně krevních destiček	protein	stimuluje mnoho buněčných typů k proliferaci
<i>Nervový růstový faktor (NGF)</i>	různé inervované tkáně	protein	zajišťuje přežití jistých tříd neuronů; působí růst jejich axonů
<i>Histamin</i>	žírné buňky	derivát histidinu	působí prodloužení buněk a zvyšuje jejich propustnost, pomáhá vytvářet záněty
<i>Oxid dusnatý (NO)</i>	nervové buňky; endoteliální buňky, které vystylají cévy	rozpuštěný plyn	působí uvolnění hladkého svalstva, reguluje aktivitu nervové buňky
<b>Nervové mediátory</b>			
<i>Acetylcholin</i>	nervová zakončení	derivát cholinu	excitační nervový mediátor v mnoha nervosvalových synapsích a v centrální nervové soustavě
<i>Kyselina <math>\gamma</math>-aminomáselná (GABA)</i>	nervová zakončení	derivát kyseliny glutamové	inhibiční nervový mediátor v centrální nervové soustavě
<b>Signální molekuly, které závisejí na kontaktu</b>			
<i>Delta</i>	zárodečné neurony, různé další buňky embrya	transmembránový protein	zabraňuje sousedním buňkám, aby se specializovaly stejným směrem, jako signalizující huňka

# Lipidové signály



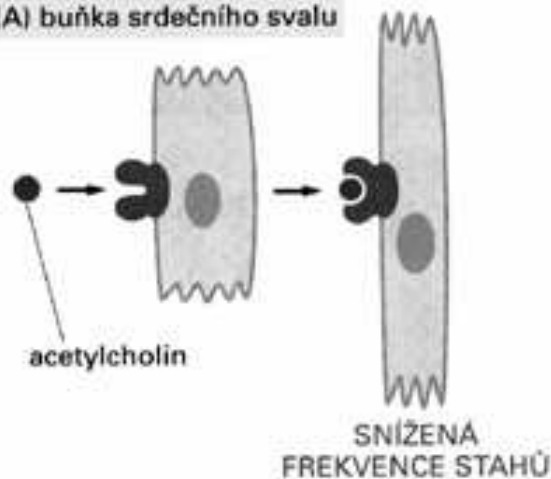


## Jedna signální molekula - rozdílné účinky na různé buňky

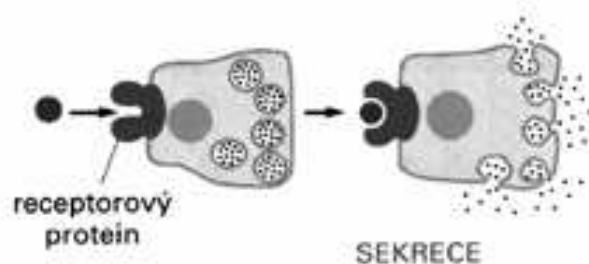
Např. acetylcholin - stimulace kontrakce b. kosterního svalstva  
X tlumící účinek na b. srdečního svalstva

Důvod: - různé typy receptorů pro daný signál  
- odlišný nitrobuněčný aparát

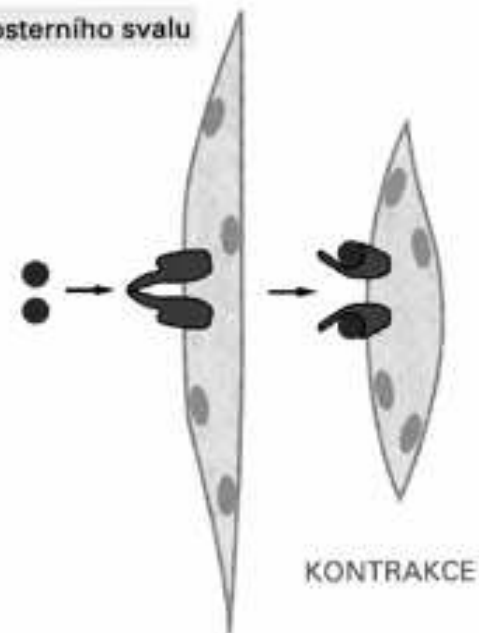
(A) buňka srdečního svalu



(B) buňka slinné žlázy



(C) buňka kosterního svalu

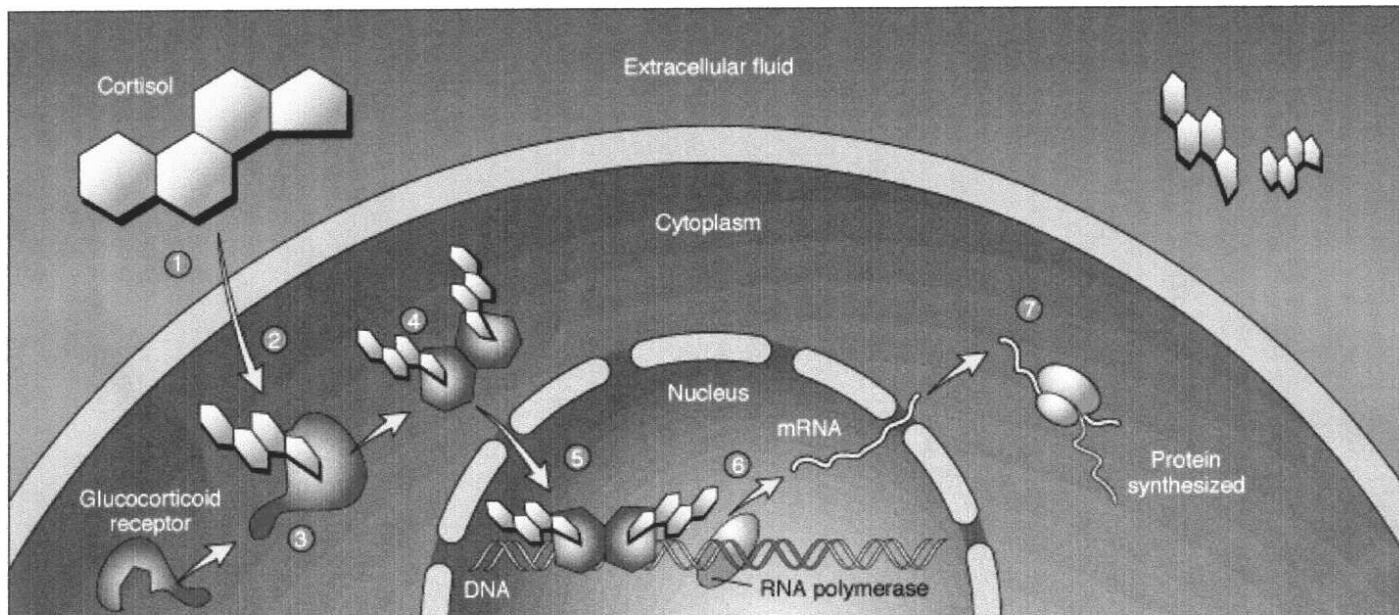
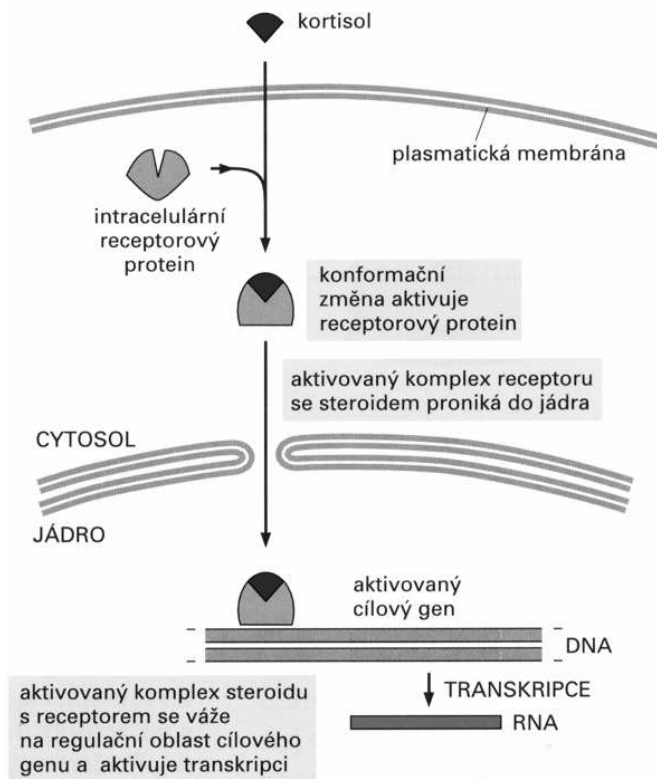


## Signalizace zprostředkované nitrobuněčnými receptory

Malý počet steroidních / tyroidních hormonů reguluje mnoho vývojových a fyziologických procesů u evolučně vzdálených organismů.

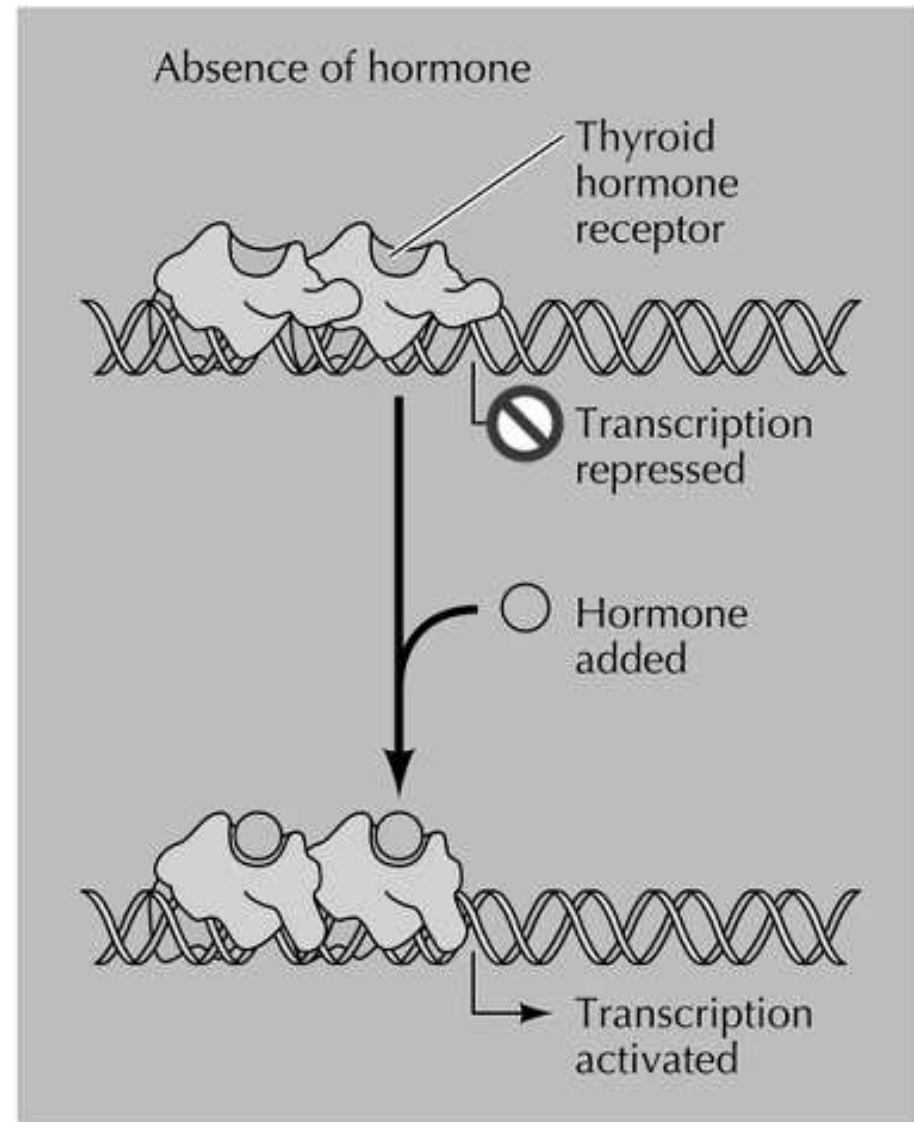
### Mechanismus účinku:

Malá velikost hormonů - snadná difúze membránou - pevná vazba na nitrobuněčný receptor - konformační změna receptoru (aktivace) - zvýšená afinita ke specifickým sekvencím DNA - regulace transkripce cílových genů

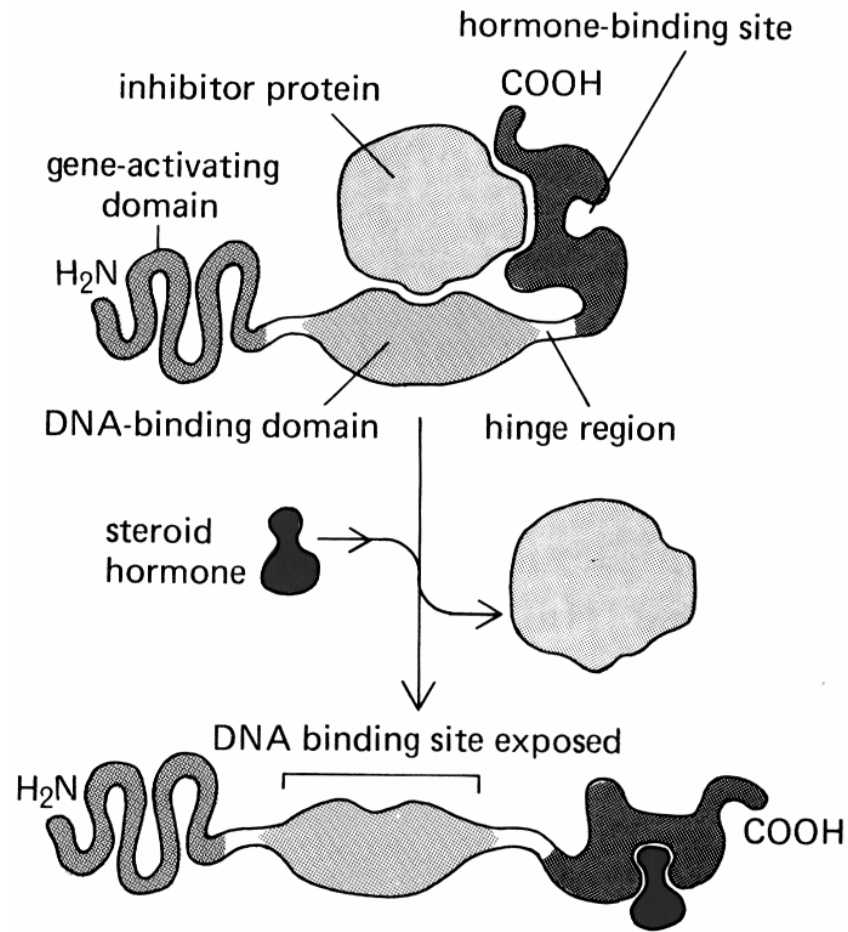


## Receptor pro tyroidní hormon se váže na DNA i za nepřítomnosti ligandu

- ale v tom případě působí jako represor transkripce
- přítomnost ligandu jej mění na aktivátor

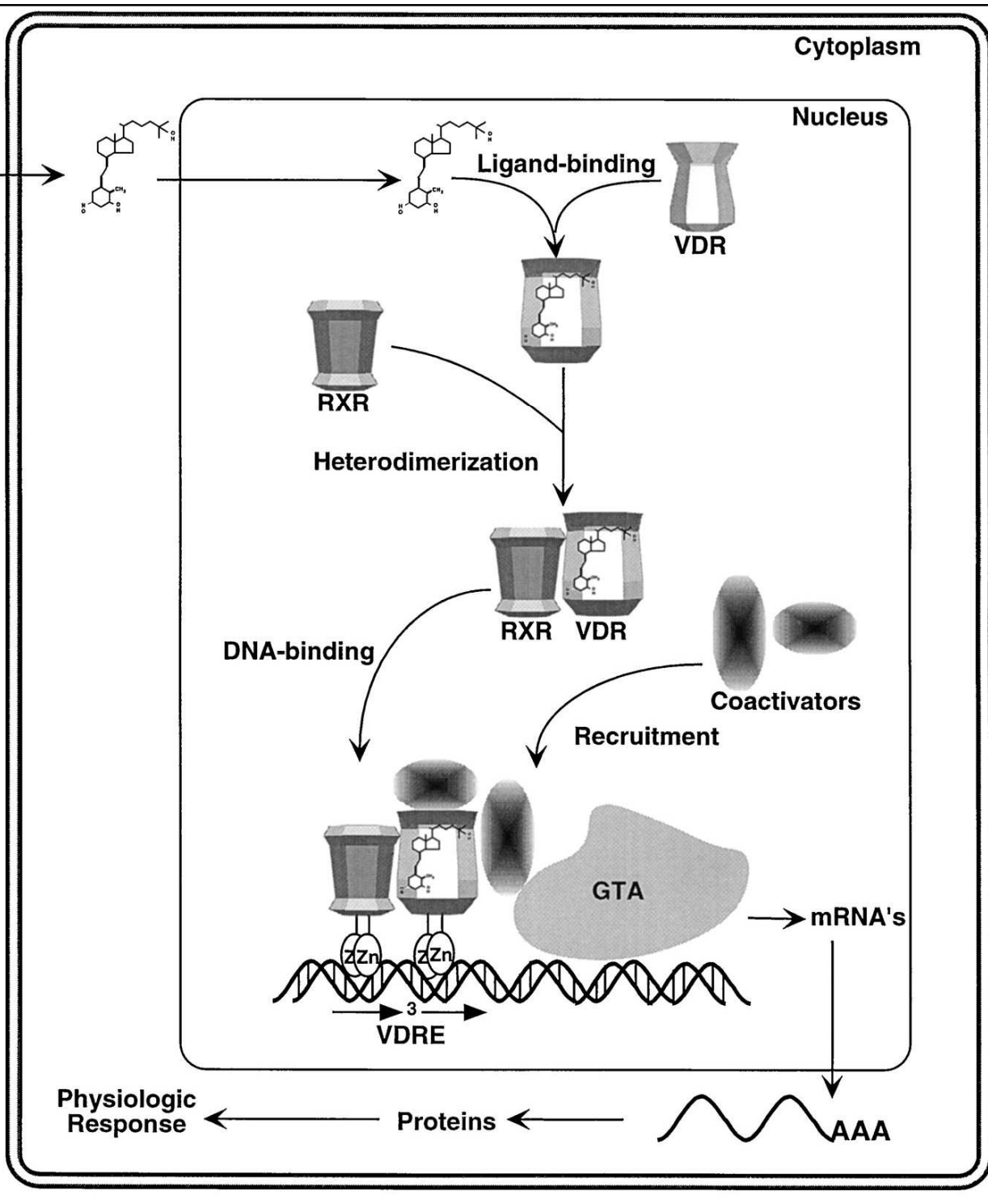
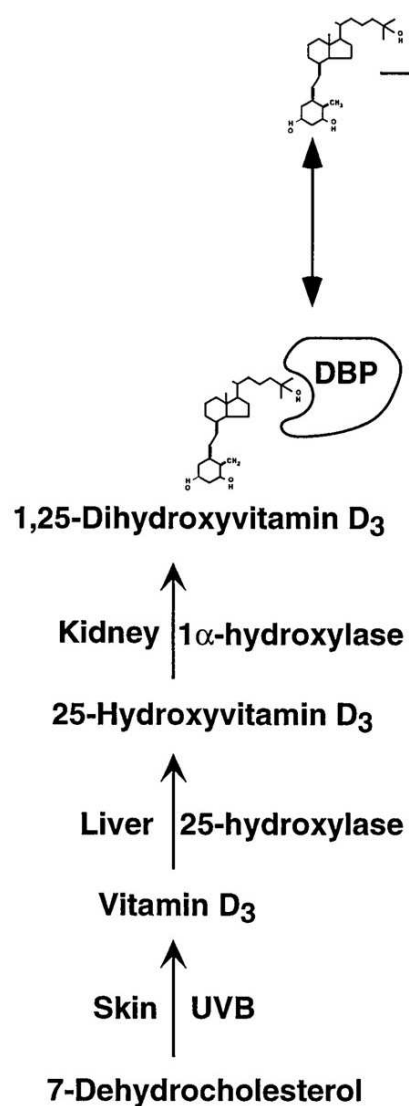


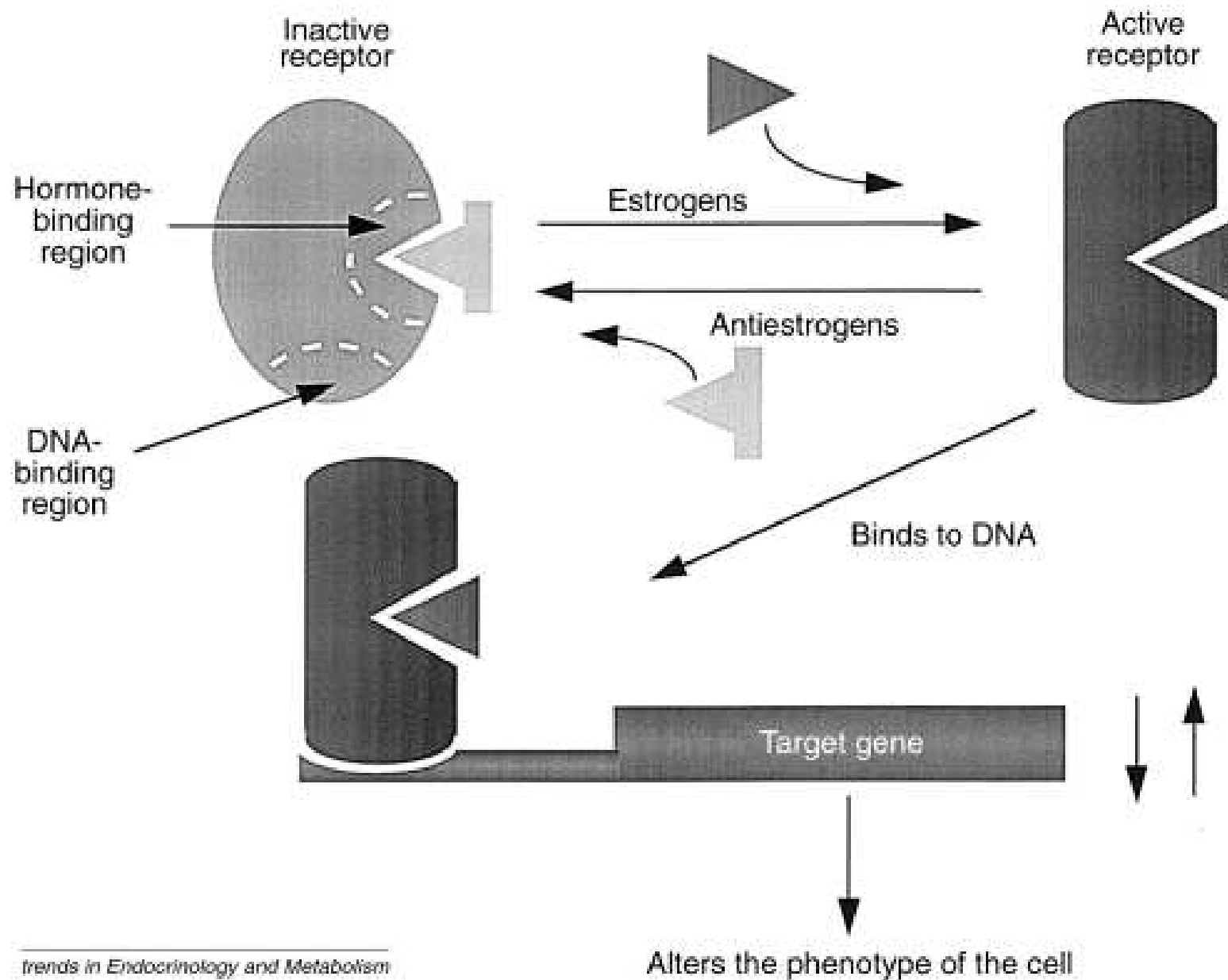
# Struktura nitrobuňečných receptorů



C-konec: doména pro vazbu hormonu  
N-konec: doména pro řízení transkripce  
Střed molekuly: doména pro vazbu DNA

# Působení vitamínu D



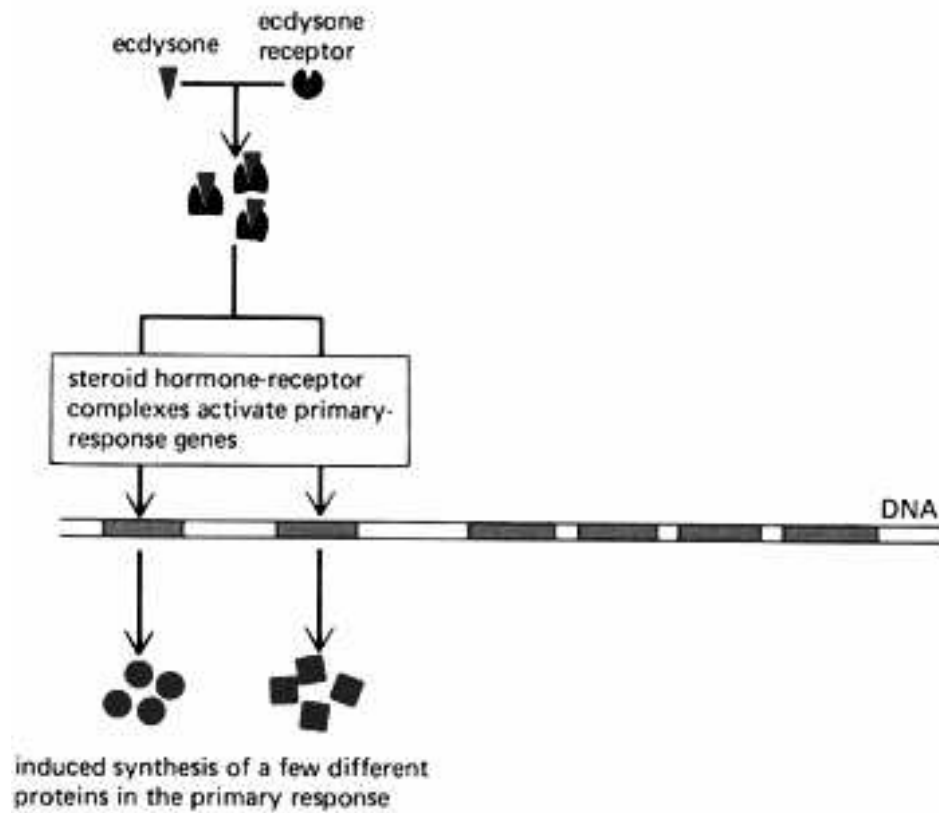


Reakce na přítomnost steroidních hormonů bývá  
dvoustupňová:

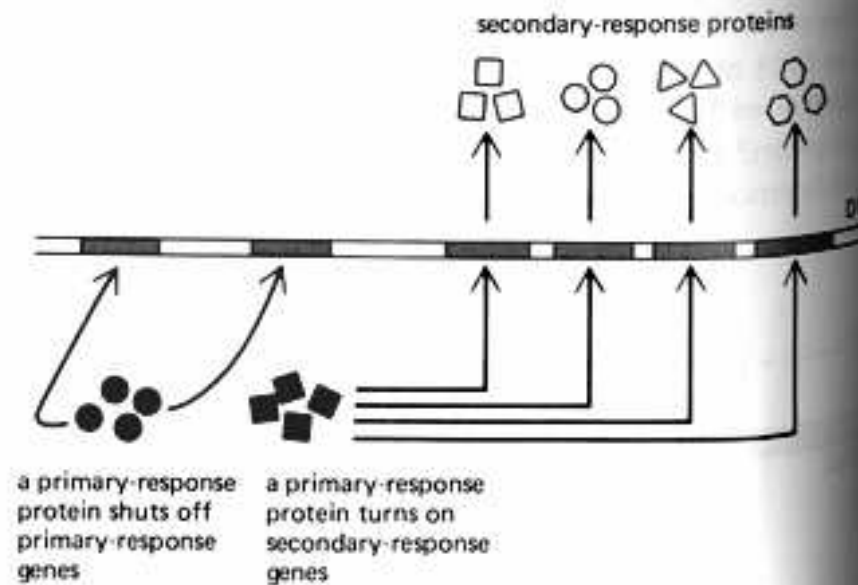
1. Primární odpověď - přímá indukce transkripce několika cílových genů
2. Sekundární odpověď - aktivace dalších genů, na které se podílejí produkty genů transkribovaných v rámci primární odpovědi



(A) EARLY PRIMARY RESPONSE TO ECDYSONE



(B) DELAYED SECONDARY RESPONSE TO ECDYSONE



# Signalizace zprostředkované povrchovými receptory

## Signální dráhy:

1. **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
  - složka replikačního aparátu
  - složka aparátu pro genovou expresi

## Amplifikace signálu

- jedna signální molekula aktivuje jediný receptor
- jediný aktivovaný receptor aktivuje větší počet molekul enzymu tvořícího sekundární přenašeč
- každá molekula tohoto enzymu katalyzuje tvorbu mnoha molekul sekundárního přenašeče
- každá molekula sekundárního přenašeče aktivuje mnoho cílových molekul

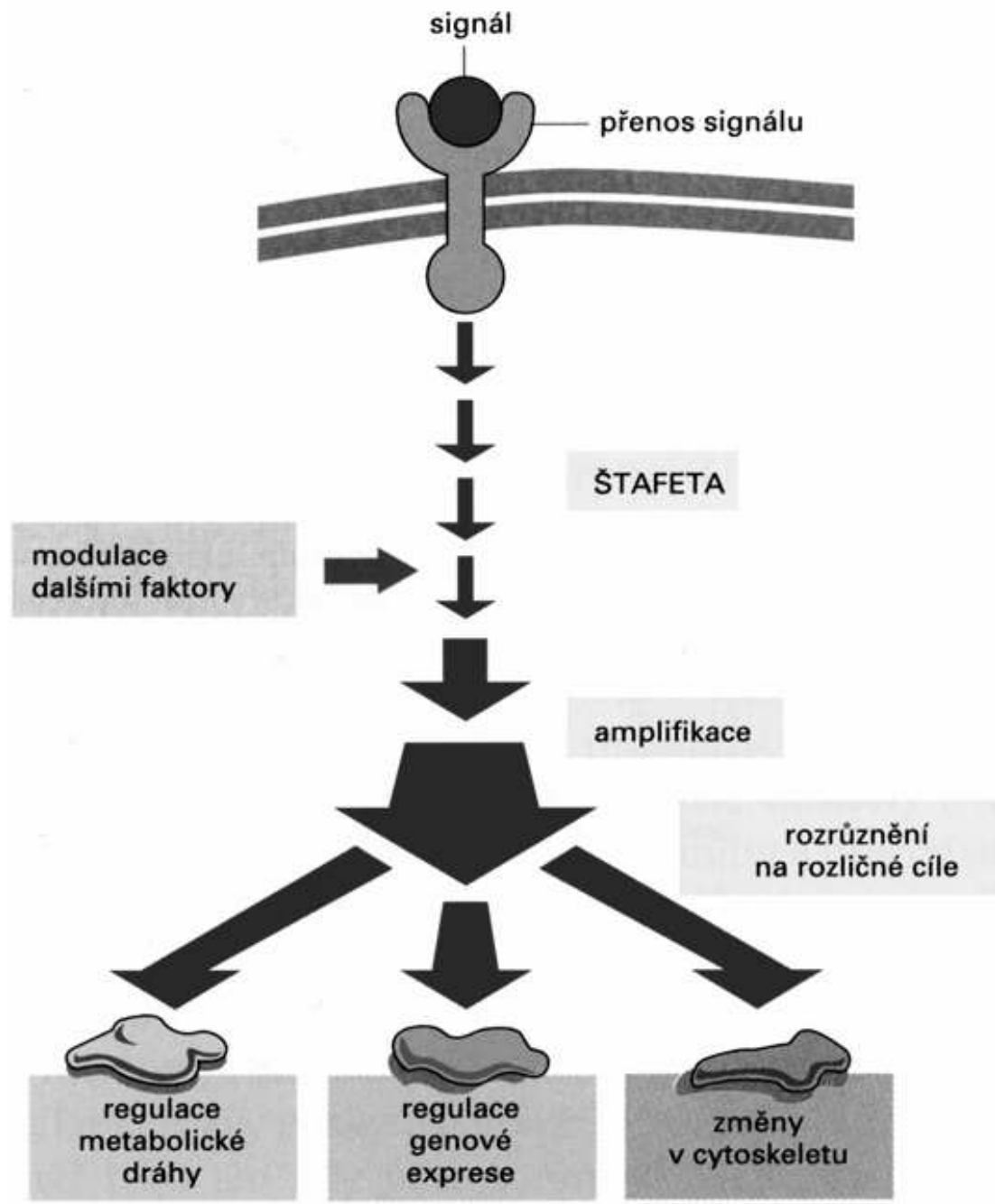
### Výsledek:

- Nízká koncentrace ligandu - významná odpověď uvnitř buňky**
- schopnost reakce na malé změny okolí.

# Funkce nitrobuněčných signálních kaskád

- *přenos* signálu z bodu přijetí do buněčného aparátu, který zajistí odpověď
- *transformace* signálu do molekulární podoby, která může stimulovat odpověď
- *zesílení* signálu
- *rozdělení* signálu tak, aby ovlivnil několik dějů - vliv na různé cílové molekuly - rozvětvení toku informace-komplexní odpověď
- každý krok kaskády je otevřen působení dalších faktorů - *modulace* odpovědi podle podmínek

# Nitrobuněčná signální kaskáda



## Všechny enzymy zapojené do signálních kaskád jsou důkladně regulovány

- aktivita enzymů je určena rovnováhou mezi signály aktivačními a inhibičními
- po přijetí signálu se rovnováha velmi rychle obnovuje (ochrana organismu proti nežádoucím extrémům)

# Typy povrchových receptorů

## 1. Receptory typu iontových kanálků

- vazbou ligandu na receptor se ovlivňuje průchodnost membránových kanálků - změna permeability membrány
- rychlá signalizace na synapsích

## 2. Katalytické receptory

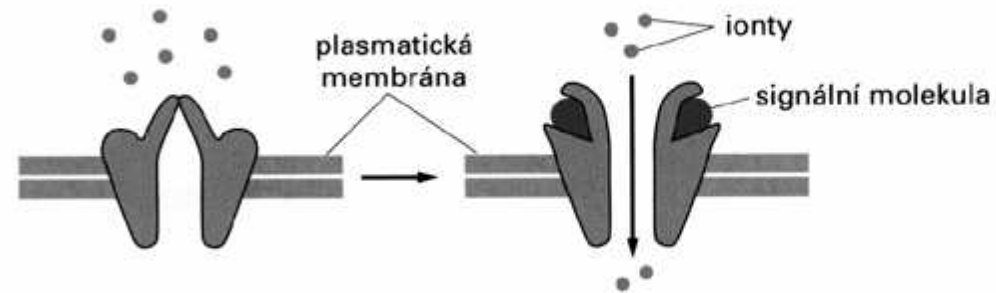
- vazbou ligandu získávají katalytickou schopnost
- obvykle transmembránové proteiny s PTK aktivitou (proteinové kinázy specifické pro tyrosin)

## 3. Receptory napojené na protein G

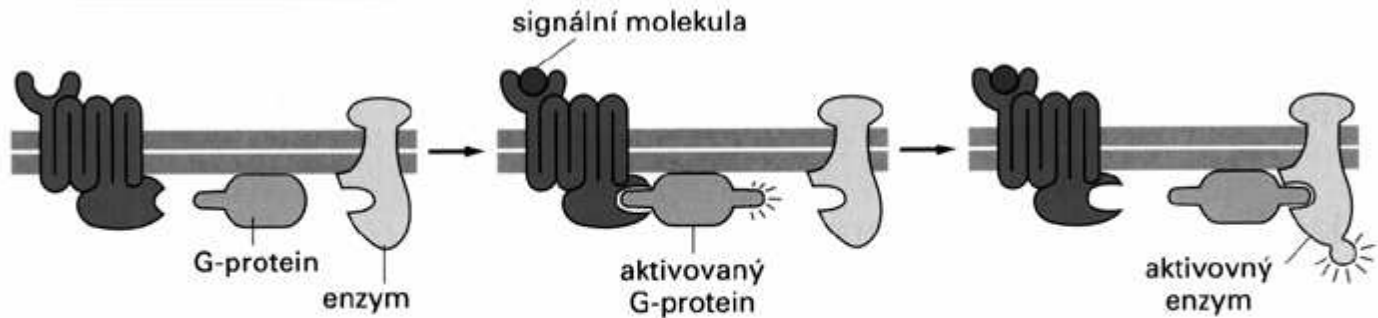
- nemají enzymovou aktivitu
- řídí aktivitu enzymů nebo průchodnost kanálků prostřednictvím proteinu G („GTP-binding regulatory protein“)

# Tři třídy povrchových receptorů

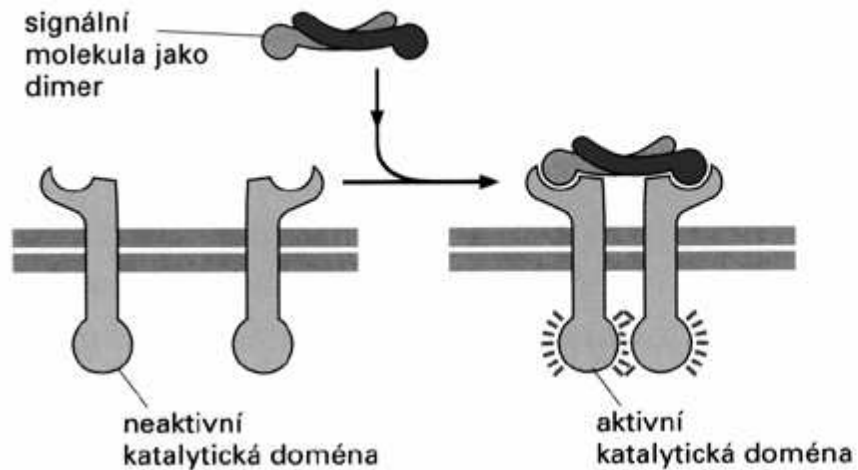
(A) receptory spojené s iontovým kanálem



(B) receptory vázané na G-protein



(C) receptory vázané na enzym





# Klasifikace katalytických receptorů

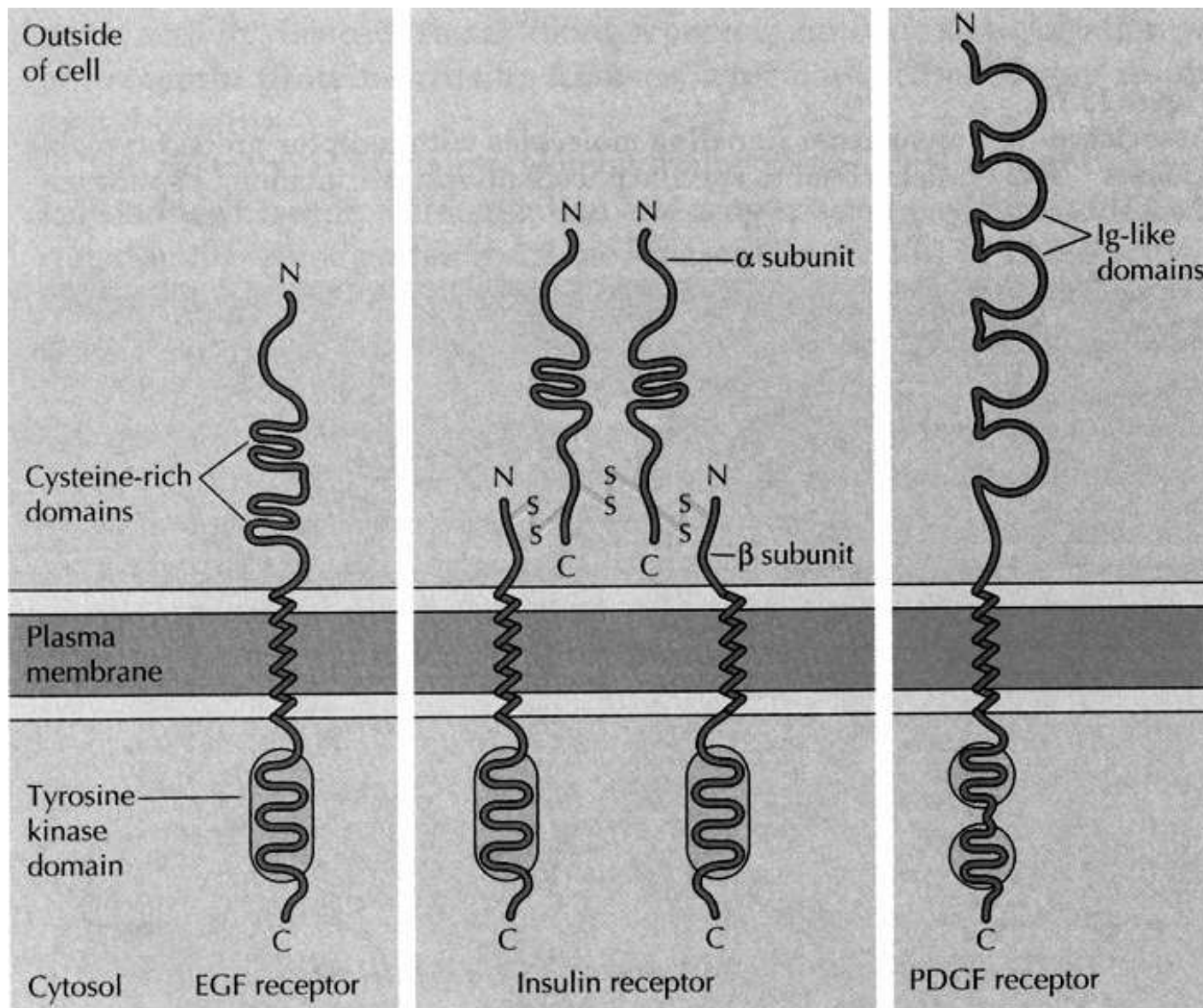
## 1. Membránově vázané PTK

- receptory pro většinu polypeptidových růstových faktorů
- společné strukturní rysy:
  - glykozylovaná N-koncová doména směřující ven z buňky pro vazbu ligandu
  - hydrofobní transmembránová šroubovice
  - cytozolická C-koncová katalytická doména
- N-koncová doména určuje typ signálu, na který bude buňka citlivá
- C-koncová doména určuje typ signální dráhy a tím také charakter buněčné odpovědi

## 2. Cytozolické PTK

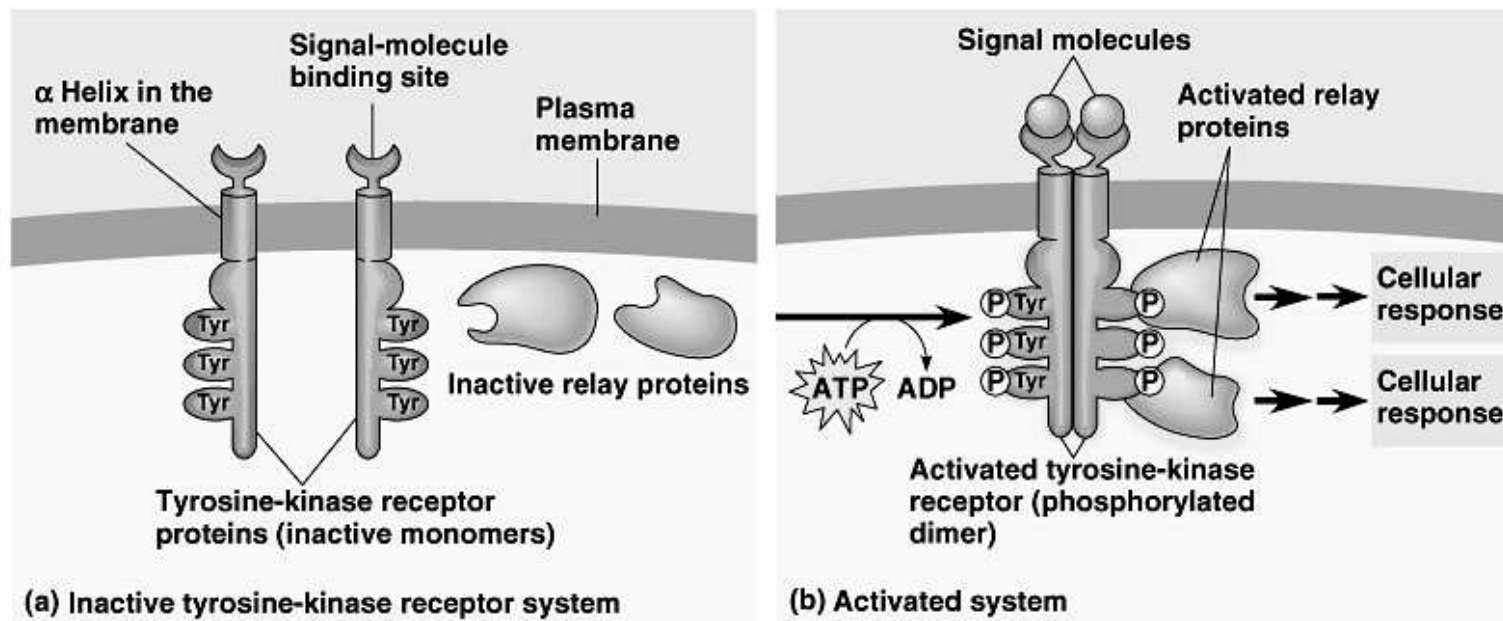
- nejsou přímo vázány na membránu
- fungují jako nitrobuněčné podjednotky transmembránových receptorů (Abl, Fps, Src, JAK)

# Organizace receptorových PTK

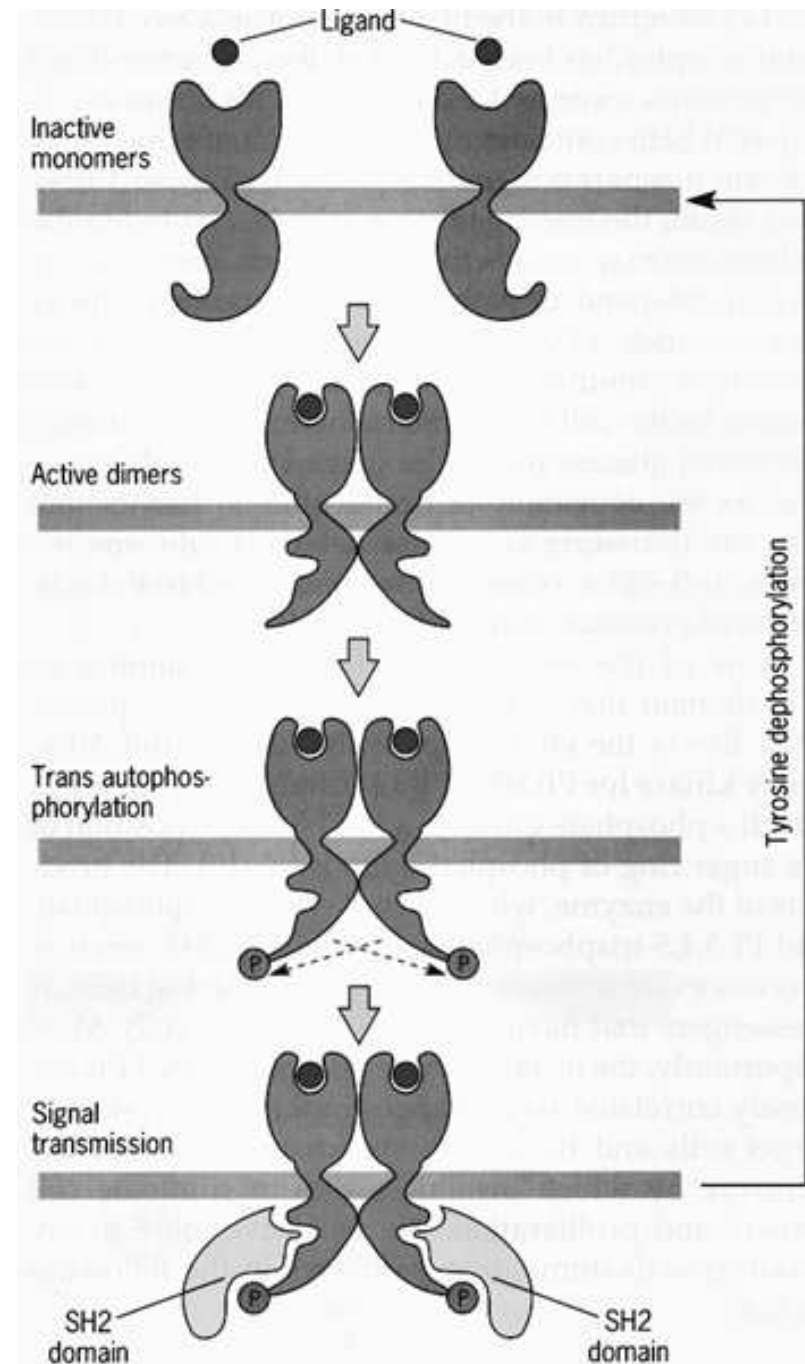


# Přenos signálu receptorovými PTK

- vazba ligandu indukuje změnu konformace receptoru
- nová konformace umožňuje interakci s jinou molekulou receptoru (dimerizace)
- autofosforylace receptoru
- stimulace PTK aktivity a umožnění vazby dalších proteinů zajišťujících přenos signálů prostřednictvím domény **SH2**



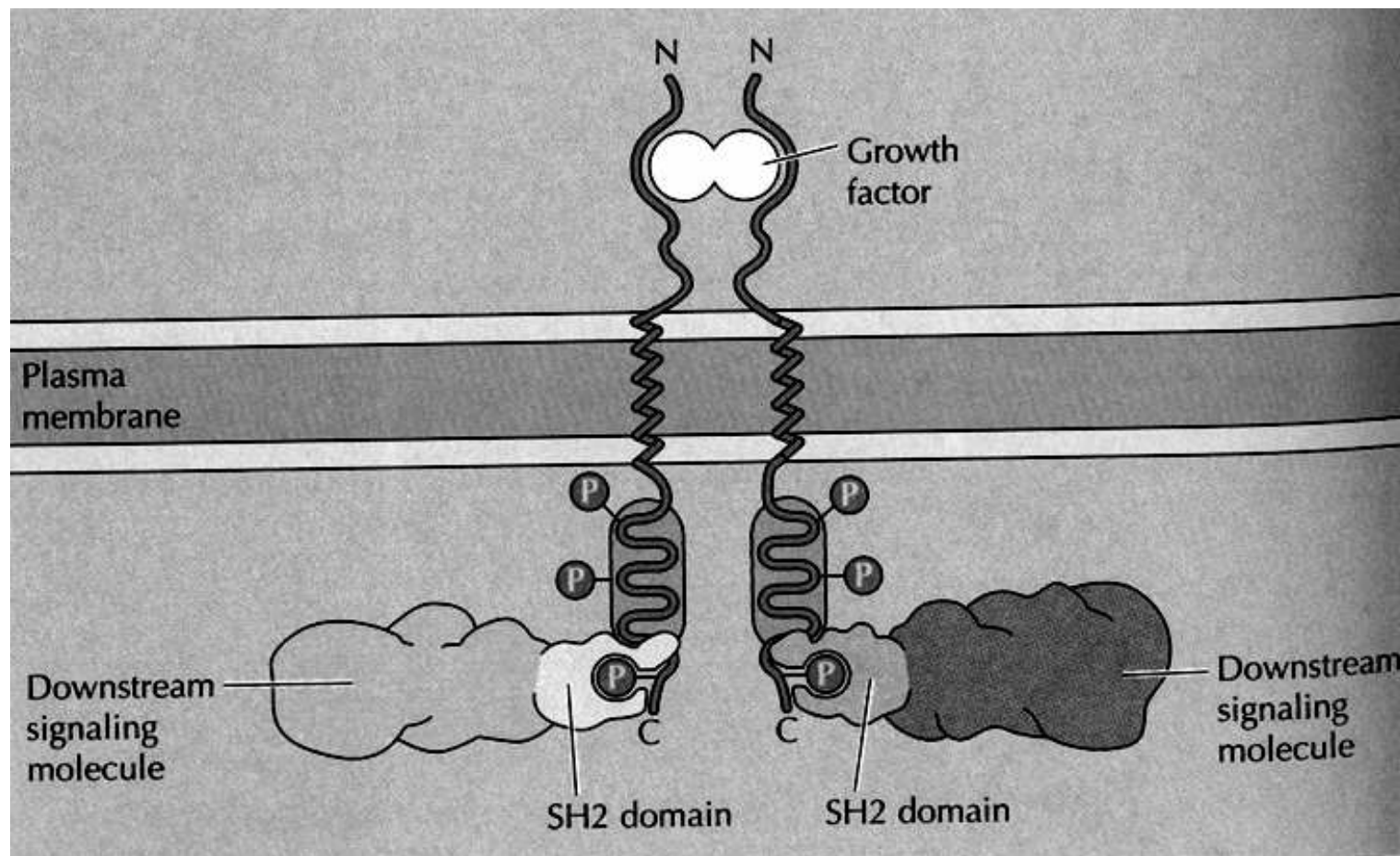
# Reakce receptorových PTK na přítomnost signální molekuly



## Doména SH2

- „Src homology“
- velikost cca 100 aminokyselin
- rozeznává a váže se k proteinovým doménám, které obsahují specifické fosfotyrosinové zbytky
- existují různé domény SH2, které se liší rozeznávacími sekvencemi - propojení různých signálních drah

Spojení receptorové PTK s nitrobuňčnými přenašeči signálů zajišťují molekuly prostřednictvím domény SH2



# SH2 zajišťuje propojení různých signálních drah

SH2 spojuje receptorové PTK s

- enzymy metabolismu fosfolipidů (fosfolipázu C)
- proteinem G (proteiny Grb2, Shc, Ras)
- transkripčními faktory (proteiny STAT)

Flexibilita signálních drah

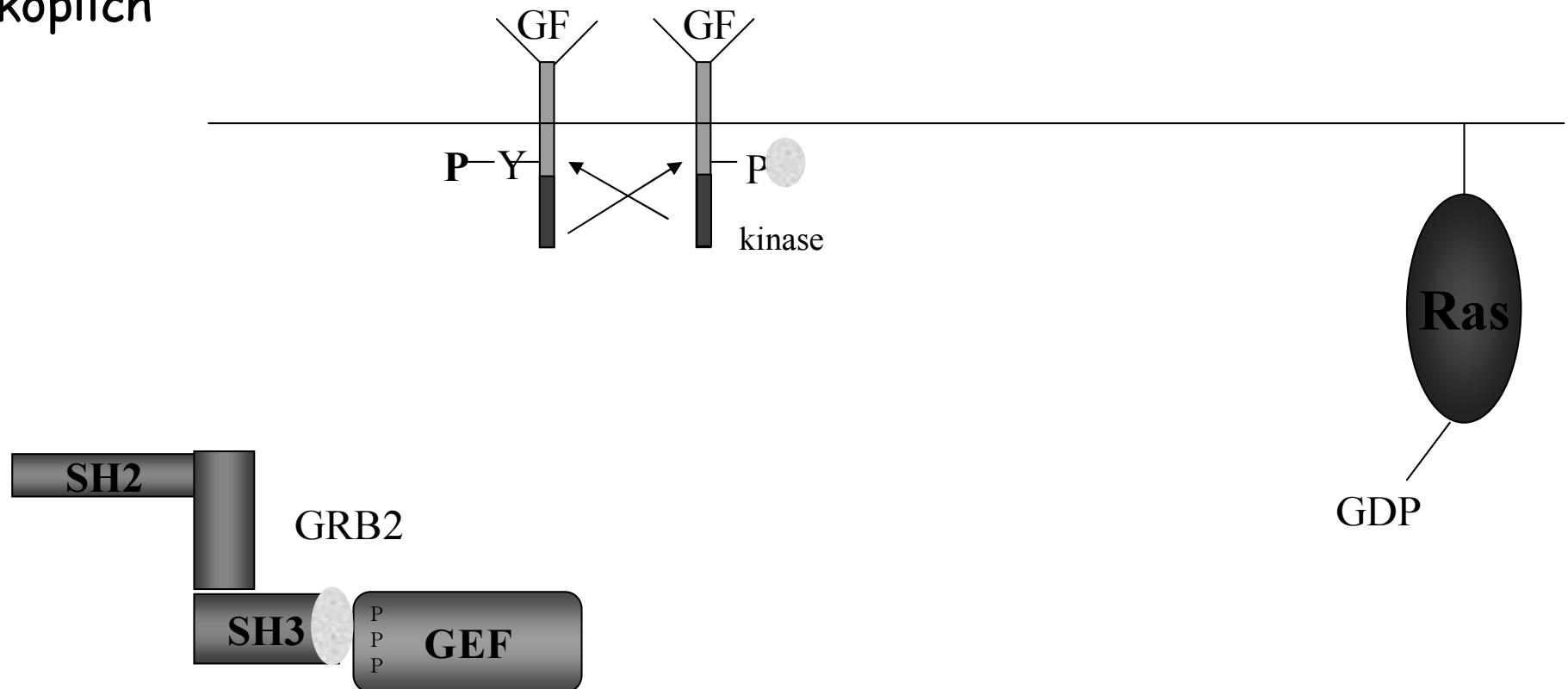
## Důsledky interakce domény SH2 s fosfotyrozinem se liší podle povahy cílového proteinu

- změna aktivity proteinu
- změna konformace proteinu - usnadnění interakce s jinými proteiny
- translokace proteinu do jiné části buňky



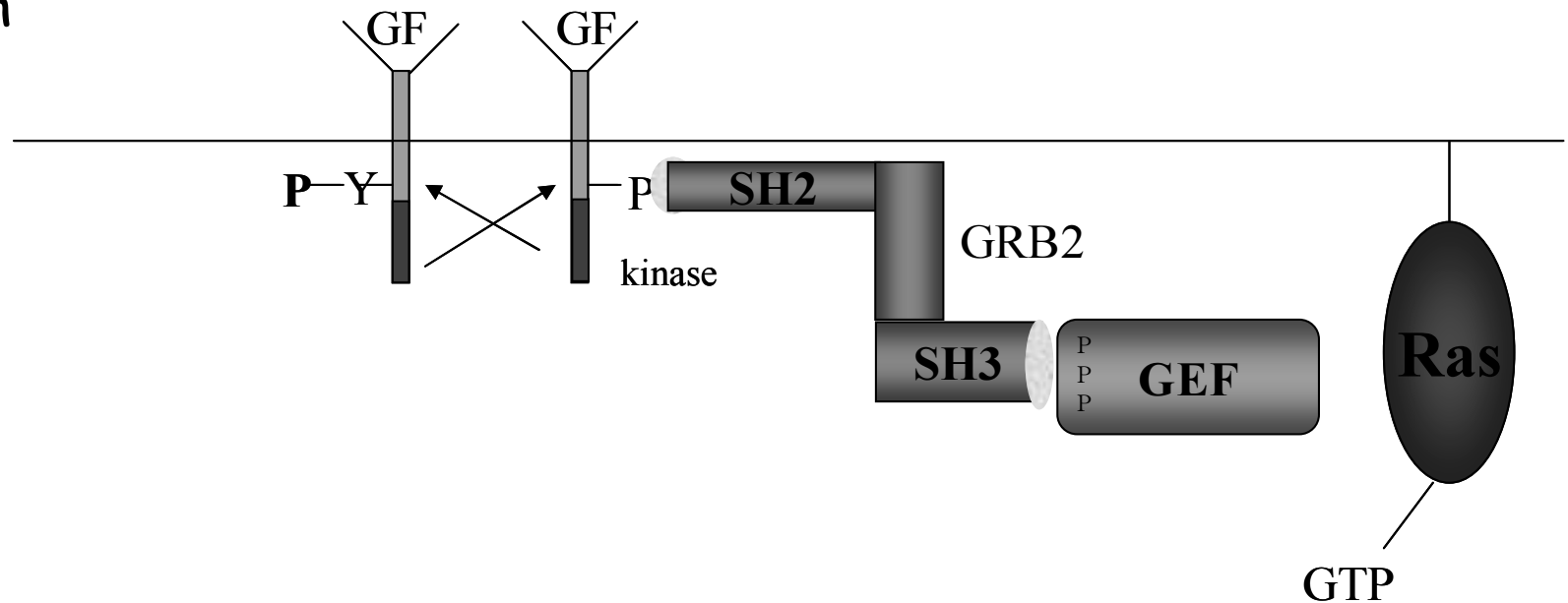
# Význam domén typu SH2

- důležité složky regulačních sítí, řídí interakce mezi signálními molekulami
- častý výskyt ve struktuře regulačních proteinů a to ve více kopiích



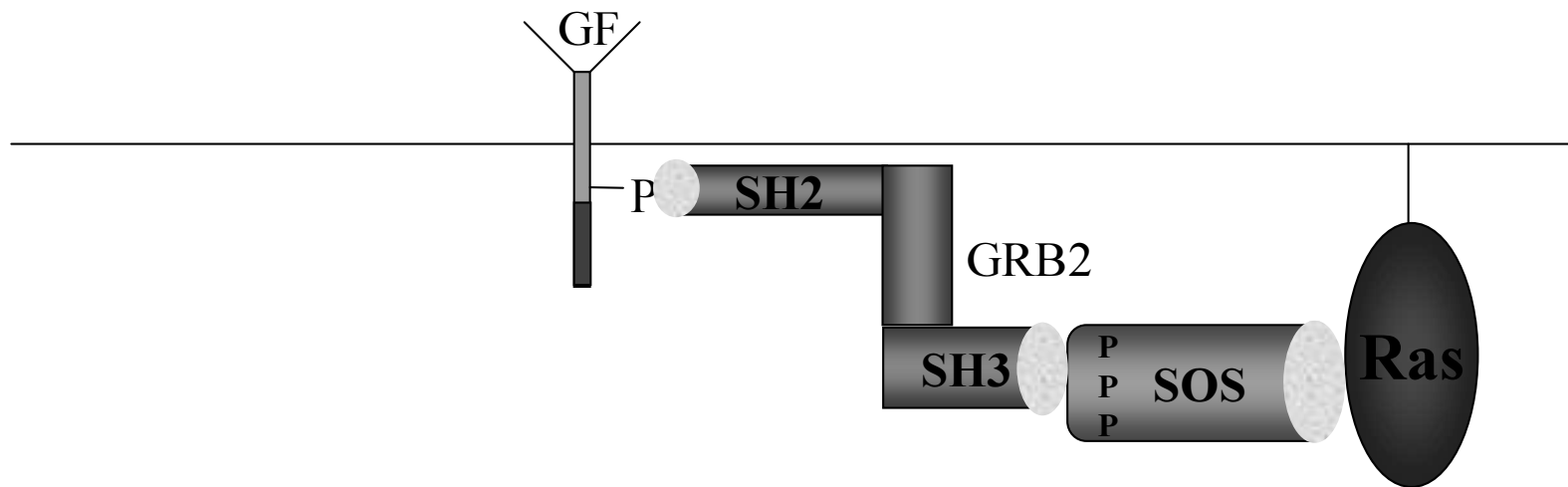
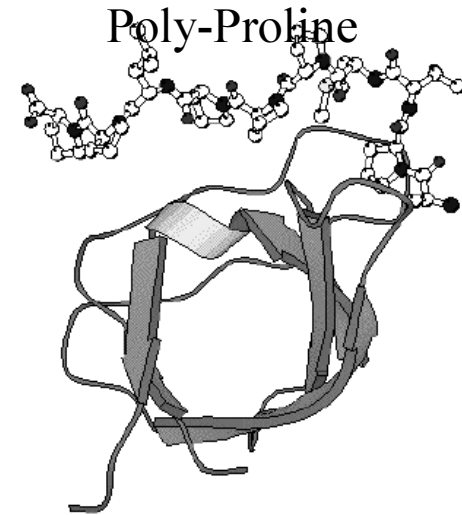
# Význam domén typu SH2

- důležité složky regulačních sítí, řídí interakce mezi signálními molekulami
- častý výskyt ve struktuře regulačních proteinů a to ve více kopiích

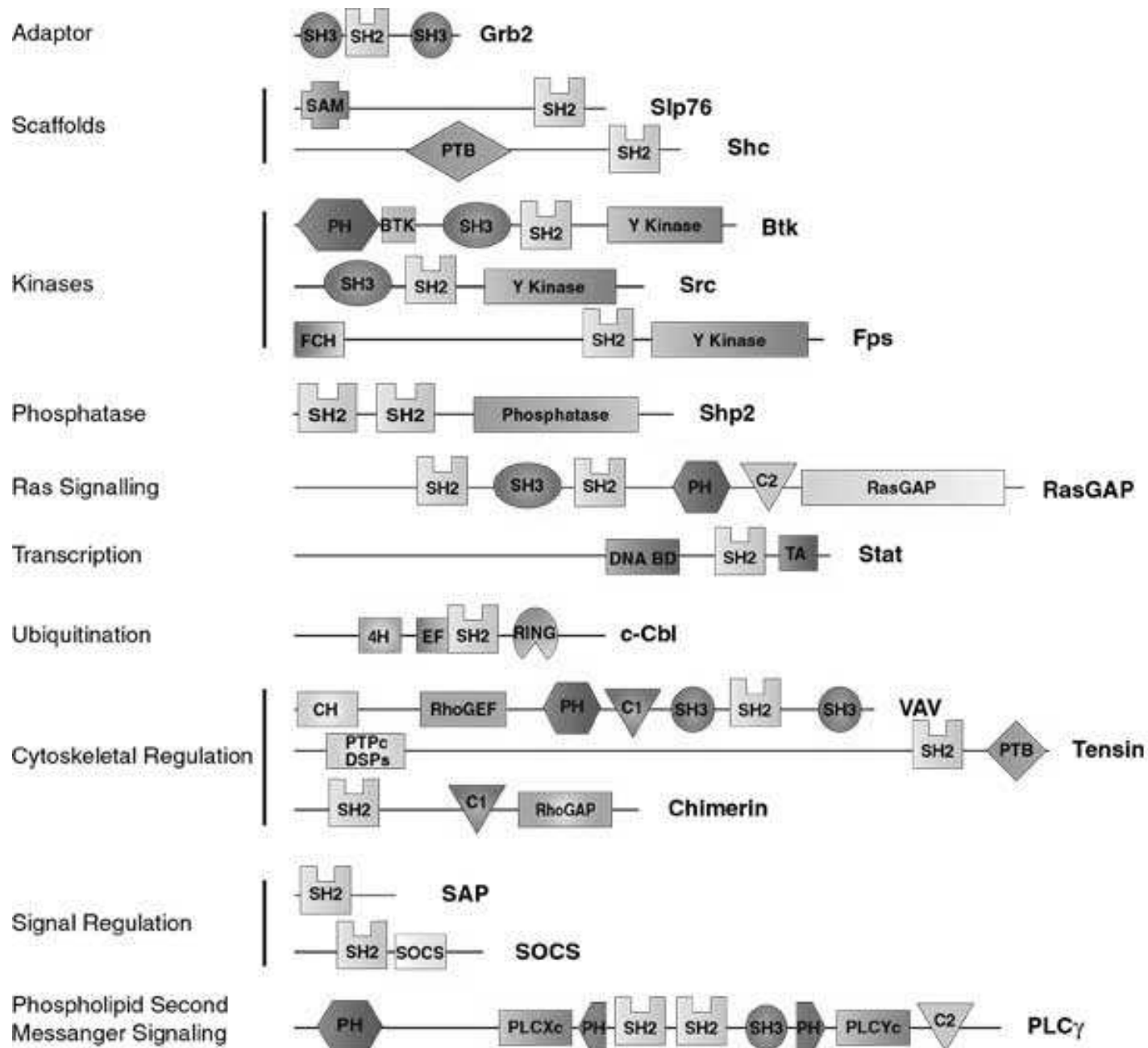


## Doména SH3

- vazebným místem je poly-prolin ve struktuře partnerské molekuly
- interakce SH3/PPP může být konstitutivní (GRB2/SOS) nebo doména SH3 domain se může otevřít vazbě s polyprolinem jen po určité stimulaci



# Příklady proteinových domén využívaných pro meziproteinové interakce



## Příklad zapojení domény SH2 do signalizací: dráha Ras

klíčovými proteiny reakční kaskády jsou proteiny **Grb2** a **Sos**

-Grb2 je adaptorový protein obsahující domény SH2 a SH3

-doména SH2 proteinu Grb2 se spojuje s aktivovanou receptorovou PTK

-doména SH3 spojuje Grb2 s proteinem Sos

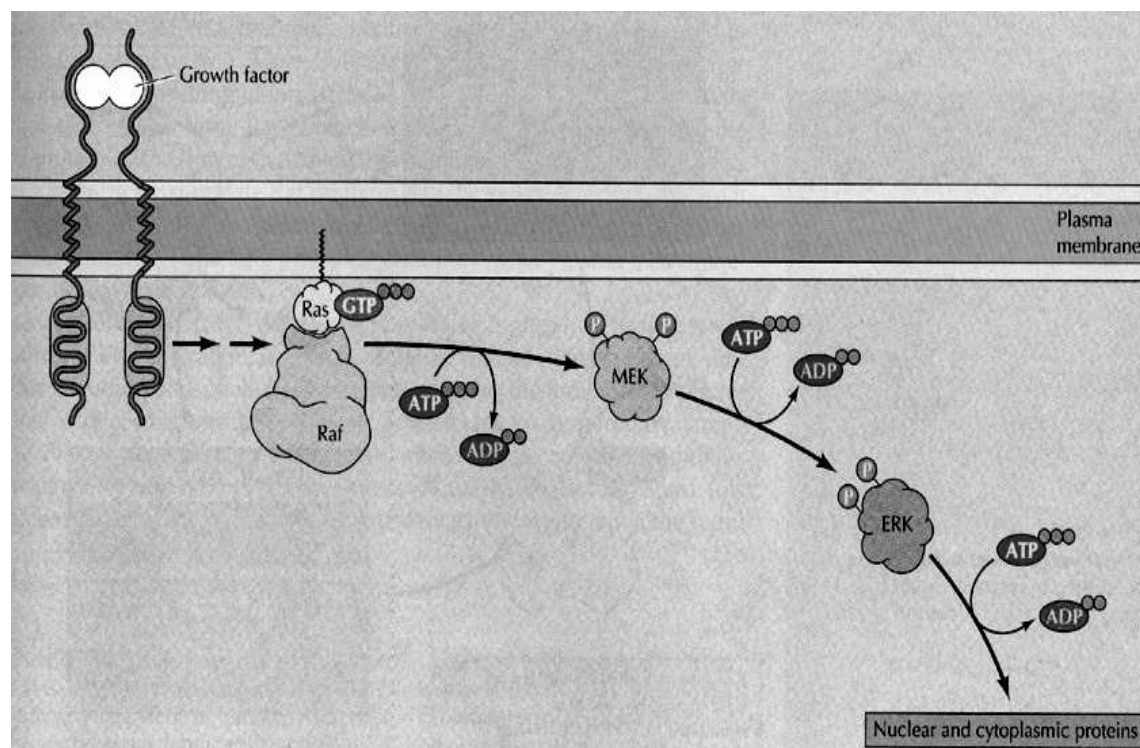
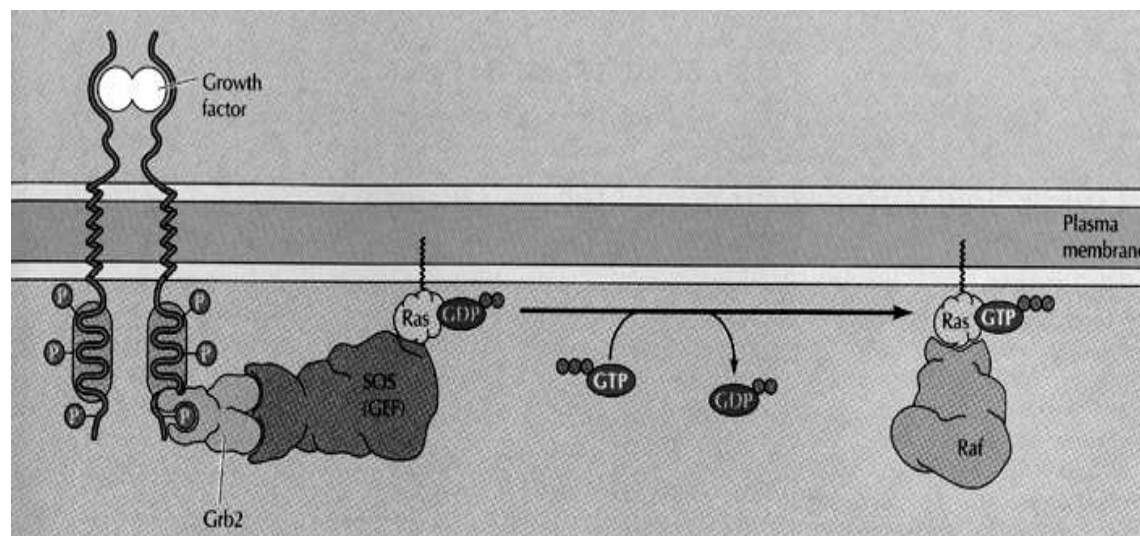
-Sos zajišťuje výměnu GDP za GTP na proteinu **Ras** (aktivace Ras)

-aktivovaný Ras váže a aktivuje své efektory, např. **Raf**, **fosfoinositid kinázu 3**, **Ral**

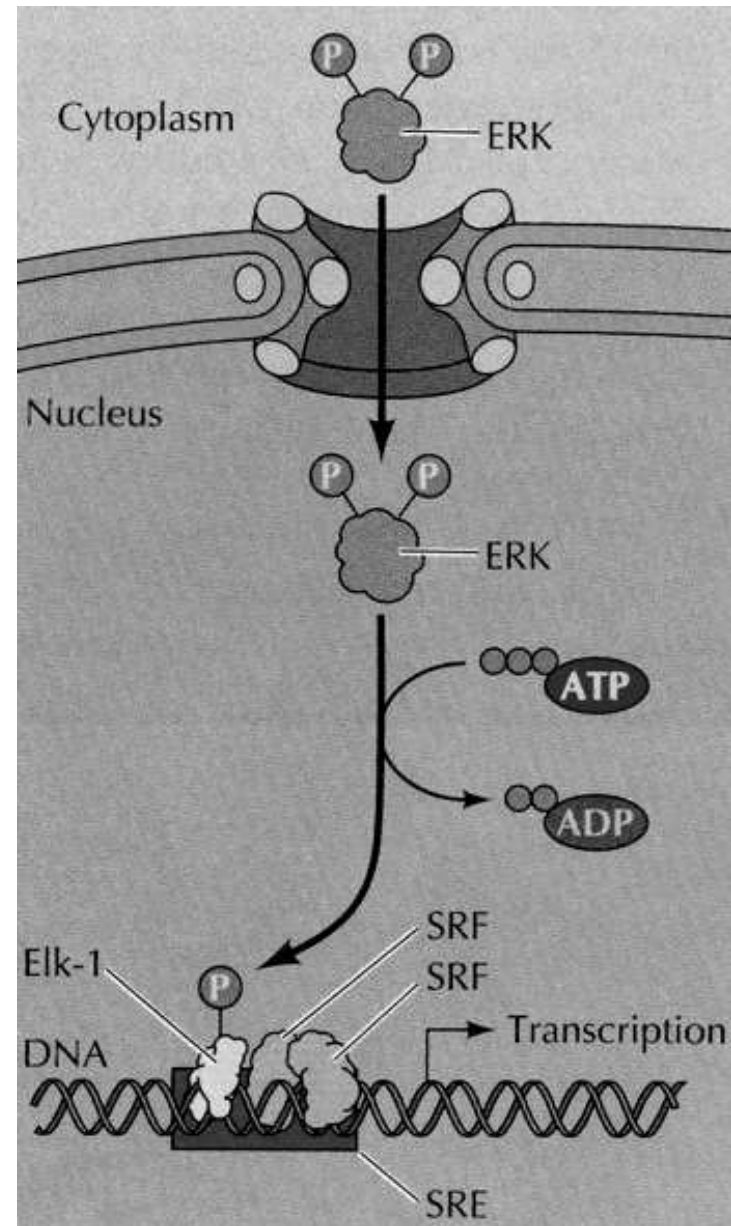
-Raf je serin-treonin kináza, která spouští kaskádu **kináz MAP**

-inaktivaci Ras zajišťuje **GTPase-activating protein**, který rovněž disponuje doménami SH2 a SH3

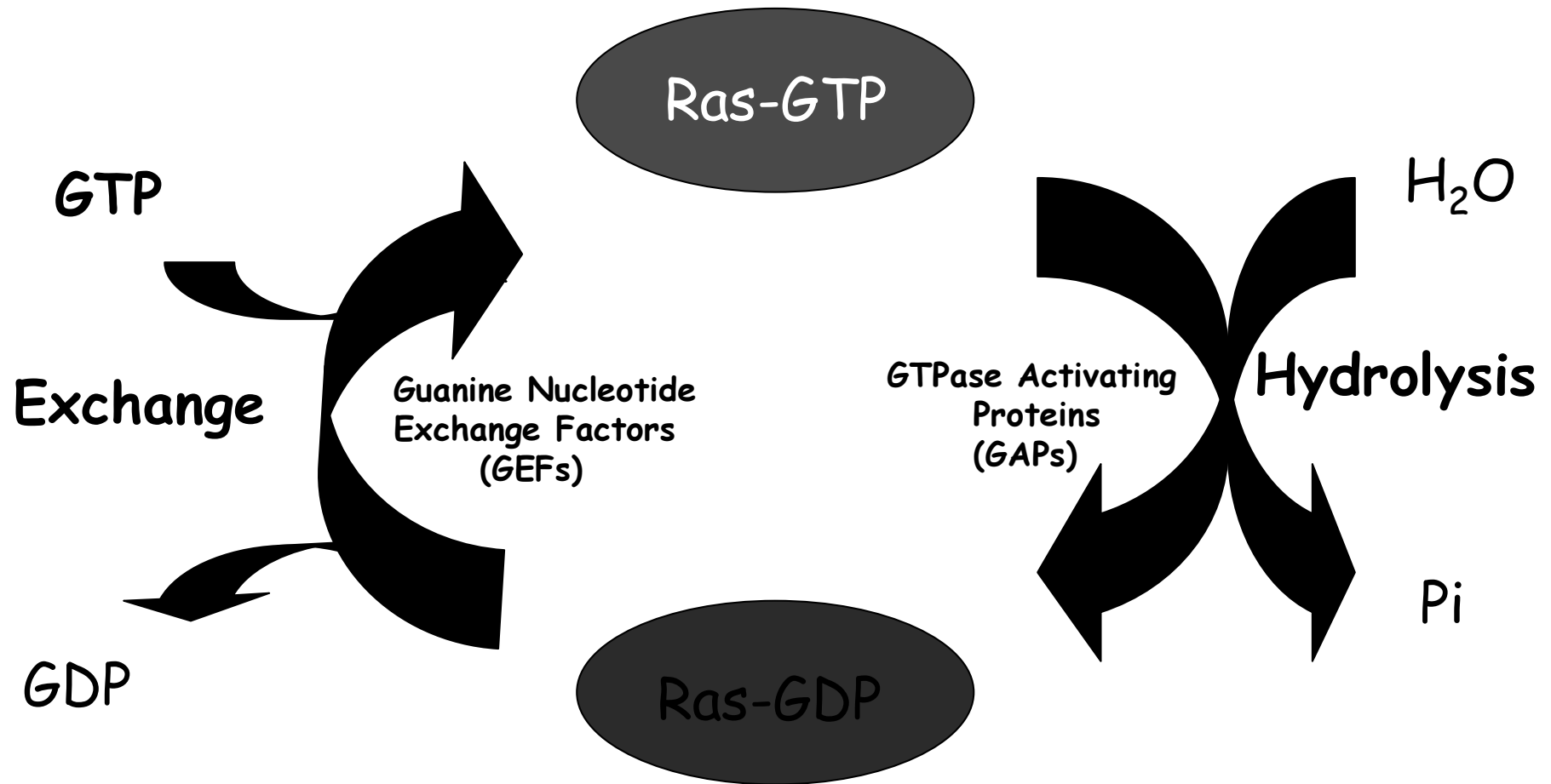
# Aktivace a signalizace proteinem Ras



**Aktivovaný ERK přechází do  
jádra, fosoryluje Elk-1,  
který indukuje transkripci  
specifických genů**

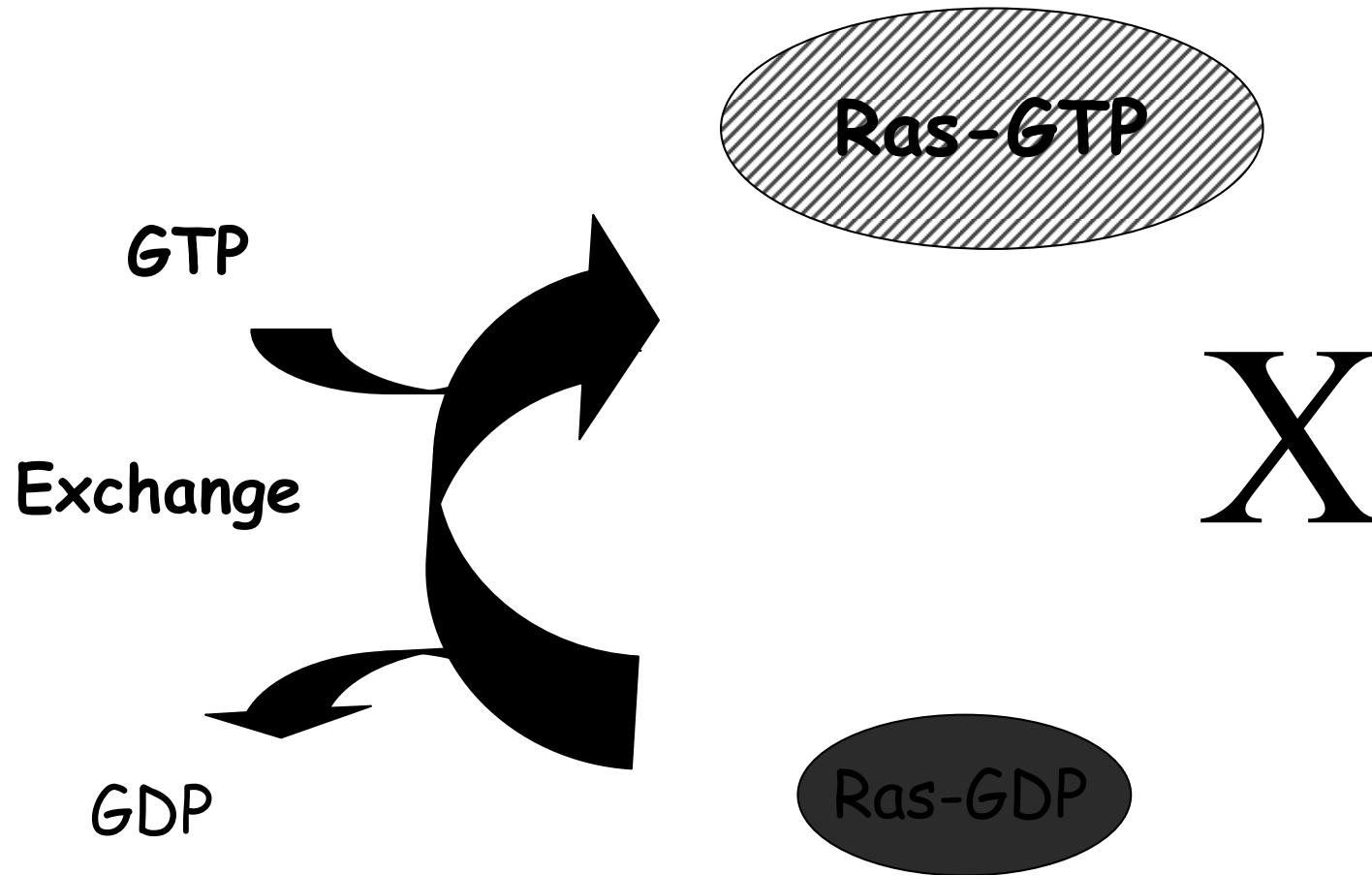


# Aktivace a inaktivace Ras



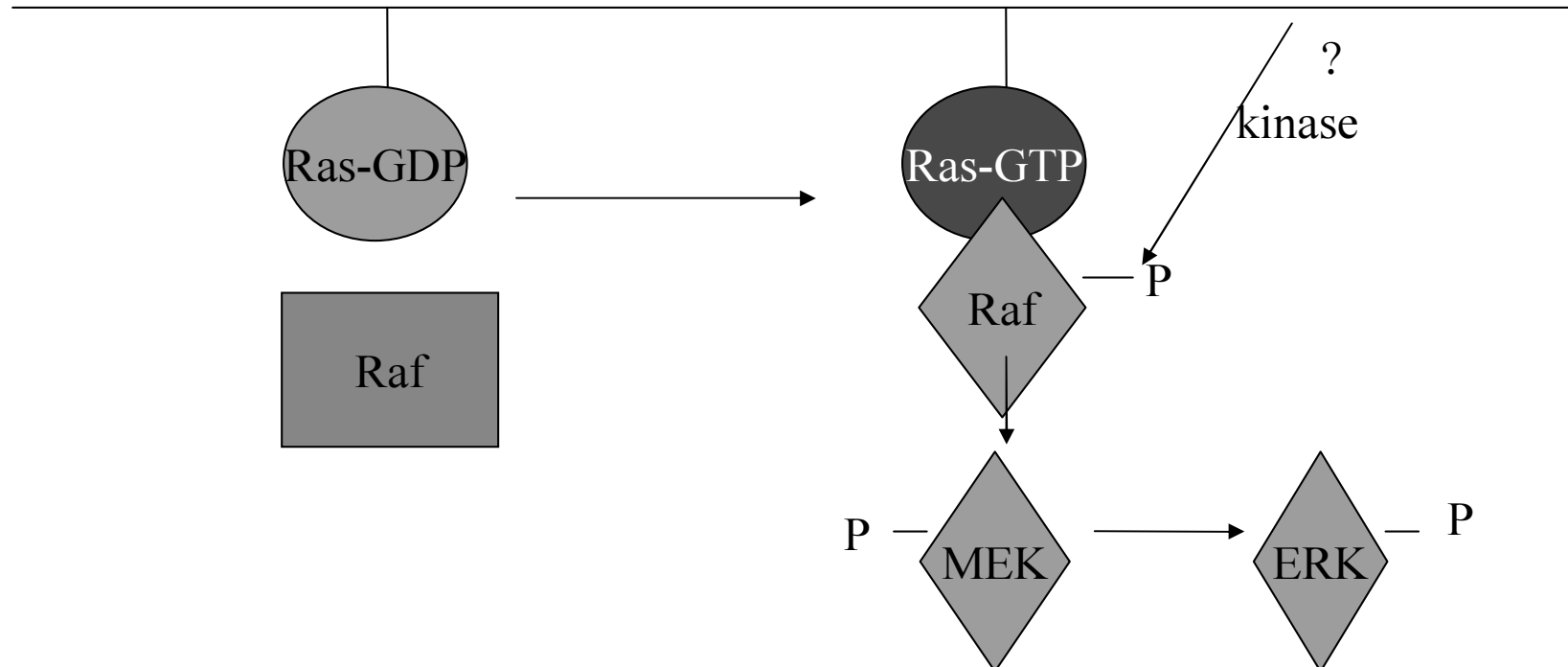


Mutantní Ras v nádorových buňkách nemůže hydrolyzovat GTP a hromadí se v aktivním stavu



# Efektorové proteiny Ras

- vážou pouze aktivovaný Ras (Ras-GTP), nikoliv Ras-GDP
- vazbou k Ras mění vlastní aktivitu
- hlavním efektoem je kináza Raf

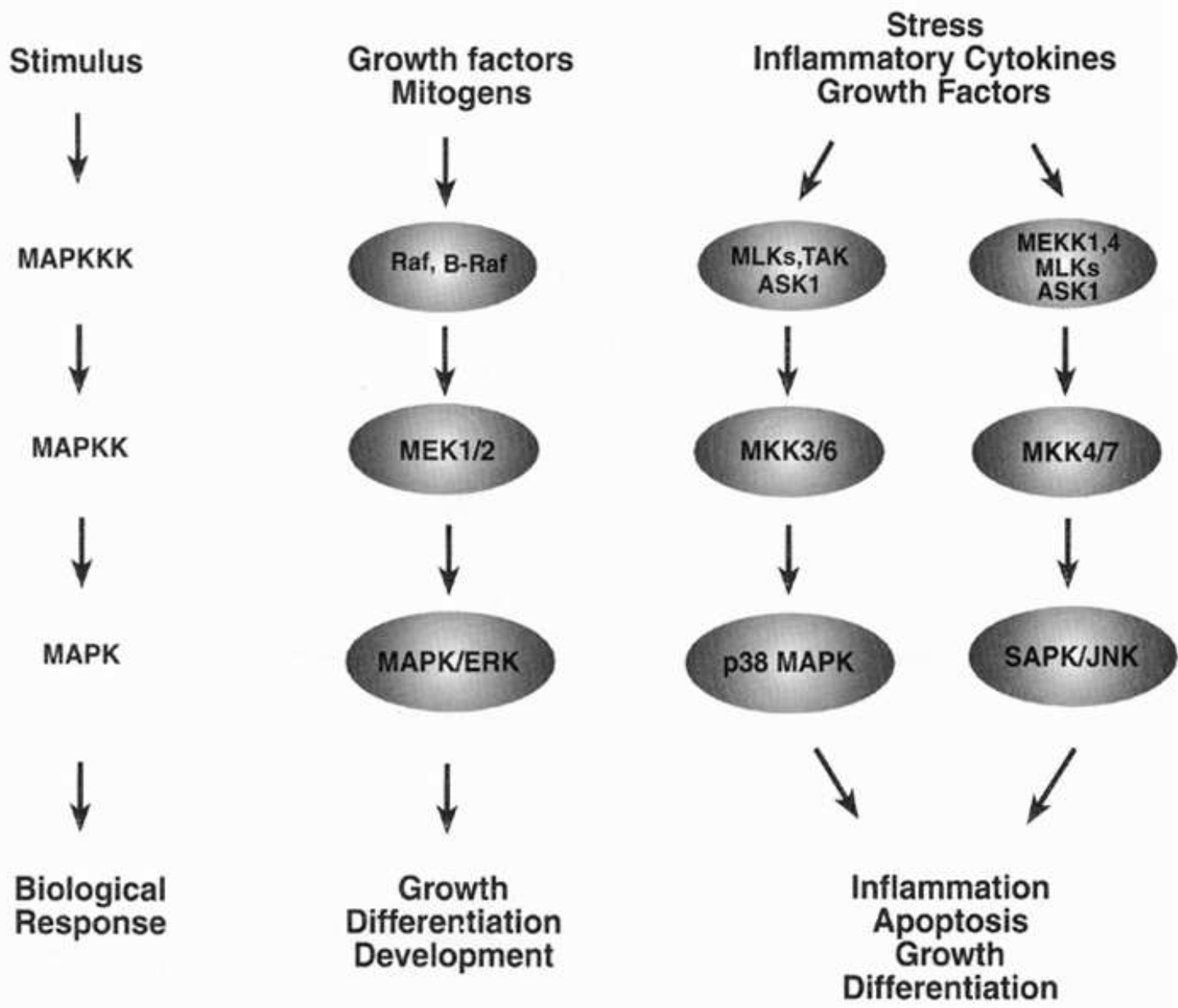


# Ras aktivuje kinázovou kaskádu

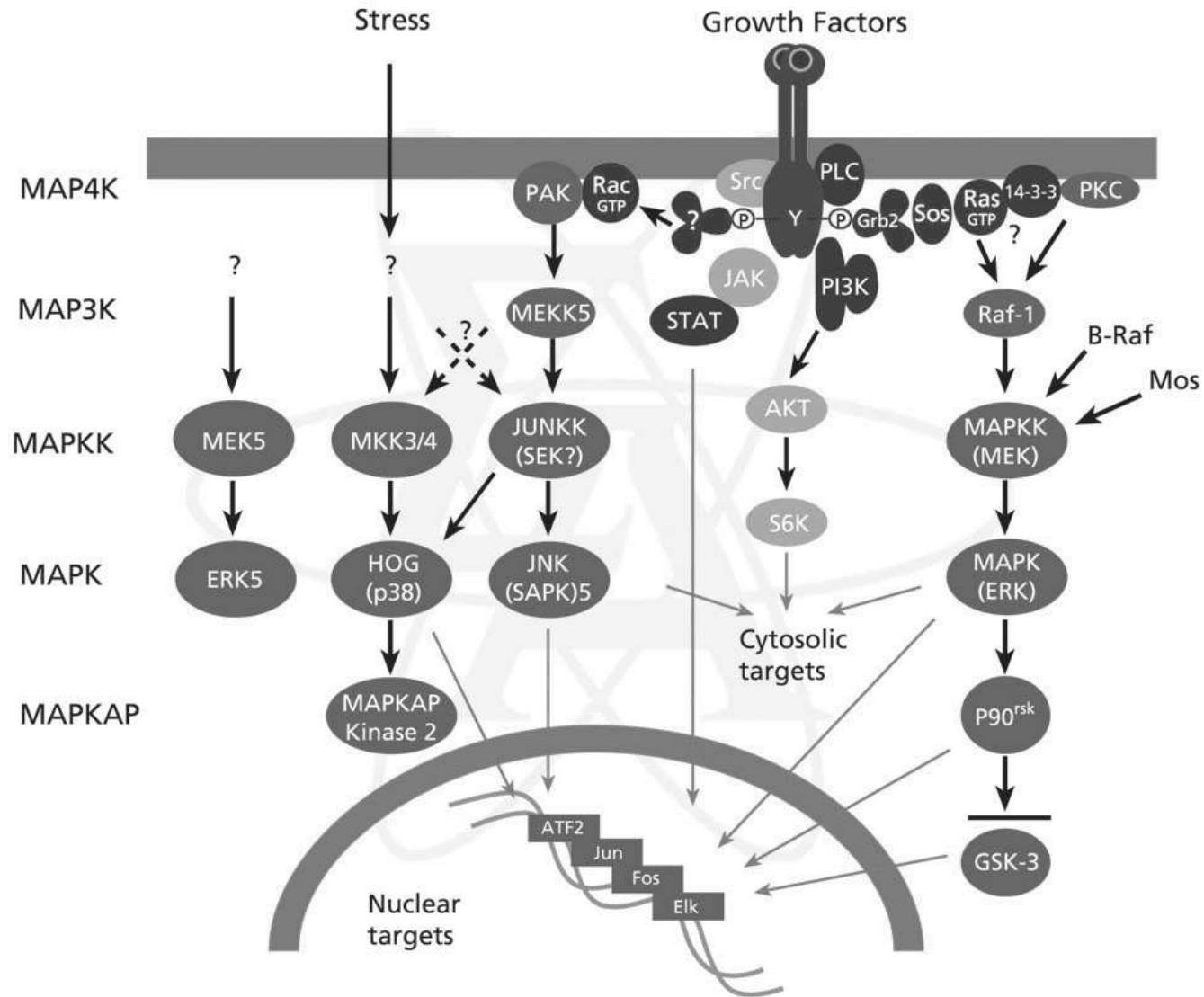
## **MAPK („mitogen-activated protein kinases“)**

- rodina serin/treonin PTK
- vysoká konzervativnost v eukaryontních buňkách
- účast na procesech proliferace, diferenciace, pohybu a buněčné smrti
- **MAPK** jsou fosforylovány a aktivovány **MAPK-kinázami (MAPKK)**
- **MAPKK** jsou fosforylovány a aktivovány **MAPKK-kinázami (MAPKKK)**
- **MAPKKK** jsou aktivovány interakcí s malými GTPázami (např. Ras) nebo jinými kinázami, které jsou napojeny na povrchové receptory

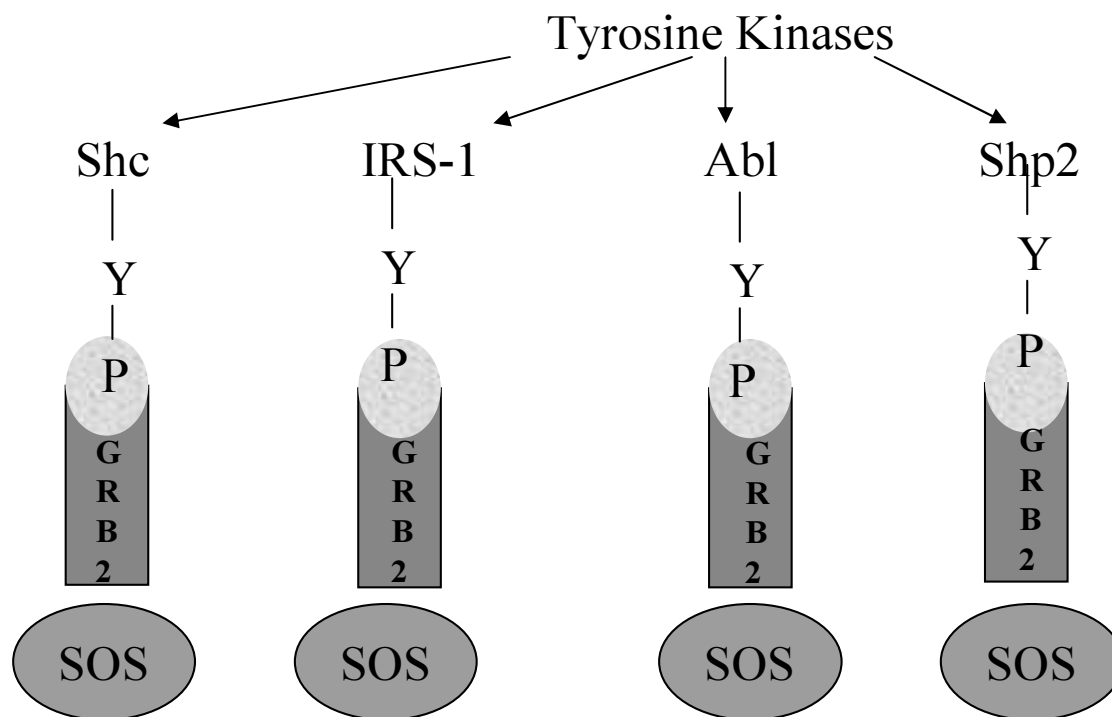
# Mitogen Activated Protein Kinase Cascades



# Kaskády kináz aktivovaných mitogeny (MAPK)

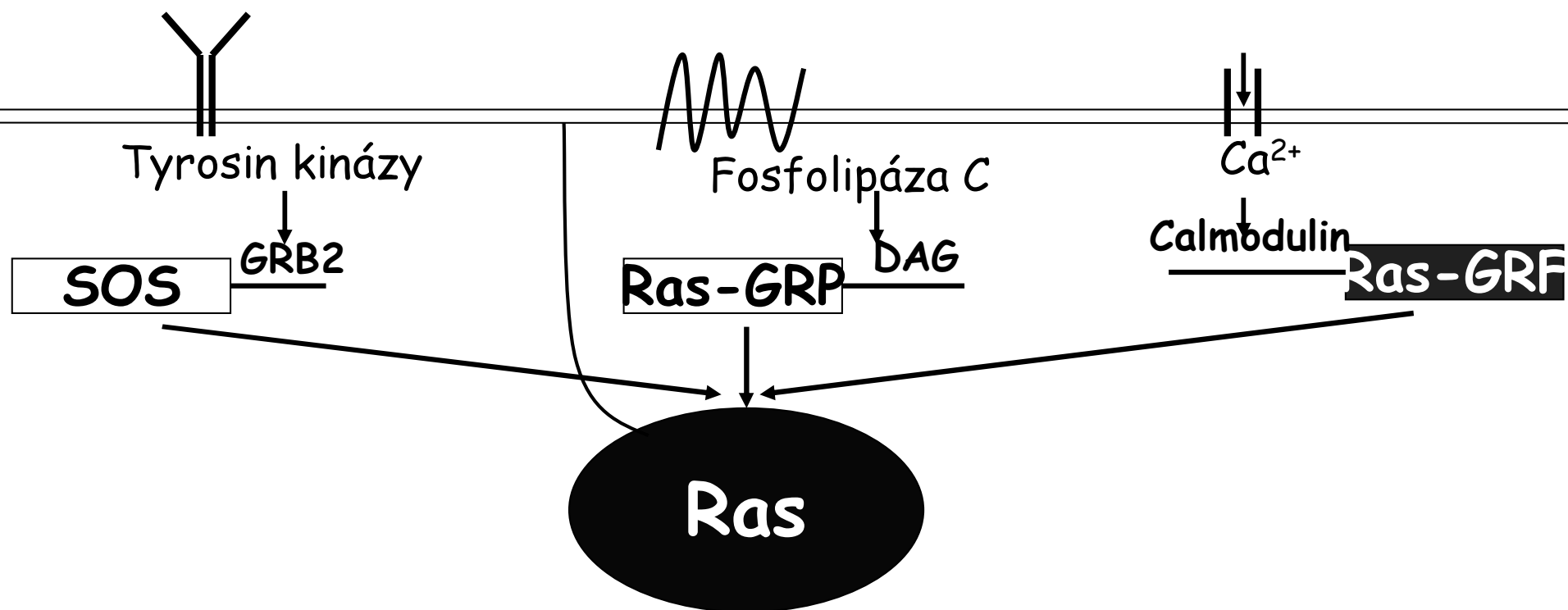


Komplikace: protein Ras může být aktivován více drahami a více signálních drah může aktivovat



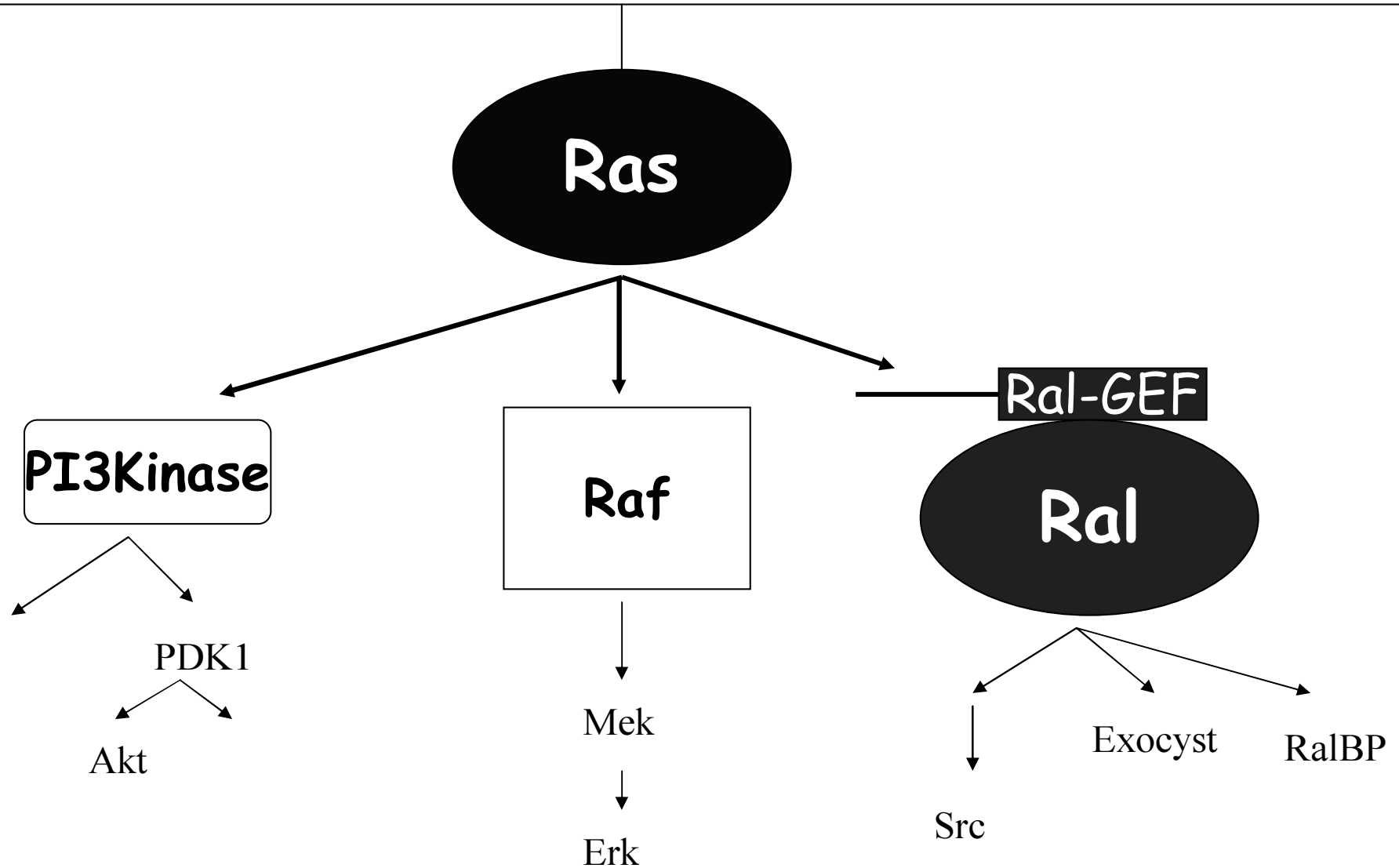
- rozsah a kinetiku aktivace Ras ovlivňují různé linkery

## Regulátory funkce Ras



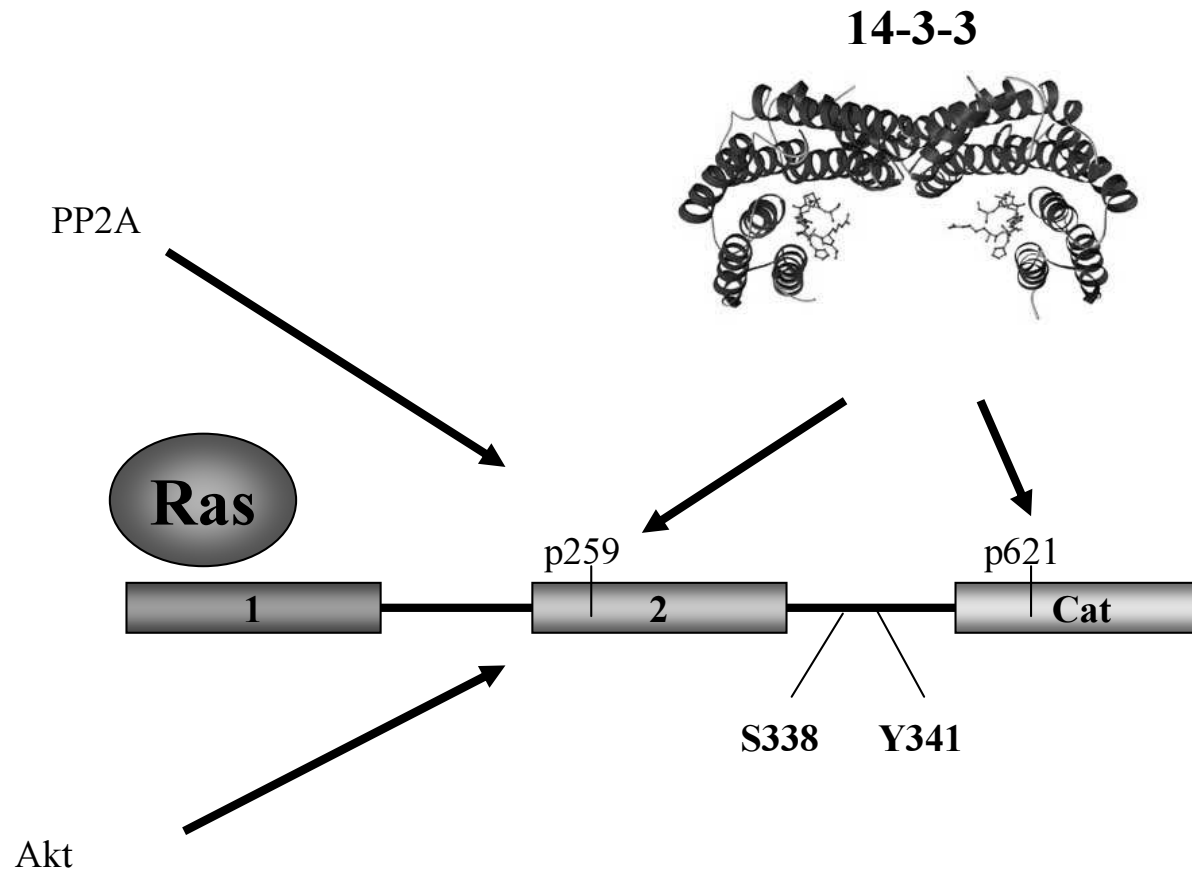
Každý GEF má strukturní motiv, který jej spojuje s určitým typem signálu, ale obdobnou katalytickou doménu umožňující aktivaci Ras

# Efektory funkce Ras





# Regulace Raf proteinem Ras, úloha fosforylace a 14-3-3



- vazba Ras zajistí přenos Raf k plazmatické membráně v blízkosti kináz, které jej fosforylují v pozicích S338 and Y341
- faktor 14-3-3 se váže na Raf ve dvou vazebných místech: pozitivním regulačním místě (p621) a negativním regulačním místě (p259). Vazbou Ras je indukována disociace 14-3-3 z místa p259.
- aktivita Raf může být negativně regulována signální drahou PI3K, konkrétně fosforylací místa 259 kinázou Akt a naopak pozitivně regulována defosforylací tohoto místa fosfatázou PP2A.

## Protein KSR spojuje Raf a MEK

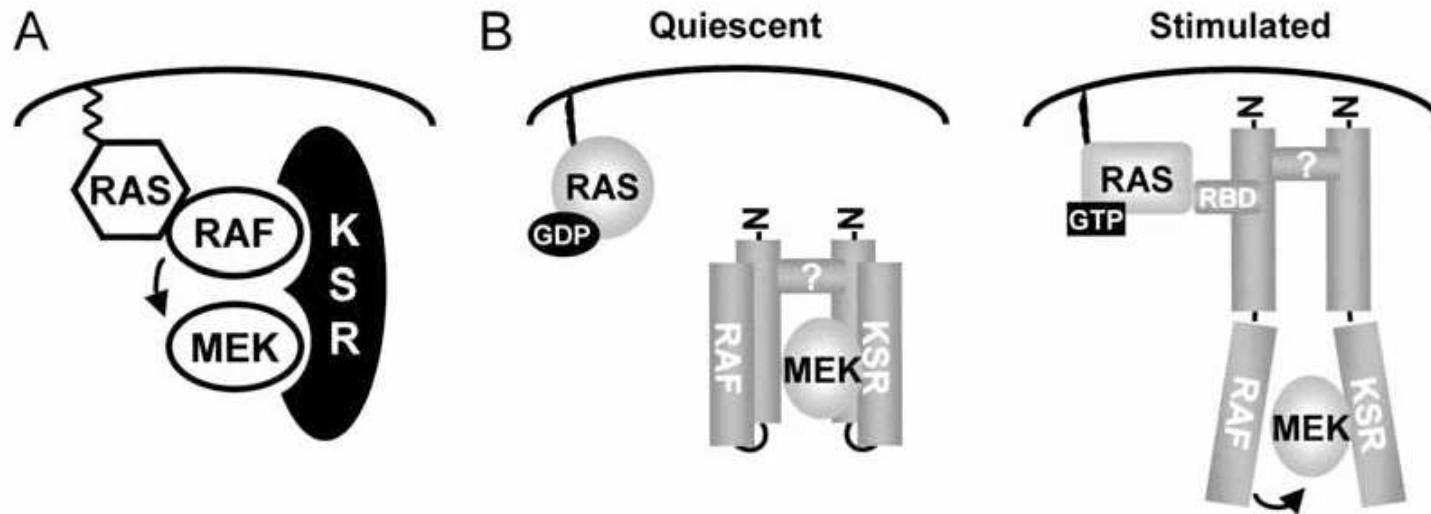


Figure 7. Model accounting for KSR function. See text for details.

- protein KSR poskytuje podporu pro Raf a MEK (MAPKK)
- protein KSR udržuje Raf v nefosforylovaném stavu dokud se po stimulaci nenaváže Ras

Ref : Genes Dev 2002 Feb 15;16(4):427-38

## Signalizace Ras, Raf, MAP - shrnutí

- dominantní při signalizacích určujících růst, vývoj a diferenciaci buněk

### Princip:

1. Interakce růstový faktor / receptor
2. aktivace Ras
3. Interakce s kinázou Raf
4. fosforylace MEK
5. aktivace ERK
6. fosforylace cílových molekul

fosfolipázy A2 - tvorba kyseliny arachidonové  
dalších kináz a transkripčních faktorů (Elk-1) -  
změna genové exprese

# Funkce proteinů Ras

## 1) Stimulace proliferace

- fibroblasty, epiteliální buňky, lymfocyty
- zprostředkování účinků růstových faktorů

## 2) Stimulace diferenciac

- neuronální progenitorové buňky (PC12)
- zprostředkování účinků neutrofinů

## 3) Příspěvek k zajištění funkcí diferencovaných buněk

- neurony CNS
- zprostředkování účinků signalizace  $Ca^{2+}$

## Nadrodina Ras

### Ras

H-Ras  
N-Ras  
K-Ras

TC21

Rap1  
Rap2

R-Ras

RalA  
RalB

Růst/  
diferenciace

### Rho

RhoA  
RhoB  
RhoC

RhoG  
RhoE

CDC42

Rac1  
Rac2

Cytoskeleton

### Rab

Rab<sub>1-N</sub>

Transport měchýřků

### Arf

Arf<sub>1-6</sub>

Translokace do jádra

### Ran

Ran

# MAPK/ERK in Growth and Differentiation

