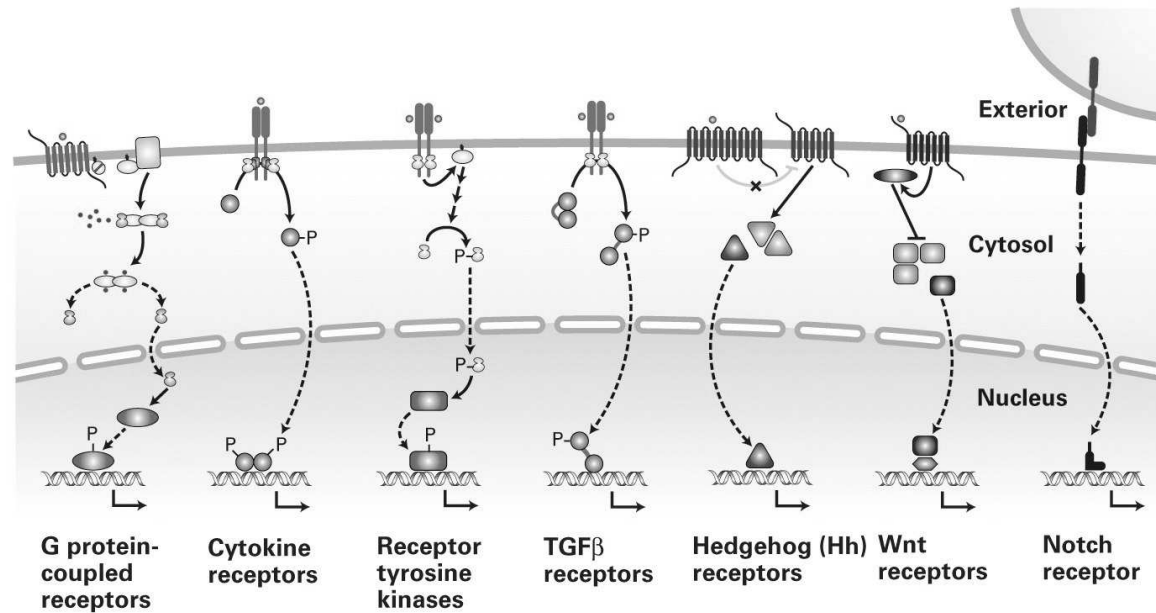


# Hlavní třídy povrchových receptorů



- přímá aktivace transkripčního faktoru (TGFβ, cytokiny)
- uvolnění aktivního TF z komplexu v cytozolu (Wnt)
- proteolytické štěpení inhibitoru uvolňuje TF (Hedgehog, Notch)
- tvorba nebo uvolnění sekundárního přenašeče (protein G)
- fosforylační kaskády (receptorové kinázy)

# Receptory pro cytokiny

- stimulují nitrobuněčné **nereceptorové tyrozin kinázy**, aniž by s nimi tvořily kovalentní vazbu (např. receptory pro erythropoietin, interleukin-2 a některé růstové hormony)
- nemají vlastní enzymovou aktivitu

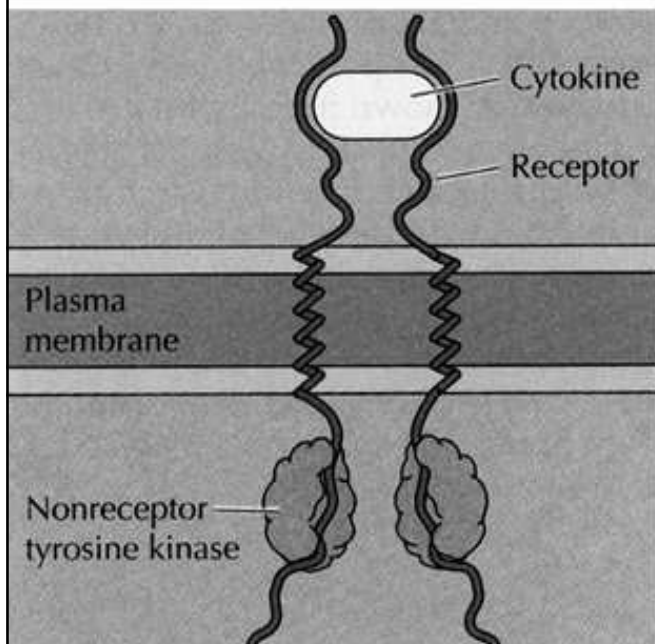
## Struktura (obdobná u všech typů):

- N-koncová extracelulární doména (vazba ligandu)
- transmembránový helix
- C-koncová cytozolová doména

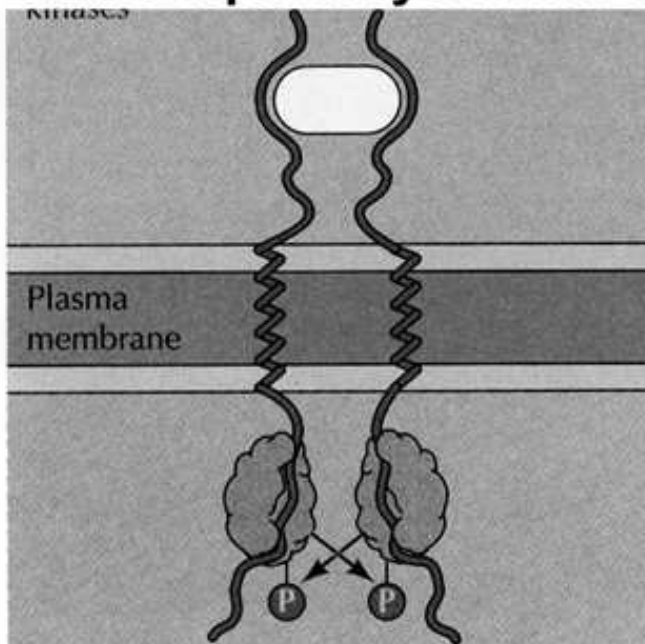
## Signalizace receptory pro cytokiny

vazba ligandu - dimerizace receptoru - křížová fosforylace  
asociovaných nerekceptorových PTK - fosforylace receptoru  
- vazba následných molekul s doménou typu SH2.

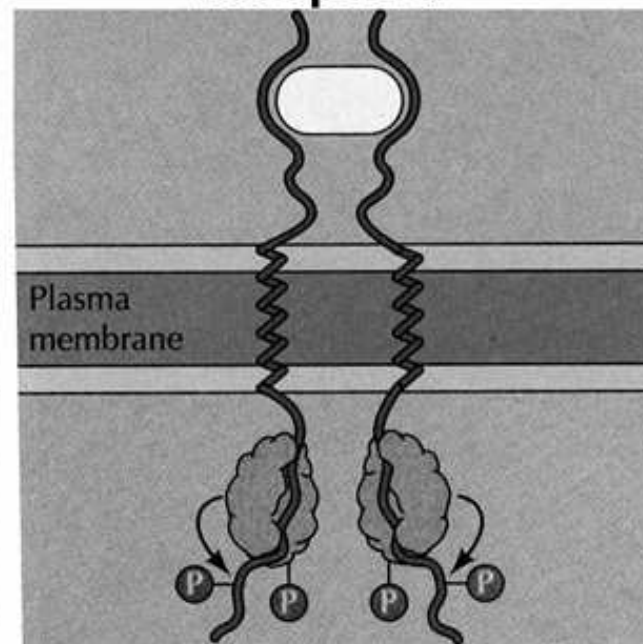
I. vazba ligandu



II. křížová fosforylace nerekceptorových kináz



III. fosforylace receptoru

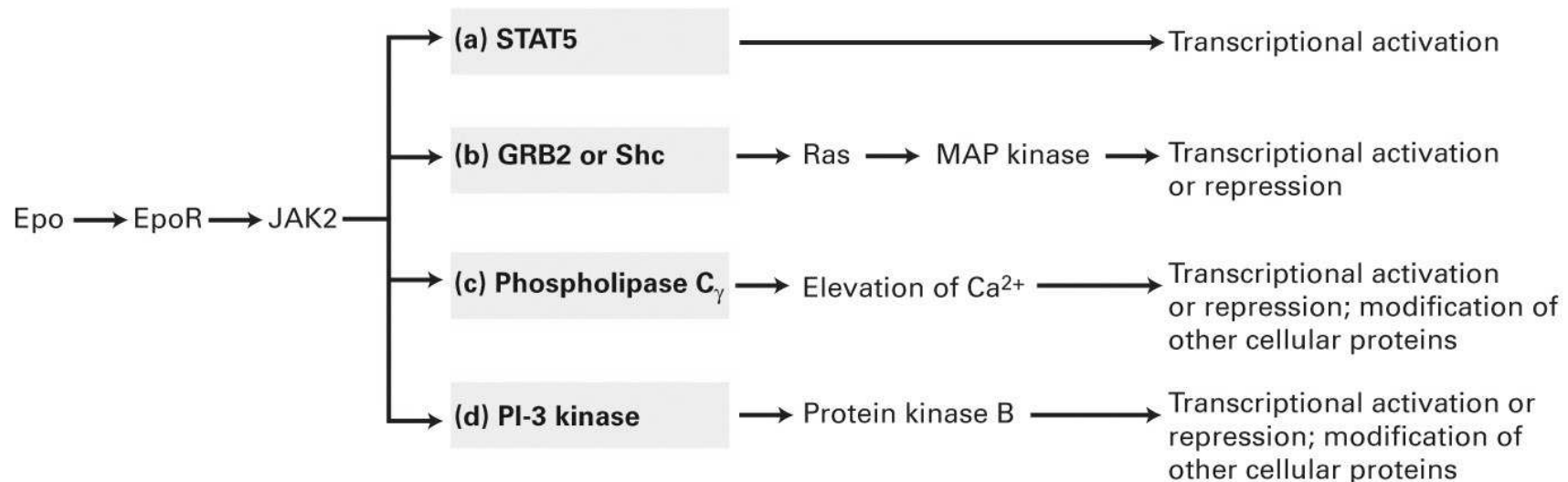


## Nereceptorové PTK

- kinázy typu Src: asociace s receptory pro antigeny na B a T lymfocytech
- kinázy Jak (Janus kinases): asociace s receptory pro cytokiny

# Existují alespoň 4 signální dráhy pod kontrolou receptoru pro erythropoietin

Každá z nich řídí expresi jiné sady genů



# Signální dráha Jak/STAT

- využívaná cytokiny
- účast na řízení růstu, přežití, diferenciaci a odolnosti k patogenům
- **Jak** „Janus-family tyrosin kinase“
- **STAT** „Signal transducer and activator of transcription“:
  - transkripční faktory opatřené doménou SH2
  - v nestimulovaných buňkách inaktivní
  - cytoplazmatická lokalizace

## Signalizace:

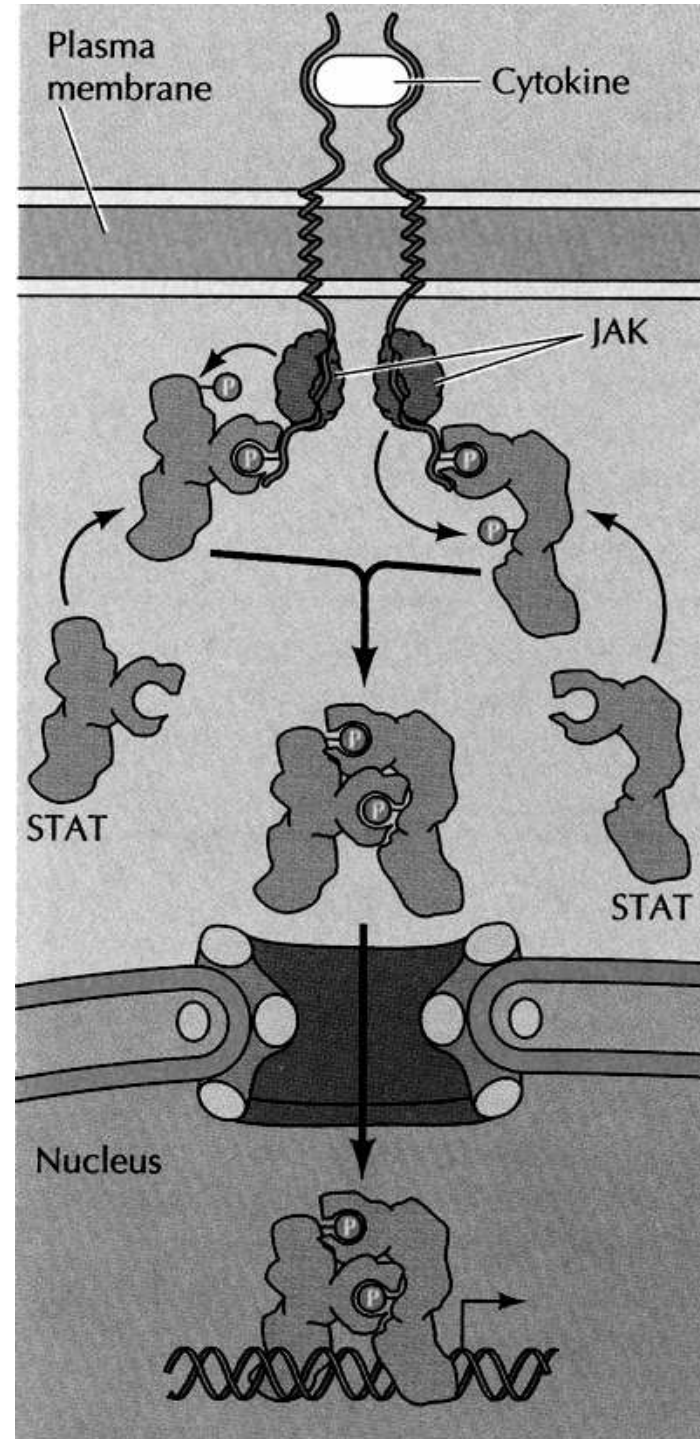
- Jak fosforyluje STAT a stimuluje tak translokaci STAT do jádra.
- Systém zajišťuje přímé spojení mezi povrchem buňky a jádrem.

## Princip signalizace Jak/STAT:

- Jak se konstitutivně asociuje s receptorem
- stimulace receptoru cytokinem indukuje dimerizaci receptoru
- aktivace asociovaných kináz Jak
- fosforylace receptoru
- fosforylovaný receptor interaguje s doménou SH2 proteinu STAT
- Jak fosforyluje STAT navázaný na receptor
- fosforylovaný STAT se odděluje od receptoru, dimerizuje a přechází do jádra
- v jádře se STAT váže na specifické enhancery
- aktivace transkripce cílových genů
- proteiny SOCS ("suppressors of cytokine signaling") tlumí signální dráhu JAK/STAT zpětnou vazbou

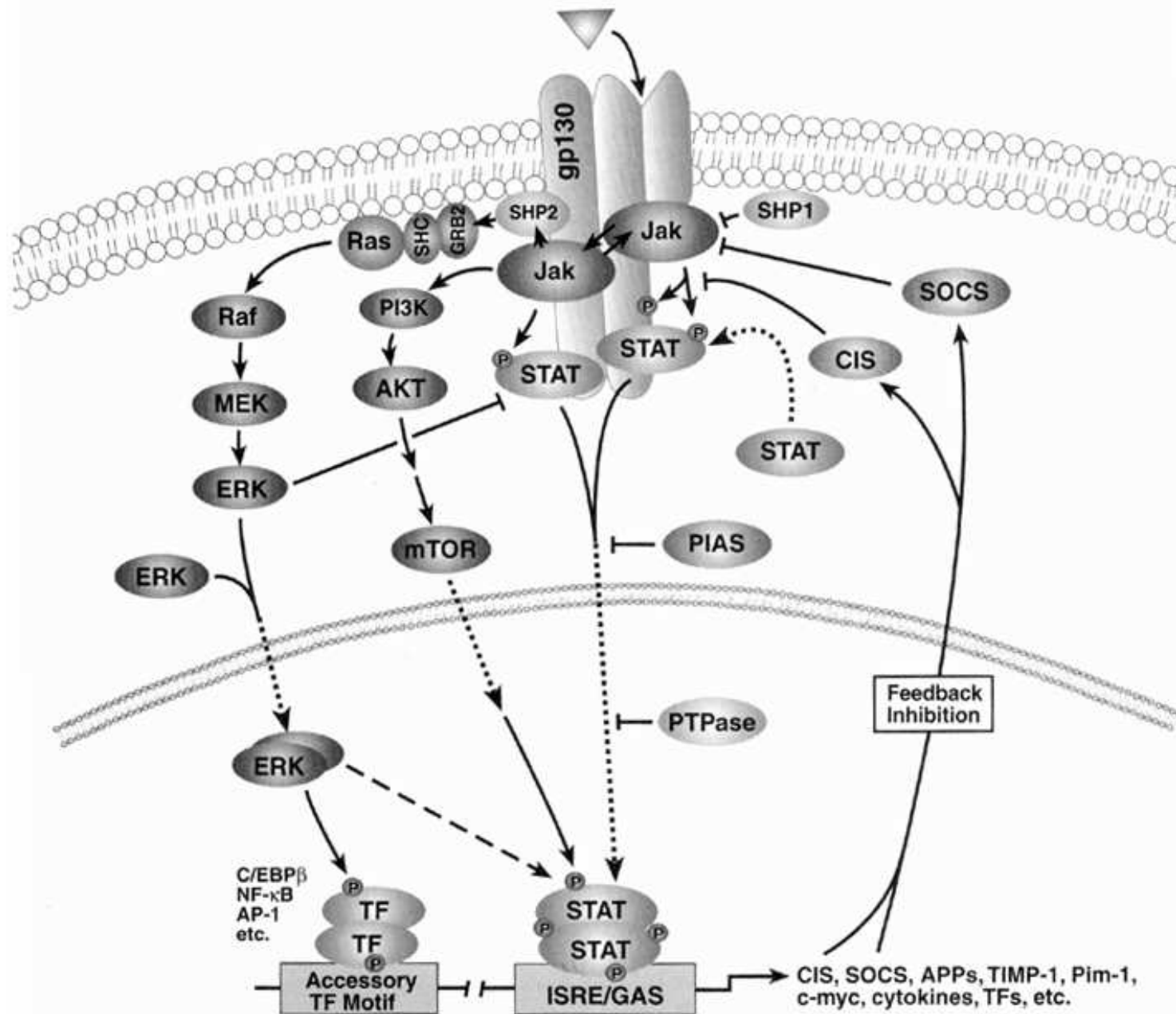
**Jak fosforylují i jiné signální proteiny - propojení různých signálních drah**

# Signalizace zprostředkovaná proteiny JAK a STAT





# Jak/STAT Signaling: IL-6 Receptor Family

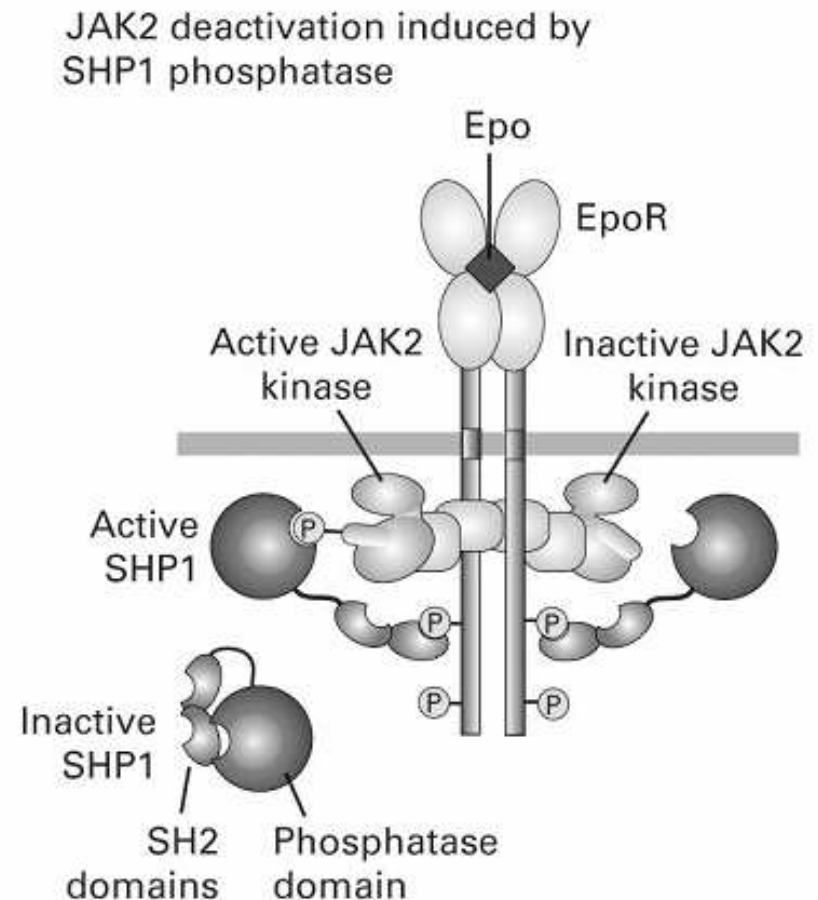


# Negativní regulace signalizace z cytokininových receptorů

Rychlé vypnutí signální dráhy za nepřítomnosti ligandu

## 1. Fosfatázou SHP1

- SHP1 je inaktivní v nestimulovaných buňkách (doména SH2 se váže na katalytické místo a inaktivuje je)
- ve stimulovaných buňkách se SH2 doména váže fosfotyrosin aktivovaného receptoru
- konformační změna SHP1 obnaží katalytické místo fosfatázy SHP1 a dopraví je do blízkosti kritického fosfátu kinázy Jak
- odstraněním fosfátu se Jak inaktivuje



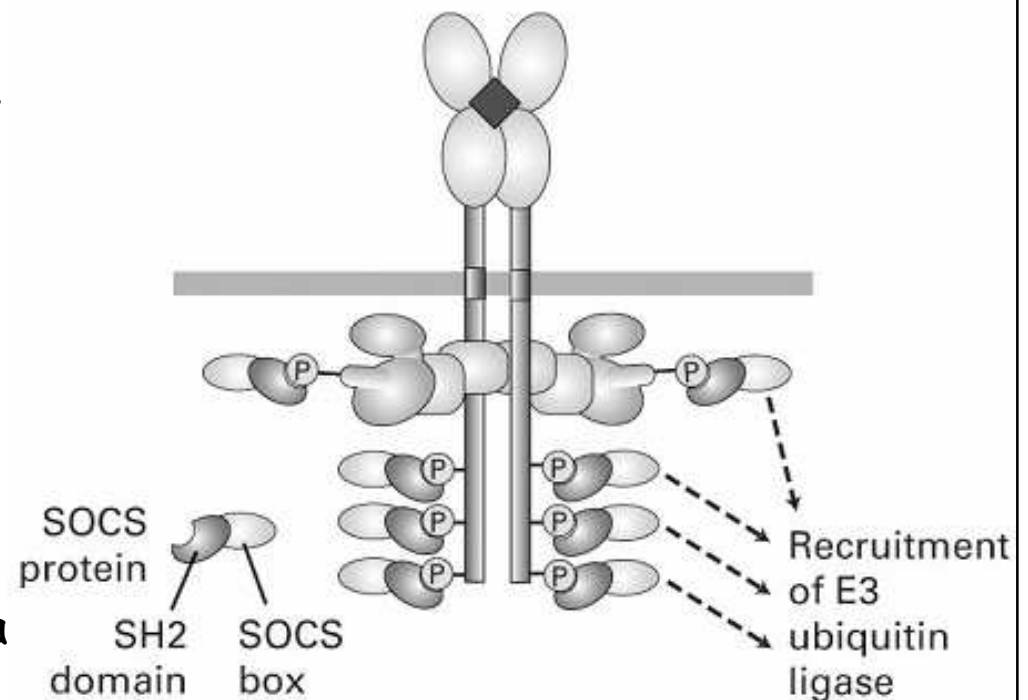
# Negativní regulace signalizace z cytokinových receptorů

Rychlé vypnutí signální dráhy za nepřítomnosti ligandu

## 2. Proteiny SOCS

- negativní regulátory signalizace cytokiny
- kódovány geny, jejichž transkripce je indukována proteiny STAT
- 2 mechanismy:
  - a. Doménou SH2 se proteiny SOCS vážou na fosfotyroziny aktivovaných receptorů: znemožnění vazby dalších proteinů
  - b. Doménou SOCS box je zprostředkována interakce s ubikvitin ligázou: polyubikvitinace a likvidace JAK proteazomem

Signal blocking and protein degradation induced by SOCS proteins



# Signalizace TGFB

## Co je TGFB?

- rodina příbuzných signálních molekul, které se významně uplatňují při řízení vývojových procesů

**BMP** (bone morphogenetic protein) indukuje tvorbu kostí v kultuře (klinické využití pro posílení kostí)

**TGFB-1** (transforming growth factor 1) indukuje vznik „transformovaného fenotypu“ u určitých buněk v kultuře

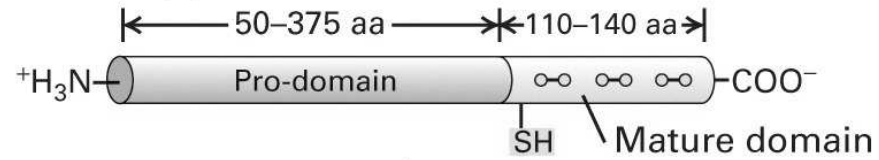
Lidské izoformy TGFB mají naopak antiproliferační účinky - kontrola buněčné adheze (narušení signální dráhy řízené TGFB je časté u lidských nádorů)

## Tvorba TGF $\beta$

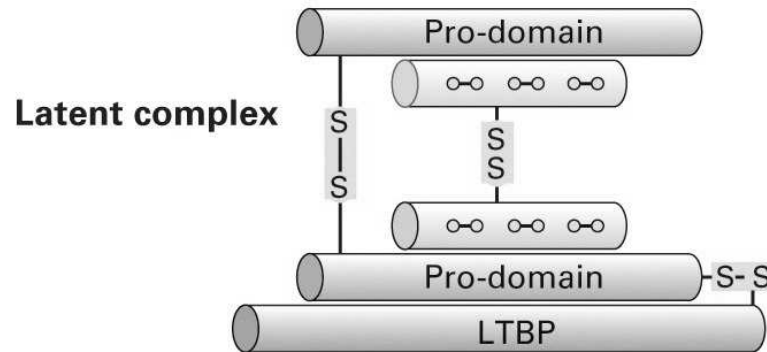
- tři izoformy, každá kódována vlastním genem
- prvotní produkt proteosyntézy každé z izoformem má podobu prekurzoru, obsahující pro-doménu
- v této podobě se sekretuje z buňky
- pro-doména se následně odštěpuje, ale zůstává nekovalentně asociována s vlastní proteinem
- pro-doména a vlastní protein se uchovávají v matrix v komplexu s LTBP (latent TGF $\beta$  binding protein)
- trombospondin nebo některé integriny (event. degradace LTBP) indukují změnu konformace LTBP, což vede k uvolnění zralého aktivního TGF $\beta$  v podobě dimeru)

(a) Formation of mature, dimeric TGFβ

**Secreted TGFβ precursor**

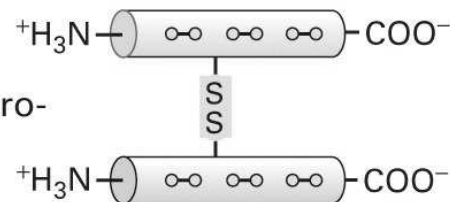


Proteolytic cleavage  
Binding by LTBP



Conformational change or  
proteolysis of LTBP;  
release of mature TGFβ

**Mature form**  
(homo- or hetero-  
dimer)



## Receptory pro TGF $\beta$ : 3 typy

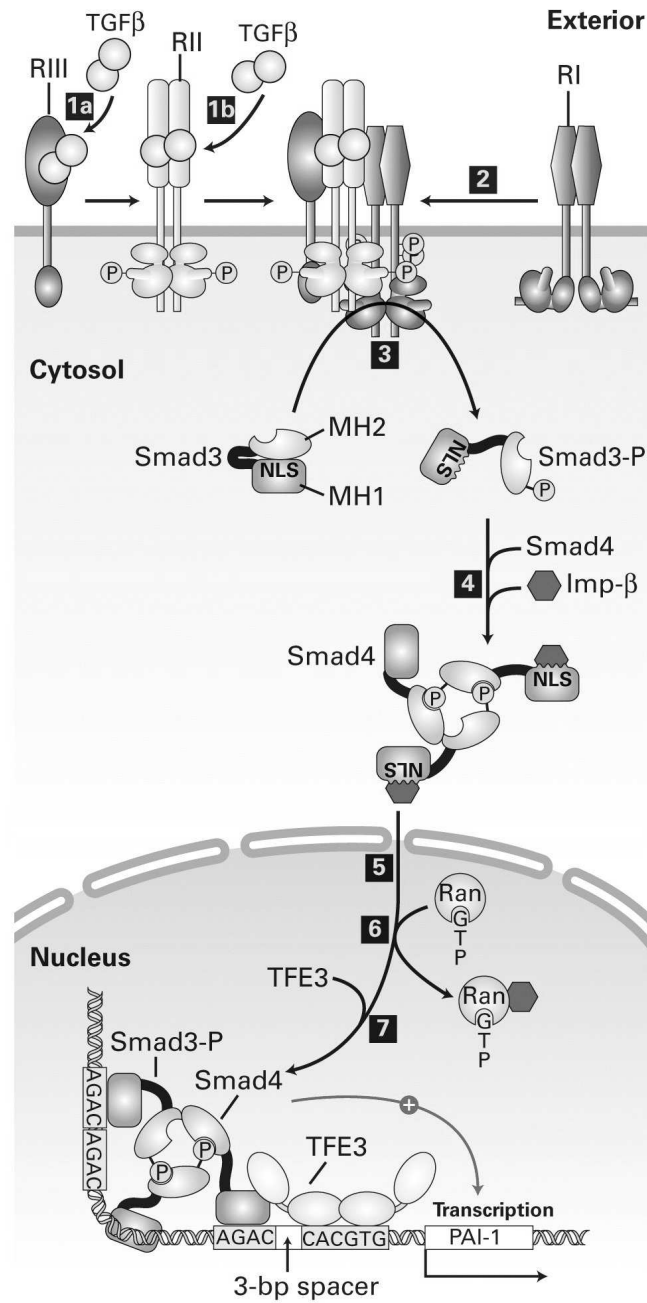
**RI a RII** - transmembránové dimerové proteiny se serin/treonin kinázovou aktivitou cytozolové domény

**RIII ( $\beta$ -glykan)** - velmi rozšířený receptor, proteoglykan, který koncentruje TGF $\beta$  v blízkosti povrchu buňky

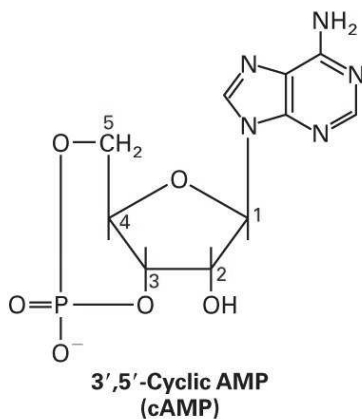
## Interakce TGF $\beta$ -receptor a následná signální dráha

- v některých buňkách se TGF $\beta$  váže k RIII, který jej předává RII
- v jiných buňkách se TGF $\beta$  váže přímo k RII
- komplex RII-TGF $\beta$  přitahuje a fosforyluje RI: uvolnění inhibice kinázové aktivity RI
- aktivovaný RI fosforyluje transkripční faktor Smad3 nebo jiný R-Smad (receptor-regulated Smad): změna konformace, která obnaží jaderný lokalizační signál NLS
- 2 fosforylované molekuly Smad3 interagují s pomocným proteinem Smad4 a importinem  $\beta$ : vzniká velký cytozolový komplex
- tento komplex přechází do jádra, kde se uvolňuje importin
- Smad3/Smad4 se spojí s transkripčním faktorem TFE3: aktivační komplex, který se váže do regulačních sekvencí cílových genů

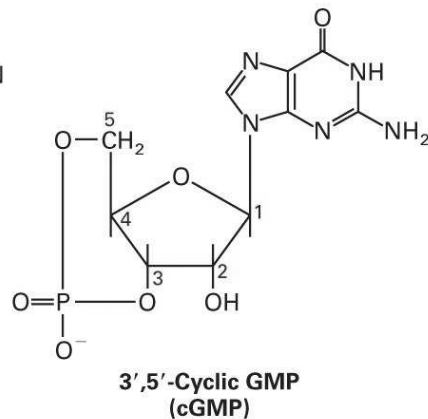




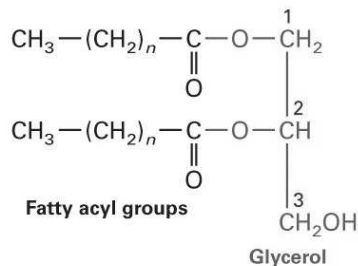
# Přenos signálu buňkou (od receptoru k efektoru) často zajišťují sekundární přenašeči



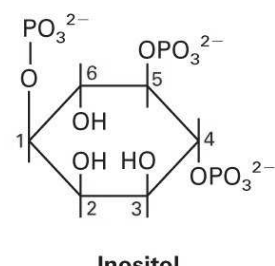
Activates protein kinase A (PKA)



Activates protein kinase G (PKG) and opens cation channels in rod cells



Activates protein kinase C (PKC)



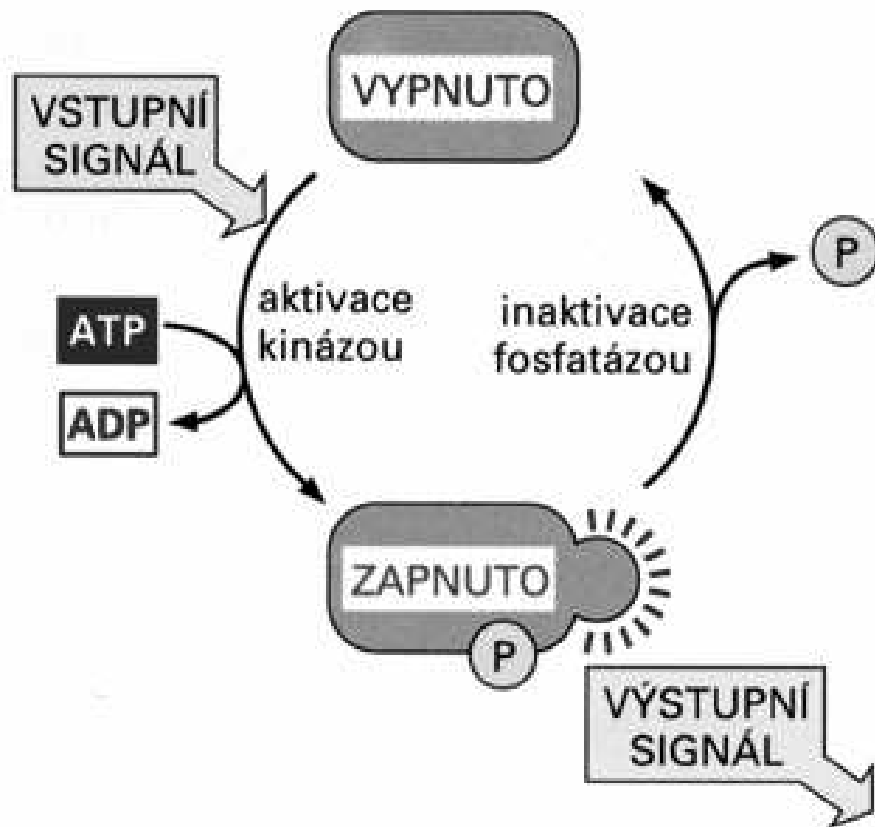
Opens Ca<sup>2+</sup> channels in the endoplasmic reticulum

## Sekundární přenašeči:

- nízká molekul. hmotnost
- koncentrace v buňce rychle stoupá a klesá v závislosti na přítomnosti primárního přenašeče (mimobuněčného signálu)
- vyvolávají rychlou změnu aktivity enzymů nebo jiných proteinů

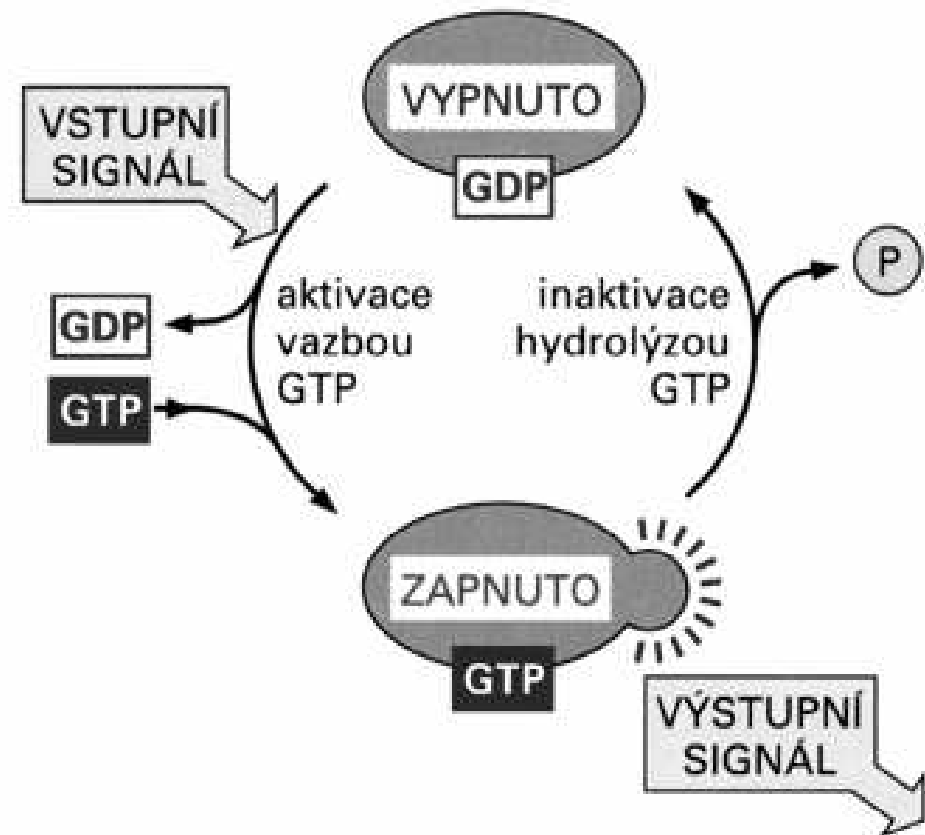
# Proteiny, které fungují jako molekulové přepínače:

## Kinázy/fosfatázy



(A) signalizace fosforylací

## GTPázy



(B) signalizace pomocí GTP-vazebných proteinů

# Rodina GTPáz

## Guanin nucleotide-binding proteins (G proteiny)

Kolísají mezi dvěma konformačními stavy:

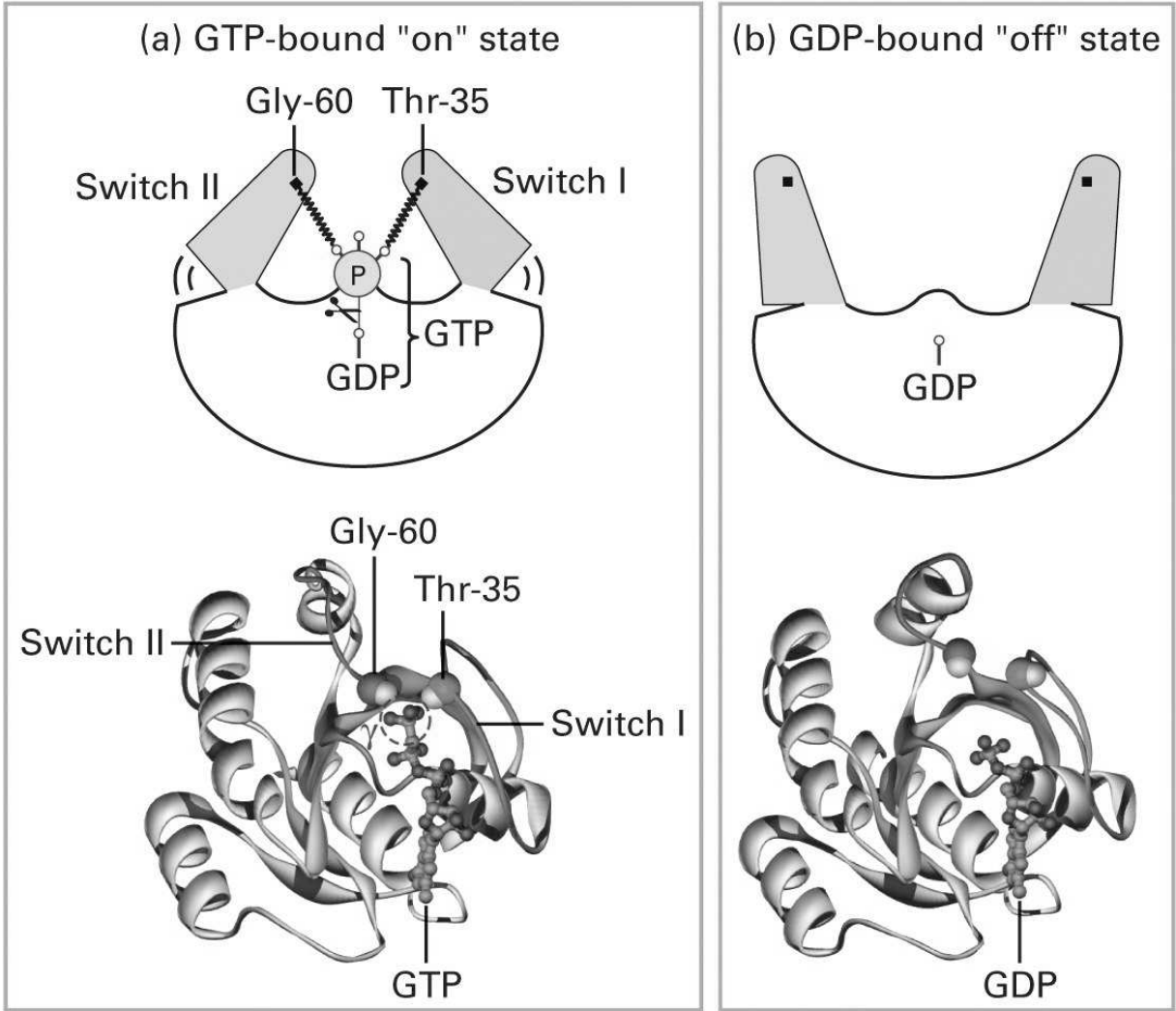
- „**zapnuto**“ (navázáno GTP)
- „**vypnuto**“ (navázáno GDP)

### Aktivace-přechod do stavu „zapnuto“

- závislá na přítomnosti mimobuněčného signálu
- zprostředkována faktorem **GEF** (guanine nucleotide-exchange factor), který z G proteinu uvolňuje GDP
- vazba GTP je usnadněna vysokou nitrobuněčnou koncentrací GTP

### Inaktivace-přechod do stavu „vypnuto“

- hydrolýza GTP na GDP a P je důsledkem vnitřní GTPázové aktivity samotného G proteinu
- rychlost reakce zvyšují faktory **GAP** (GTPase-accelerating factors)



# Klasifikace proteinů G

1. **Trimerní (velké) G proteiny**, které se indukují přímou vazbou s receptory

2. **Monomerní (malé) G proteiny** typu Ras, které interagují s receptory nepřímo prostřednictvím adaptérů

Všechny stimulované G proteiny obsahují oblasti, které interagují s jinými proteiny a tak ovlivňují jejich aktivitu

## Struktura velkých proteinů G

- několik variant, každá je typická pro určitý soubor receptorů a určitý soubor následujících cílových proteinů

### **3 podjednotky:**

$\alpha$  - obsahuje vazebné místo pro GTP/GDP, zajišťuje hydrolýzu GTP

$\beta$  a  $\gamma$  - ukotvují G protein na cytoplazmatické straně plazmatické membrány

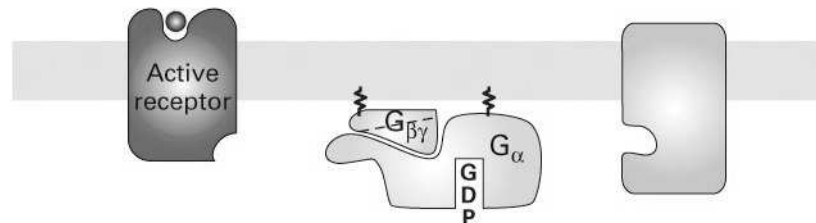
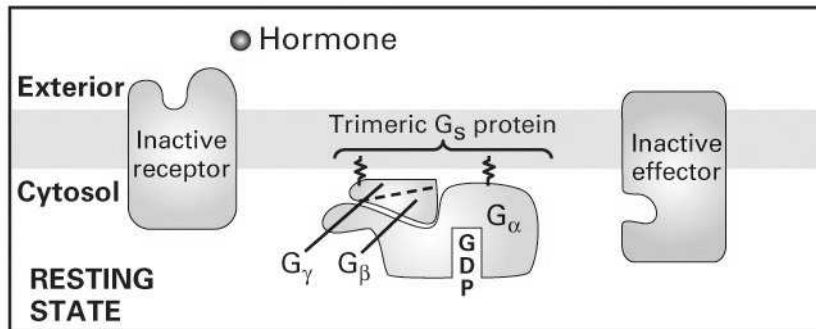
- u savců dosud charakterizováno 20 různých typů podjednotky  $\alpha$ , 5 typů podjednotky  $\beta$  a 6 typů  $\gamma$

- evoluční konzervativnost

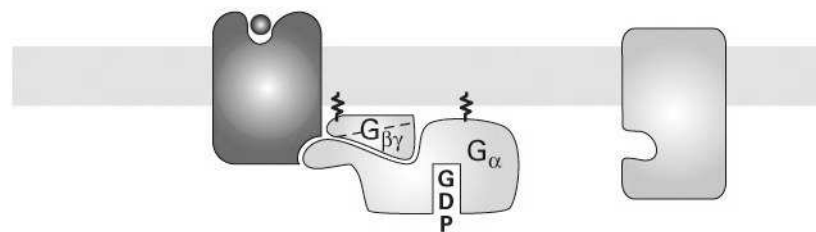
## Funkce G proteinů

- spojovací články mezi povrchovými receptory a producenty sekundárních přenašečů uvnitř buňky
- G proteiny reagují pouze s aktivovanými receptory
- interakce mezi aktivovaným receptorem a G proteinem vede k výměně GDP na podjednotce  $\alpha$  za GTP
- podjednotka  $\alpha$  s navázaným GTP přechází do aktivního stavu a odděluje se od podjednotek  $\beta$  a  $\gamma$
- uvolněná podjednotka  $\alpha$  s navázaným GTP (podobně jako uvolněné podjednotky  $\beta$  a  $\gamma$ ) může interagovat se svou cílovou molekulou v plazmatické membráně (efektorem), který signál předává dál
- značná rozmanitost efektorů G proteinů (adenylát cyklázy, fosfolipáza C, cGMP fosfodiesteráza, různé typy iontových kanálků)

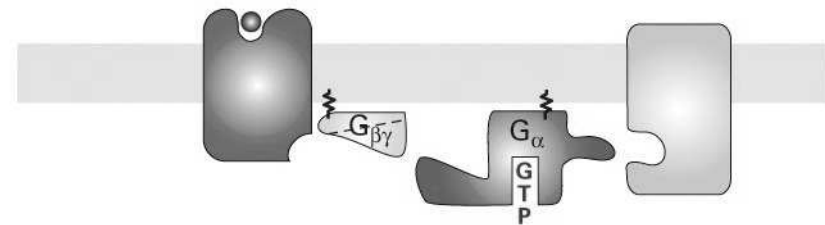




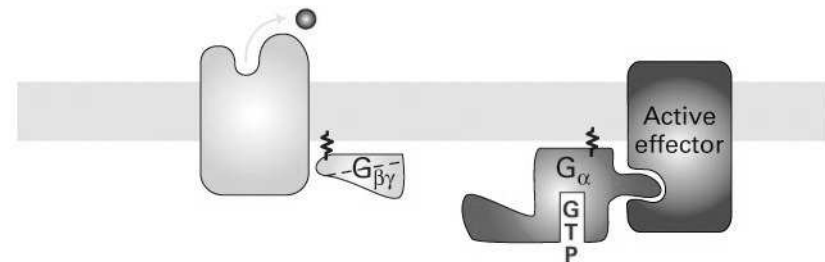
**1** Binding of hormone induces a conformational change in receptor



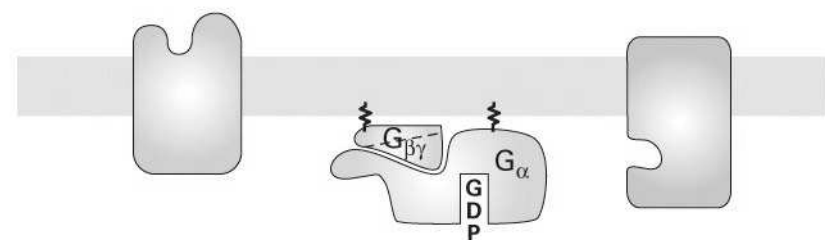
**2** Activated receptor binds to  $G_\alpha$  subunit



**3** Binding induces conformational change in  $G_\alpha$ ; bound GDP dissociates and is replaced by GTP;  $G_\alpha$  dissociates from  $G_{\beta\gamma}$



**4** Hormone dissociates from receptor;  $G_\alpha$  binds to effector, activating it



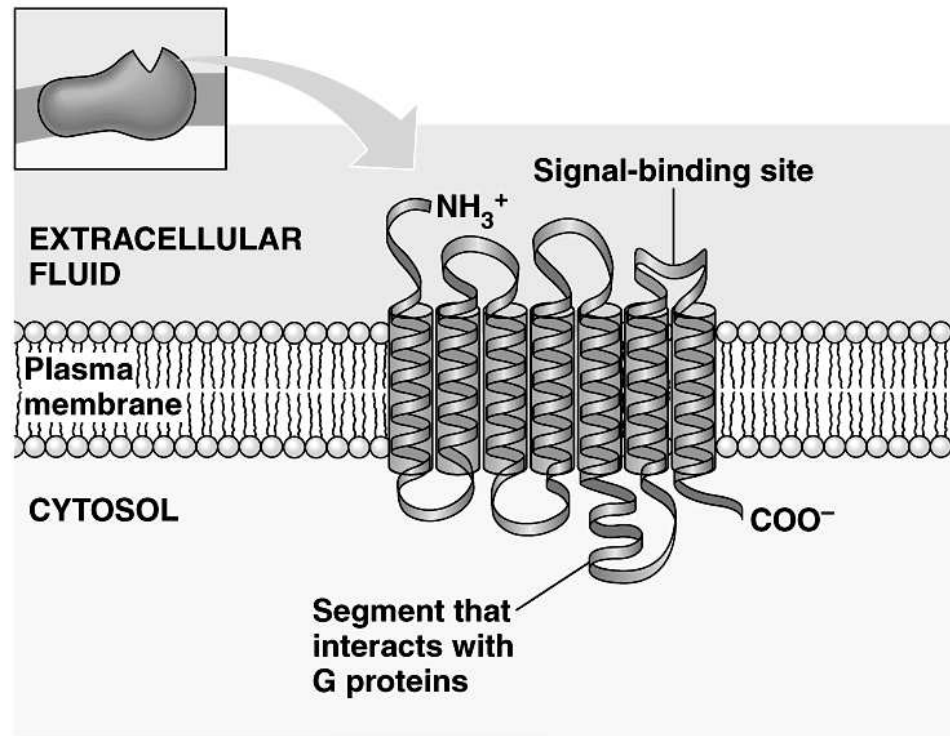
**5** Hydrolysis of GTP to GDP causes  $G_\alpha$  to dissociate from effector and reassociate with  $G_{\beta\gamma}$

# Vypnutí signálu

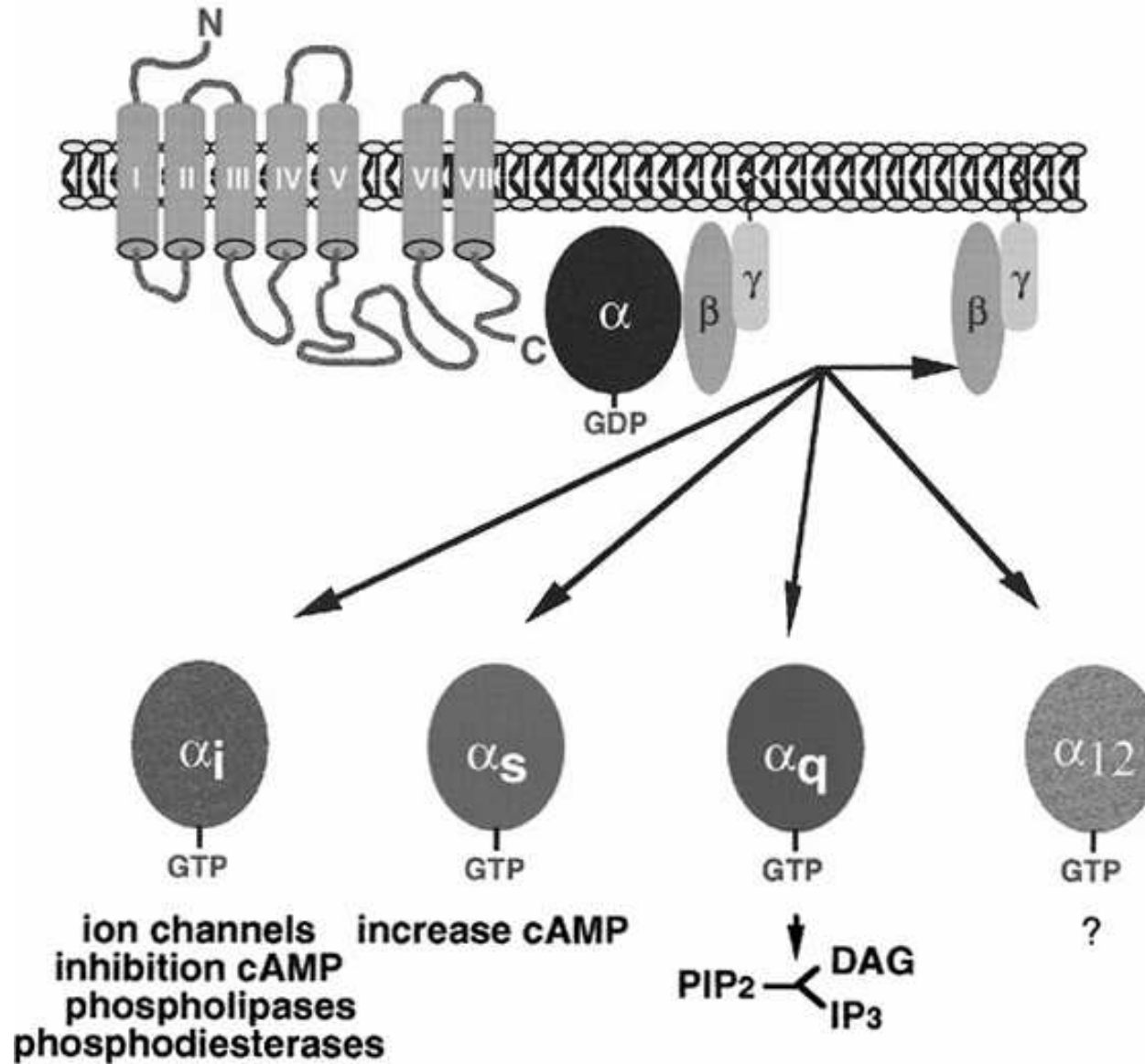
- nastává po několika sekundách aktivity *G*-proteinu, kdy *GTP*ázová aktivita podjednotky  $\alpha$  vyvolá hydrolýzu *GTP*
- aktivita *G* proteinu je vymezena dobou, po kterou jsou podjednotky  $\alpha$  a  $\beta\gamma$  disociovány
- po hydrolýze *GTP* na *GDP* se podjednotky  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  spojují a vypínají signál

# Receptory spojené s G proteiny

- největší rodina buněčných povrchových receptorů (stovky členů v savčích buňkách)
- obdobná struktura: jediný polypeptidový řetězec, sedminásobné vinutí šroubovice membránou
- vysoká evoluční konzervativnost v rámci eukaryot
- vazba ligandu způsobí změnu konformace nitrobuněčné části receptoru: vazba s G proteinem na cytozolové straně membrány - aktivace G proteinu



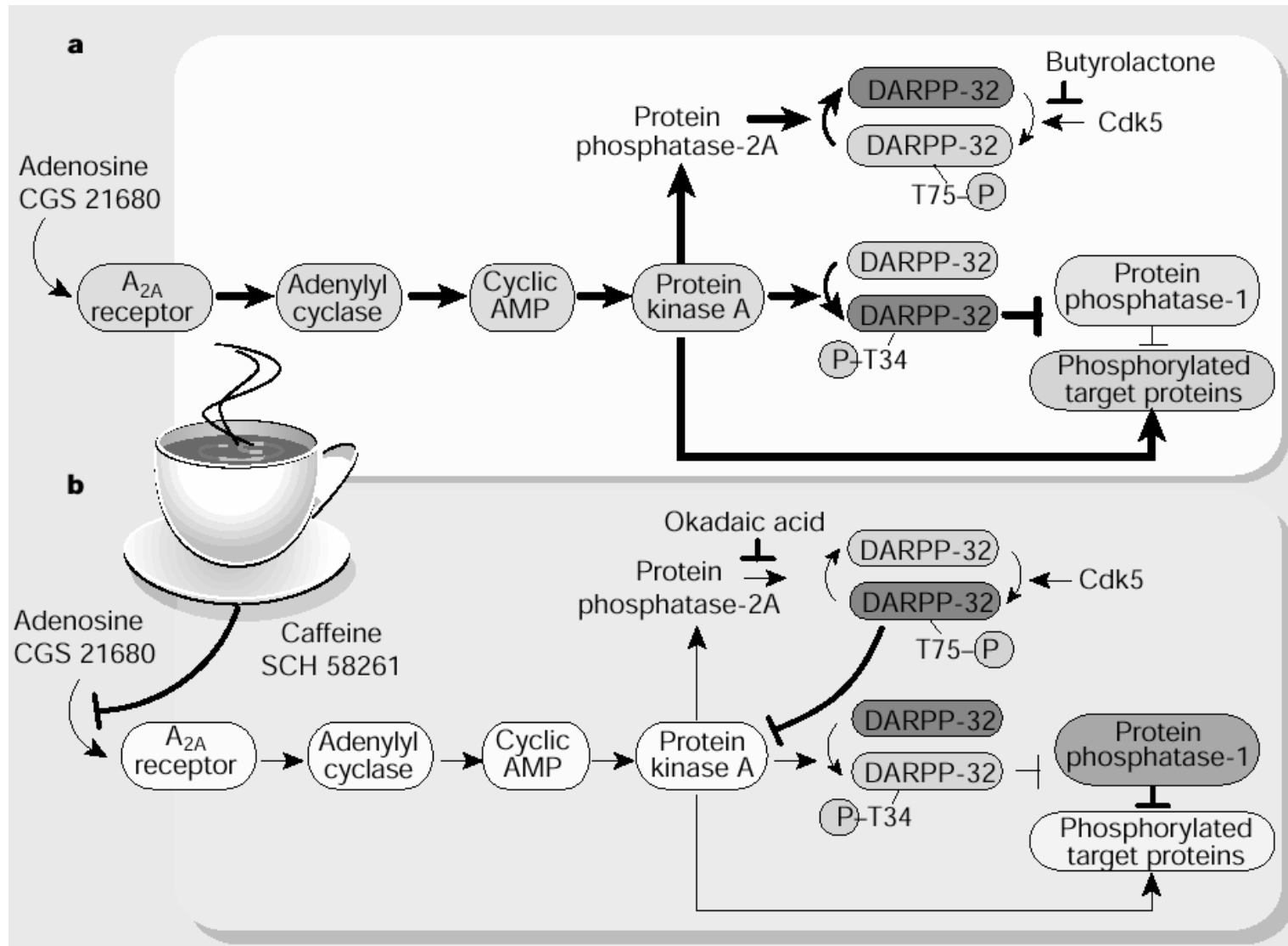
# Rozmanité funkce G proteinu



## Biologické funkce G proteinu

- přenos chuťových a pachových signálů
- přenos světelných signálů
- přenos nervových signálů
- chemotaxe
- exocytóza
- kontrola krevního tlaku
- embryogeneze
- vývoj
- buněčný růst a diferenciace
- onkogeneze
- infekce HIV
- funkce v endokrinních žlázách

# More than half of all therapeutic drugs work through G-protein receptors . . . Including the caffeine in coffee:



Vaugeios (2002) Positive Feedback from Coffee. Nature 418: 734-735.

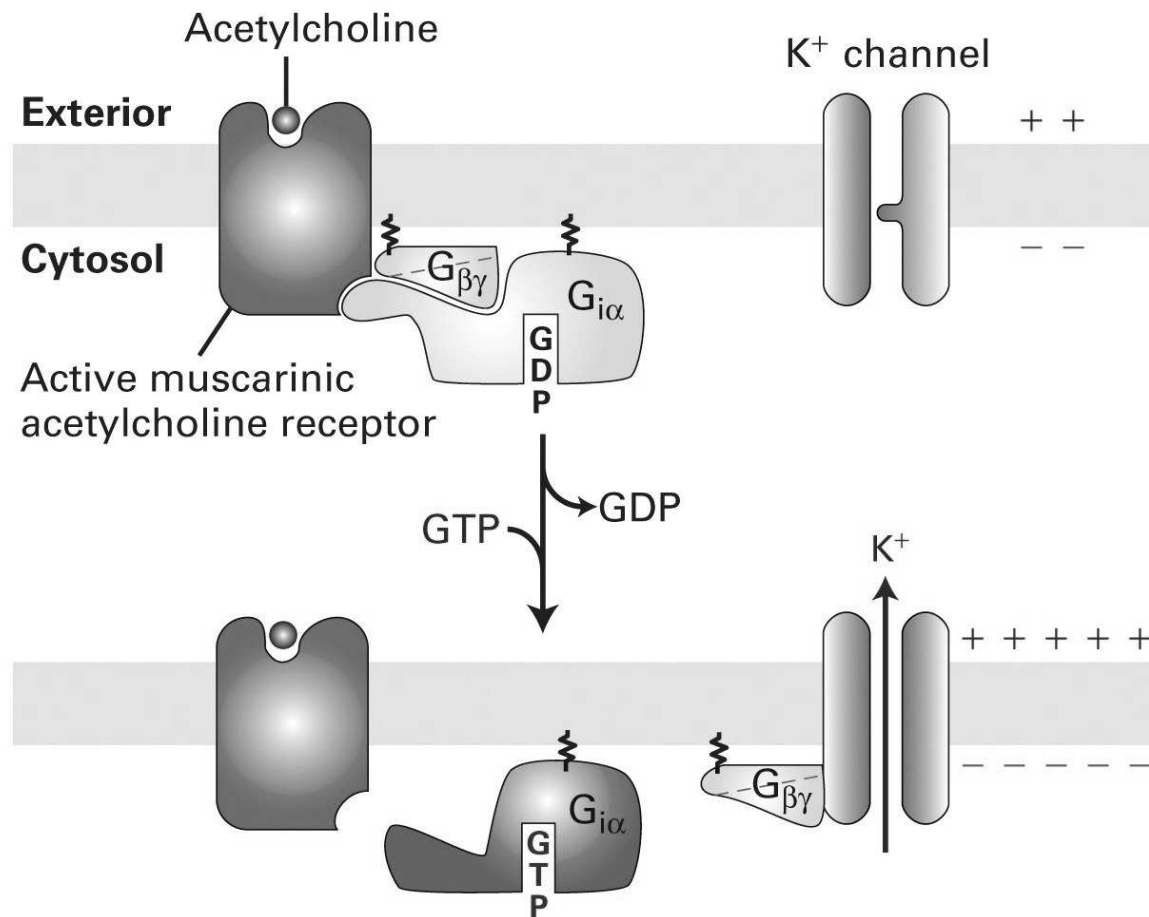
# Některé G-proteiny regulují propustnost iontových kanálků

Např. regulace činnosti srdečního svalu

- **nervová vlákna** pro zpomalení činnosti srdce uvolňují acetylcholin
- **acetylcholin** se váže na **receptor** lokalizovaný na buňkách srdečního svalu
- aktivace **G-proteinu**, disociace na podjednotky  $\alpha$ ,  $\beta\gamma$
- vazba komplexu  $\beta\gamma$  na **kanálek  $K^+$**  v plazmatické membráně buňky srdečního svalu
- **zvýšení propustnosti** kanálku
- **změna elektrických vlastností** buňky srdečního svalu, zpomalení stahů
- **hydrolýza GTP**: spojení podjednotek G proteinu, zavření kanálku

# Receptory pro acetylcholin v srdečním stavu zpomalují kontrakci

Příčinou je hyperpolarizace svalové membrány

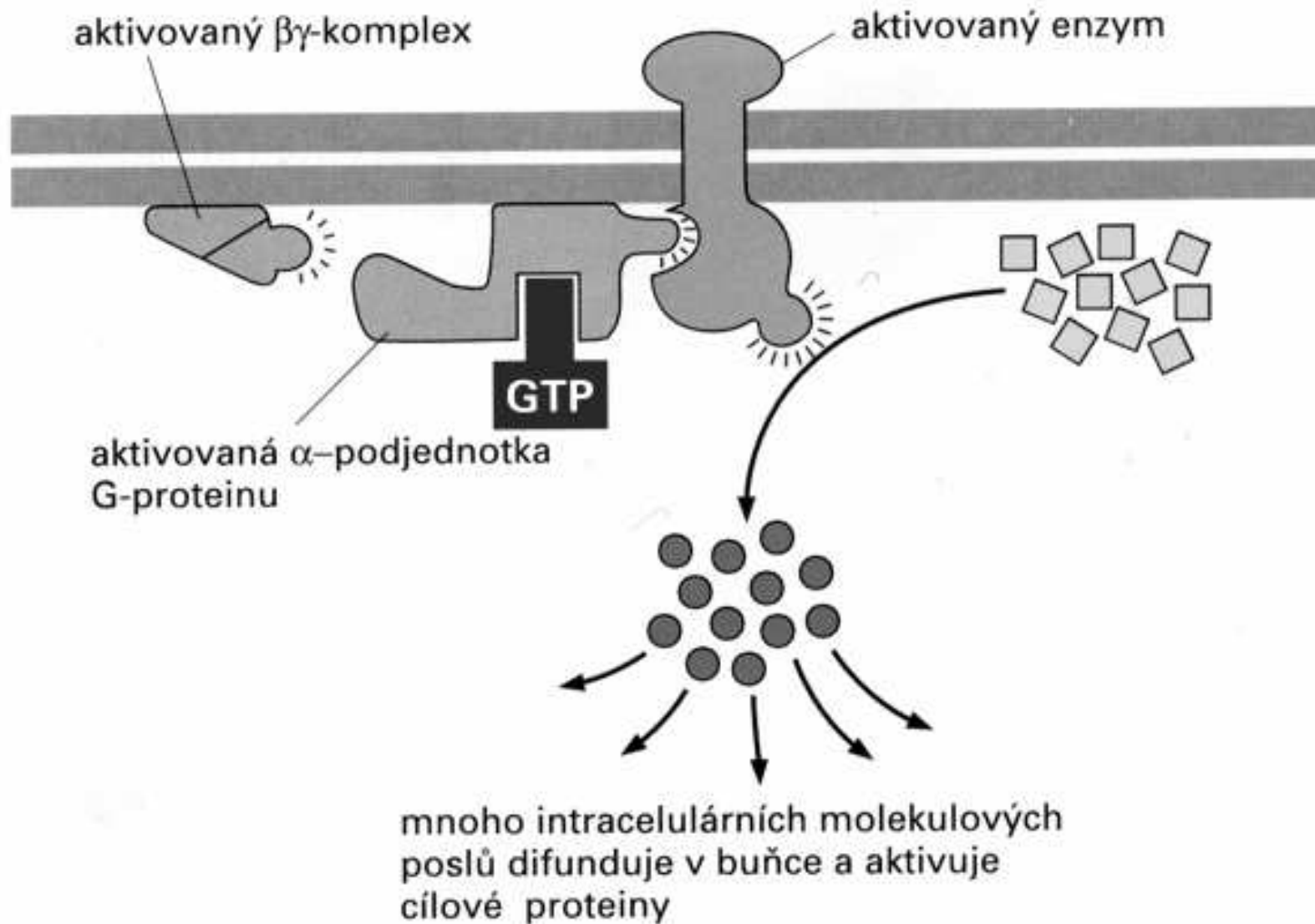




## Některé G-proteiny aktivují enzymy vázané v membráně

- následná tvorba dalších signálních molekul - komplexní důsledky
- nejčastějšími cílovými enzymy jsou **adenylátcykláza** (tvorba cAMP) a **fosfolipáza C** (tvorba inositoltrifosfátu a diacylglycerolu)
- spřažení mezi G proteinem a tvorbou druhých poslů může být stimulační (*G<sub>s</sub>*) nebo inhibiční (*G<sub>i</sub>*)

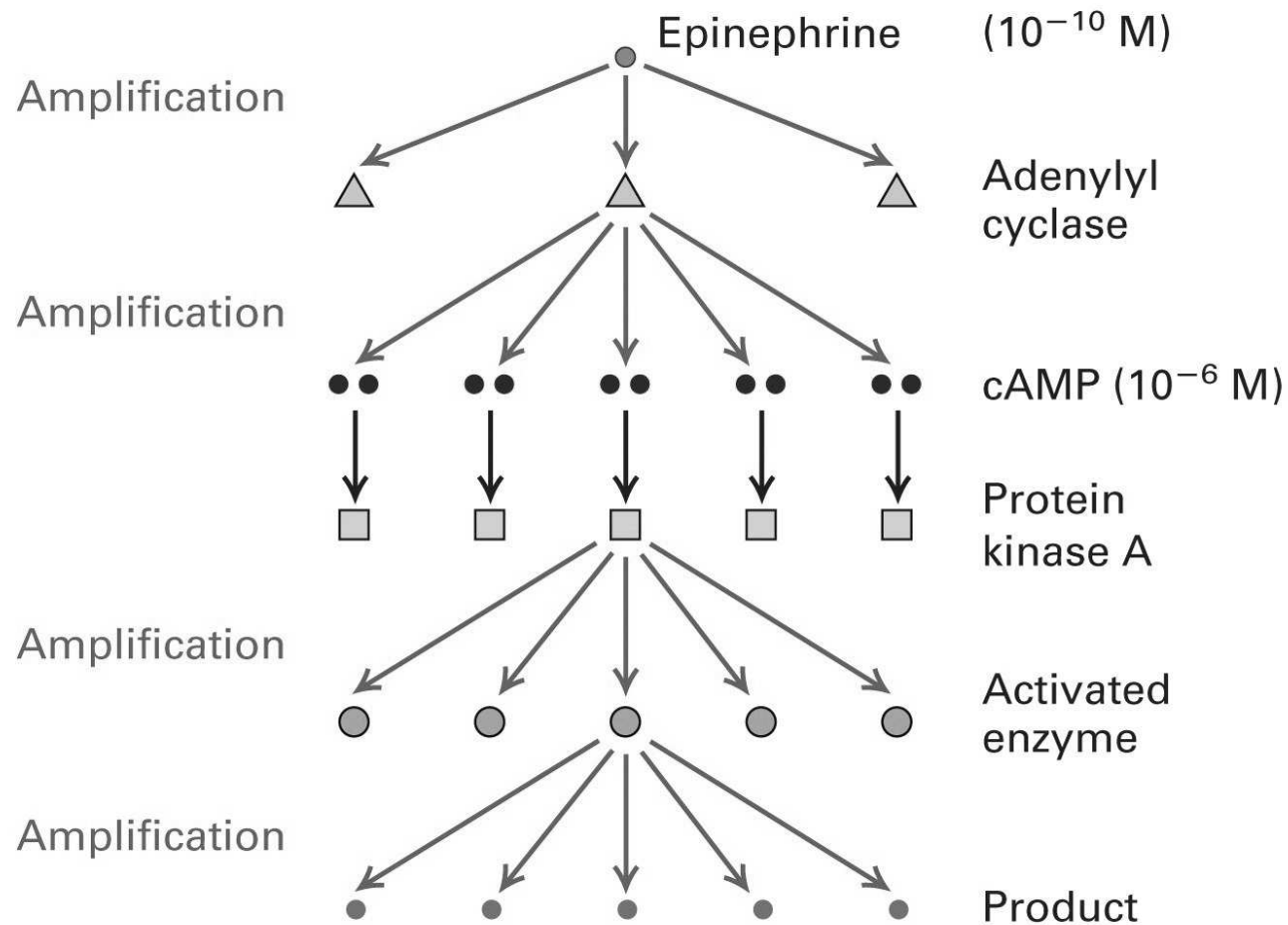
# Enzymy aktivované G-proteiny katalyzují syntézu molekul nitrobuněčných poslů



## Výhody G-proteinů

- **amplifikace** signálu
- **regulace** signálu (možnost kovalentních modifikací G-proteinů, vliv koncentrace G-proteinů v membráně)

# Amplifikace vnějšího signálu během přenosu buňkou



## Poruchy funkce G proteinů

- tvorba nádorů
- infekční choroby

### cholera:

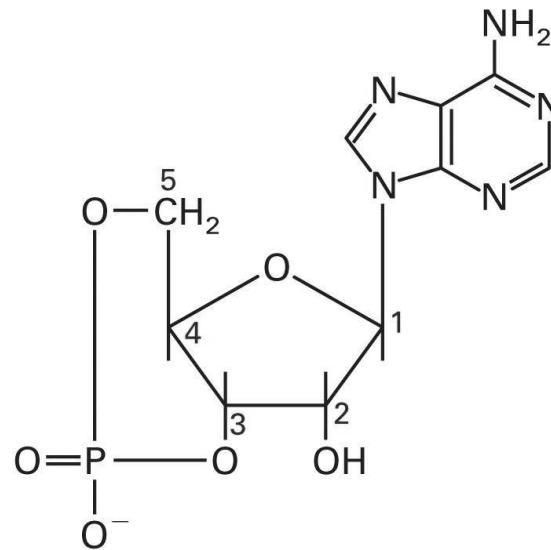
*Vibrio cholerae* produkuje **cholerový toxin** (tj. enzym, který katalyzuje **přenos ADP-ribózy na podjednotku  $\alpha$  proteinu Gs**)

Gs stimuluje aktivitu **adenylát cyklázy** - ADP ribozylace podjednotky  $\alpha$  Gs vyvolaná choleroým toxinem snižuje rychlost hydrolýzy GTP - protein Gs zůstává v aktivním stavu - neustálá aktivace adenylát cyklázy: vysoká hladina cAMP - vysoká propustnost sodíkových kanálků střevními buňkami - velká míra příjmu vodu a iontů sodíku do střev

# Nitrobuněčné signální dráhy

## 1. Dráha cAMP

- cAMP objeven při studiu metabolismu glykogenu (Sutherland, 1958):



**3',5'-Cyclic AMP  
(cAMP)**

Activates protein  
kinase A (PKA)

Pozorování: Adrenalin působí na svalové nebo jaterní buňky tak, že je stimuluje k uvolnění a štěpení glykogenu

### Mechanismus

-v izolovaných membránách jaterních buněk za přítomnosti **ATP** **adrenalin** indukuje tvorbu **cAMP**

-cAMP aktivuje **kinázu A**

-kináza A fosforyluje a aktivuje **fosforylázovou kinázu**

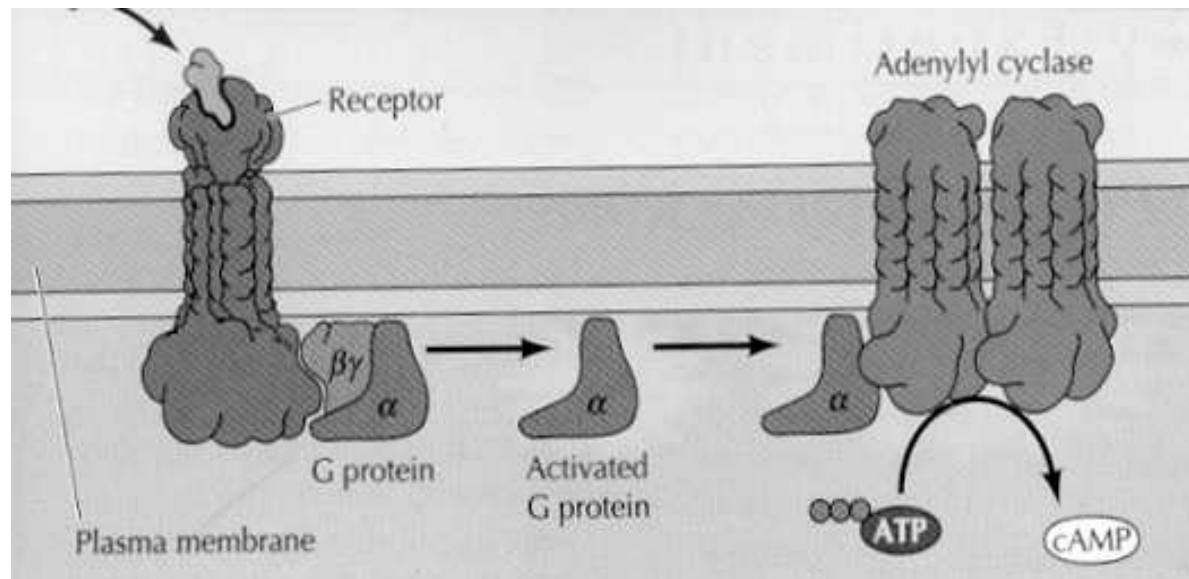
-fosforylázová kináza fosforyluje a aktivuje **glykogen fosforylázu** (štěpení glykogenu)

kináza A fosforyluje a inaktivuje **glykogen syntázu** (inaktivace syntézy glykogenu)

# Spojení cAMP a fosforylace bylo poprvé demonstrováno při studiu metabolismu glykogenu kosterního svalstva

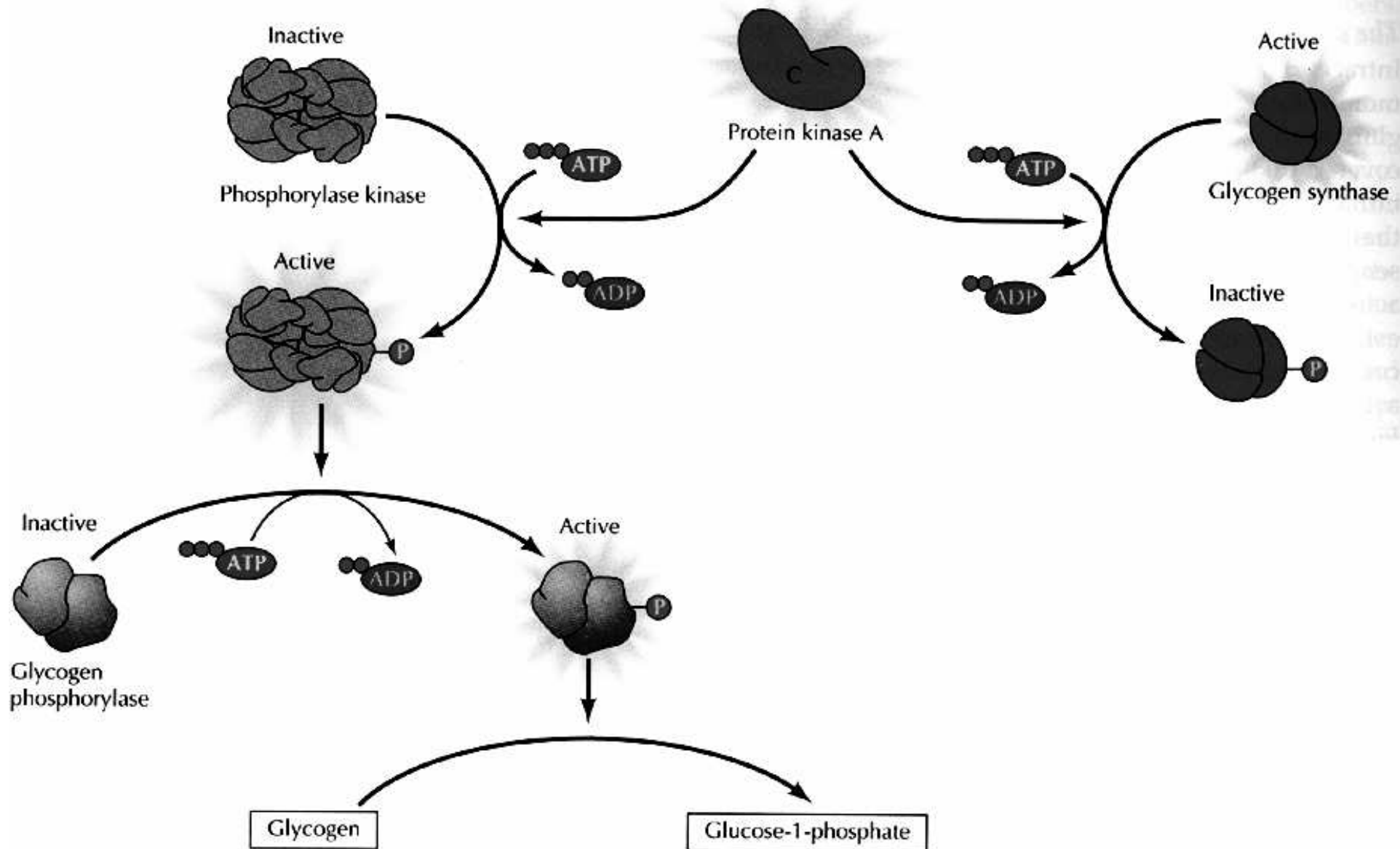
**glykogen** = zásobárna glukózy, odbourávání řízeno adrenalinem

stres - produkce adrenalinu do krve - adrenalin se váže na  $\beta$ -adrenergní receptory svalových buněk - aktivace proteinu G - aktivace adenylát cyklázy - zvýšení hladiny cAMP - aktivace kinázy A - fosforylace / aktivace fosforylázové kinázy - fosforylace / aktivace glykogenové fosforylázy - štěpení glykogenu na glukózo 1 P





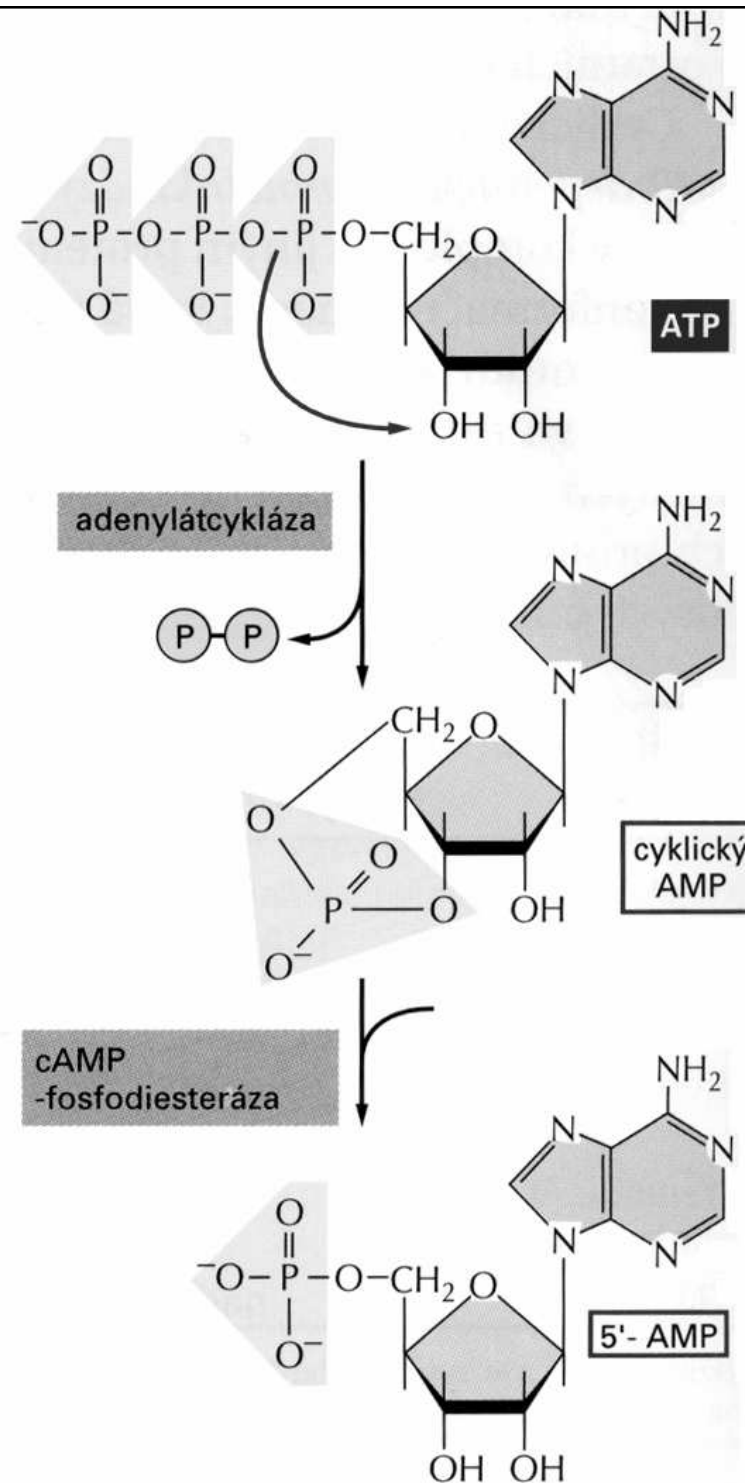
# Regulace metabolismu glykogenu protein kinázou A



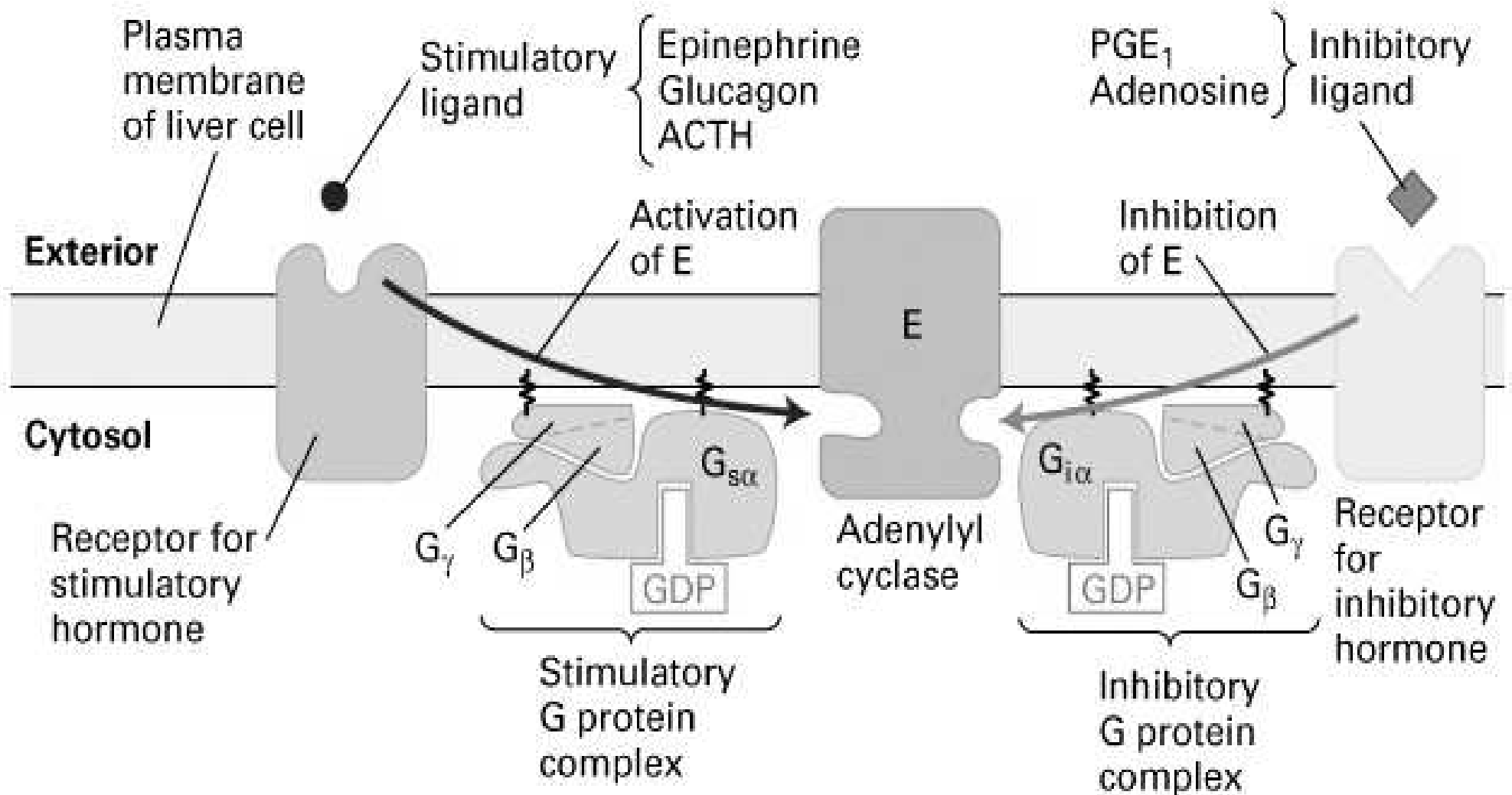
## cAMP

- kontrola jeho koncentrace uvnitř buňky závisí na rovnováze aktivit **adenylátcyklázy** a **cAMP-fosfodiesterázy**
- aktivita adenylát cyklázy je regulována *G* proteinem, aktivita cAMP fosfodiesterázy nepodléhá kontrole (je konstitutivní)
- rychlá změna koncentrace v reakci na mimobuněčné signály
- rozpustnost ve vodě umožňuje přenos signálu z membrány k proteinům cytozolu nebo jádra
- **aktivuje cAMP-dependentní protein kinázu (kinázu A)**

# Syntéza a odbourávání cAMP

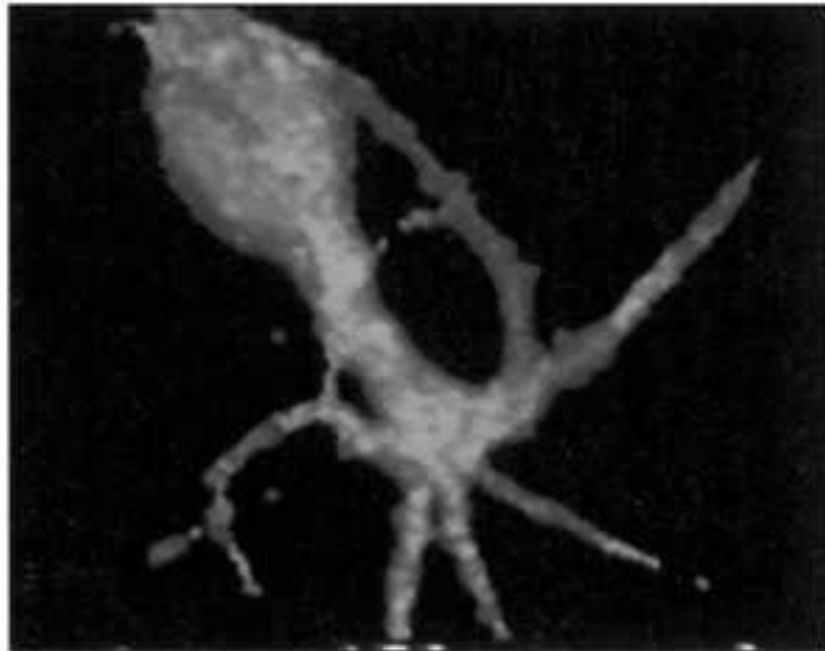


# Ligandy mohou aktivovat i inhibovat adenylát cyklázu



## Koncentrace cAMP roste při reakci na mimobuněčný signál

čas 0 s



(A)

+ serotonin



čas 20 s



(B)

Hladina cAMP měřena prostřednictvím injikovaného fluorescenčního proteinu, který po navázání cAMP měnil barvu.

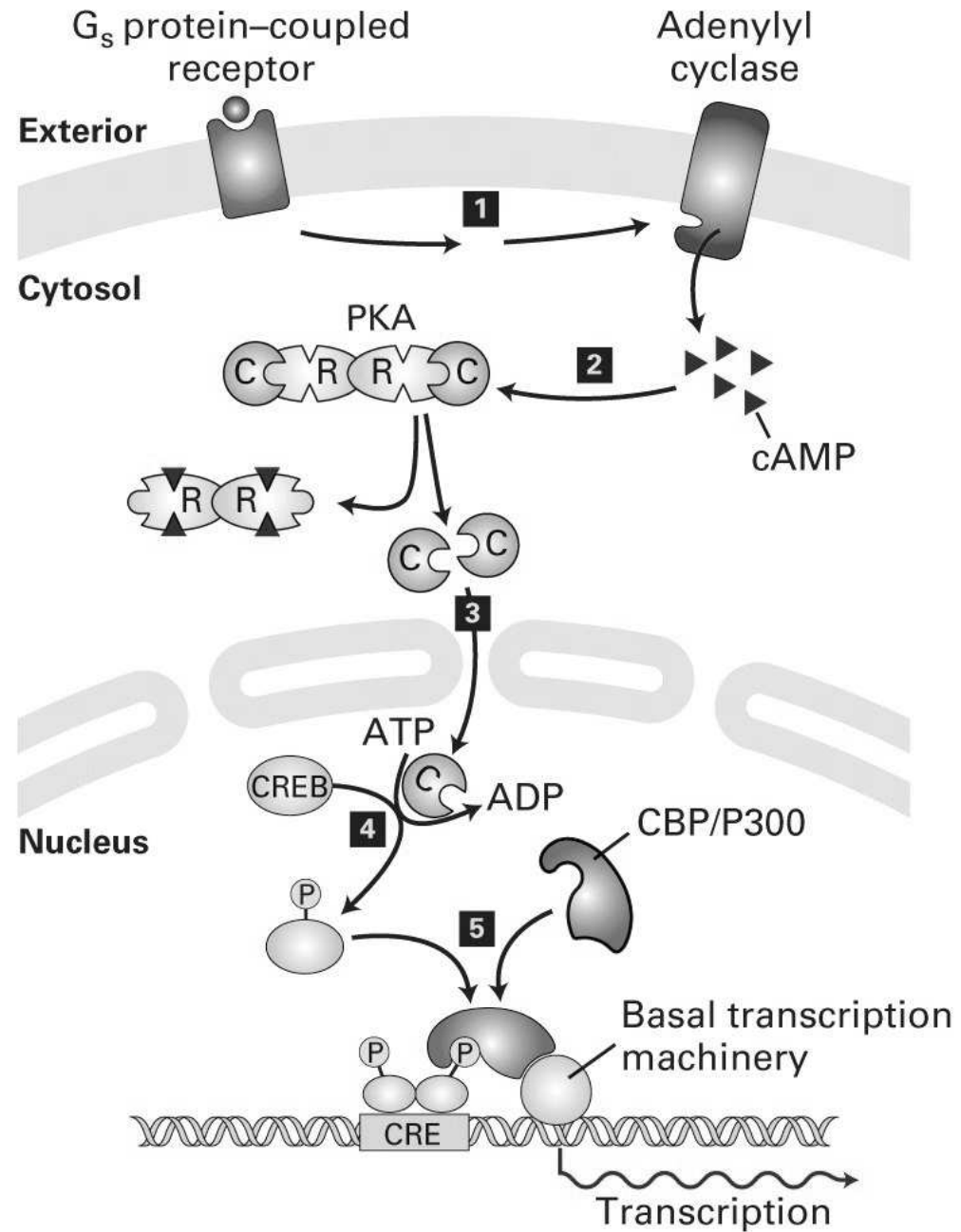
## Protein kináza A

-v metabolismu glykogenu:

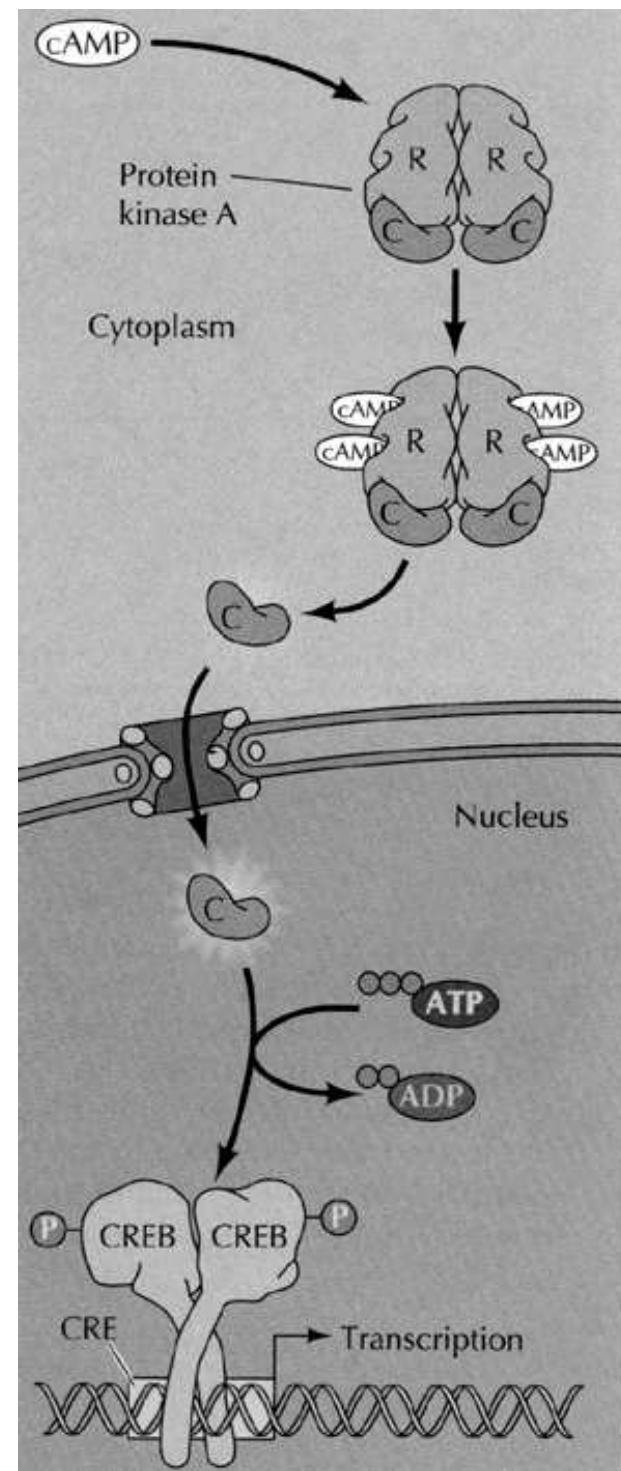
fosforyluje **kinázu fosforylázy** (aktivace štěpení glykogenu) a **glykogen syntázu** (inaktivace syntézy glykogenu)

-obecně:

fosforyluje transkripční faktor **CREB** (zodpovídající za transkripci genů vybavených sekvencí CRE - „cAMP-response element“)

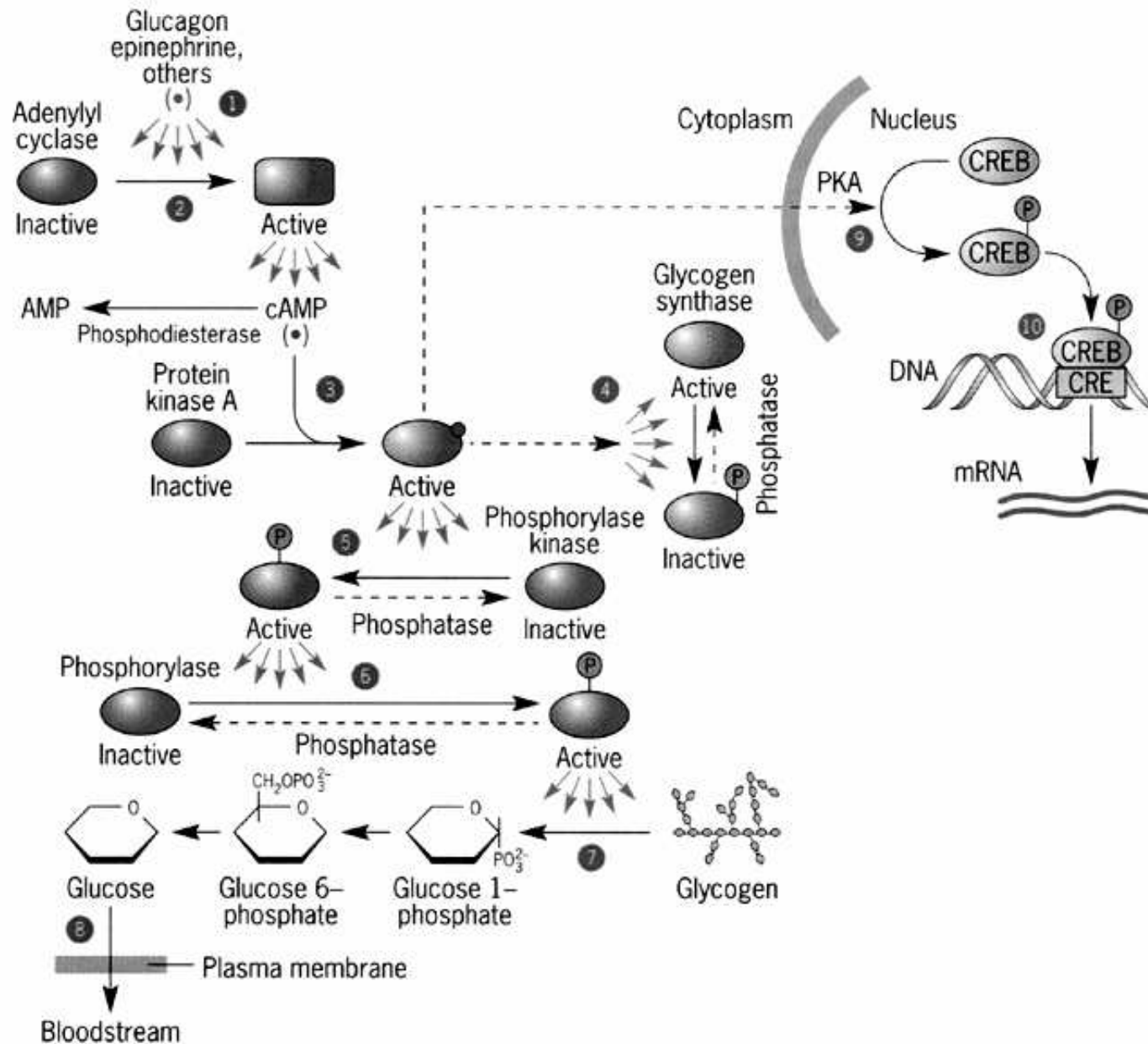


# Regulace genové exprese protein kinázou A





# Reakce jaterní buňky na glukagon nebo adrenalin



# Struktura protein kinázy A

## Inaktivní stav:

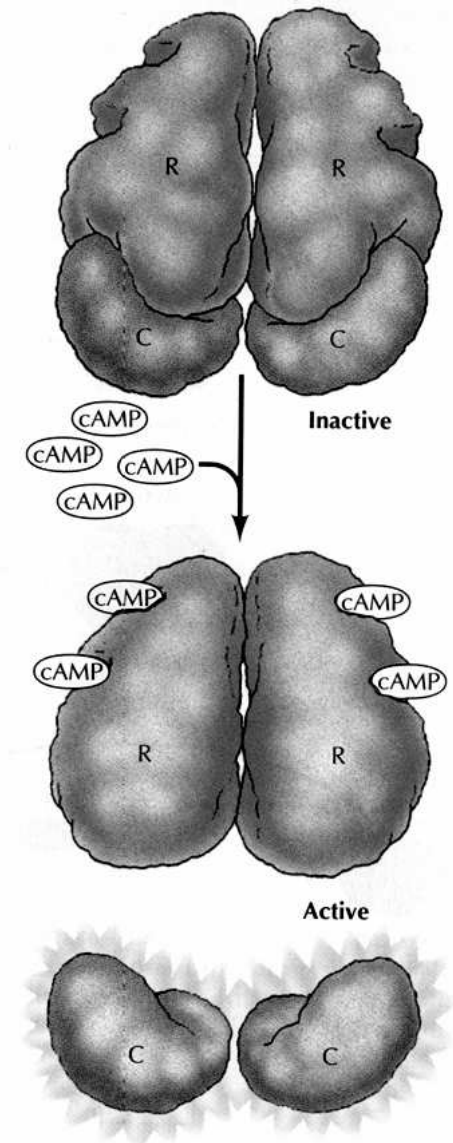
- dvě regulační podjednotky (vazba cAMP)
- dvě katalytické podjednotky

## Aktivní stav:

- vazba cAMP - změna konformace regulačních podjednotek - disociace regulačních podjednotek z komplexu - uvolněné katalytické podjednotky mohou fosforylovat své substráty

## PKA:

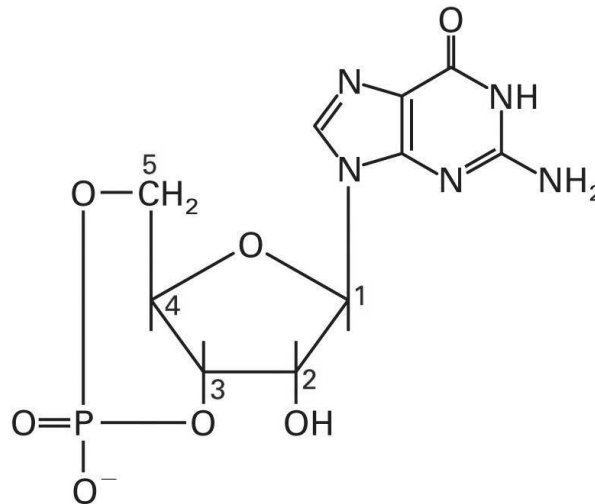
- výskyt ve všech živočišných buňkách
- zprostředkovává většinu účinků cAMP



## 2. Dráha cGMP

-kontrola jeho koncentrace uvnitř buňky závisí na rovnováze aktivit **guanylátcyklázy** a **cGMP-fosfodiesterázy**

Funkce cGMP - **aktivace cGMP-dependentní protein kinázy**  
- **změna propustnosti iontových kanálků**



**3',5'-Cyclic GMP  
(cGMP)**

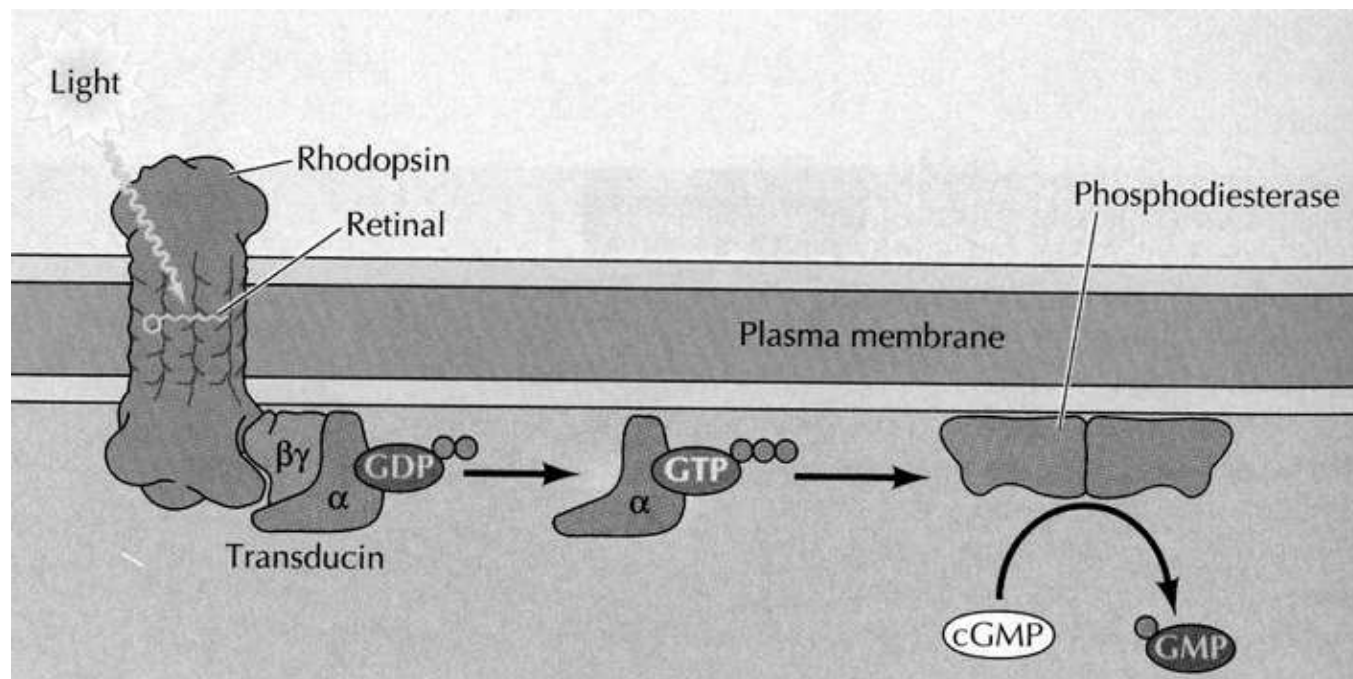
Activates protein kinase G (PKG)  
and opens cation channels in  
rod cells

## cGMP v očích obratlovců zodpovídá za přeměnu vizuálních (světelných) signálů v nervové

-fotoreceptor (**rhodopsin**) v sítnici je napojen na G protein (**transducin**)

### Mechanismus signalizace:

- dopad světla - izomerizace retinalu - konformační změna rhodopsinu - aktivace G-proteinu (transducinu) - stimulace cGMP fosfodiesterázy - snížení hladiny cGMP - změna propustnosti iontových kanálků v plazmatické membráně nerovných buněk



### 3. Dráha $\text{Ca}^{2+}$

1947: injekce  $\text{Ca}^{2+}$  do svalových buněk vyvolává jejich kontrakci

Koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytozolu a mimobuněčné tekutině není stejná:

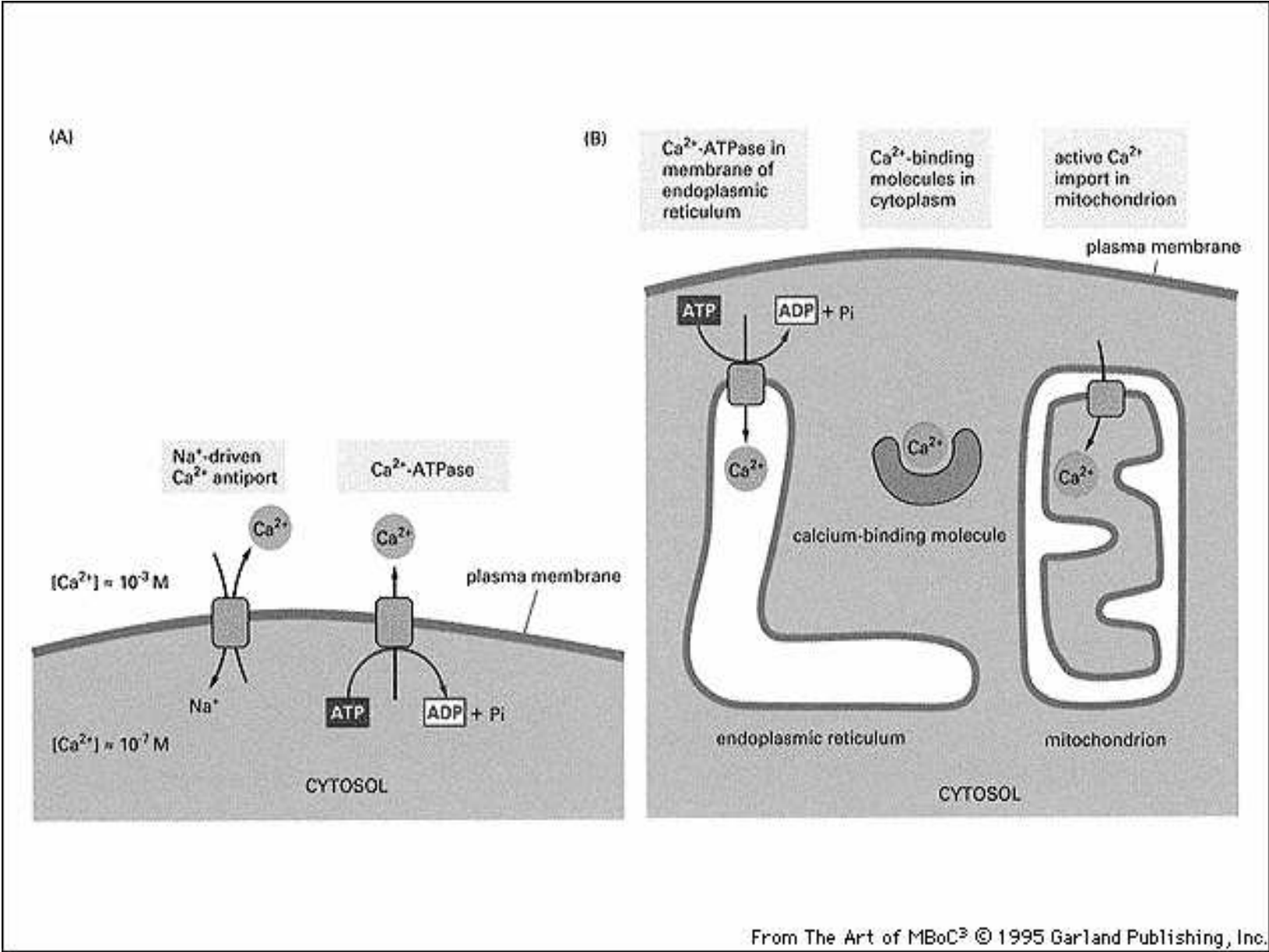
Cytoplazma:  $10^{-7}\text{M}$

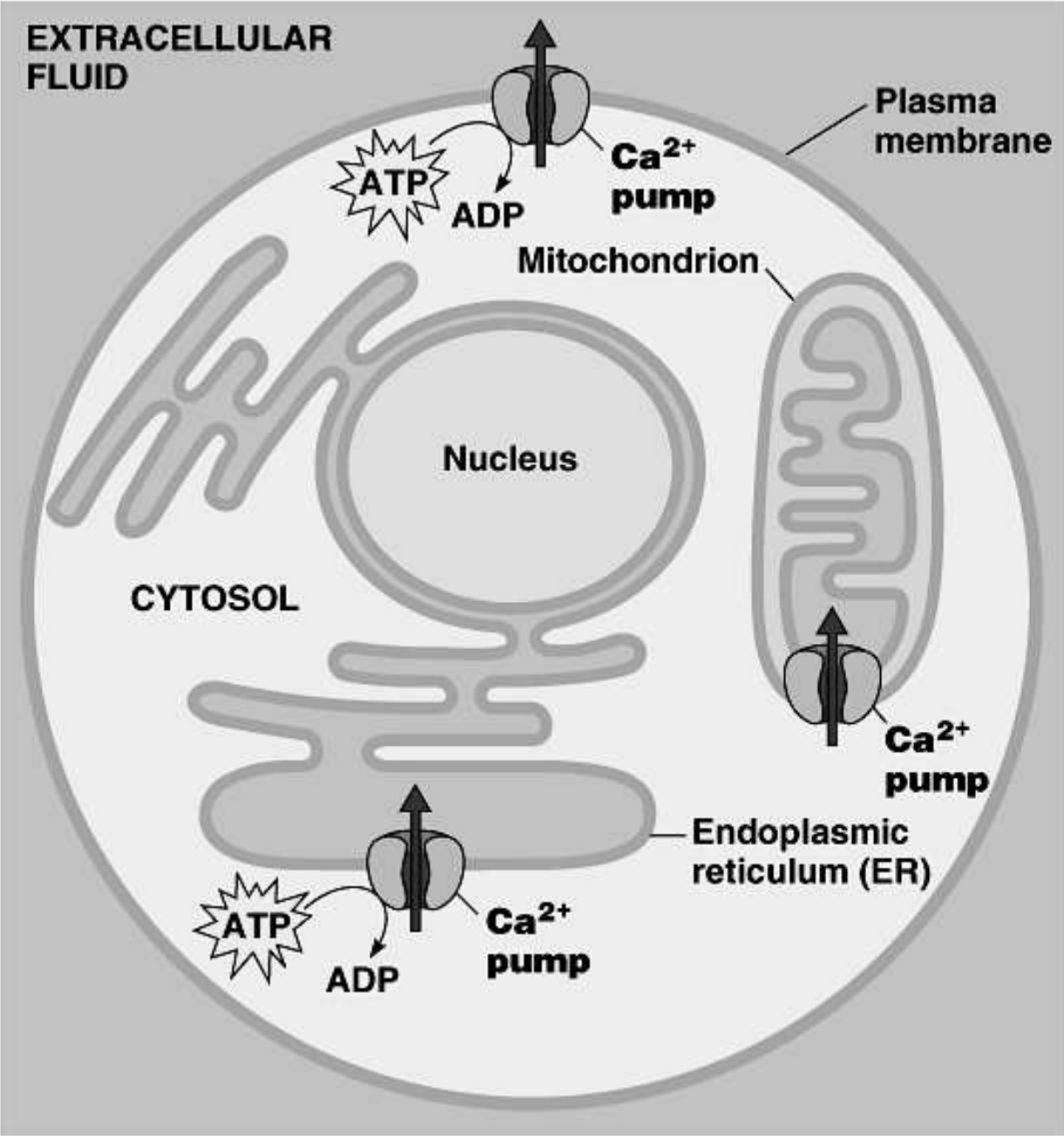
Mimobuněčný prostor:  $10^{-3}\text{M}$

Koncentrační gradient tlačí ionty  $\text{Ca}^{2+}$  do cytozolu

Zvýšená permeabilita membrány - vyšší koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytozolu -  
aktivace nitrobuněčného signálního mechanismu

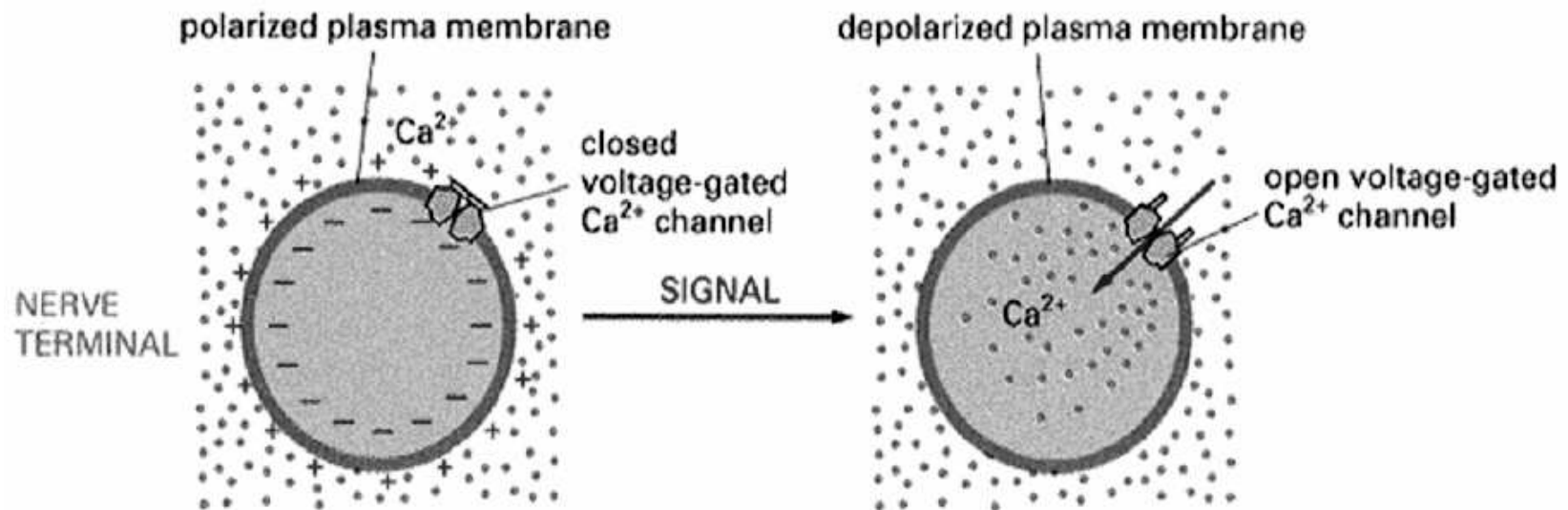
# Systemy udržující nízkou koncentraci $\text{Ca}^{2+}$ v cytozolu





## Dva způsoby vstupu $\text{Ca}^{2+}$ do cytozolu

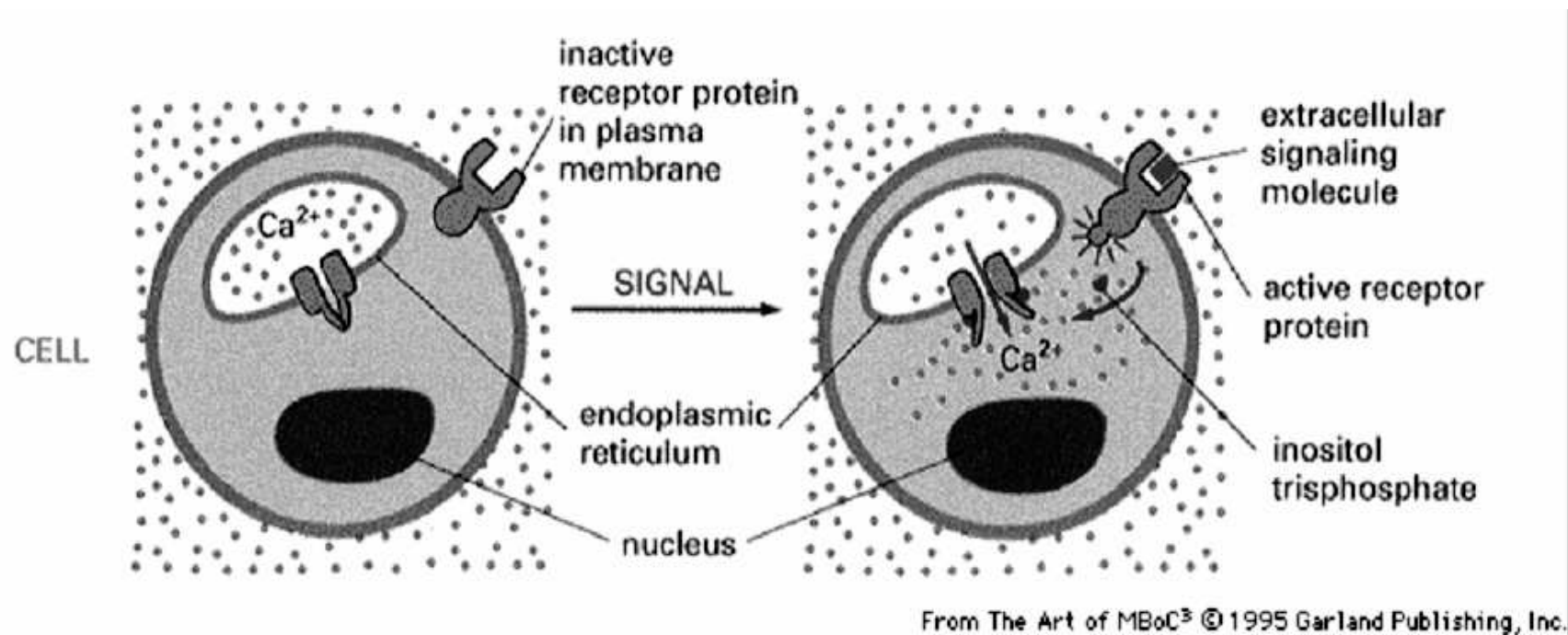
1. Depolarizace membrány (akčním potenciálem) - otevření vápníkových kanálků - zvýšený příjem  $\text{Ca}^{2+}$  z vnějšího okolí





## Dva způsoby vstupu $\text{Ca}^{2+}$ do cytozolu

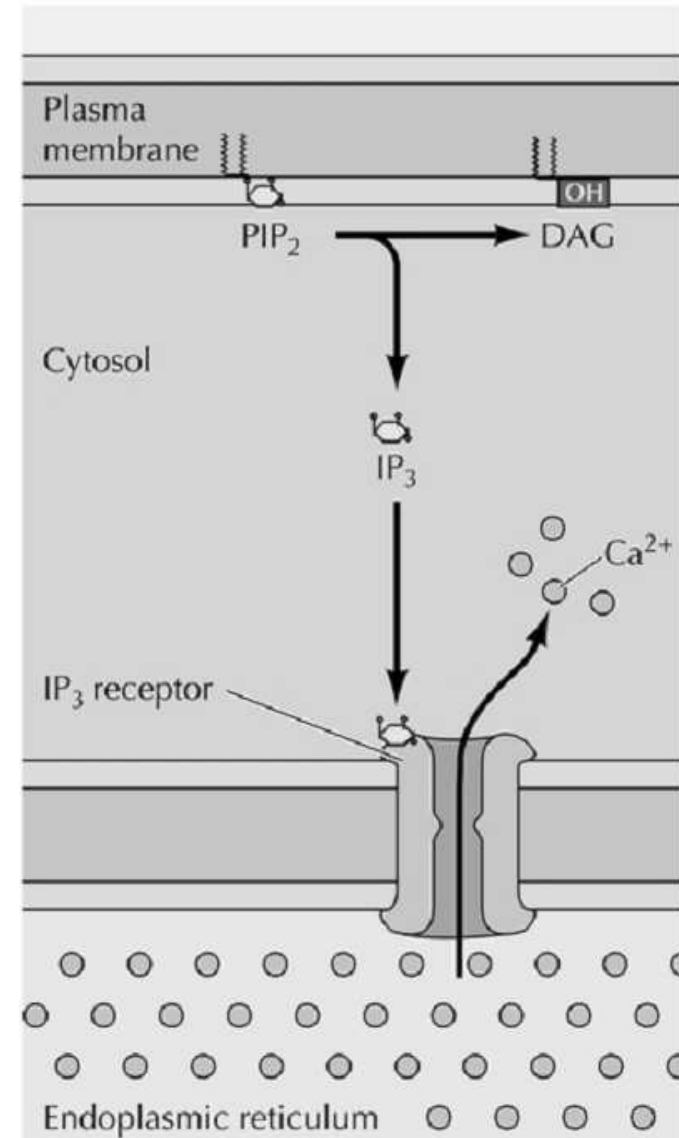
2. Vazba ligandu k receptoru - aktivace proteinu  $G$  - tvorba sekundárního přenašeče ( $\text{IP}_3$ ) - otevření kanálků v membránách organel - zásobárnách  $\text{Ca}^{2+}$  - uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z organel do cytozolu

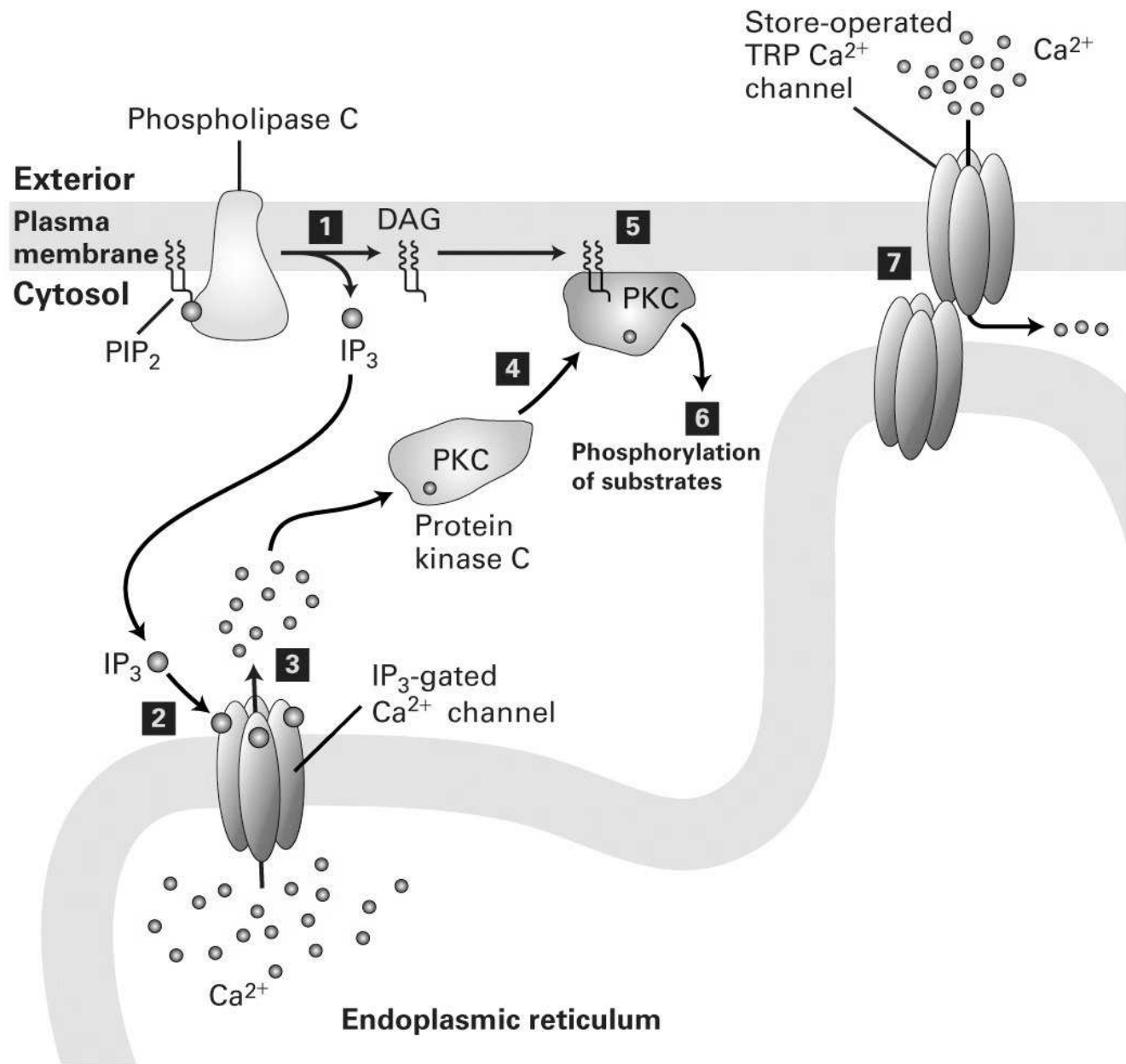


# Fosfolipáza C určuje hladinu IP<sub>3</sub>, který otevírá kanálky Ca<sup>2+</sup> v ER

## Vazba ligandu k receptoru

- aktivace proteinu G - aktivace fosfolipázy C - tvorba inositoltrifosfátu (IP<sub>3</sub>) a diacylglycerolu (DAG)
- IP<sub>3</sub> opouští plazmatickou membránu a difunduje cytozolem
- otevře kanálky Ca<sup>2+</sup> v ER - uvolnění Ca<sup>2+</sup>

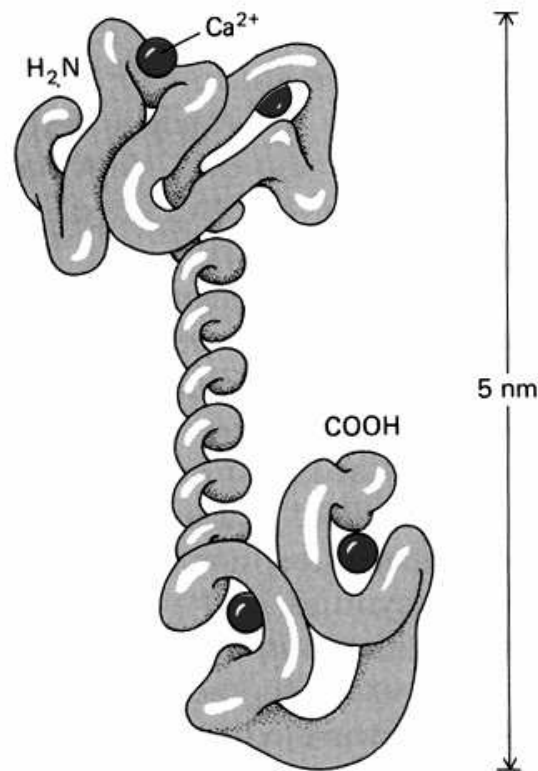




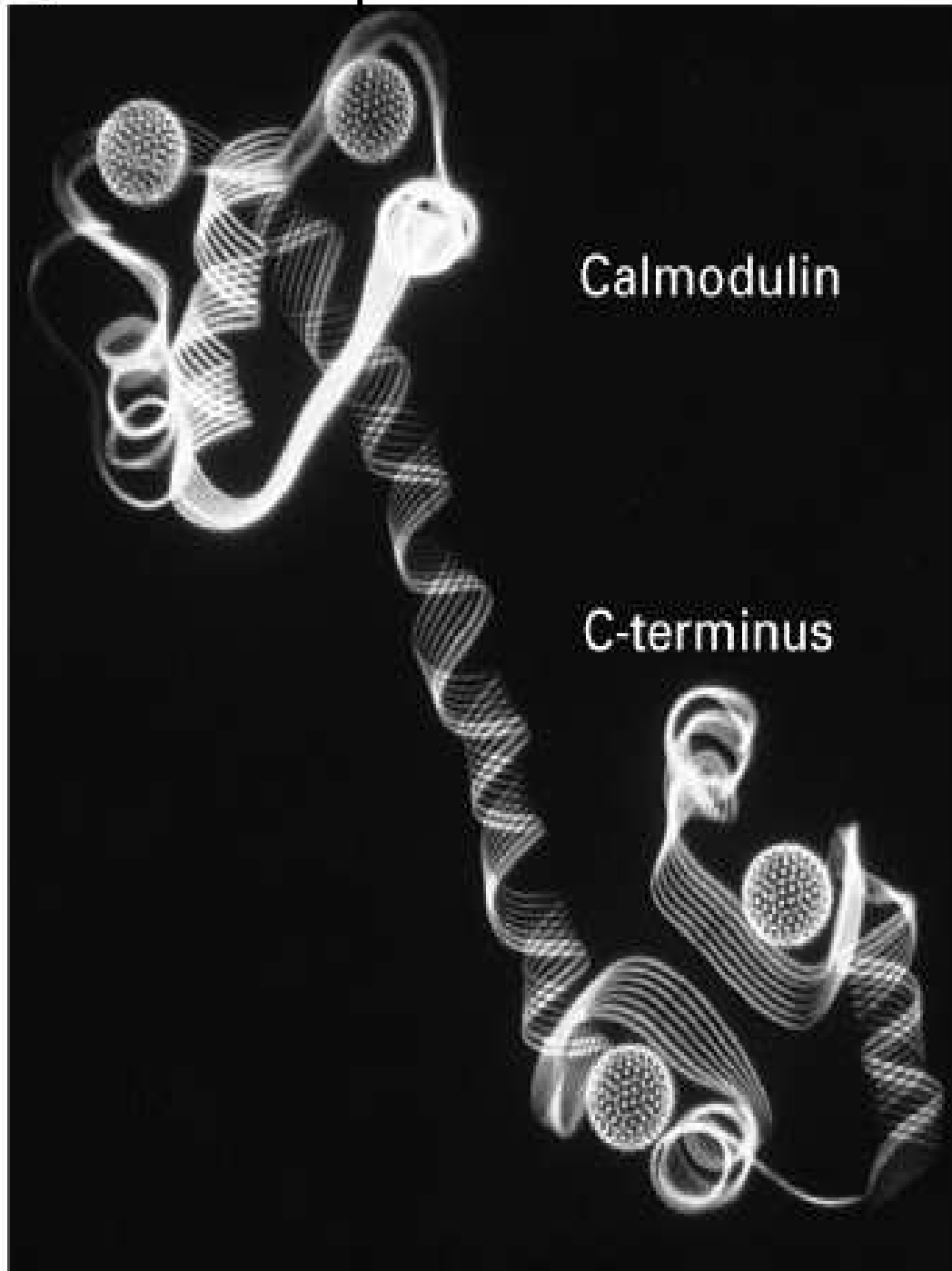
## Cílové proteiny pro signalizaci ionty $\text{Ca}^{2+}$

Troponin C - přítomen v buňkách kosterního svalstva  
- úloha při svalové kontrakci

Kalmodulin - jediný polypeptid se 4 místy pro vazbu  $\text{Ca}^{2+}$   
- zprostředkovává většinu reakcí na  $\text{Ca}^{2+}$



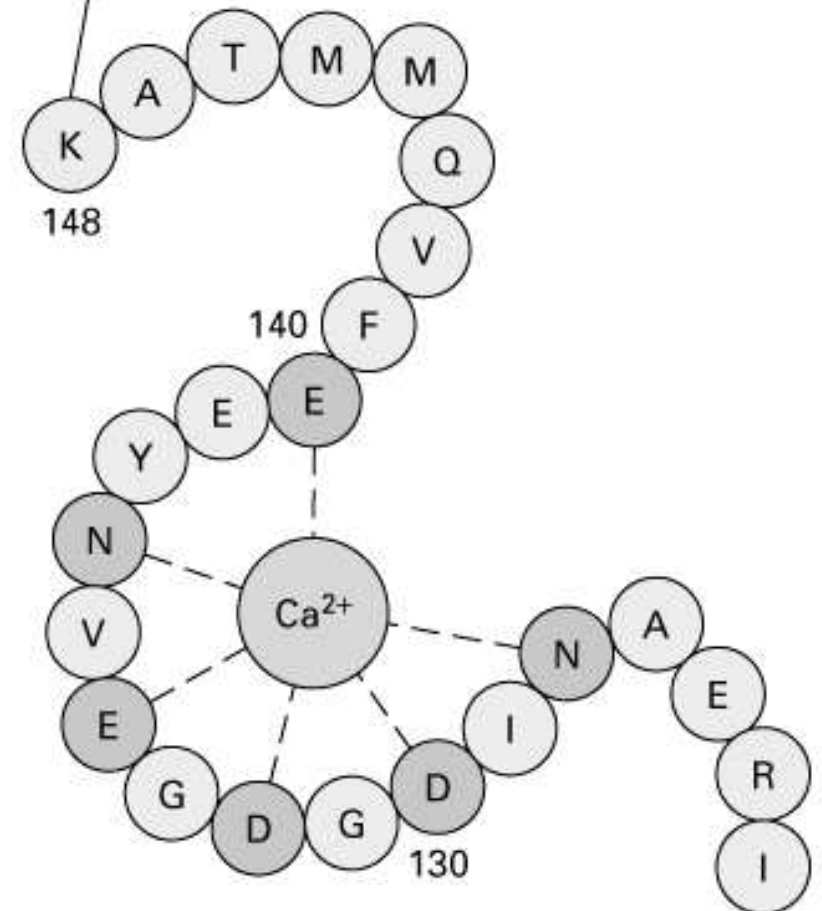
(a) Komplex  $\text{Ca}^{2+}$ -CAM



Sekvence aminokyselin  
jednoho ze 4 vazebných  
míst pro ionty  $\text{Ca}^{2+}$

(b)

C-terminus

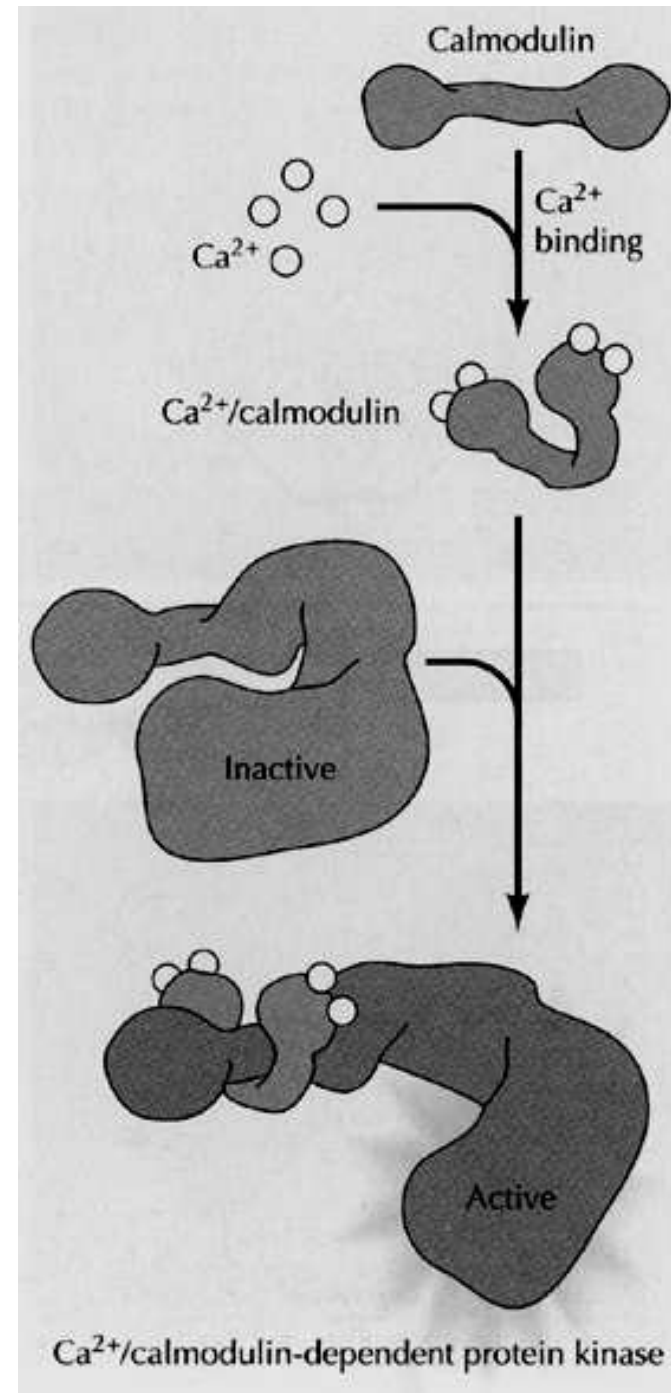


## Kalmodulin - funkce

### Princip:

- vazba  $\text{Ca}^{2+}$  na kalmodulin - zvýšení afinity pro jiné proteiny
  - změna jejich aktivity
- někdy je kalmodulin stálou regulační složkou enzymových komplexů
- důležitou cílovou molekulou řízenou komplexu kalmodulin/ $\text{Ca}^{2+}$  je  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentní protein kináza (**Ca-kináza**), která fosforyluje Ser/Thr cílových proteinů

# Funkce kalmodulinu



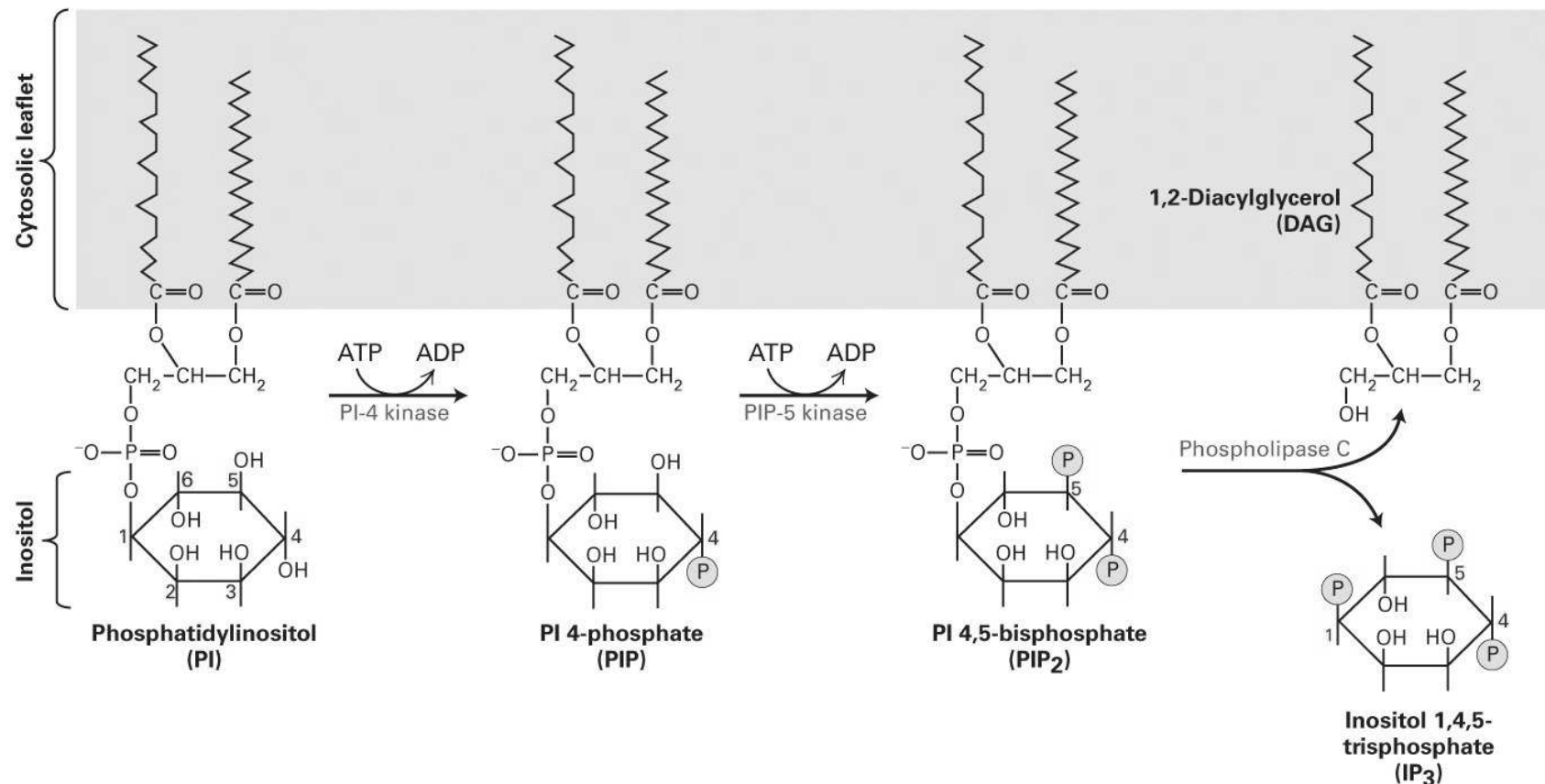
## Signální dráhy řízené cAMP a $\text{Ca}^{2+}$ vzájemně interagují

1. Hladiny cAMP a  $\text{Ca}^{2+}$  se ovlivňují navzájem:
  - např. komplexy  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin mohou vázat a regulovat aktivitu cAMP fosfodiesterázy a adenylát cyklázy
  - kináza A může fosforylovat některé kanálky určující obsah  $\text{Ca}^{2+}$  v cytozolu
2. Ca-kináza může být fosforylována kinázou A
3. Kináza A a kináza Ca často fosforylují aminokyseliny téhož proteinu (např. CREB)



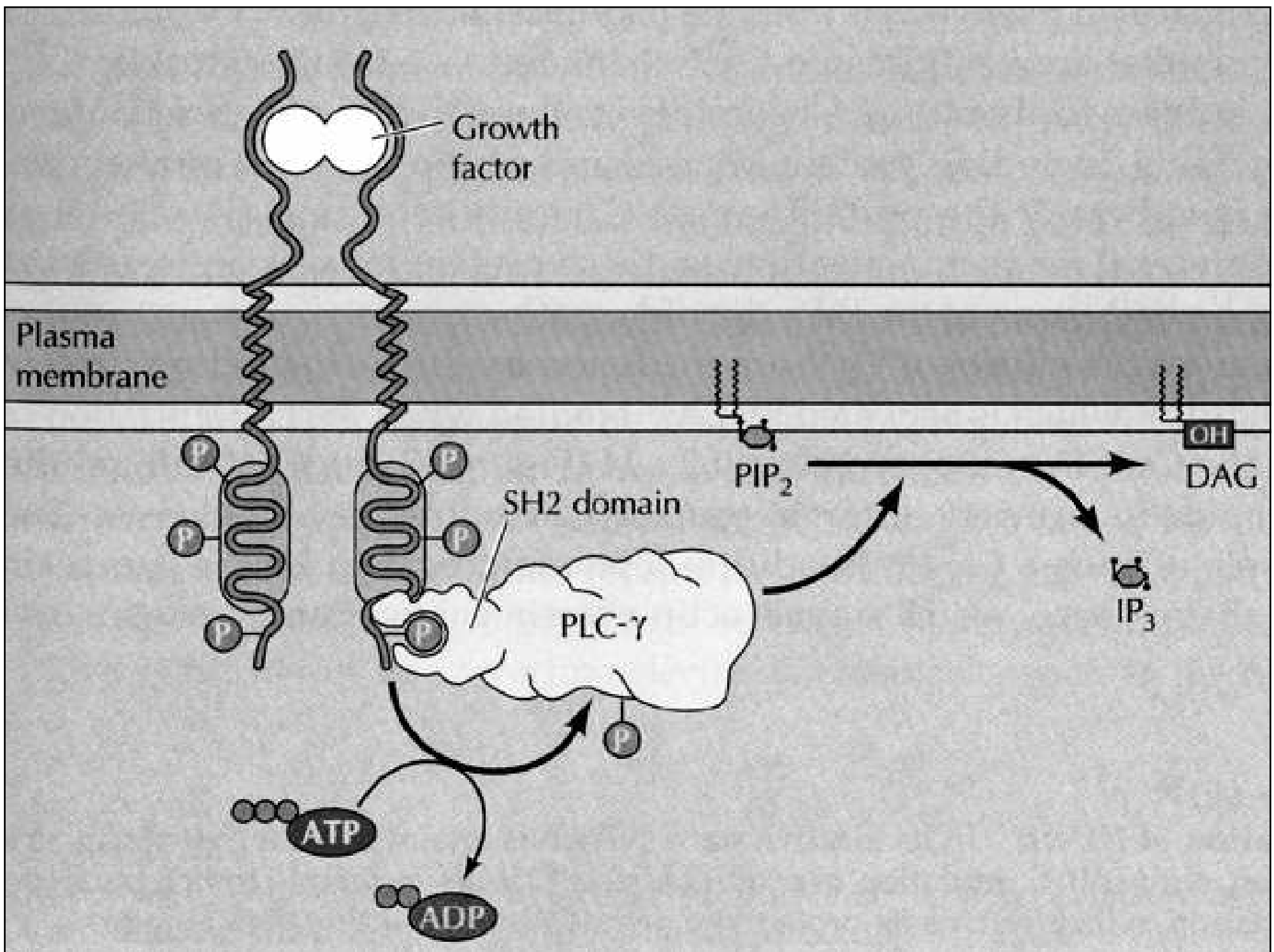
# 4. Dráha inositolových fosfolipidů

Syntéza DAG a IP3 z membránově vázaného fosfatidylinositolu (PIP)



## První část signalizace: plazmatická membrána

- vazba ligandu na povrchový receptor s kinázovou aktivitou
- aktivace fosfolipázy C (dva způsoby):
  - a) interakce aktivovaného receptoru s fosfolipázou  $C\gamma$  prostřednictvím domény SH2
  - b) Interakce aktivovaného receptoru s proteinem G a následná aktivace fosfolipázy  $C\beta$
- štěpení  $PIP_2$  na  $IP_3$  a DAG



Growth factor

Plasma membrane

SH2 domain

PLC-γ

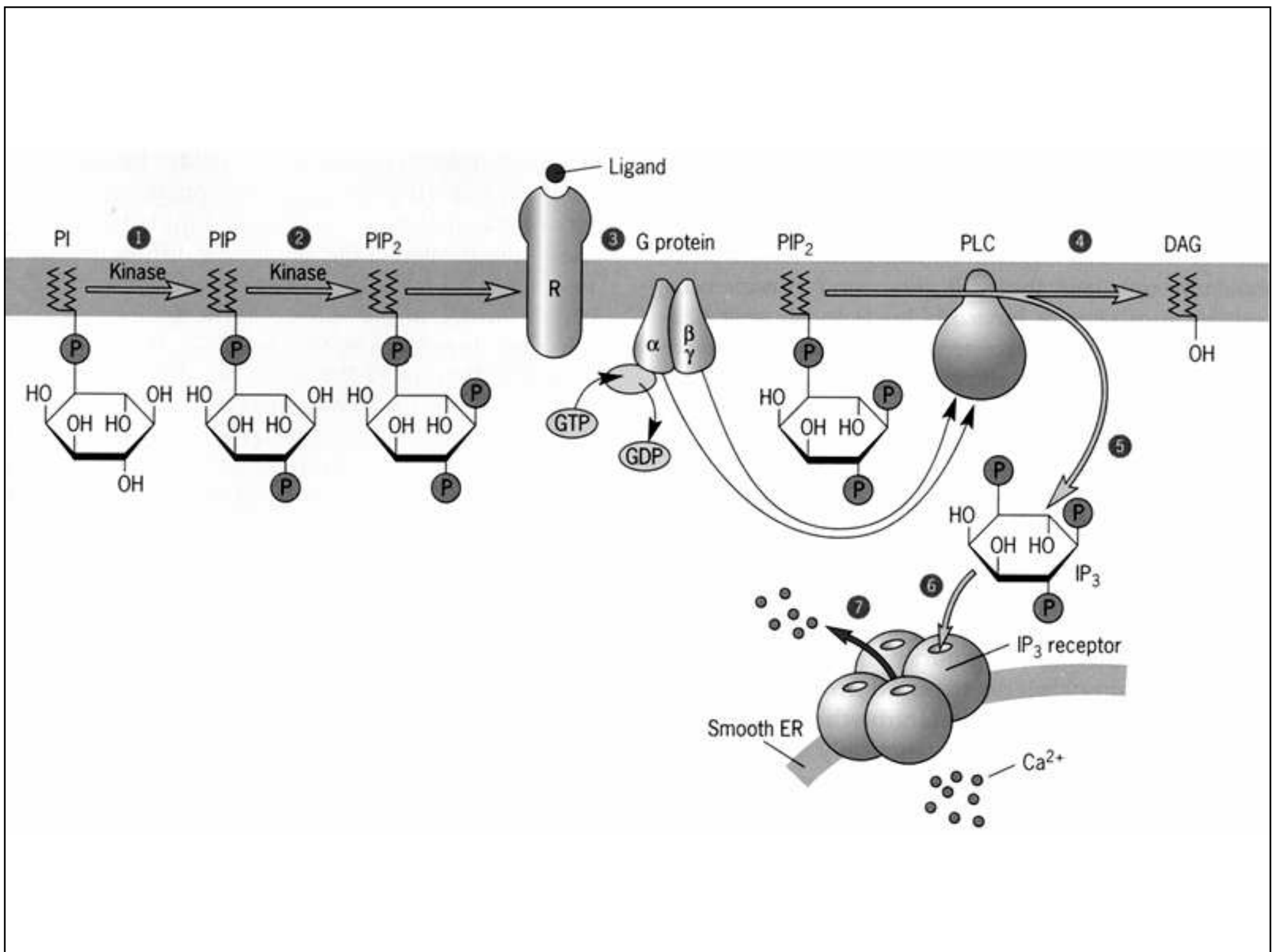
PIP<sub>2</sub>

DAG

IP<sub>3</sub>

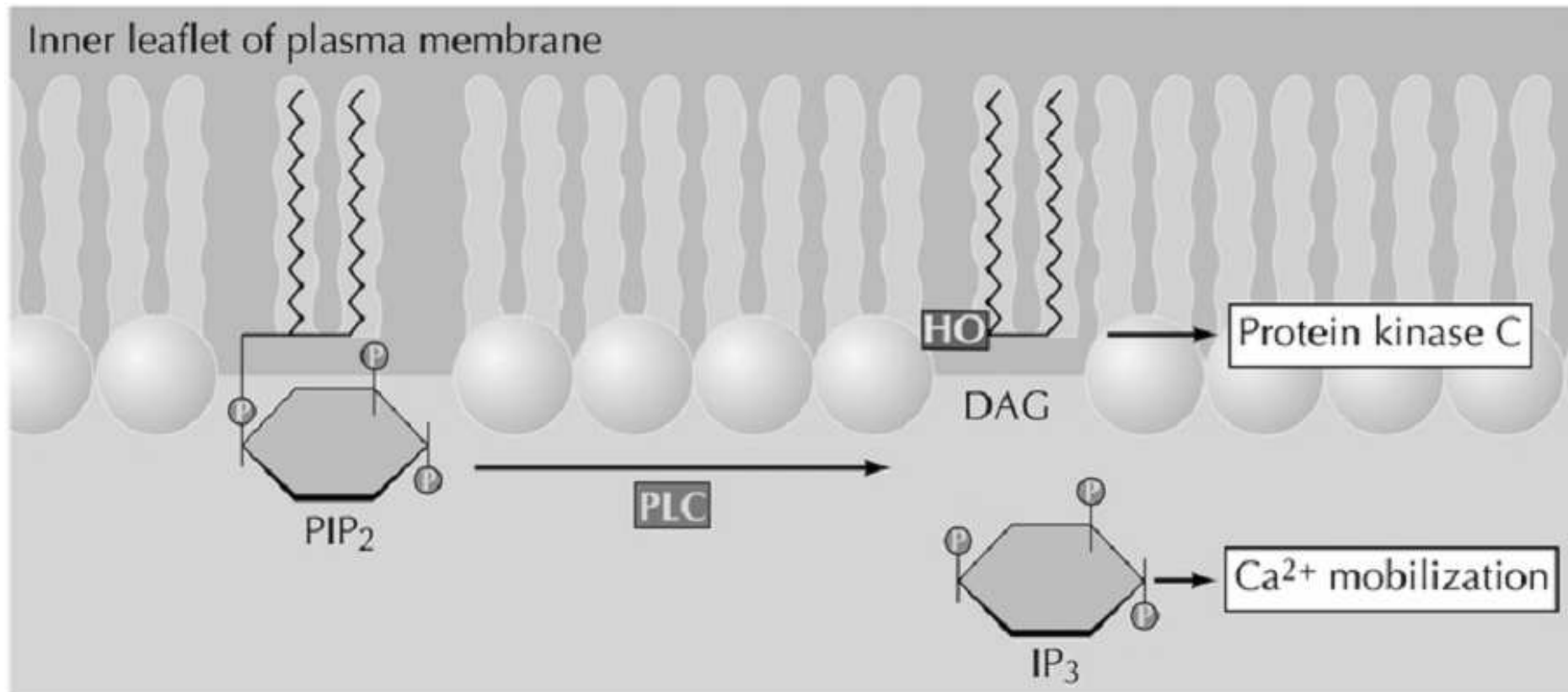
ATP

ADP

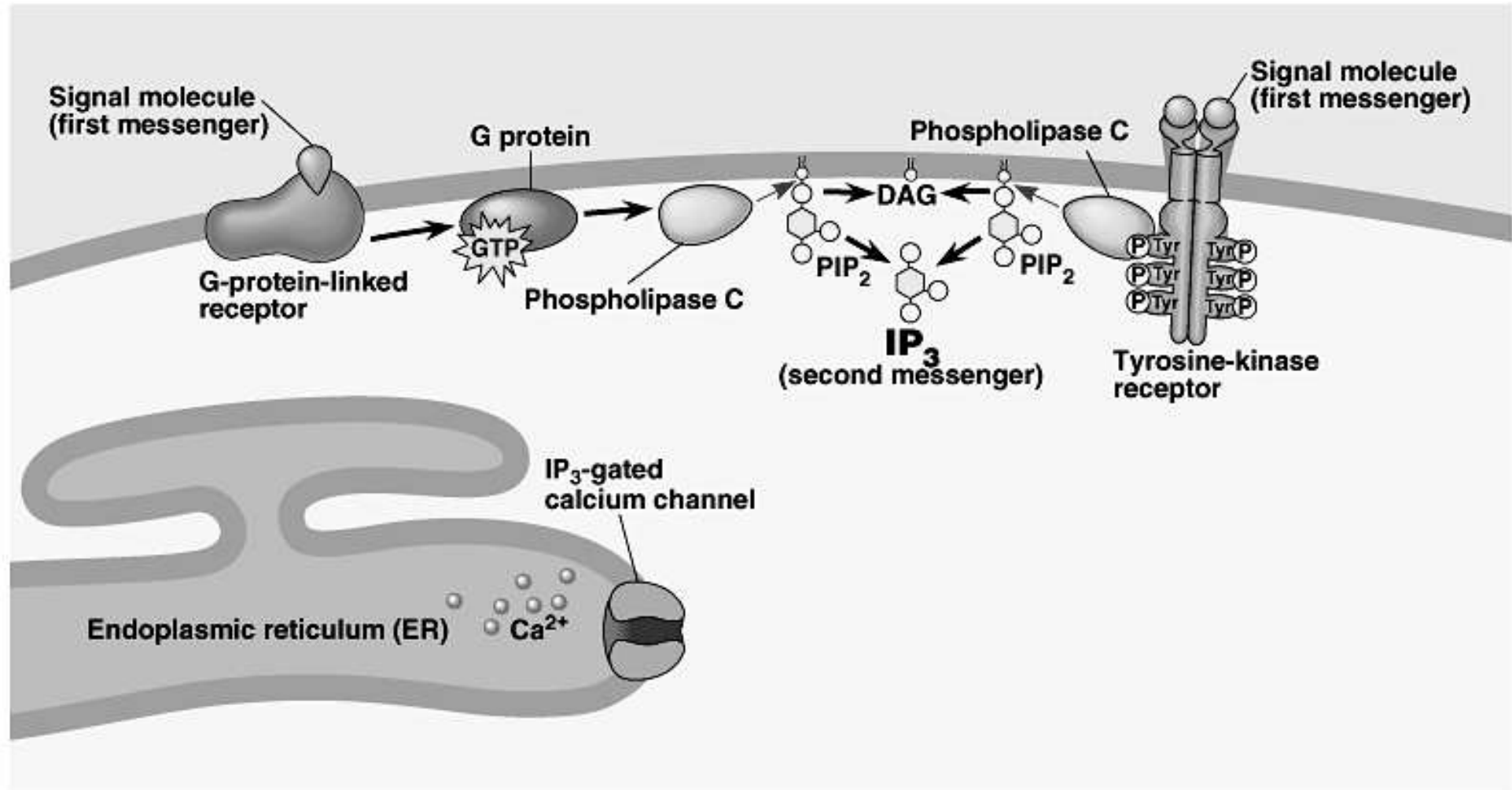


## Druhá část signalizace: plazmatická membrána + cytozol

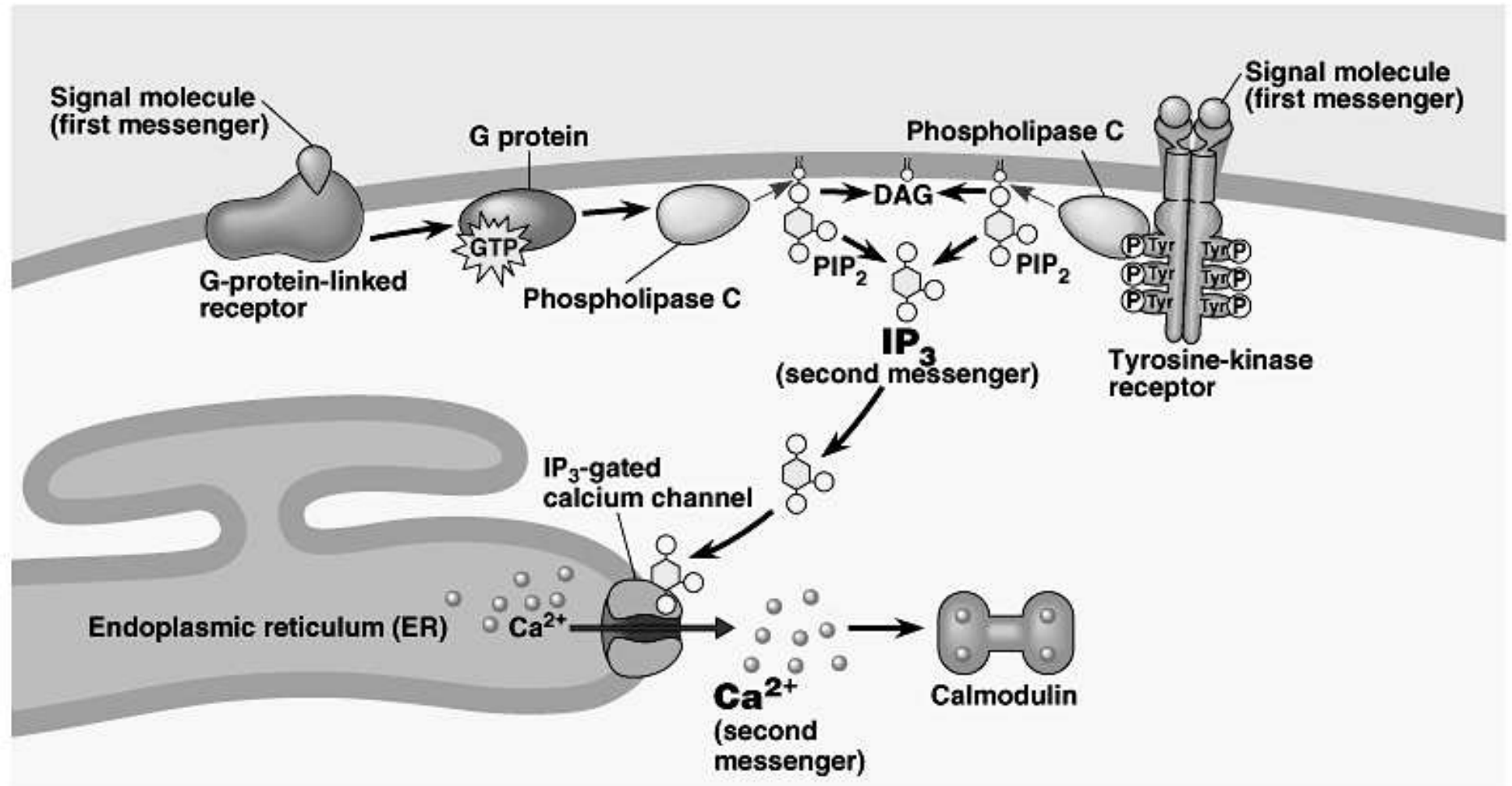
- Inositol 3P zajistí **uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$**  z buněčných zásob
- Diacylglycerol:
  - a) štěpení na **kyselinu arachidonovou** - syntéza prostaglandinů
  - b) aktivace **protein kinázy C**



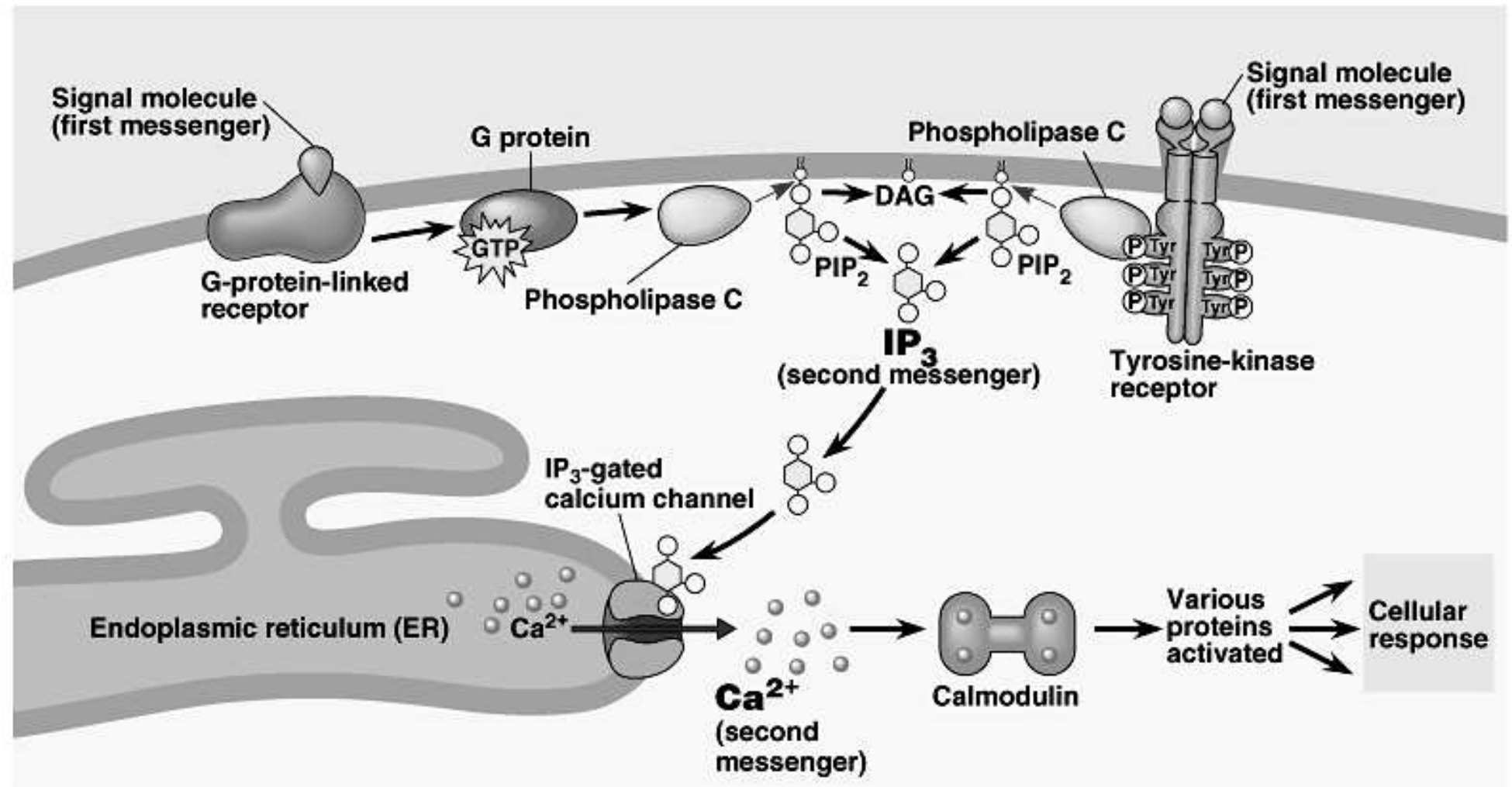
# Tvorba $IP_3$ v blízkosti plazmatické membrány



# Přesun $IP_3$ do cytozolu



# Otevření $\text{Ca}^{2+}$ kanálků





## Protein kináza C

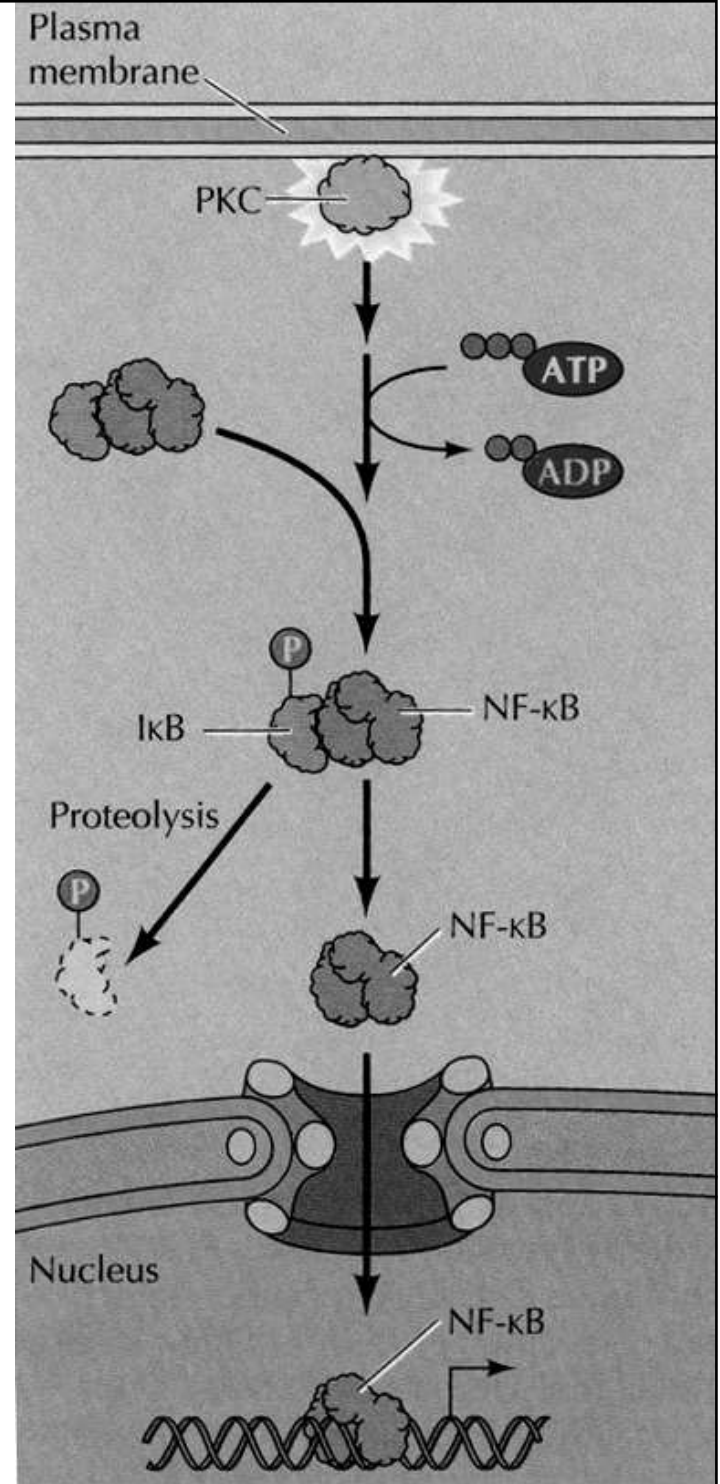
-fosforyluje řadu substrátů, např. protein **NFκB** (zapojen do imunitních reakcí)

### Inaktivní NFκB

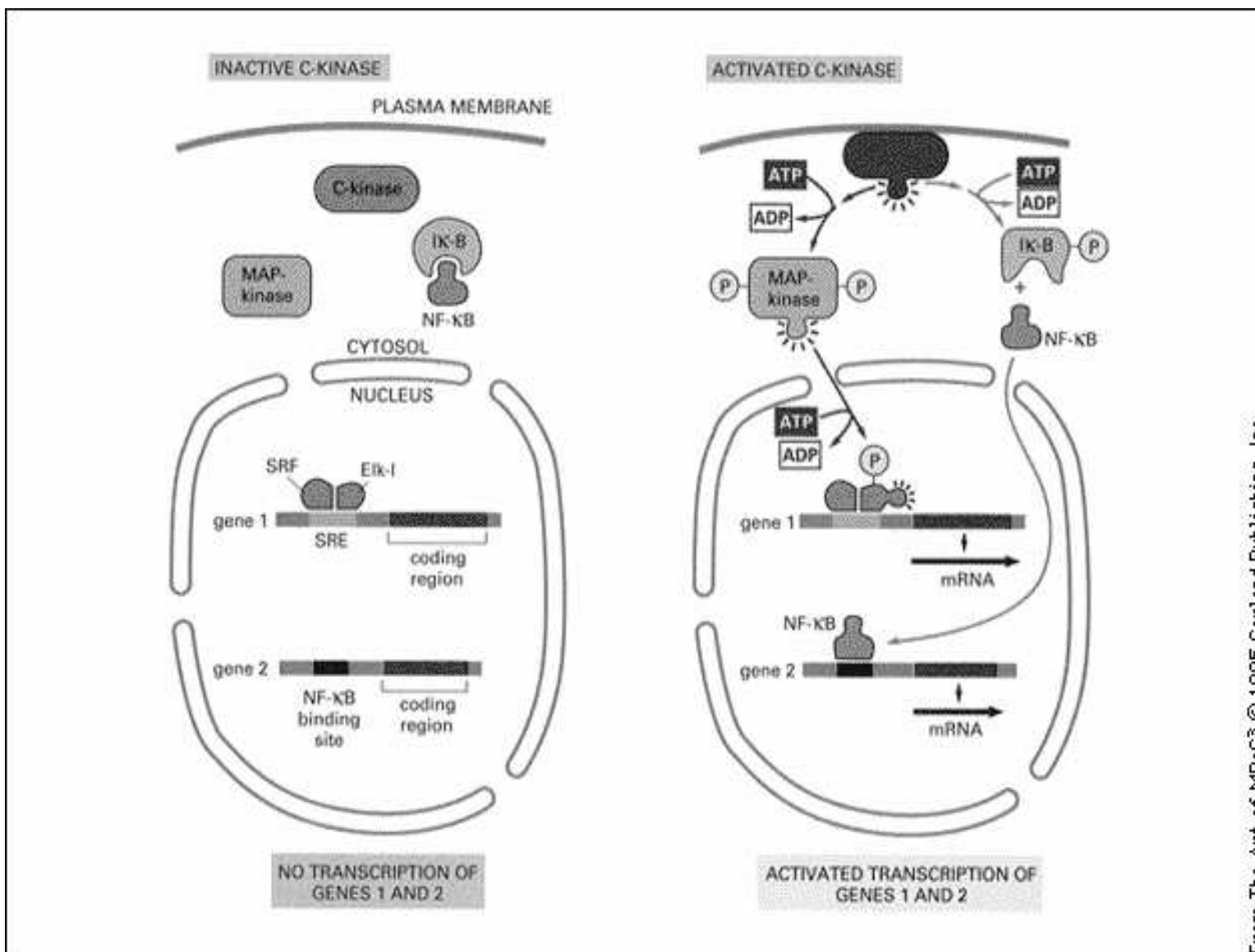
-výskyt v cytoplazmě v komplexu s inhibítorem IκB

### Aktivace NFκB

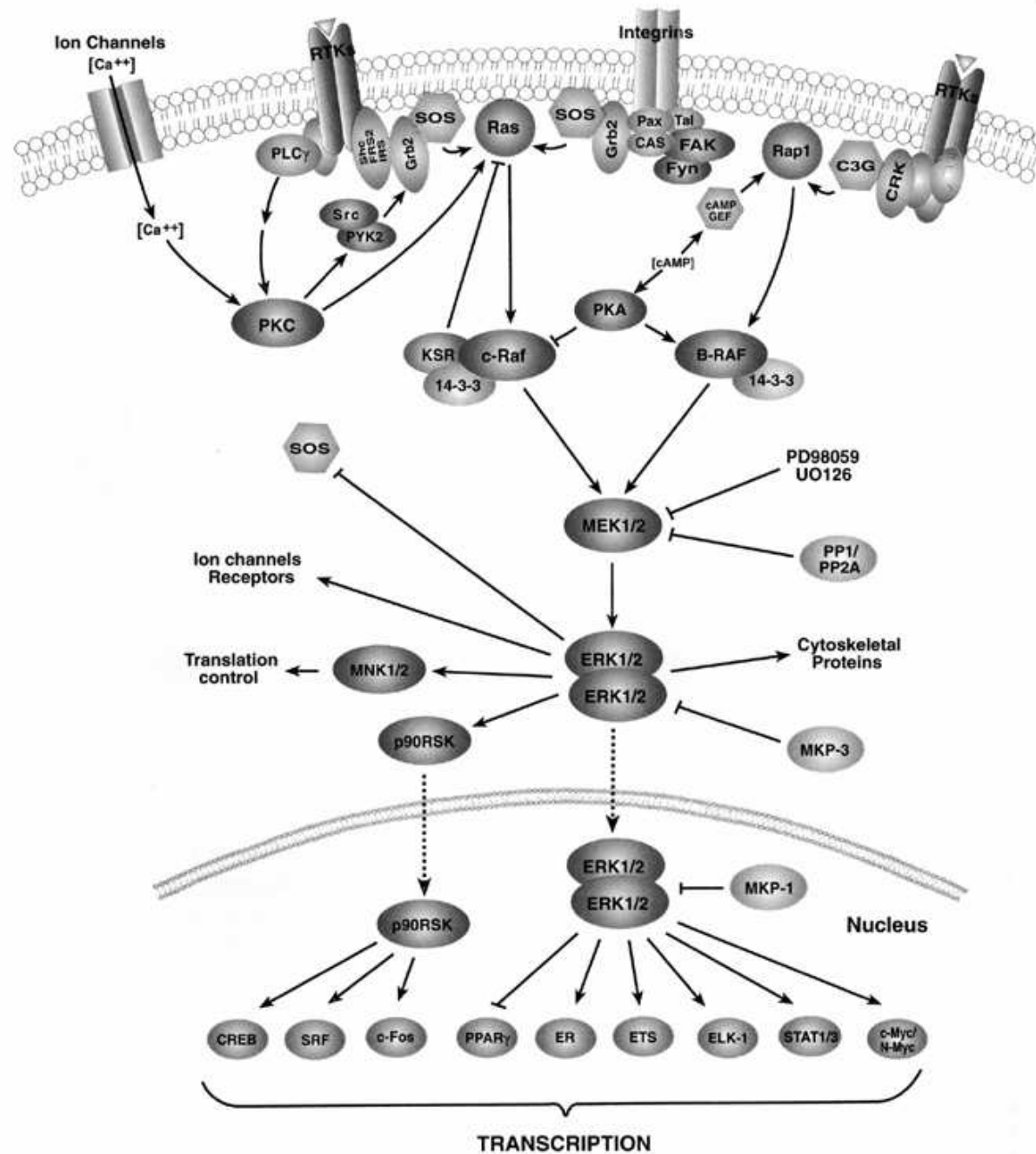
-fosforylace IκB protein kinázou C  
-zvýšení citlivosti IκB k proteázám  
-uvolněný NFκB je translokován do jádra  
-aktivace exprese cílových genů



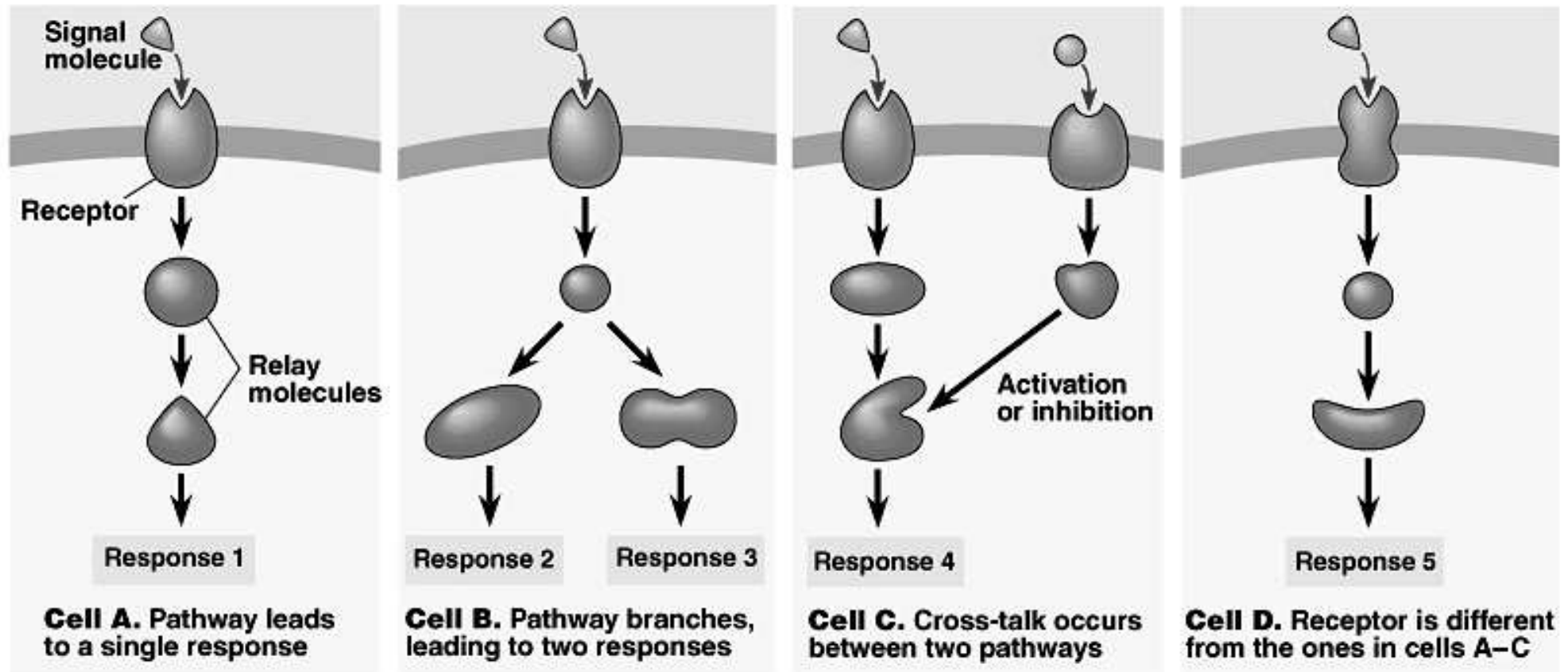
# Protein kináza C je zapojena do reakcí buňky na mitogeny



# MAPK/ERK in Growth and Differentiation

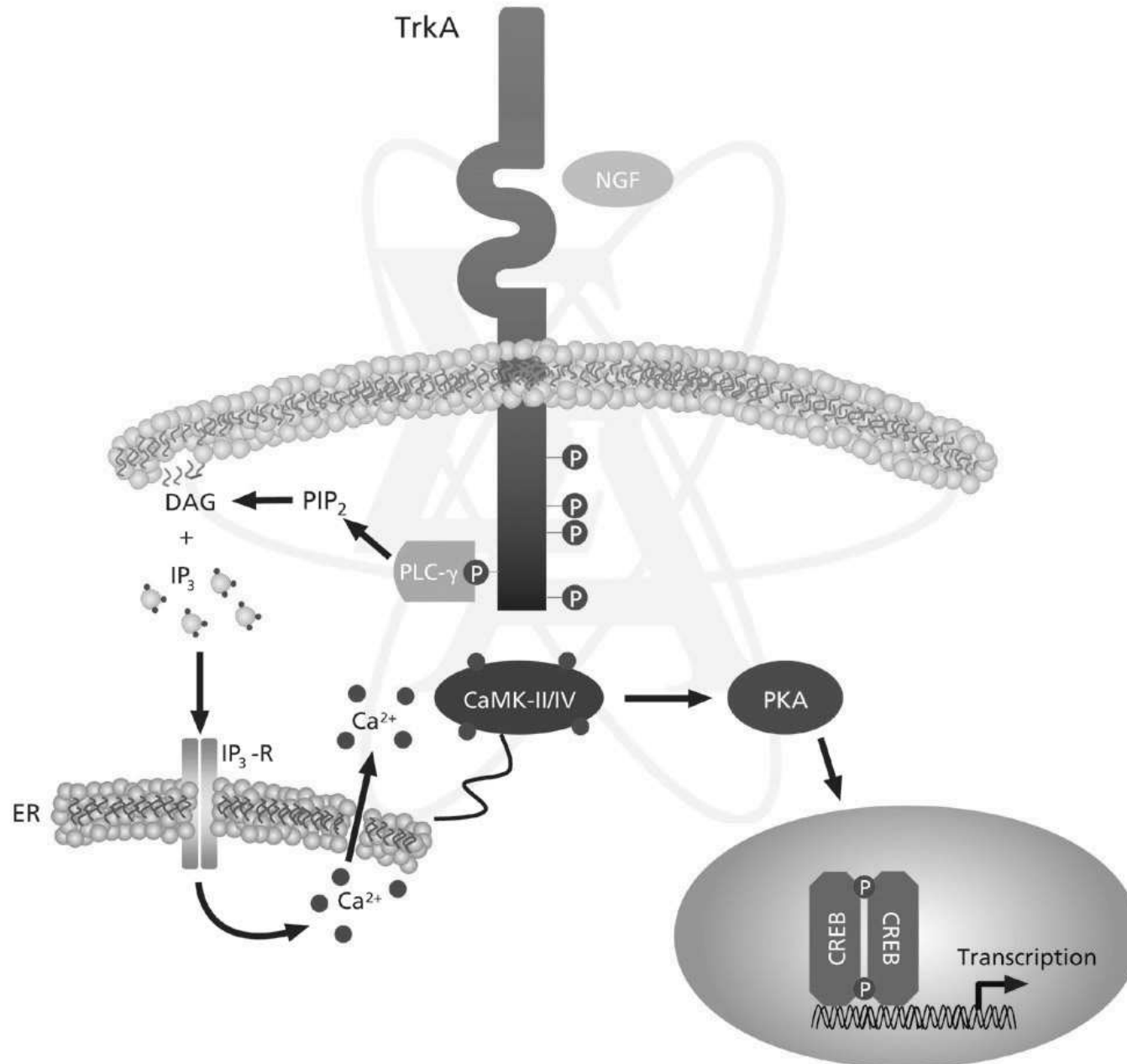


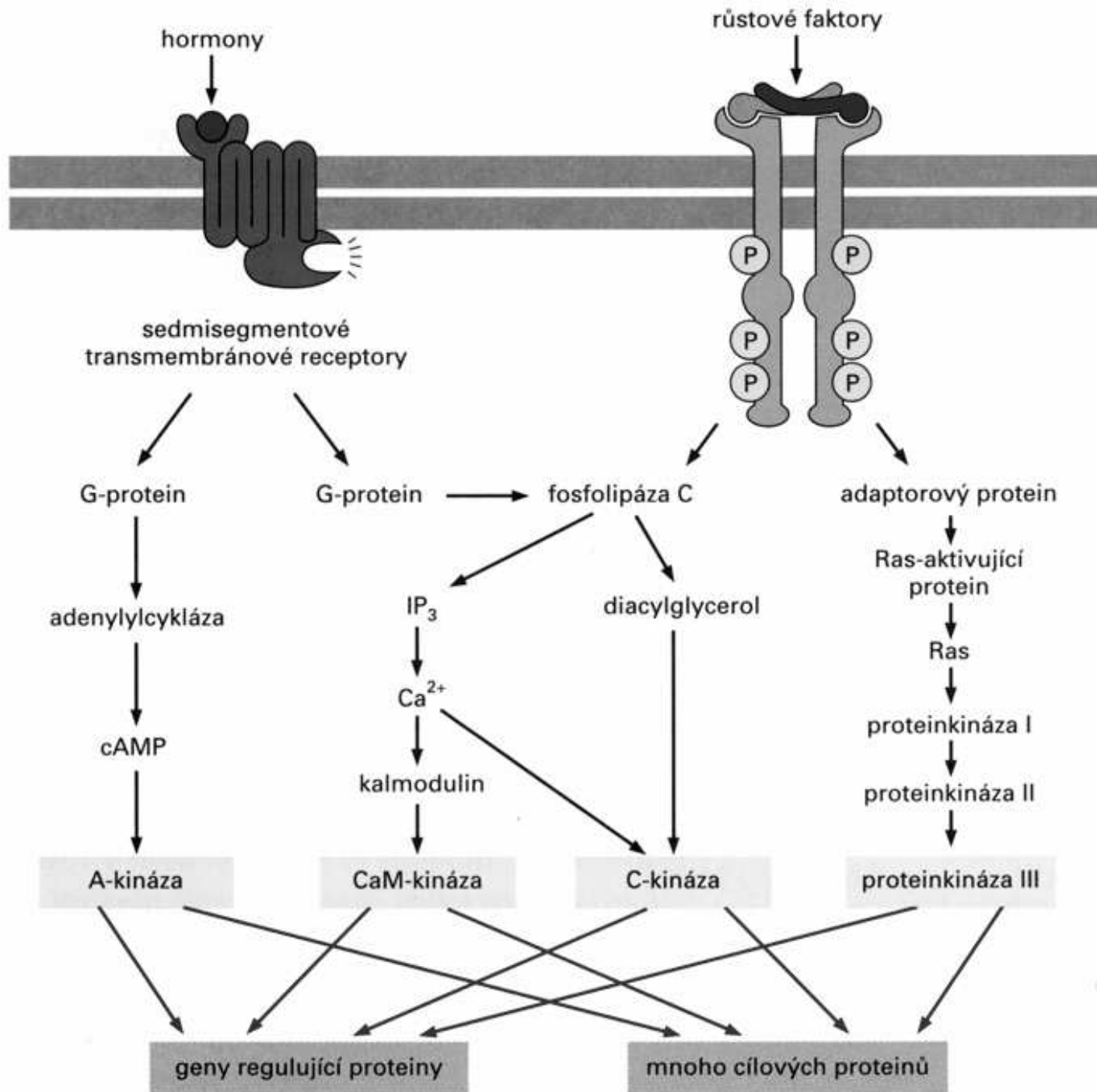
# Specifita signálních drah



# Signaling by Inositol Phospholipids

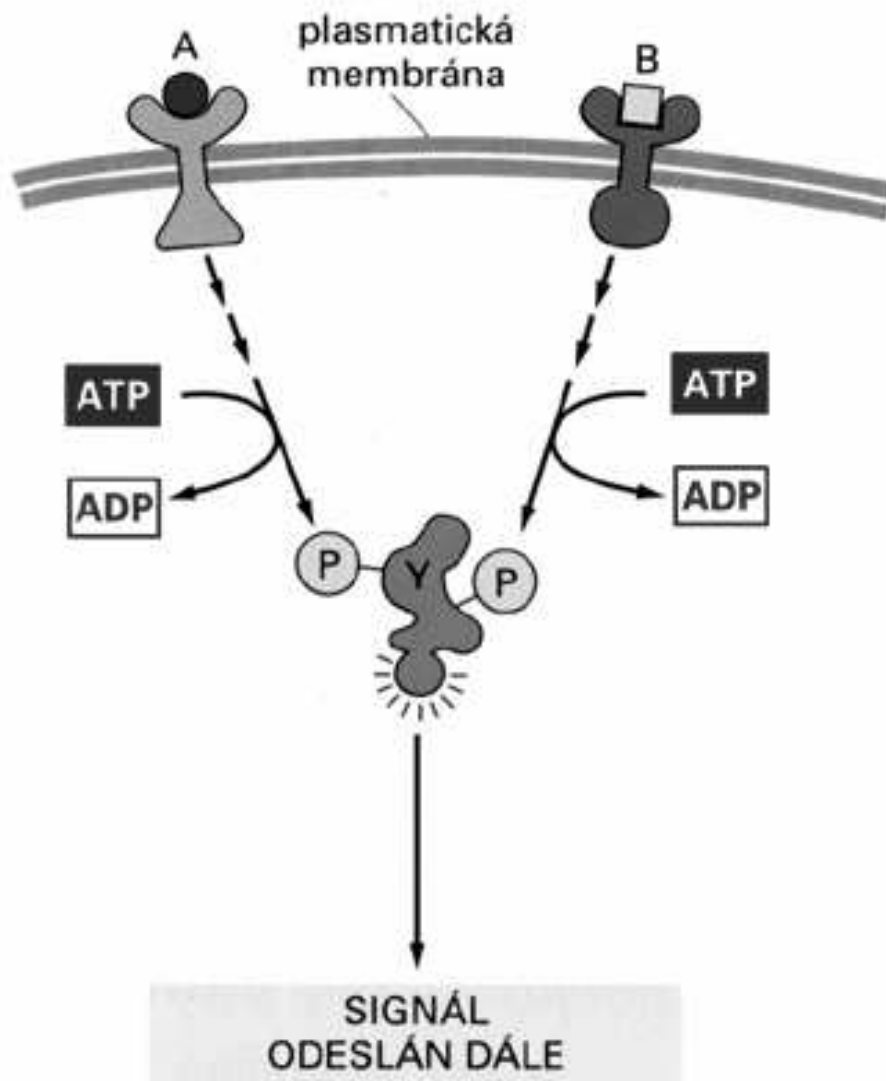
SIGMA-ALDRICH



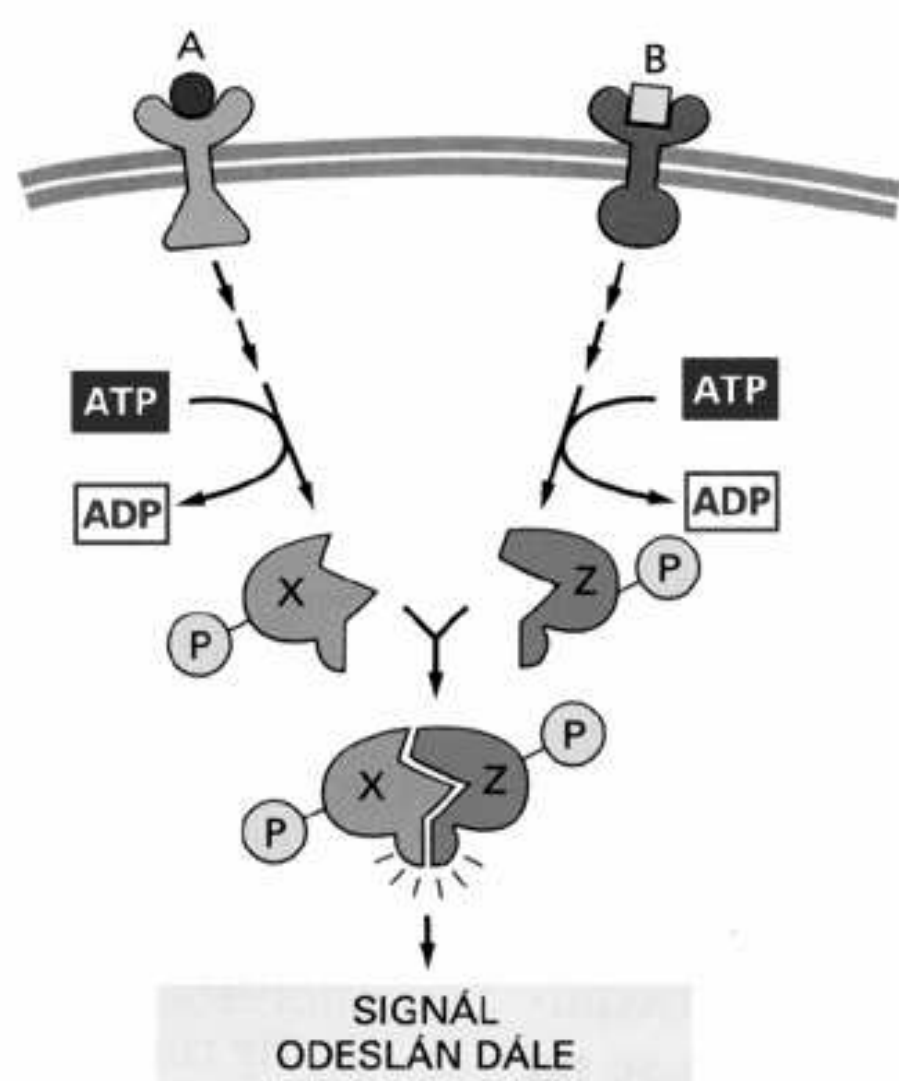


# Mechanismy integrace signálu

(A)



(B)

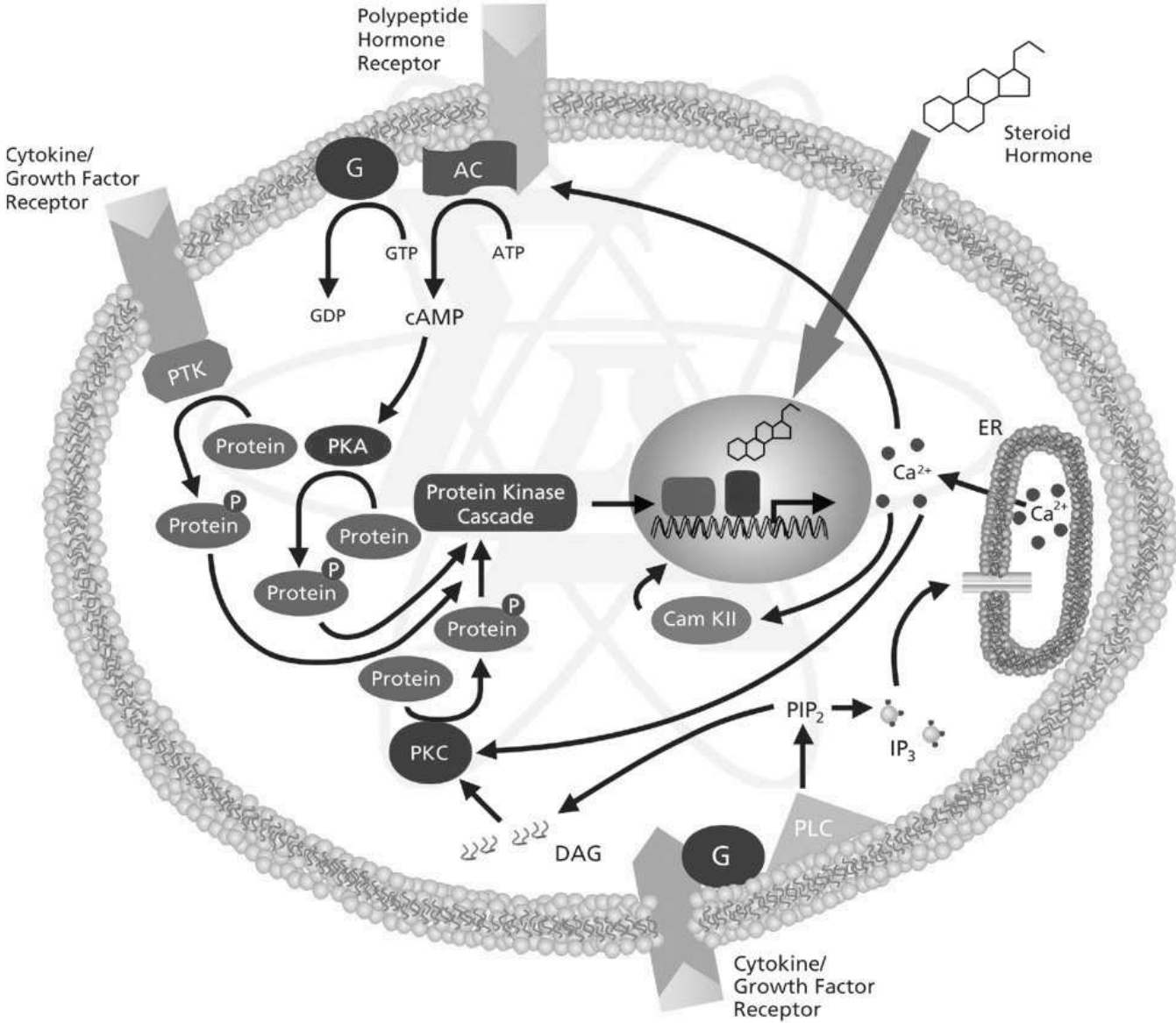


# Integrující proteiny

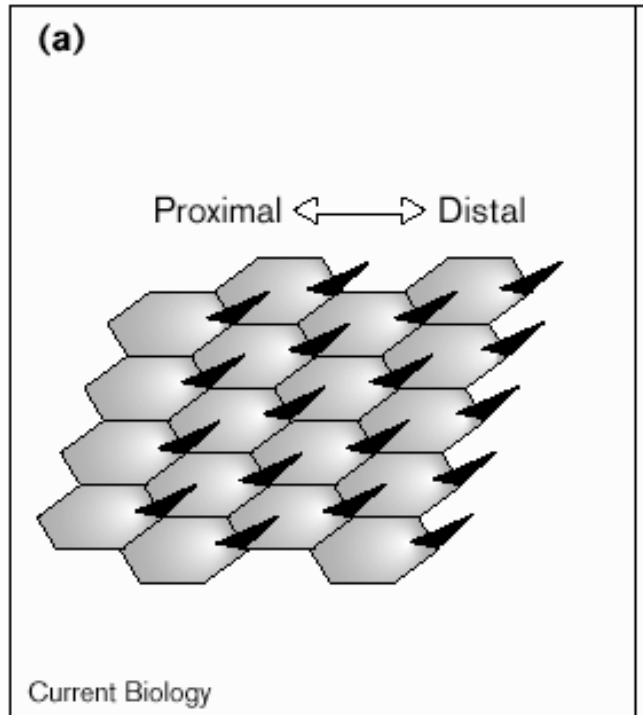
- proteiny, které umožňují spojování informací z různých zdrojů
- mají několik míst, která mohou být fosforylována různými kinázami
- vysílají signál k různým cílům



# Souhrn



## Signály ve vývojových drahách- Wg (Wnt)



Správná polarita křídla Drozofily závisí na signální dráze Wingless. Pro zajištění orientace vlásků vyčnívajících z distální části každé buňky křídla jsou nutné proteiny **Frizzled** and **Dishevelled**. V případě jejich nepřítomnosti je orientace vlásků křídel narušena.

**Donald G. McEwen and Mark Peifer (2000) "Wnt signaling: Moving in a new direction." Current Biology 10: R562–R564**

## Signály ve vývojových drahách Wg (Wnt)

**Wg = wingless (u Drozofily) u obratlovců je ekvivalentem Wnt**

**Wnt je signální protein, který se váže na transmembránový receptor (sedminásobné vinutí membránou), který je kódován genem frizzled**

**Vazba Wnt na frizzled aktivuje dishevelled, který je součástí kaskády: inhibuje kinázu glykogen syntázy GSK, která fosforyluje  $\beta$ -katenin. Fosforylovaný  $\beta$ -katenin podléhá proteolýze.**

**Defosforylovaný  $\beta$ -katenin přechází do jádra a zajistí transkripci Wnt-specifických genů.**

(B) WITH Wnt SIGNAL

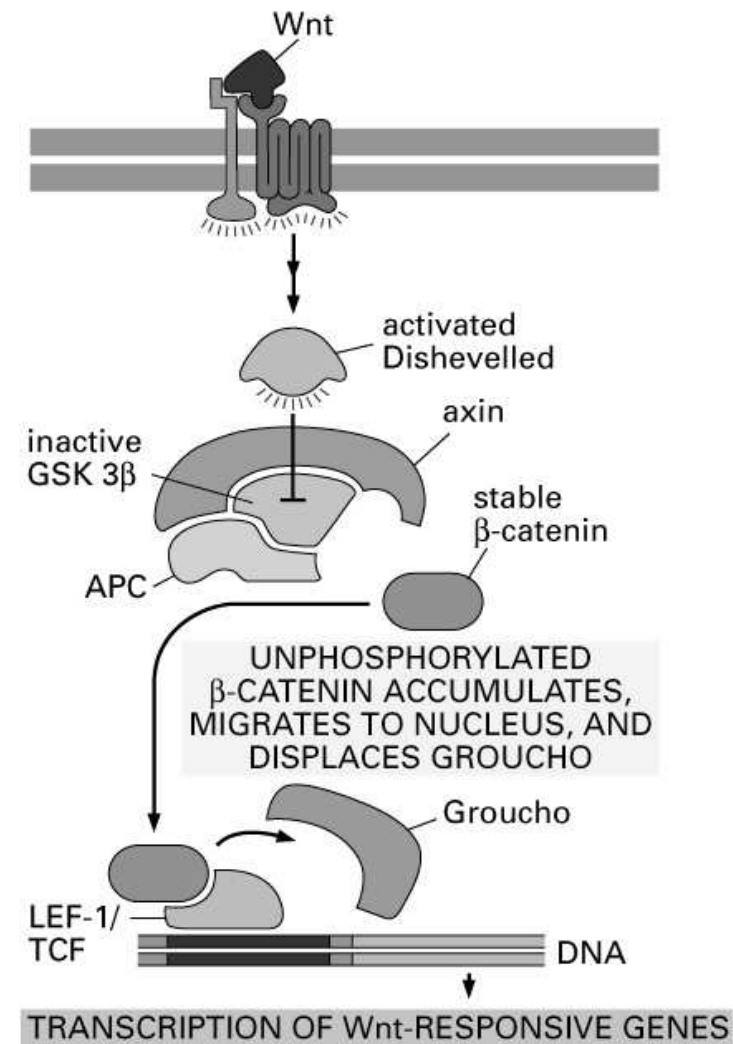
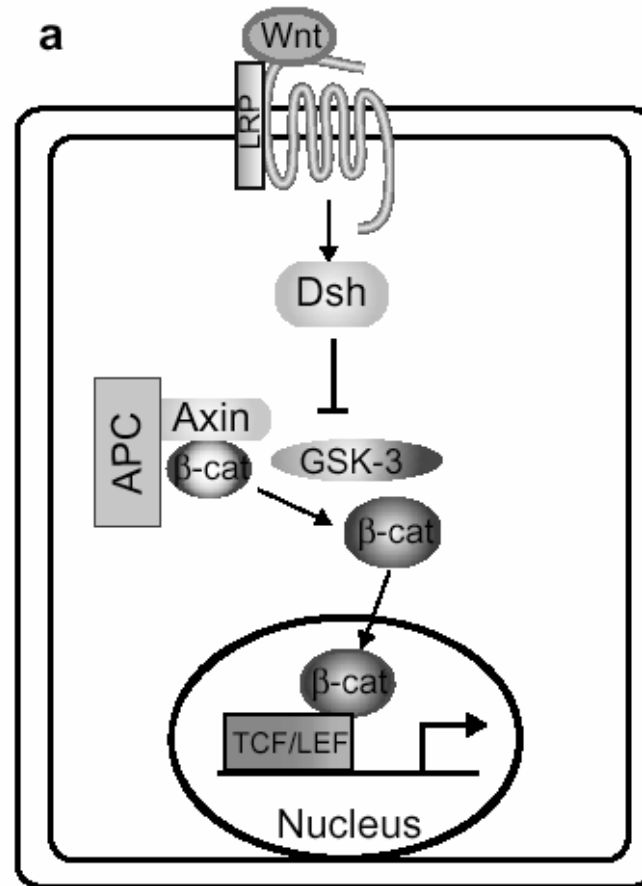


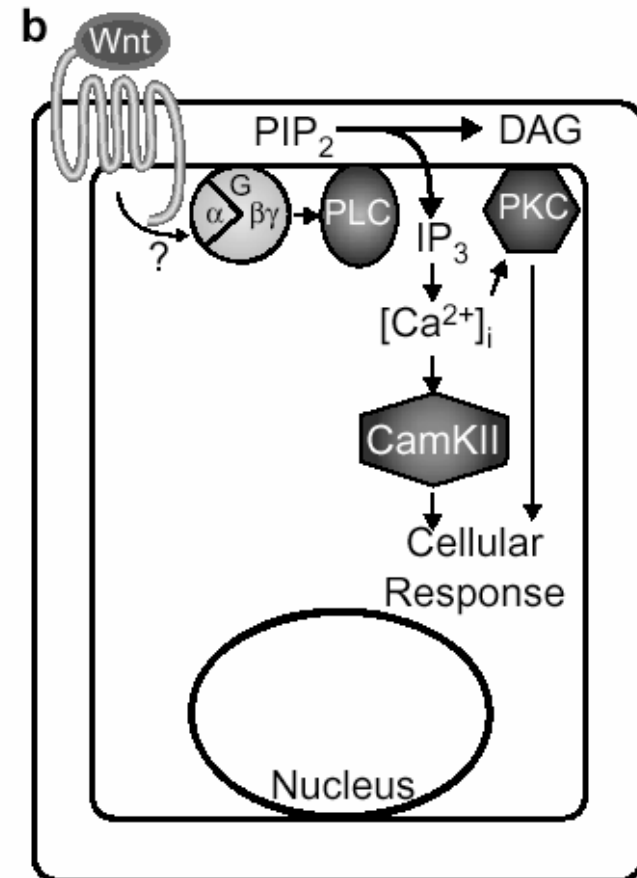
Figure 15-72 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Signály ve vývojových drahách Wg (Wnt)

Wnt je  
zapojen do  
signalizace  
ionty  $Ca^{++}$ :



Canonical Wnt/ $\beta$ -cat pathway



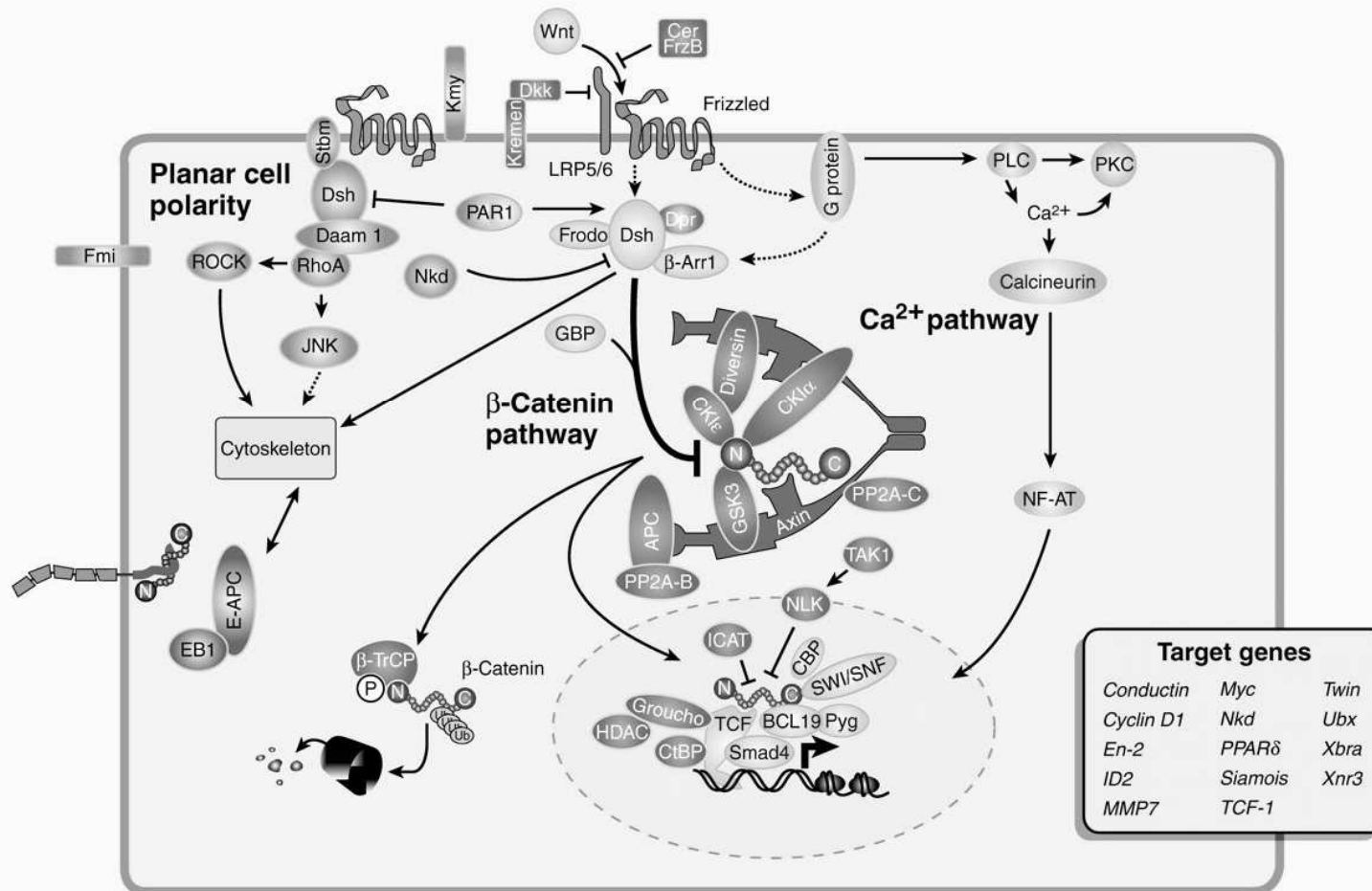
Non-canonical Wnt/  
Calcium pathway

# Signály ve vývojových drahách Wg (Wnt)

Journal of  
Cell Science

## A Wnt Signalling Update

Joerg Huelsken and Juergen Behrens



## Signalizace ve vývojových drahách Wg (Wnt)

Signalizace  
Wnt je  
důležitý pro  
gastrulaci

**Silberblick/Wnt11 mediates  
convergent extension  
movements during zebrafish  
gastrulation**

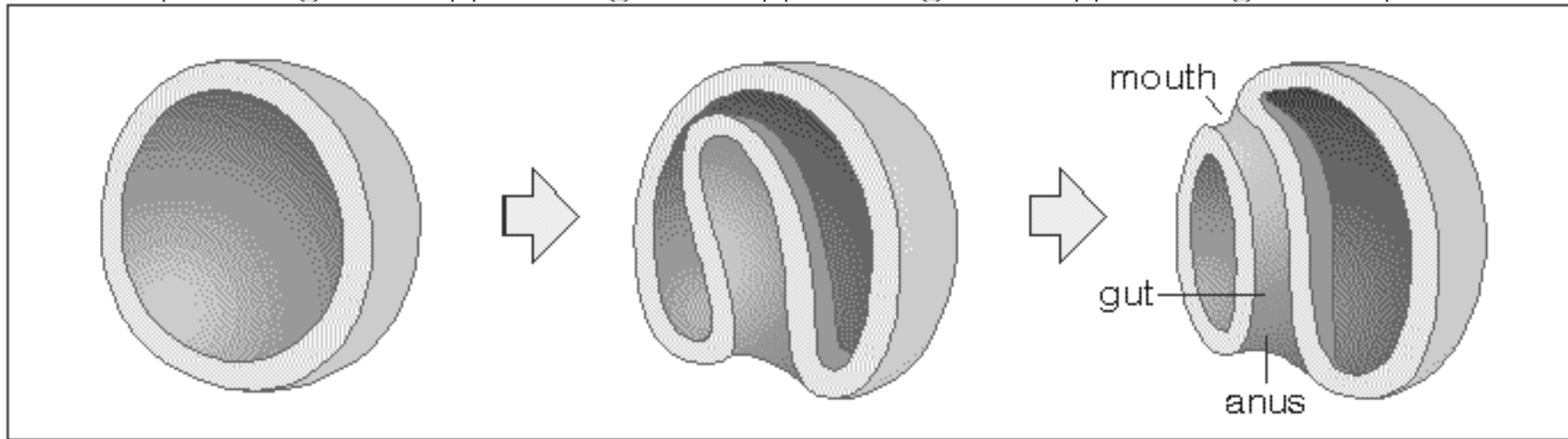
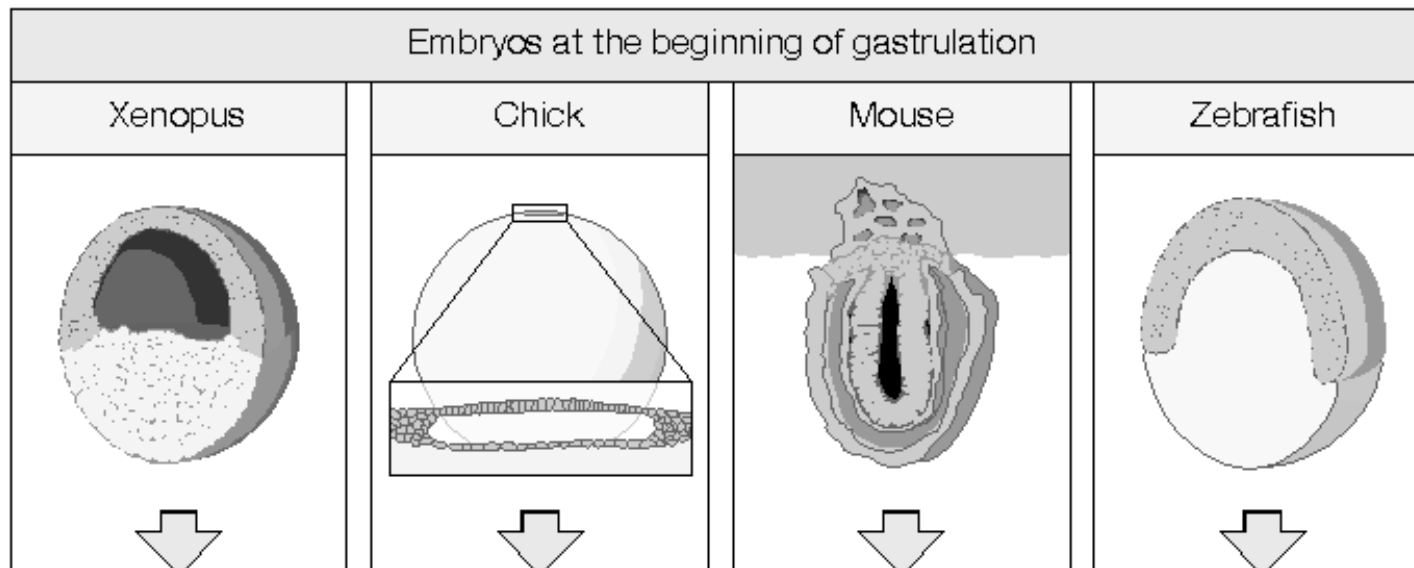
Carl-Phipp Heisenberg<sup>\*†</sup>, Masazumi Tada<sup>†‡</sup>, Gerd-Jörg Rauch<sup>§</sup>,  
Leonor Saúde<sup>‡</sup>, Miguel L. Concha<sup>\*</sup>, Robert Geisler<sup>§</sup>, Derek L. Stemple<sup>‡</sup>,  
James C. Smith<sup>‡</sup> & Stephen W. Wilson<sup>\*</sup>

Nature 405: 76-81

**Dishevelled controls cell polarity  
during *Xenopus* gastrulation**

John B. Wallingford<sup>\*</sup>, Brian A. Rowning<sup>†</sup>, Kevin M. Vogeli<sup>\*</sup>,  
Ute Rothbächer<sup>‡§</sup>, Scott E. Fraser<sup>‡</sup> & Richard M. Harland<sup>\*</sup>

Nature 405: 81-85.



**“Nejdůležitější událostí ve vašem životě není narození ani smrt ani svatba.**

**Je to gastrulace.” (Lewis Wolpert)**

# Utlumení signálních drah

- snížení hladiny produkovaných hormonů
- nitrobuněčné negativní regulátory signálních drah (Ski, SOCS)
- defosforylace složek signálních drah fosfatázami
- odstranění receptorů z buněčného povrchu endocytózou
- sekrece proteinů, které vychytávají hormony



# Endocytóza povrchových receptorů je ligand-dependentní

## EGF

- za nepřítomnosti EGF jsou receptory pohlcovány s nízkou frekvencí
- vazba EGF na receptor indukuje konformační změnu v cytozolické části receptoru
- tím se otevře sekvenční motiv pro dopravu receptoru do klatrinových váčků, následuje jeho pohlcení, transport do lysozomů a degradace

Některé receptory (LDLR) mohou být po endocytóze opět dopraveny na buněčný povrch (recyklace).

## Sekrece proteinů, které snižují koncentraci hormonů

- tyto proteiny obsahují doménu pro vazbu hormonu, ale nejsou schopny aktivovat nitrobuňčnou signalizaci

Např. kontrola resorbce kostí:

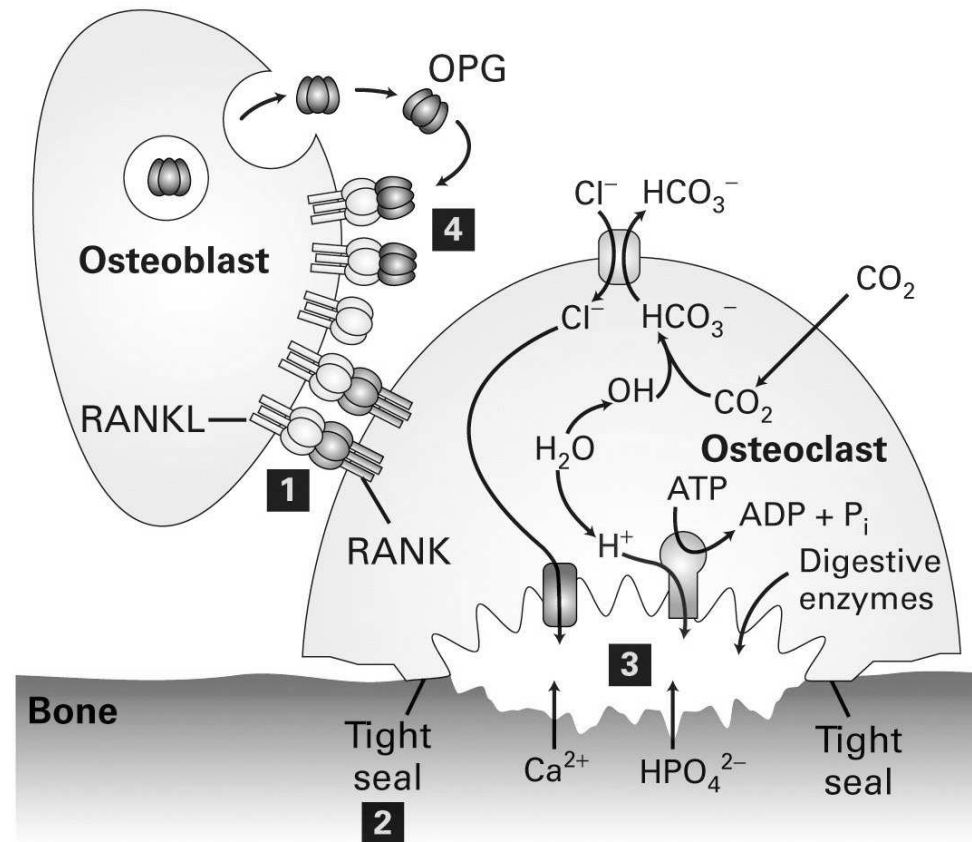
- vychytávací protein osteoprotegerin (OPG) je sekretován osteoblasty, váže RANKL a tak brání jeho interakci s osteoklasty: inhibice resorbce kosti
- myši postrádající gen OPG mají slabé porézní kosti v důsledku přílišné kostní resorbce

## Tvorba kostí u savců je dynamický proces

- rovnováha tvorby a rozkladu kostní tkáně

**Osteoklasty** zodpovídají za resorbci kosti: varianta makrofágů schopných těsné adheze na povrch kosti, do uzavřeného prostoru vylučují směs HCl a proteáz - rozpuštění anorganických složek kosti, degradace kostních proteinů

**Osteoblasty** zodpovídají za tvorbu kosti: exprimují signální protein RANKL (člen rodiny  $TNF\alpha$ , ligand pro povrchový receptor RANK osteoklastů) - vazba RANKL na RANK aktivuje buněčné signální dráhy, včetně dráhy  $NF\kappa B$  - indukce diferenciacce a změny tvaru osteoklastů pro zajištění těsné vazby na kost, stimulace resorbce



1. Interakce RANKL-RANK: reorganizace cytoskeletu osteoklastu, tvorba těsných vazeb s kostí
2. Aktivovaný osteoklast sekretuje látky resorbující kost
3. Osteoblasty mohou utlumit resorbci kosti sekrecí osteoprotegerinu, který brání vazbě RANKL na RANK

# Osteopetróza versus osteoporóza

Poruchy tvorby kostí u člověka

**Osteopetróza:** vzácné dědičné onemocnění typické zvýšenou densitou kostní tkáně

- důsledek abnormálně nízké resorbce kosti

**Osteoporóza:** metabolická porucha typická nedostatečnou densitou kostní tkáně (zvýšená křehkost kostí)

- důsledek přílišné resorbce kosti