

Buněčné signalizace



Jan Šmarda
Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta MU

Přednáška kurzu Molekulární biologie eukaryot
24.10. 2019

Osnova

- molekulární principy buněčné signalizace
- typy signálních molekul
- typy receptorů
- důsledky aktivace receptorů – přenos signálu vnitřním prostředím buňky
- signální dráhy zprostředkované proteiny G
- signální dráhy aktivované růstovými faktory
- signální dráhy řízené cytokiny

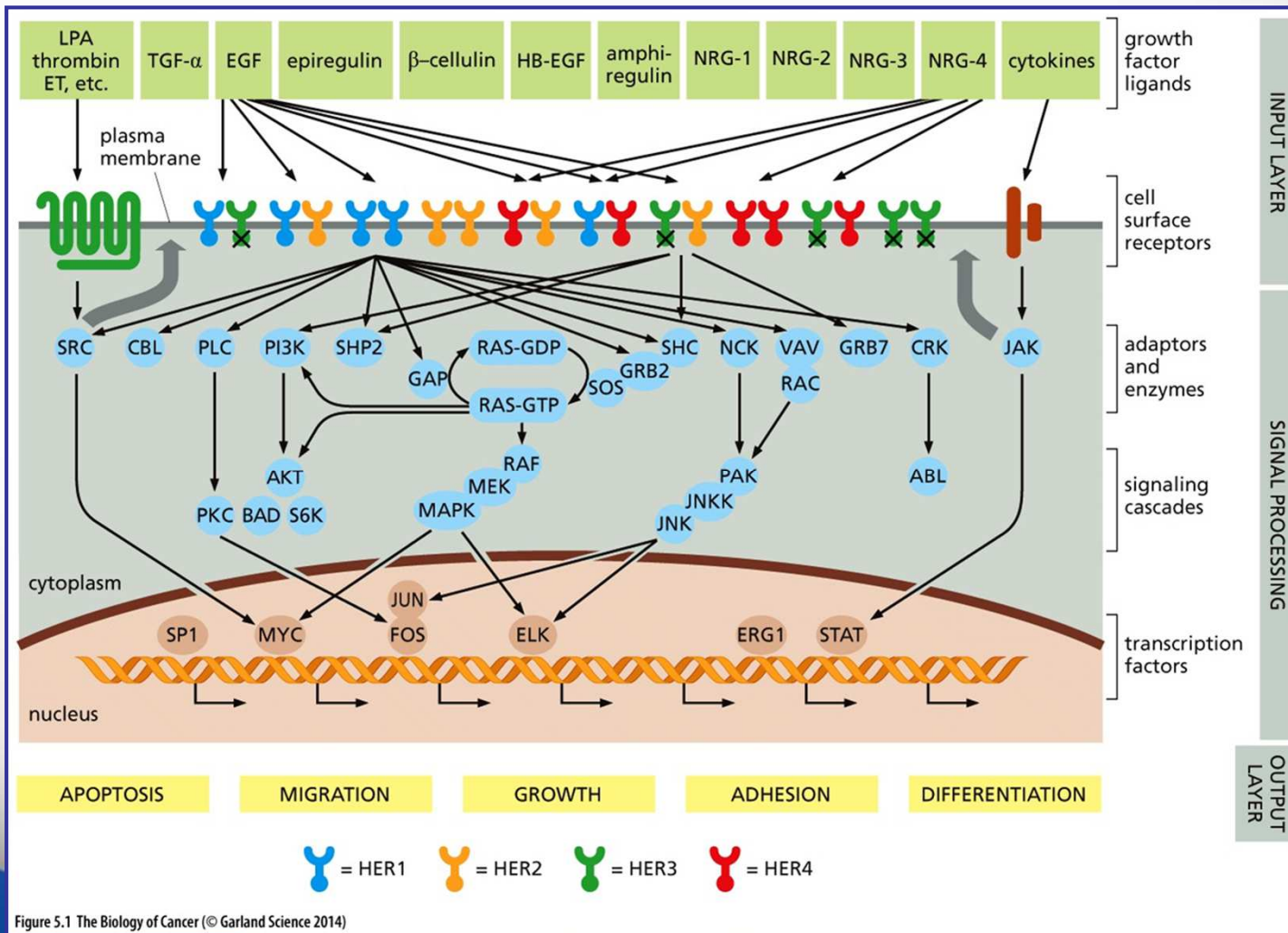


Proč komunikovat?

- podmínka řádné výstavby tkání a orgánů
- reakce na podněty změnou metabolismu, růstu, diferenciací, pohybu, životaschopnosti, sekrecí proteinů apod.

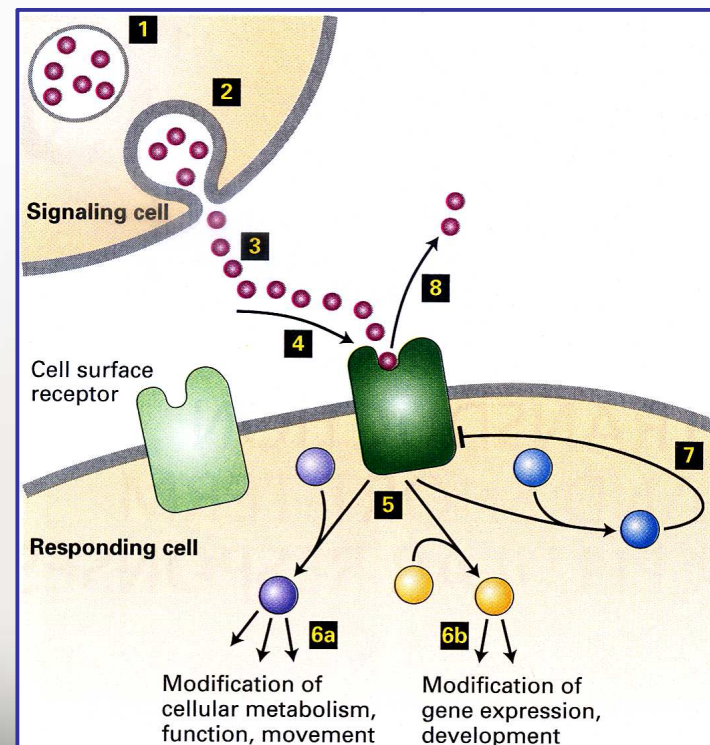


Signální síť



Princip signalizace

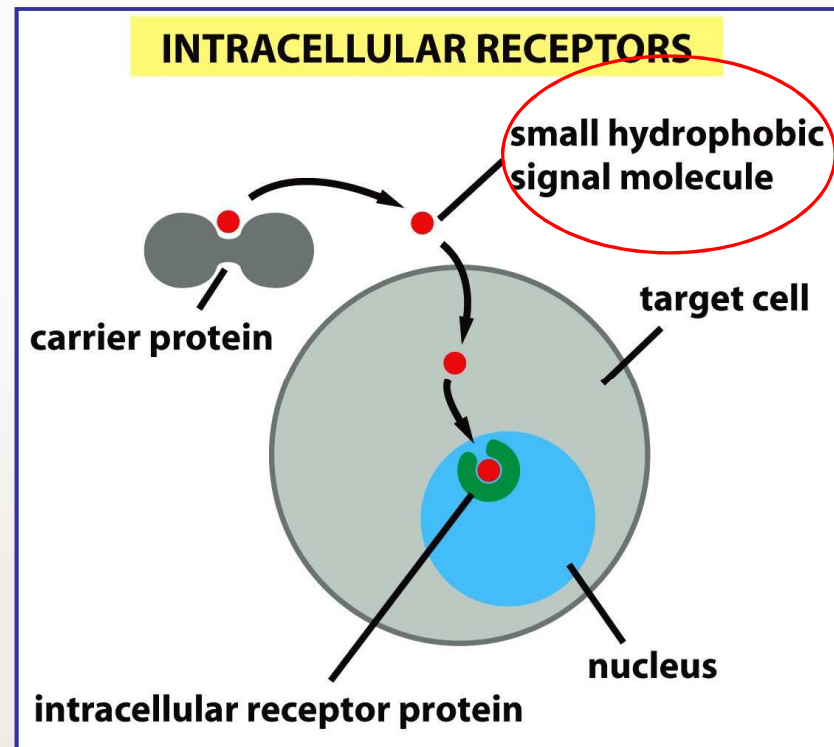
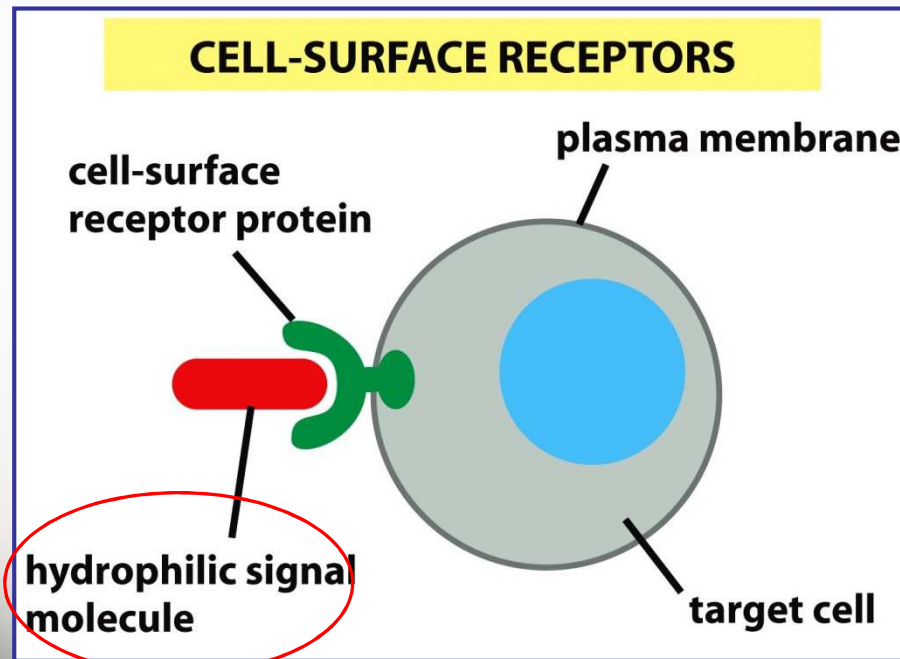
- **tvorba a přenos** signálu
- **registrace** signálu receptorem
- **přenos** signálu z receptoru **k efektorům** („signal transduction“)
- efektorům může být transkripční faktor, enzym, složka cytoskeletu, atd...
- schopnost buňky reagovat na podněty je geneticky určena spektrem receptorů, které je schopna vytvořit



Chemická povaha signálů

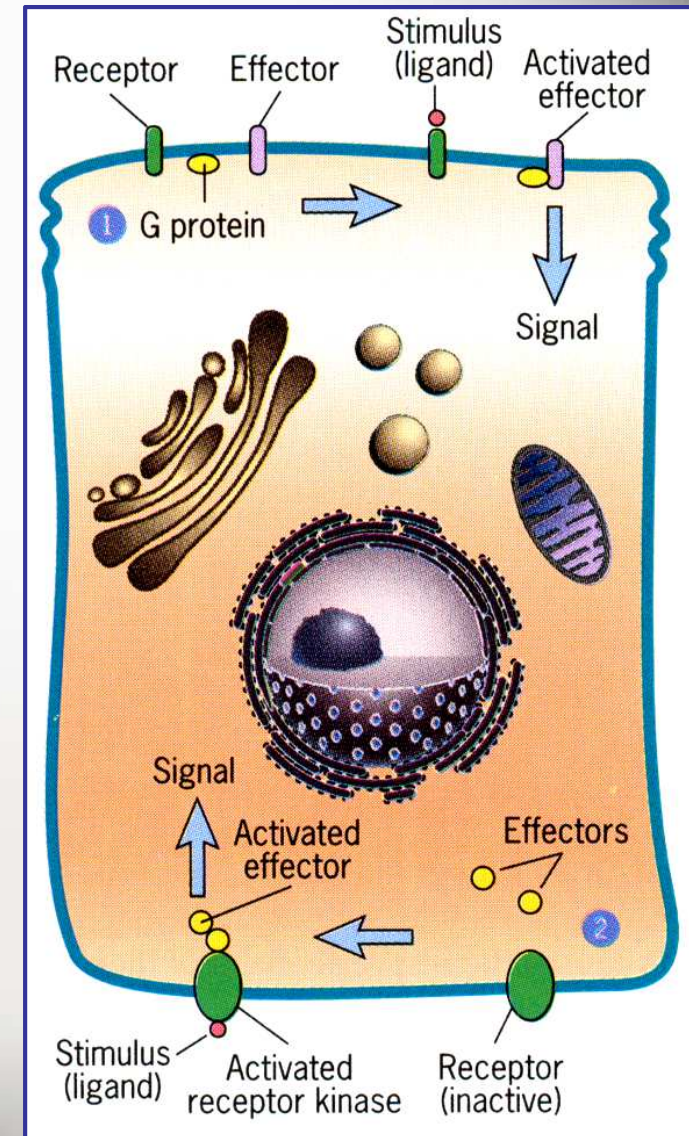
- proteiny
- krátké peptidy
- aminokyseliny
- nukleotidy
- steroidy
- retinoidy
- mastné kyseliny a jejich deriváty
- plyny

Význam rozpustnosti signální molekuly



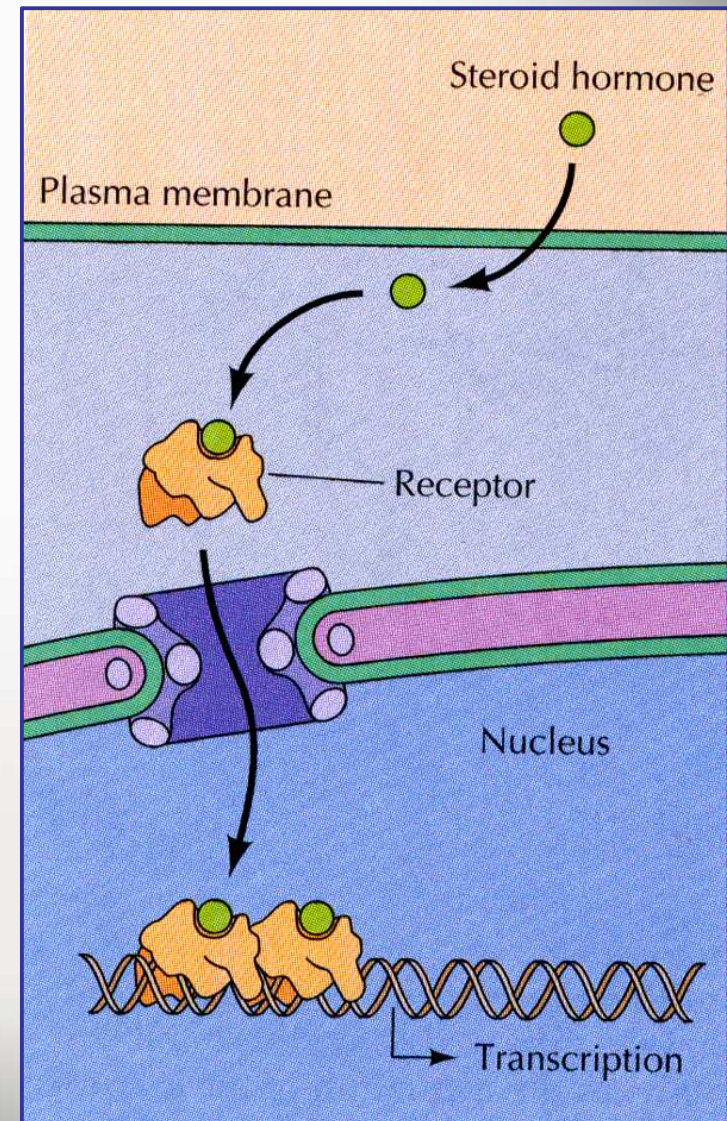
Hydrofilní signály

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



Lipofilní signály

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



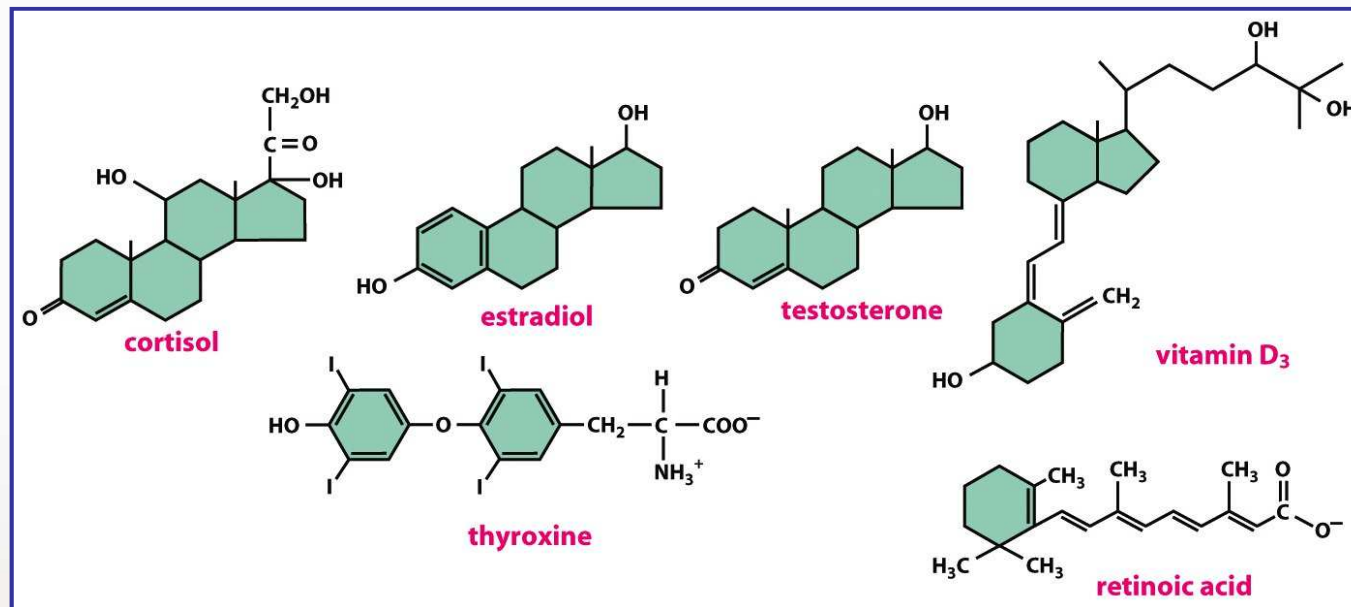
Nitrobuněčné receptory

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

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

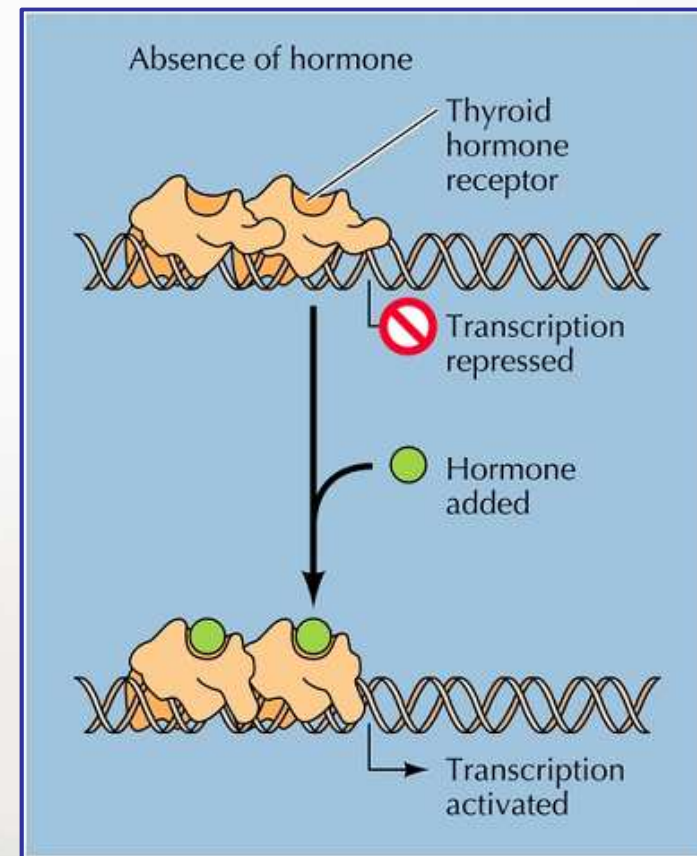
Signální molekuly pro nitrobuněčné receptory



- nízká molekulová hmotnost
- hydrofobní povaha
- jejich receptory jsou zároveň efekторы

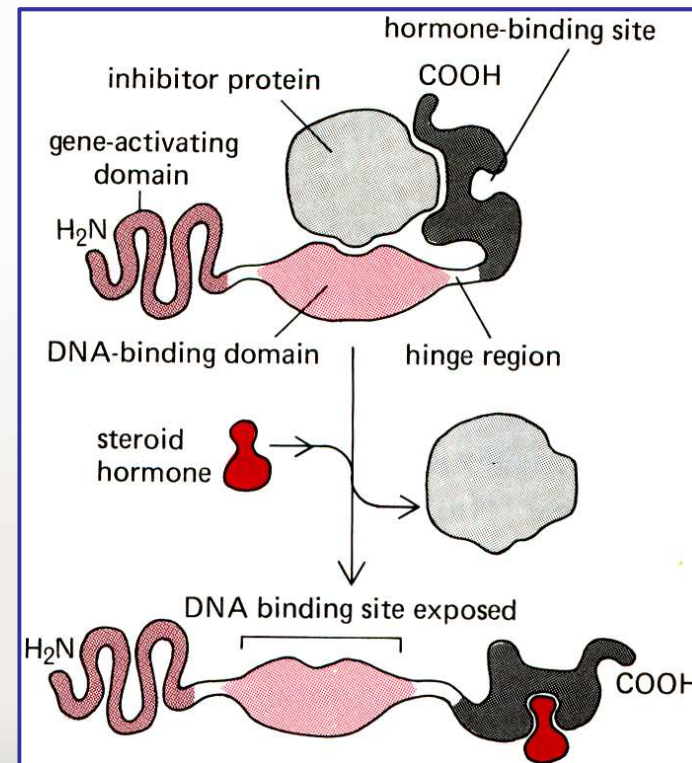
Receptor pro tyroidní hormon

- váže se na DNA i za nepřítomnosti ligandu (represe transkripce)
- přítomnost ligandu jej mění na aktivátor



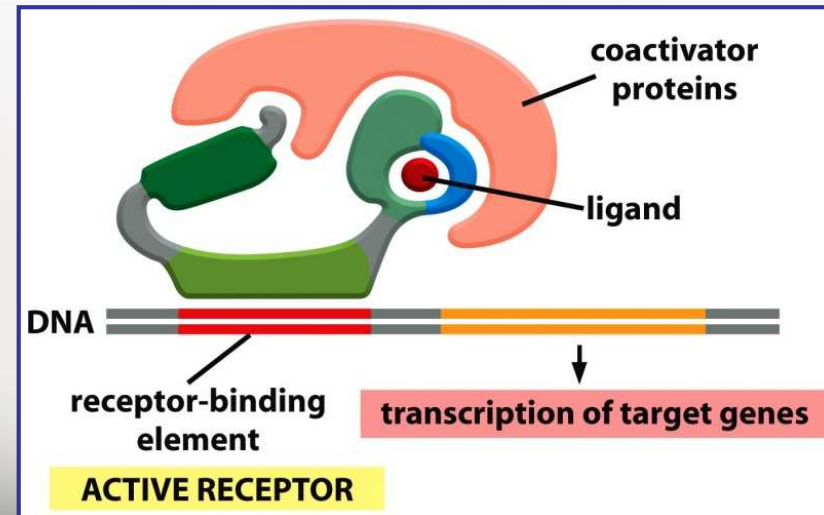
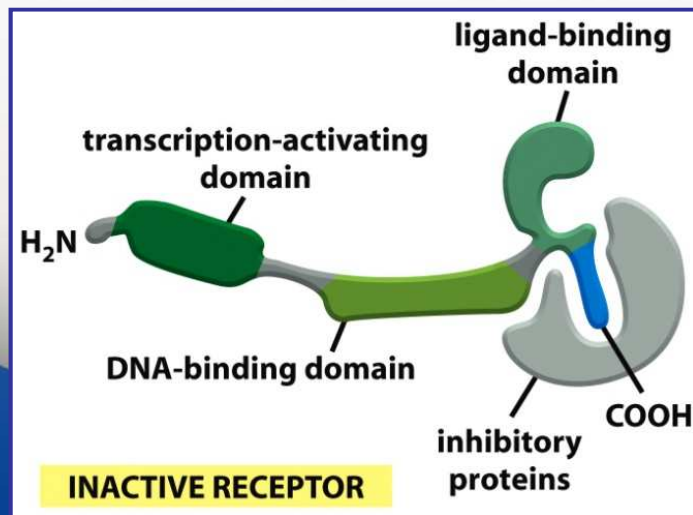
Struktura nitrobuněčných receptorů

- C-konec: vazba hormonu
- N-konec: řízení transkripce
- Střed molekuly: vazba DNA



Aktivace jaderného receptoru

- vazba ligandu
- „sevření“ ligandu receptorem (komplementarita povrchů)
- disociace inhibičního proteinu
- umožnění vazby koaktivátorových proteinů
- vazba na DNA a aktivace transkripce cílových genů



Signalizace povrchovými receptory – signální kaskády

mimobuněčný signál (ligand, „primary messenger“):

- růstový faktor, cytokin, hormon, atd.

povrchový receptor:

- převod mimobuněčného ligandu do podoby nitrobuněčného signálu

sekundární přenašeč:

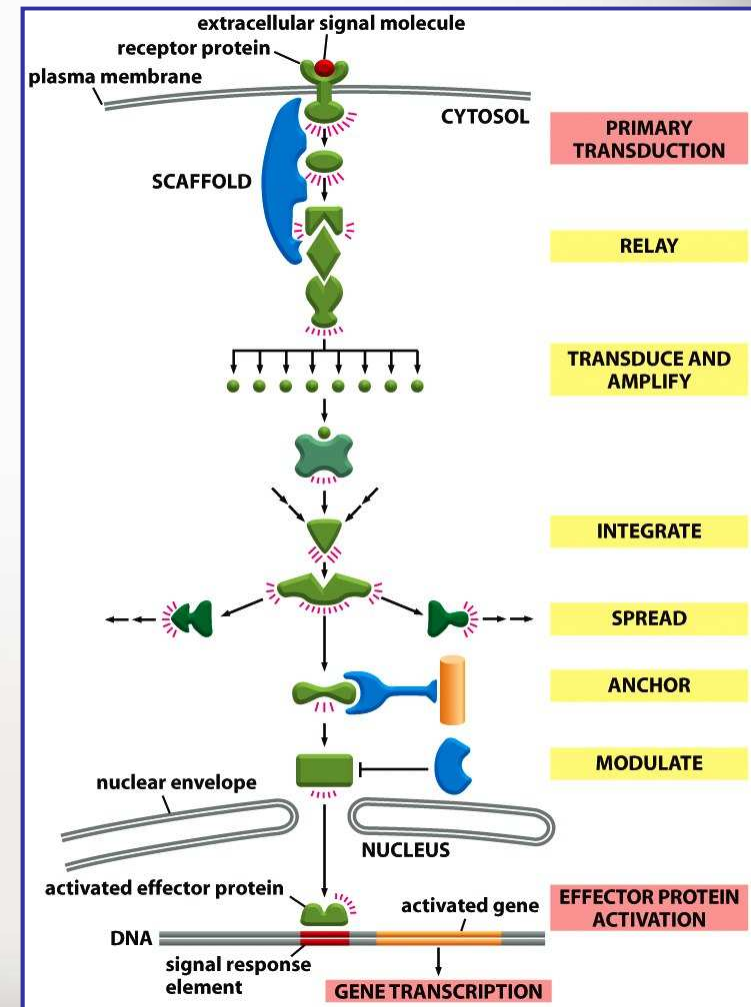
- nízkomolekulární struktura (cAMP, Ca²⁺, diacylglycerol, zbytek kyseliny fosforečné, atd.)
- zesílení a přenos signálu od povrchových receptorů k efektorům

cílová molekula (efektor):

- enzym
- složka replikačního aparátu
- složka aparátu pro genovou expresi
- složka cytoskeletu

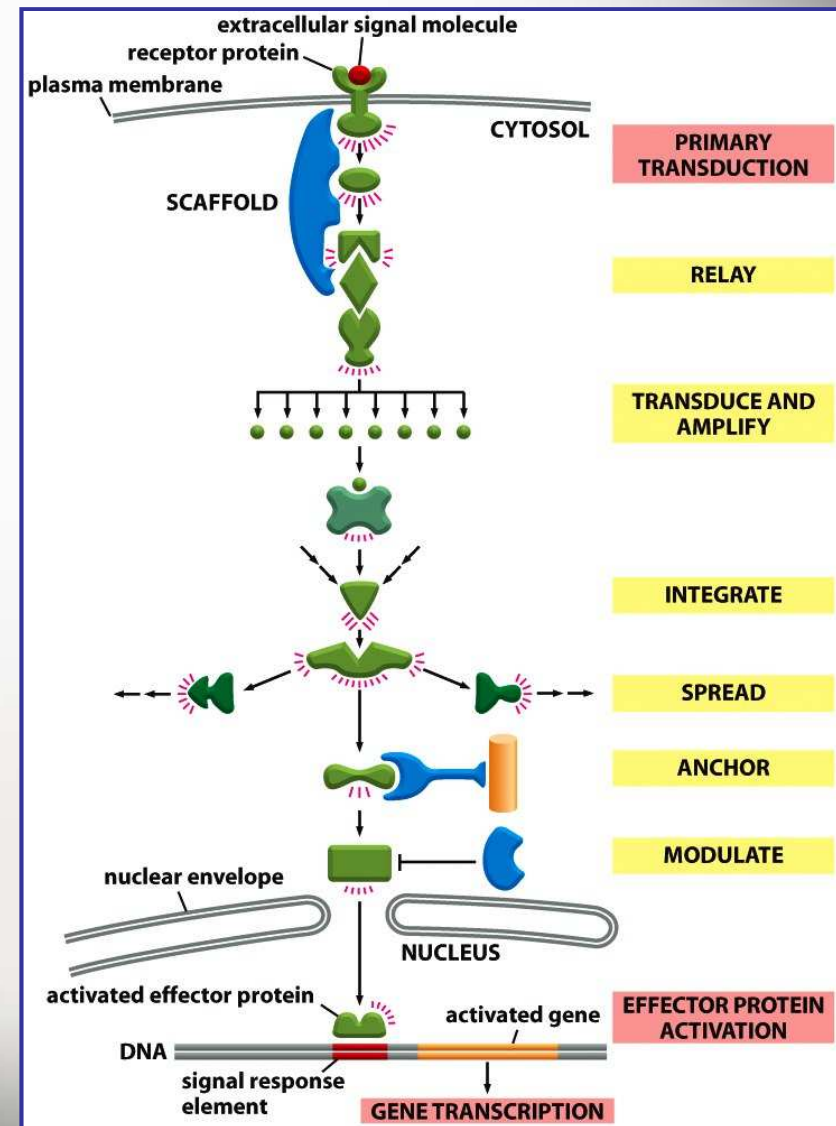
Principy přenosu signálů

- z jedné molekuly na druhou („**relay**“)
- využití „lešení“ („**scaffold**“) pro udržení přenašečů ve vzájemné blízkosti
- možnost převodu jednoho typu signálu na jiný („**transduction**“)
- zesílení signálu tvorbou velkého počtu nitrobuněčných mediátorů: malý počet mimobuněčných signálů vyvolává významnou odpověď („**amplification**“)



Principy přenosu signálů

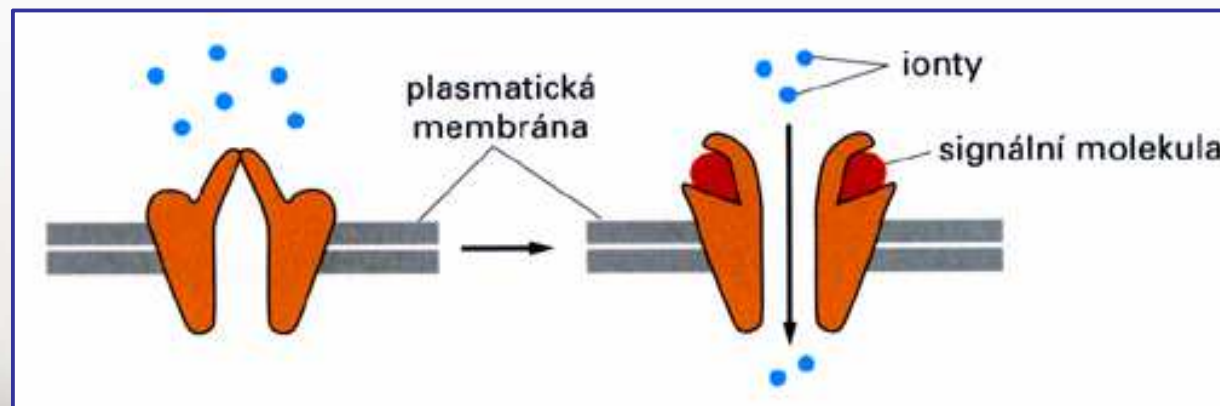
- jedna molekula může přijímat signál z různých drah a **integrovat** jej, před jeho odesláním dále
- signál se může větvit a šířit z jedné dráhy do jiné („**spread**“)
- signál se může ukotvit do určité molekuly a imobilizovat se tak („**anchor**“)
- signál může být ovlivněn jinými proteiny (např. inhibitory), které ovlivní jeho působení na efektory („**modulate**“)



Hlavní typy povrchových receptorů

1. Receptory typu iontových kanálků

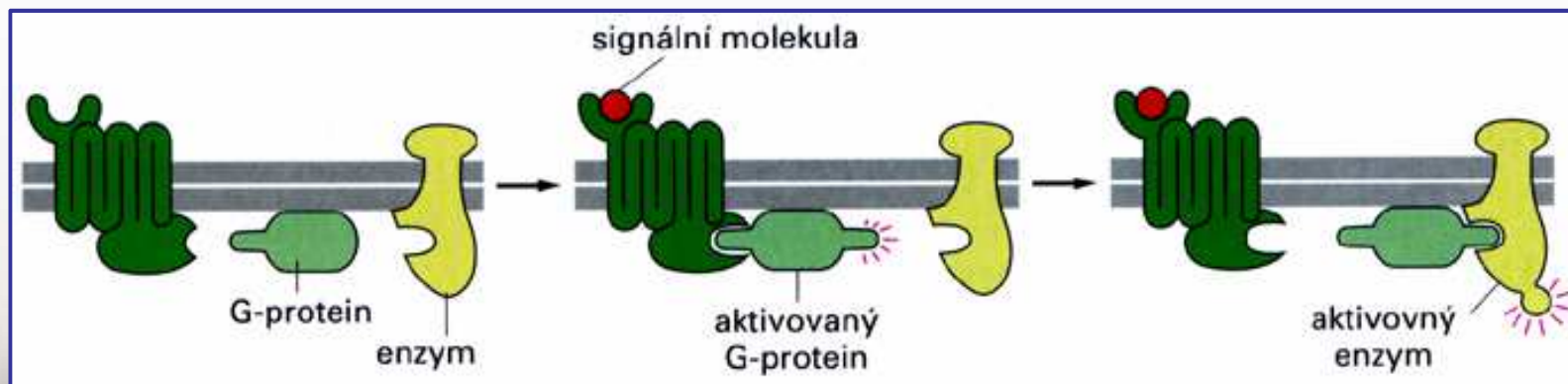
- vazbou ligandu ovlivňují průchodnost kanálků
- mění se permeabilita membrány



Hlavní typy povrchových receptorů

2. Receptory napojené na protein G

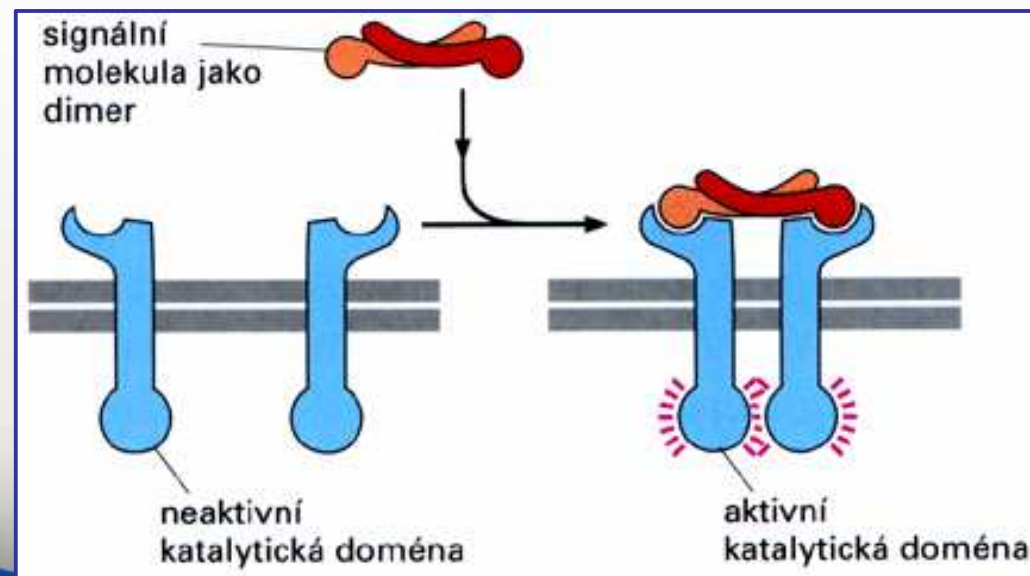
- nemají enzymovou aktivitu
- řídí aktivitu efektorů prostřednictvím proteinu G („GTP-binding regulatory protein“)



Hlavní typy povrchových receptorů

3. Receptory s katalytickou aktivitou

- katalytickou schopnost získávají vazbou ligandu
- obvykle transmembránové proteiny s kinázovou aktivitou



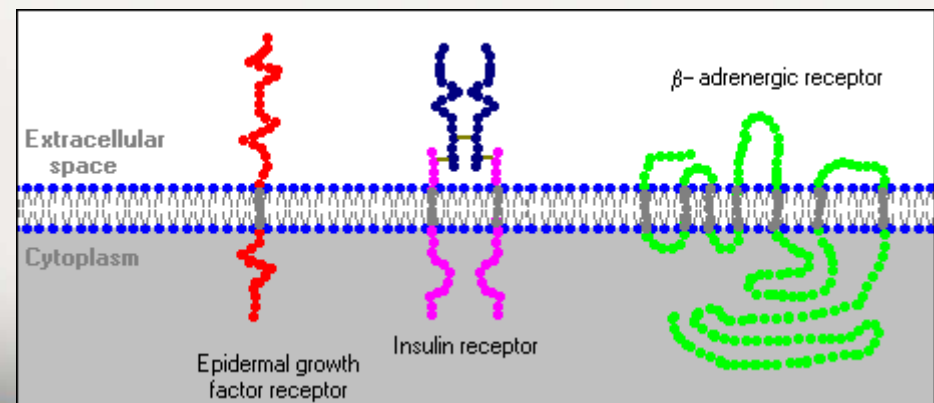
Přenos signálu přes plazmatickou membránu

Konformační změna receptoru

- vyvolanou vazbou ligandu, která se projeví na vnitřní straně membrány
- typické pro receptory se sedminásobným vinutím membránou

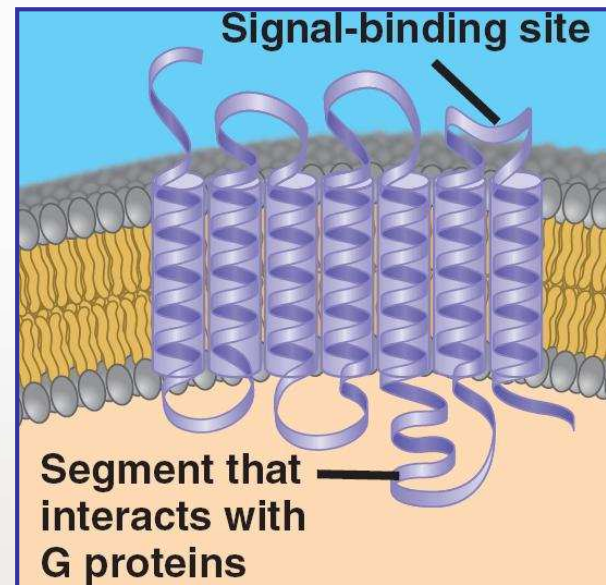
Dimerizace receptoru

- ligand seskupí inaktivní podjednotky receptorů, které jsou schopny laterálního pohybu membránou
- dimerizace receptoru umožní takové přiblížení jejich kinázových cytoplazmatických domén, že se mohou vzájemně fosforylovat a tak aktivovat



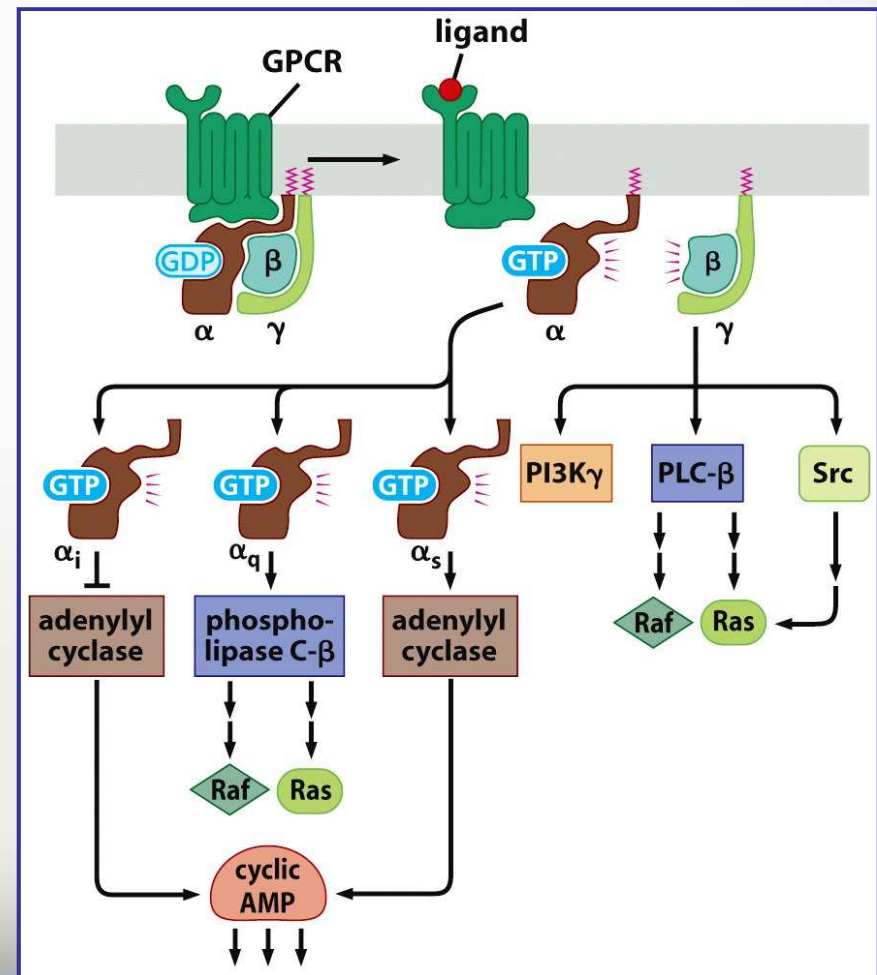
Receptory se sedminásobným vinutím membránou

- nejpočetnější rodina receptorů
- 7 transmembránových α -šroubovic
- evoluční konzervativnost
- odpovídají na různé signály (světlo, aminokyseliny, peptidy, proteinové hormony, katecholaminy, lipidy)
- interagují s proteinem G



Receptory se sedminásobným vinutím membránou

- receptor se aktivuje ligandem
- tuto informaci převede na protein G
- **GDP** disociuje z proteinu G a je nahrazen **GTP**
- protein G po navázání GTP **ovlivní aktivitu důležitých enzymů**

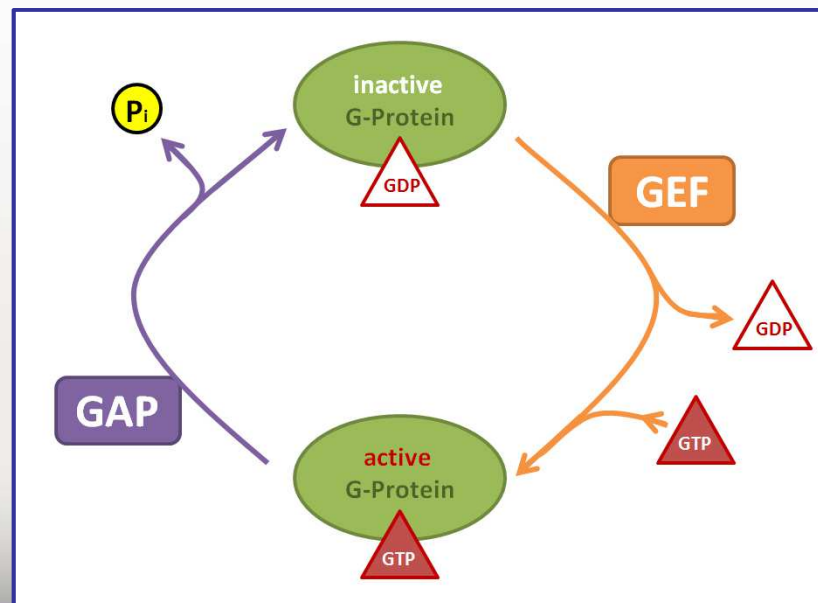


Dva hlavní typy proteinů G

- **trimerní (velké)**, které se indukují přímou vazbou s receptory
- **monomerní (malé)** typu Ras, které interagují s receptory nepřímo prostřednictvím adaptérů
- všechny proteiny G mohou vázat GTP/GDP a disponují GTPázovou aktivitou

Proteiny G a GTP

- proteiny G kolísají mezi konformacemi „zapnuto“ (s **GTP**) a „vypnuto“ (s **GDP**)
- zapínání zajišťují proteiny **GEF** (*guanine nucleotide–exchange factors*), které katalyzují disociaci GDP a jeho nahrazení nahrazení GTP
- rychlost hydrolýzy GTP závisí na aktivitě **GAPs** (*GTPase-accelerating / activating proteins*), které mohou také reagovat na mimobuněčné signály

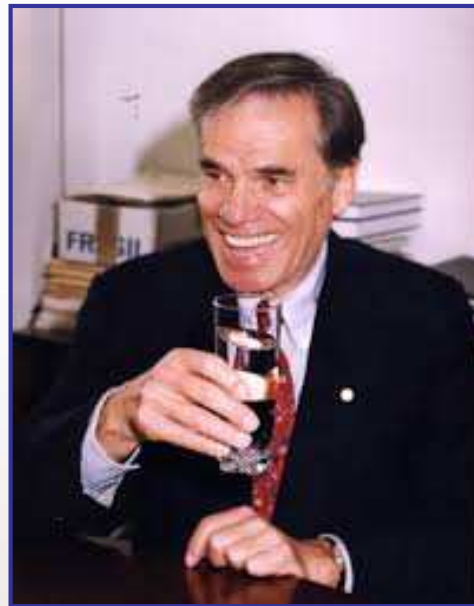


Objevitelé proteinů G

Alfred G. Gilman a Martin Rodbell
Nobelova cenu za fyziologii a medicínu v r. 1994



Alfred G. Gilman
(1941-2015)



Martin Rodbell
(1925-1998)

Struktura velkých proteinů G

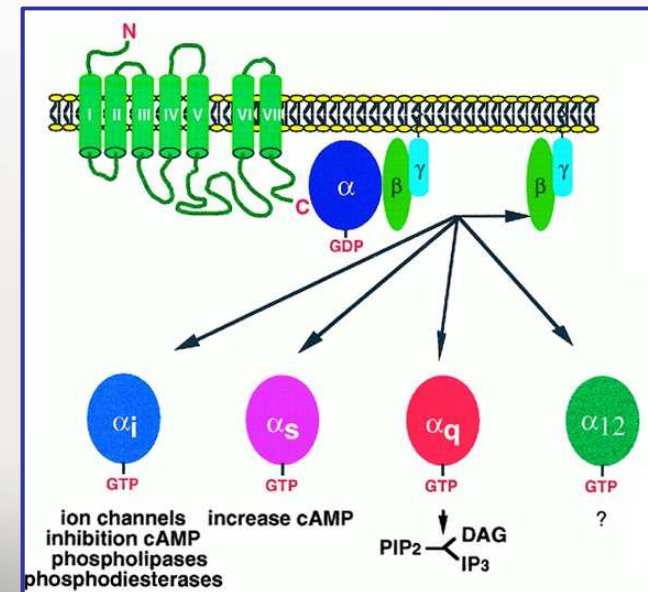
- několik variant, každá typická pro určitý soubor receptorů a určitý soubor cílových proteinů

3 podjednotky:

- α – obsahuje vazebné místo pro GTP/GDP, zajišťuje hydrolýzu GTP
- β a γ - ukotvují G protein na cytoplazmatické straně plazmatické membrány
- u savců dosud charakterizováno 20 různých typů podjednotky α , 5 typů podjednotky β a 6 typů γ
- evoluční konzervativnost

Funkce proteinů G

- spojovací články mezi povrchovými receptory a producenty sekundárních přenašečů
- interagují pouze s aktivovanými receptory
- výměna **GDP** na podjednotce α za **GTP**
- **podjednotka α** s navázaným GTP přechází do aktivního stavu a **odděluje se** od podjednotek β a γ
- uvolněná podjednotka α s navázaným GTP (podobně jako uvolněné podjednotky β a γ) interaguje se svou **efektorovou molekulou** v plazmatické membráně
- rozmanitost efektorů: **adenylátcykláza, fosfolipáza C, iontové kanálky**)



Hlavní efektory proteinů G

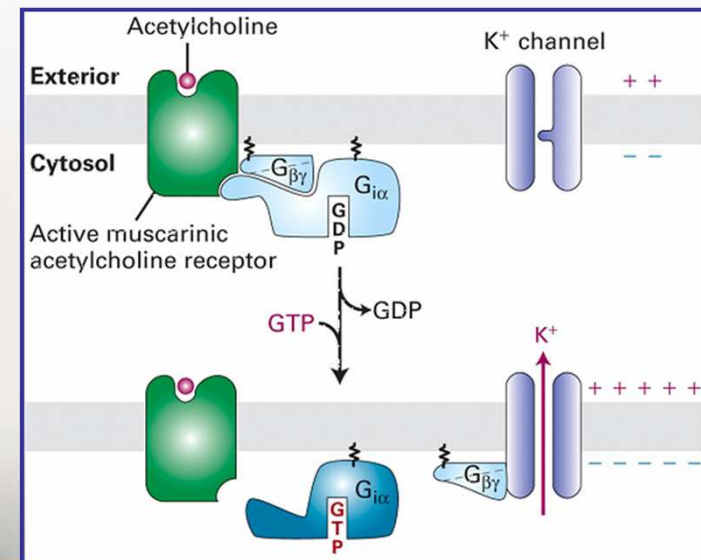
G protein complex	Effectors	Second messenger	Cellular effect
G α s	Adenylyl cyclase	cAMP	PKA phosphorylates target proteins
G α i	Adenylyl cyclase	Inhibits cAMP	Inhibits PKA
G α q	Phospholipase C	DAG, IP ₃ , Ca ²⁺	Activate PKC Regulate Ca ²⁺ -binding proteins

+ G α t

Proteiny G regulují propustnost iontových kanálků

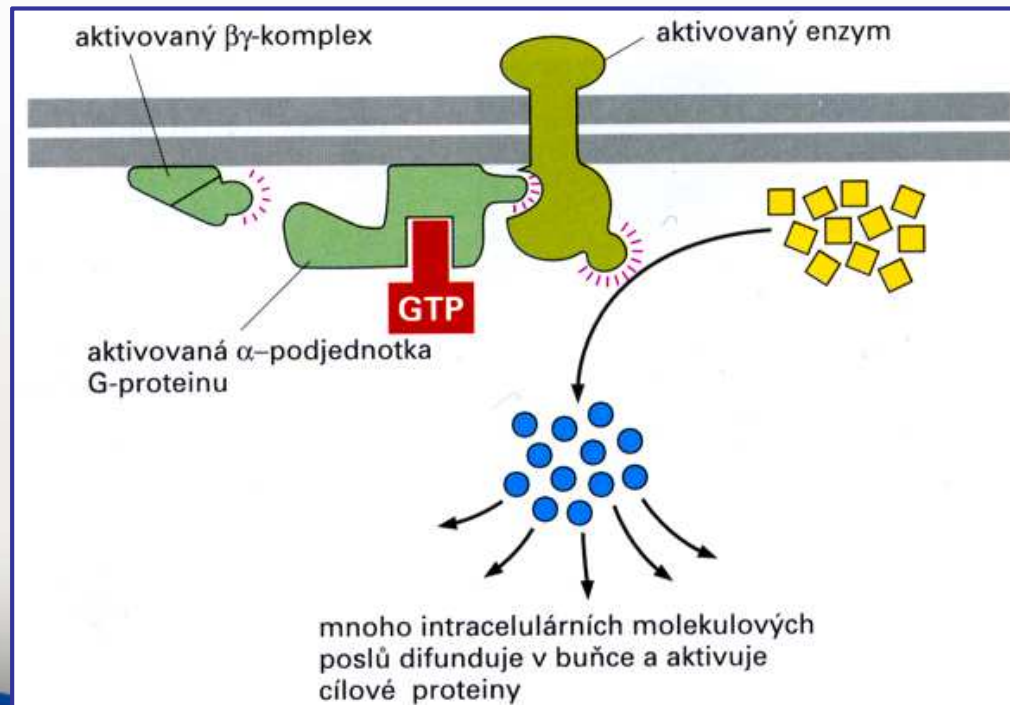
Např. regulace činnosti srdečního svalu acetylcholinem

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



Proteiny G aktivují enzymy

- **adenylátcyklázu** (tvorba **cAMP**)
- **fosfolipázu C** (tvorba **inositoltrifosfátu** a **diacylglycerolu**)
- vzniklé rozpustné malé molekuly rychle difundují buňkou („druhotní poslové“)



Vypnutí signálu

- nastává po několika sekundách aktivity proteinu G, kdy GTPázová aktivita podjednotky α vyvolá **hydrolýzu GTP**
- rychlost hydrolýzy GTP ovlivňuje i aktivita GAPs
- aktivita proteinu G je vymezena dobou, po kterou jsou podjednotky α a $\beta\gamma$ disociovány
- po hydrolýze GTP na GDP se podjednotky α , β , γ spojují a vypínají signál



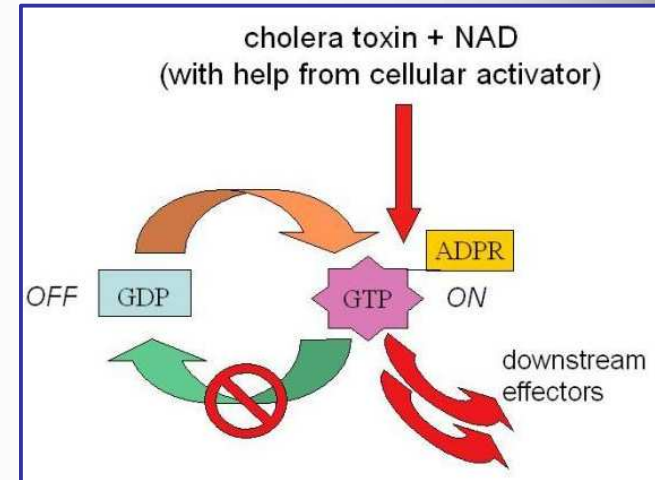
Poruchy funkce proteinu G

- tvorba nádorů
- infekční choroby



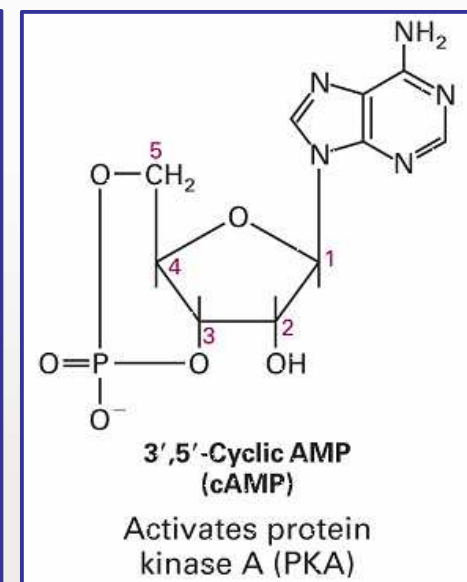
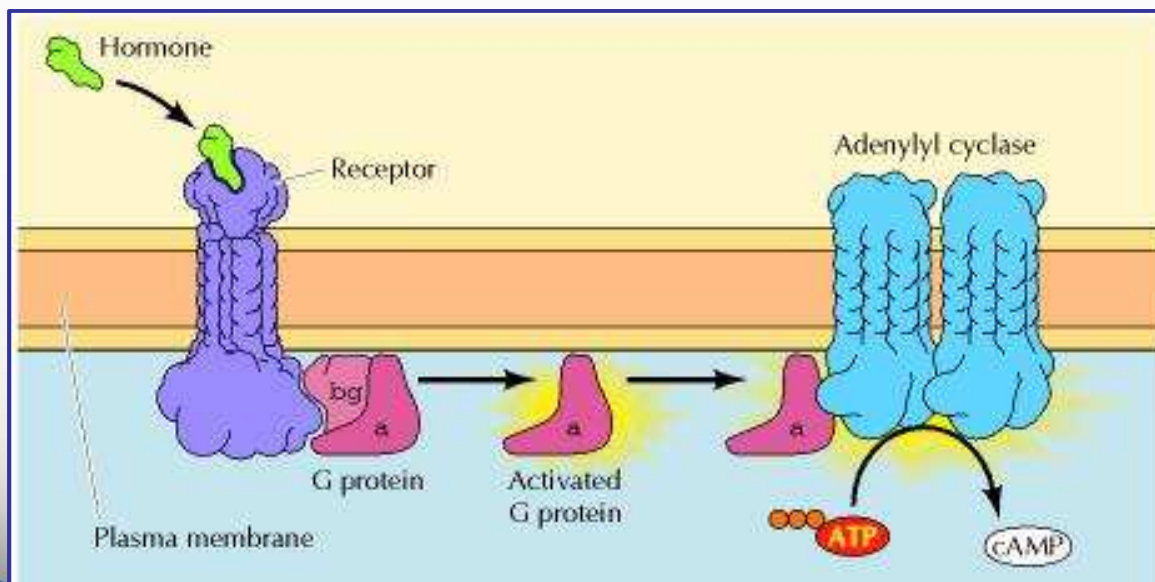
cholera:

- *Vibrio cholerae* produkuje cholerový toxin (tj. enzym, který katalyzuje přenos ADP-ribózy na podjednotku α proteinu Gs a tím neadekvátně prodlužuje jeho aktivitu)
- **ADP ribozylace** podjednotky α Gs vyvolaná cholerokým 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 vody a iontů sodíku do střev – letální průjmy



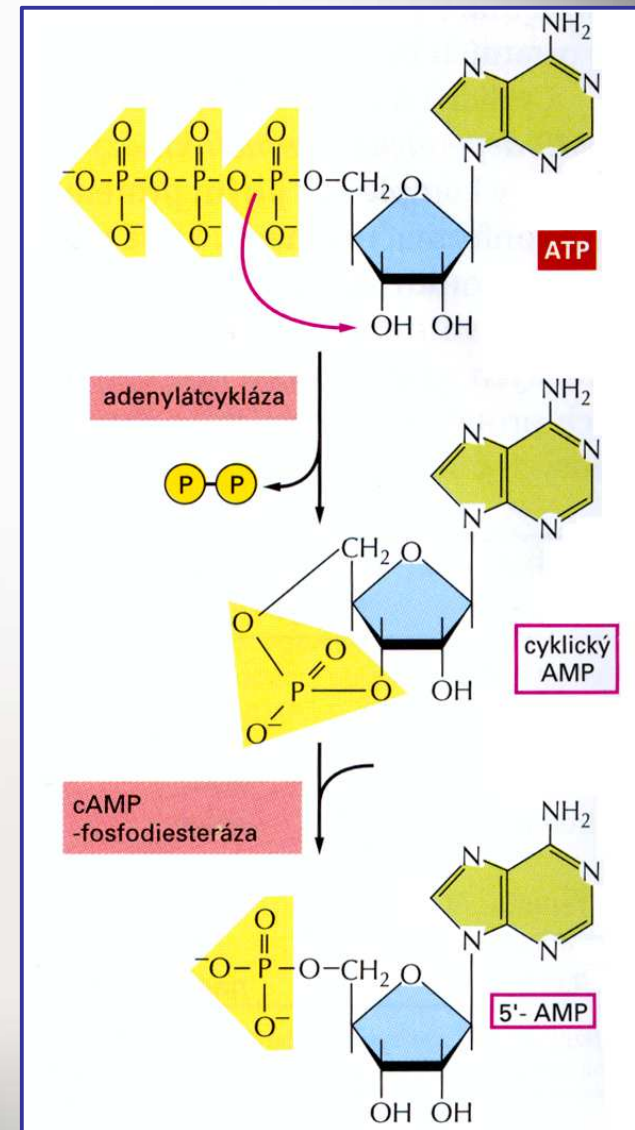
Protein G: aktivace adenylátcyklázy

Regulace tvorby **cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP)**
(cAMP objeven při studiu metabolismu glykogenu, Sutherland, 1958)



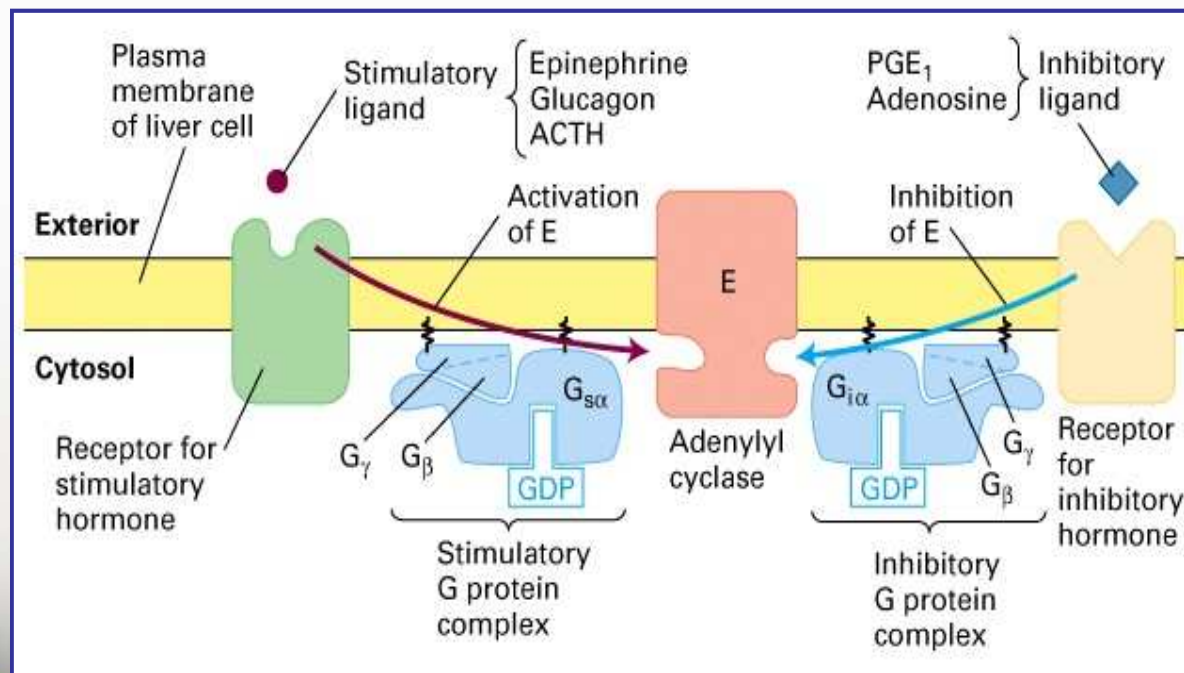
cAMP

- hladina cAMP závisí na rovnováze aktivit adenylátcyklázy a cAMP-fosfodiesterázy
- aktivita adenylátcyklázy je regulována proteinem G, aktivita cAMP-fosfodiesterázy podléhá regulaci jen vzácně (je konstitutivní)
- rychlá změna koncentrace v reakci na mimobuněčné signály
- rozpustnost cAMP ve vodě umožňuje jeho přesun z membrány do cytozolu



Regulace adenylátcyklázy

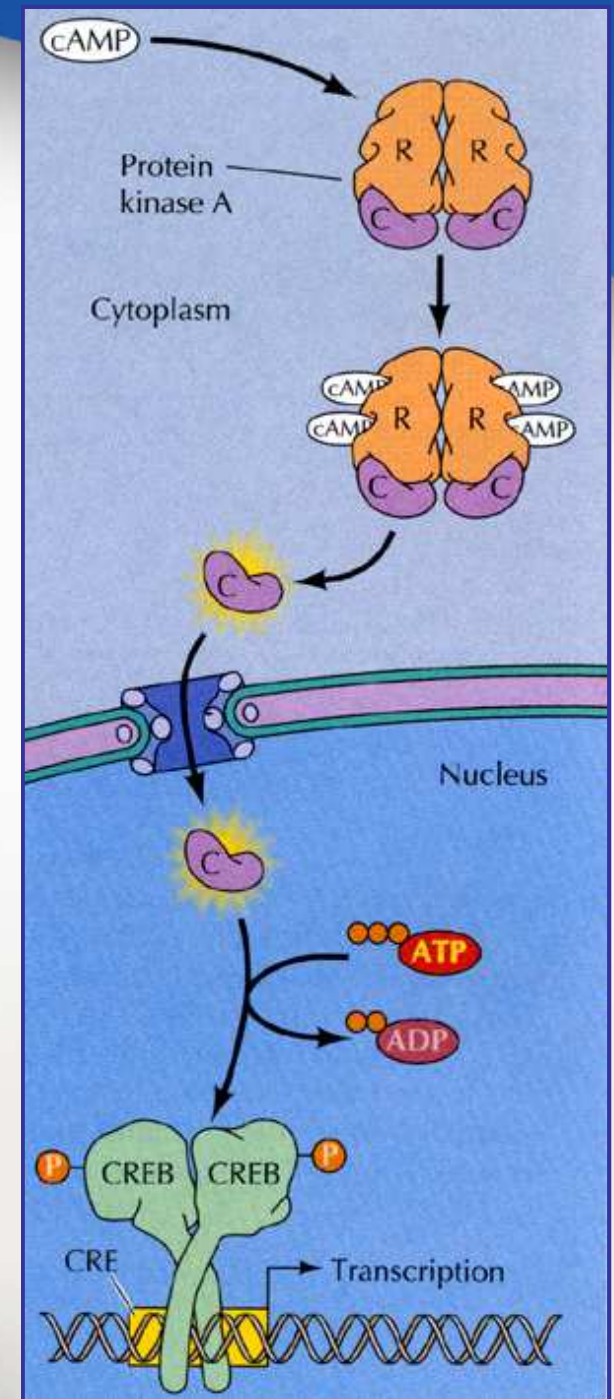
Různé proteiny G (spojené s různými receptory) mohou mít na adenylátcyklázu různý vliv



Efektory cAMP

Protein kináza A

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



Struktura protein kinázy A

Inaktivní stav:

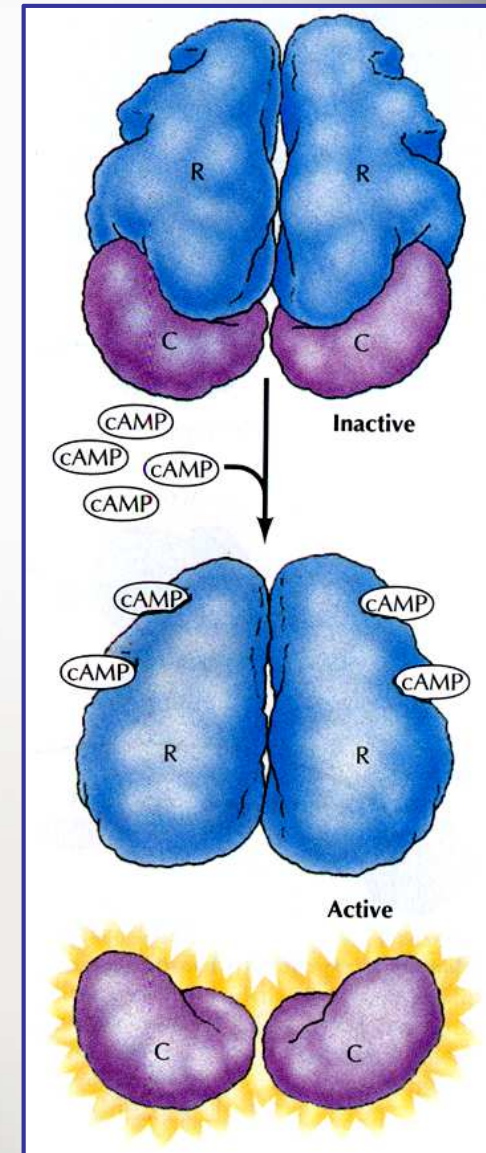
- dvě regulační podjednotky (vazba cAMP)
- dvě katalytické podjednotky

Aktivní stav:

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

PKA:

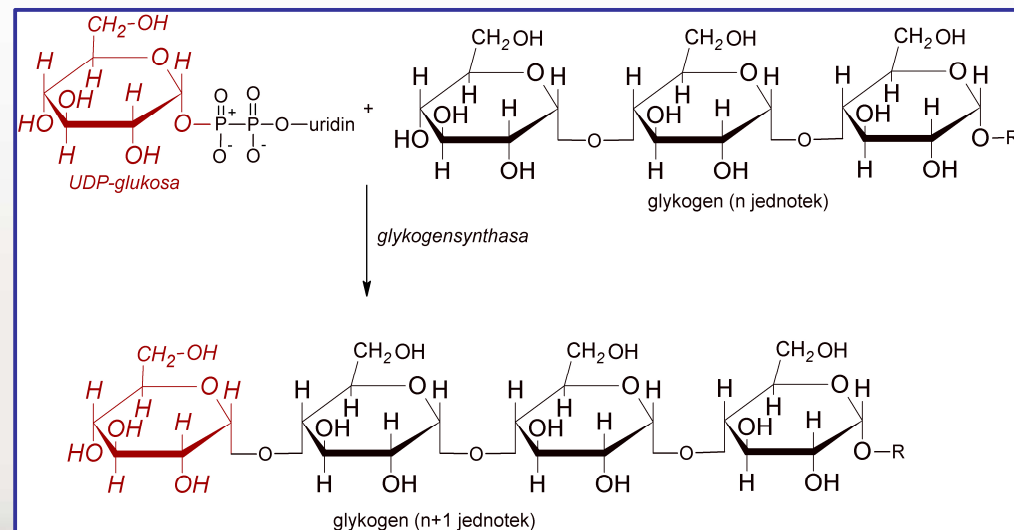
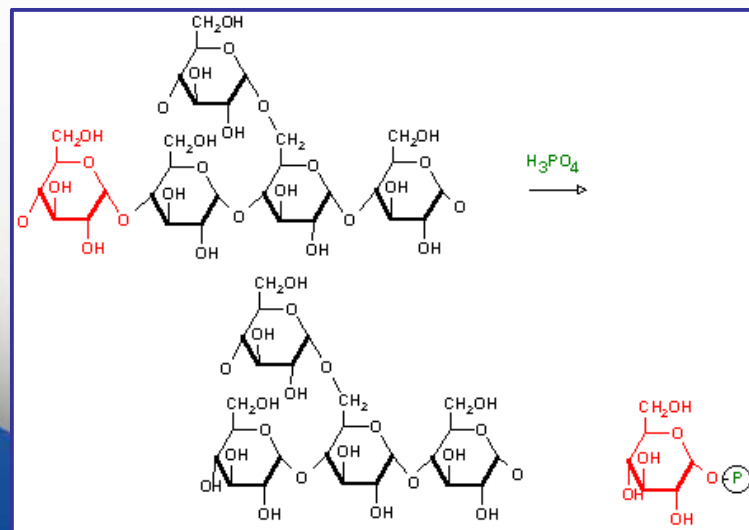
- výskyt ve všech živočišných buňkách
- zprostředkovává většinu účinků cAMP



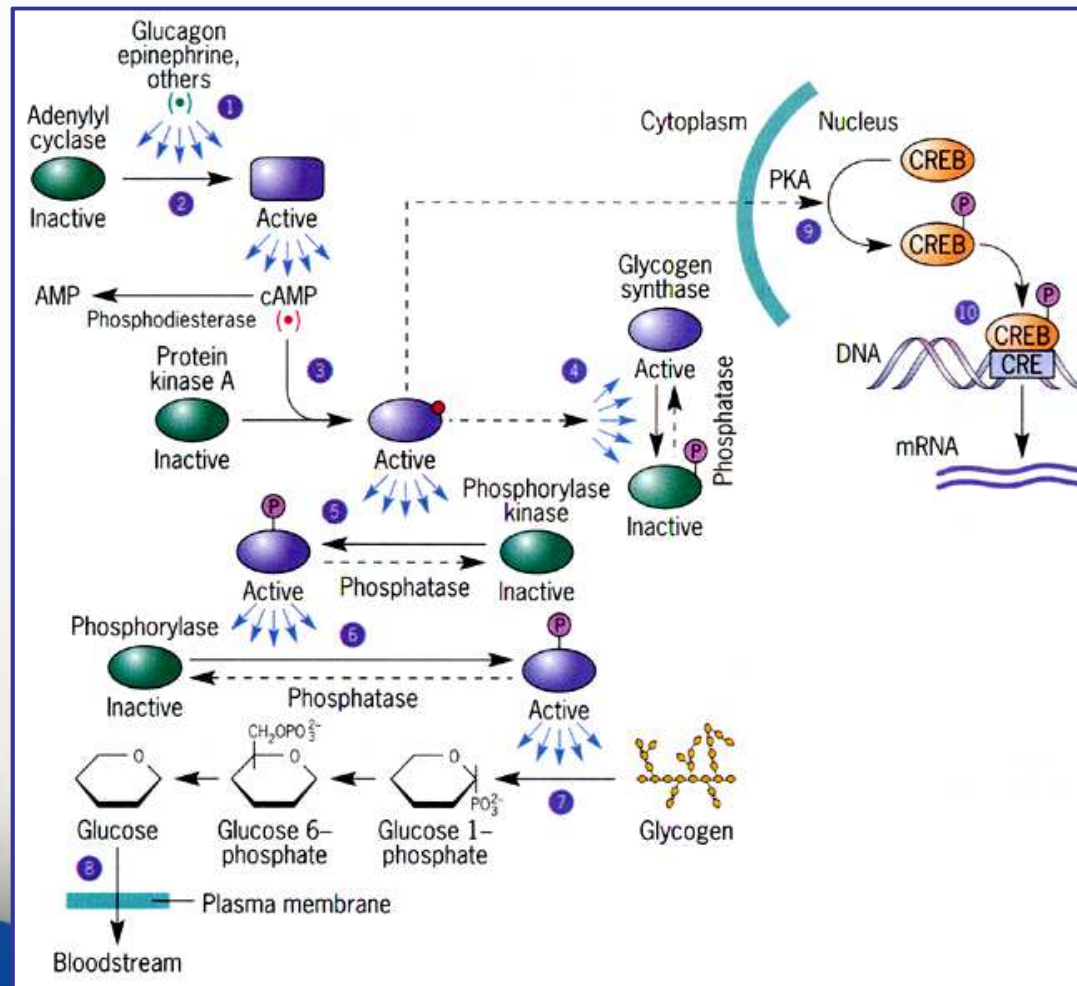
Efektory cAMP

Kináza fosforylázy a glykogen syntáza

- oba enzymy zapojeny do metabolismu glykogenu
- kináza fosforylázy - regulace fosforylázy štěpící glykogen
- glykogensyntáza regulace syntézy glykogenu

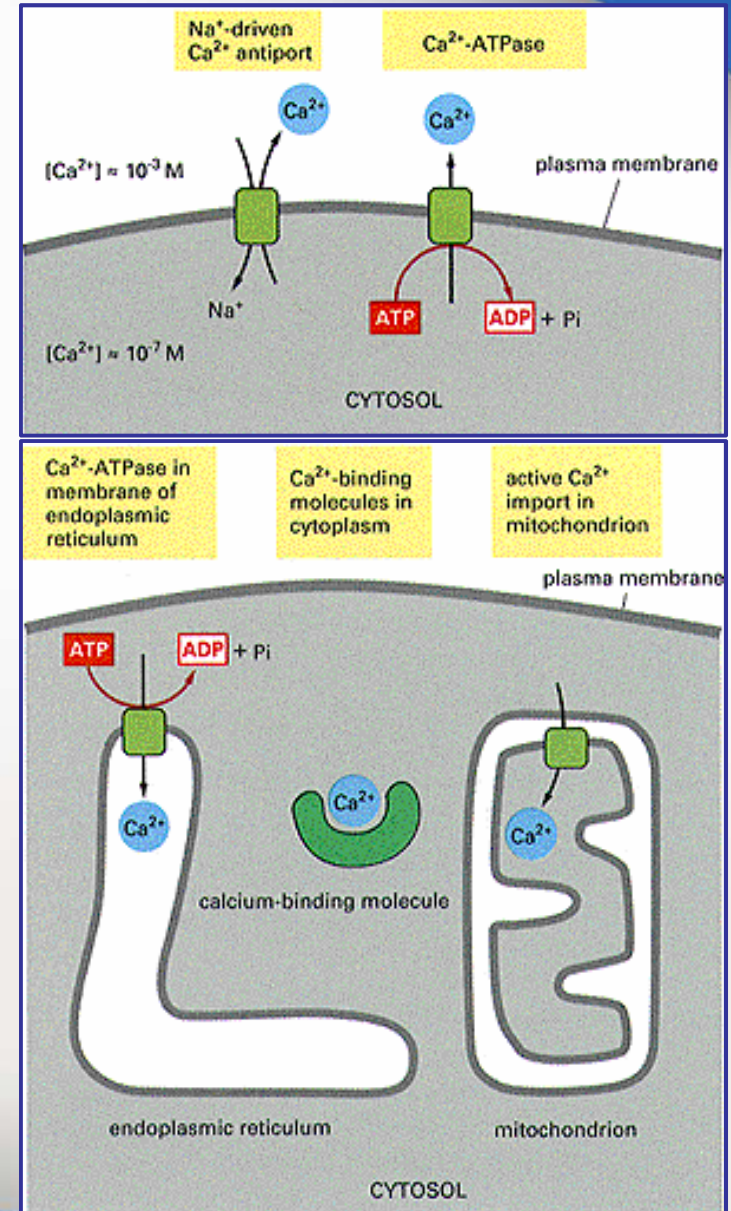


cAMP a metabolismus glykogenu



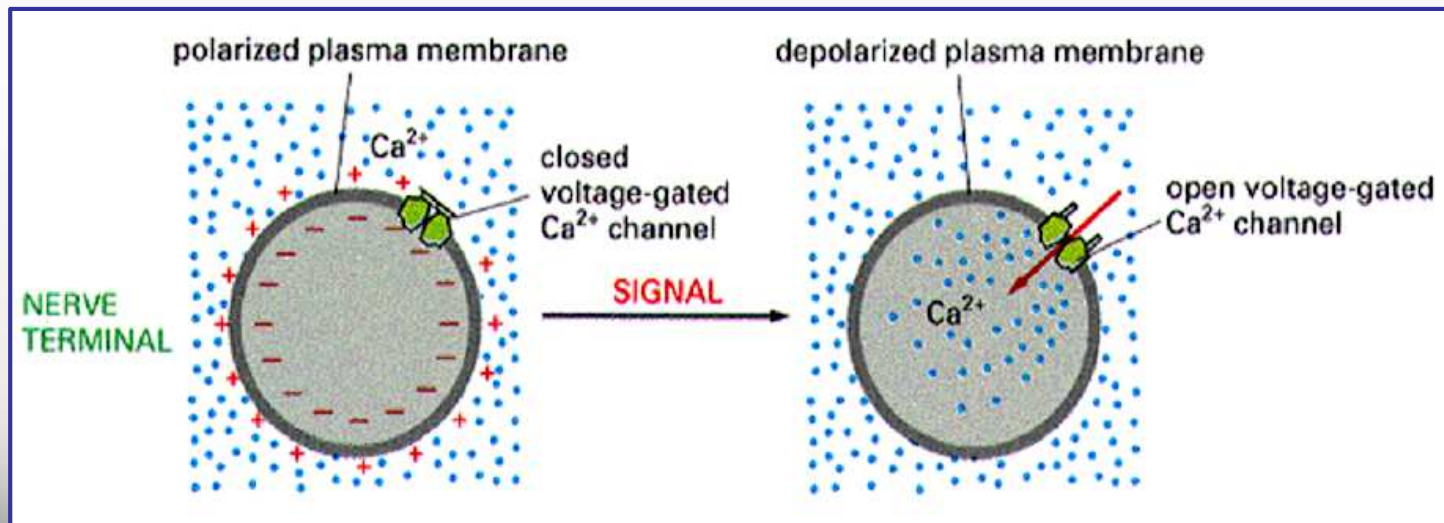
Ionty Ca^{2+}

- protein G ovlivňuje hladinu Ca^{2+} v cytozolu
- různá koncentrace Ca^{2+} v cytozolu a mimobuněčném prostoru/buněčných zásobárnách: cytozol - 10^{-7}M mimobuněčný prostor/zásobárny - 10^{-3}M
- důsledek činnosti iontových pump
- koncentrační gradient tlačí ionty Ca^{2+} do cytozolu
- zvýšená permeabilita membrány – vyšší koncentrace Ca^{2+} v cytozolu – aktivace nitrobuněčného signálního mechanismu



Dva způsoby vstupu Ca^{2+} do cytozolu

1. Depolarizací membrány (akčním potenciálem) – otevření vápníkových kanálků - zvýšený příjem Ca^{2+} z vnějšího okolí

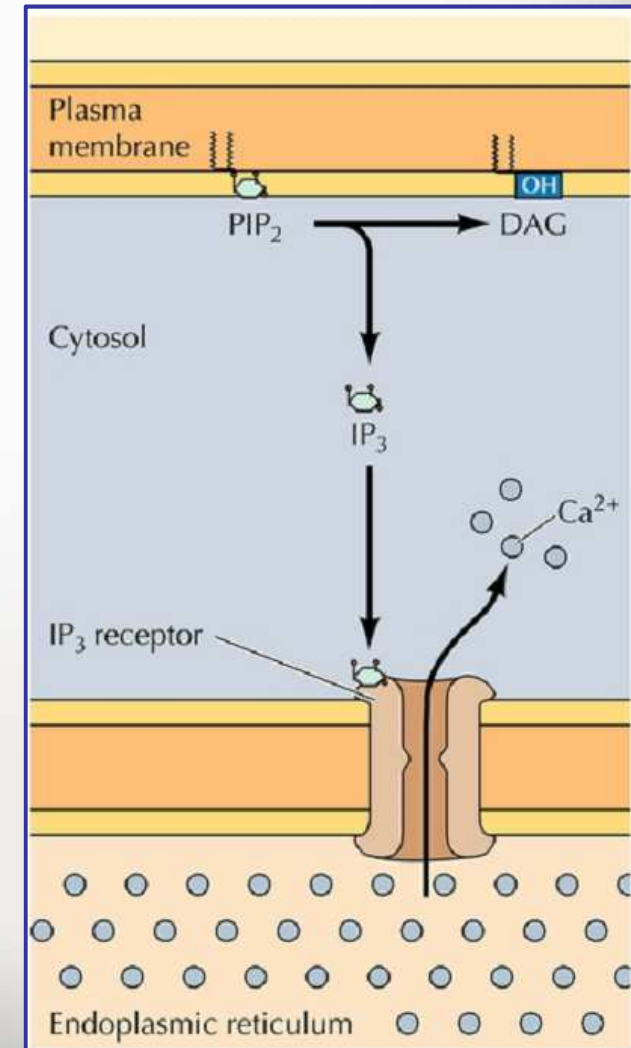


Dva způsoby vstupu Ca^{2+} do cytozolu

2. otevřením kanálků pro Ca^{2+} **inozitoltrifosfátem (IP₃)**

Signální kaskáda:

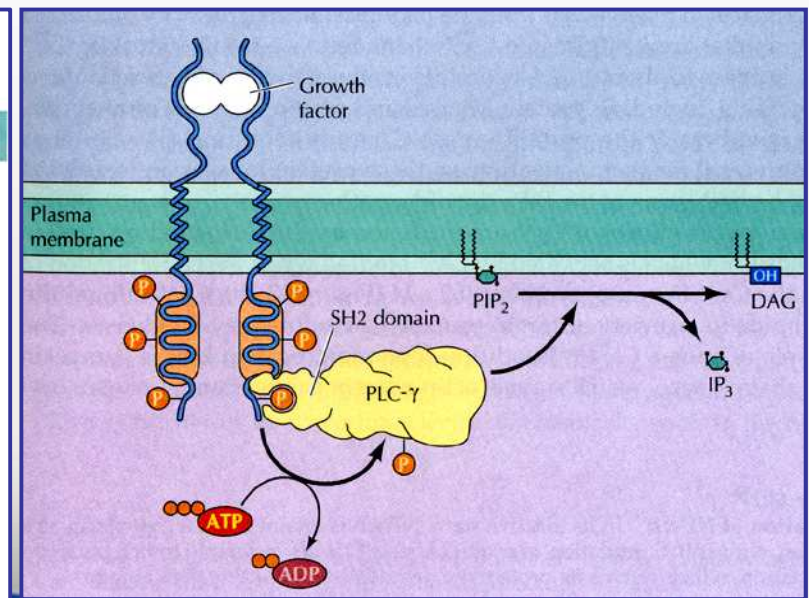
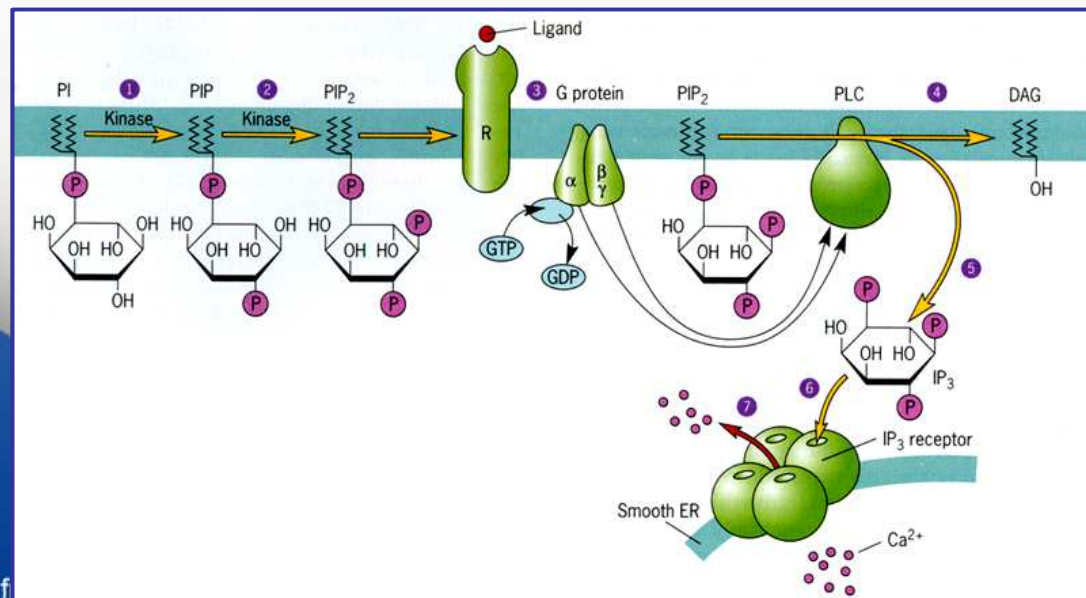
- vazba ligandu k receptoru – aktivace
- proteinu G – aktivace **fosfolipázy C β** –
- tvorba IP₃ a diacylglycerolu (DAG) z fosfatidylinositol-bisfosfátu
- IP₃ opouští plazmatickou membránu a difunduje cytozolem – otevře kanálky Ca^{2+} v ER – uvolnění Ca^{2+} do cytozolu



Proteiny G a fosfolipáza C

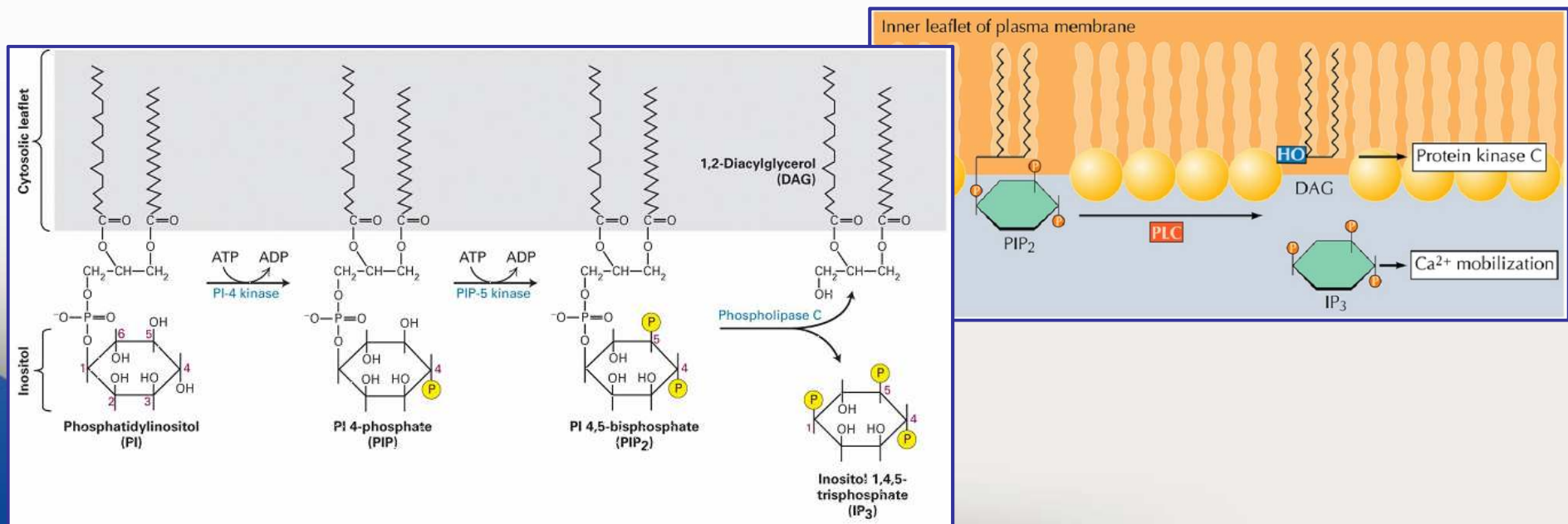
aktivace fosfolipázy C (2 způsoby):

- zprostředkovaná proteinem G - aktivace **fosfolipázy C β**
- přímou interakcí s receptorem pomocí domény SH2 - **fosfolipáza C γ**



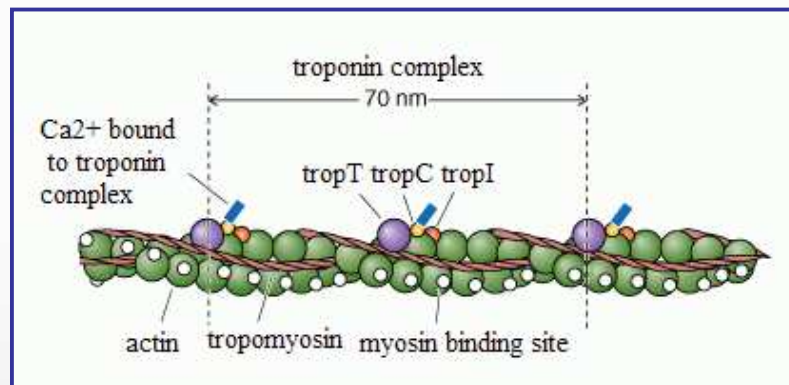
IP3 a DAG

- produkty enzymové aktivity fosfolipázy C
- IP3 zajistí uvolnění Ca^{2+} z buněčných zásob
- diacylglycerol se účastní:
 - a) metabolismu kyseliny arachidonové – syntéza prostaglandinů
 - b) aktivace protein **kinázy C**

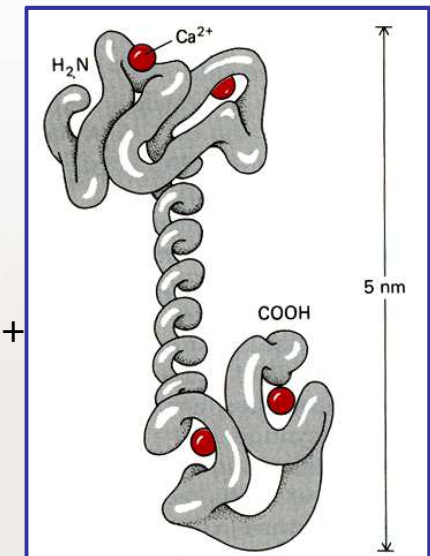


Efektory iontů Ca^{2+}

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

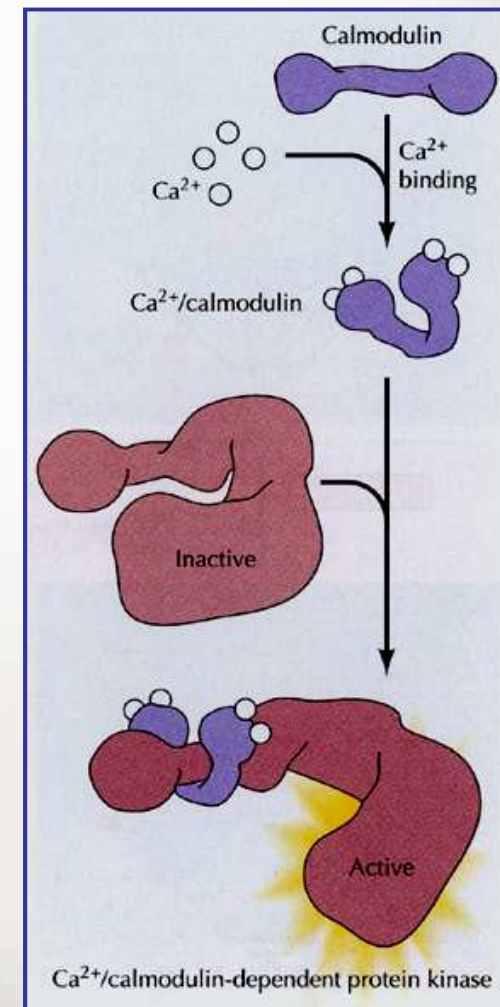


Kalmodulin – jediný polypeptid se 4 místy pro vazbu Ca^{2+}
- zprostředkovává většinu reakcí na Ca^{2+}



Kalmodulin po aktivaci Ca^{2+}

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



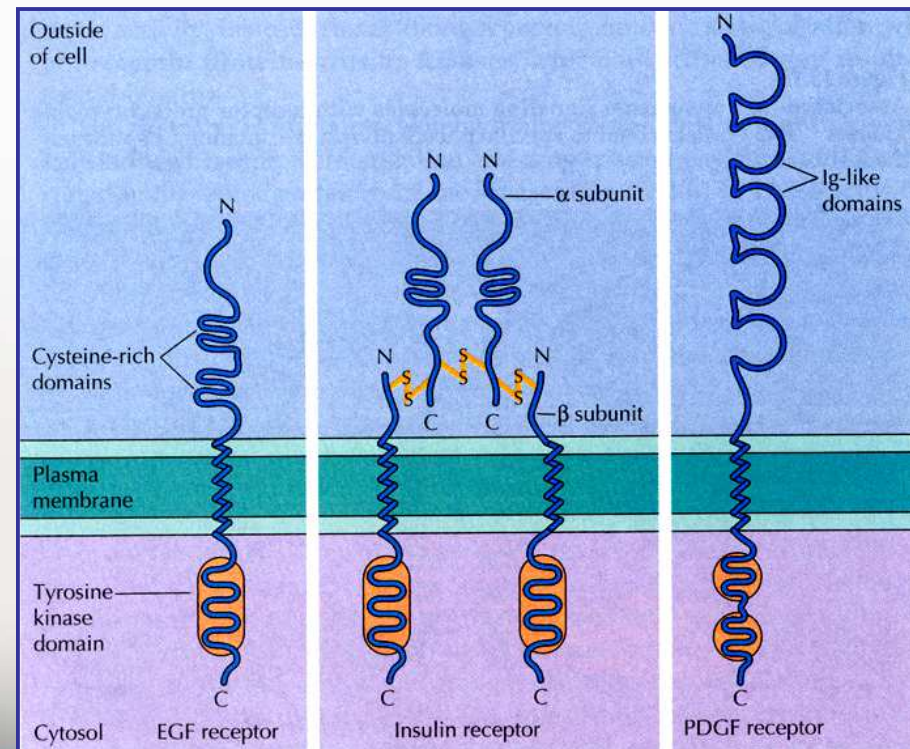
Signální dráhy

cAMP a Ca²⁺ vzájemně interagují

- hladiny **cAMP** a **Ca²⁺** se ovlivňují navzájem:
 - např. komplexy Ca²⁺/kaldmodulin mohou vázat a regulovat aktivitu adenylát cyklázy
 - kináza A může fosforylovat některé kanálky určující obsah Ca²⁺ v cytozolu
- **Ca-kináza** může být fosforylována **kinázou A**
- kináza A a kináza Ca často **fosforylují aminokyseliny téhož proteinu** (např. CREB)

Katalytické receptory

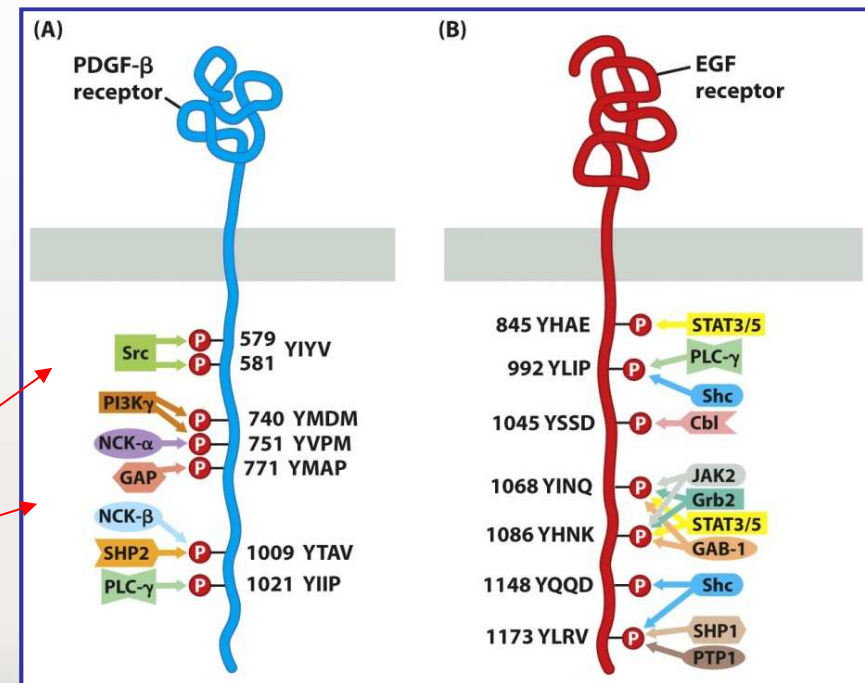
- zprostředkovávají reakce na růstové faktory/hormony
- disponují proteinkinázovou aktivitou závislou na ligandu
- glykozylovaná N-koncová doména směřuje ven z buňky
- středová hydrofobní doména prochází membránou
- C-koncová doména má kinázovou aktivitu nebo je schopna asociovat s nitrobuněčnými PTK – určuje typ signální dráhy a tím také charakter buněčné odpovědi



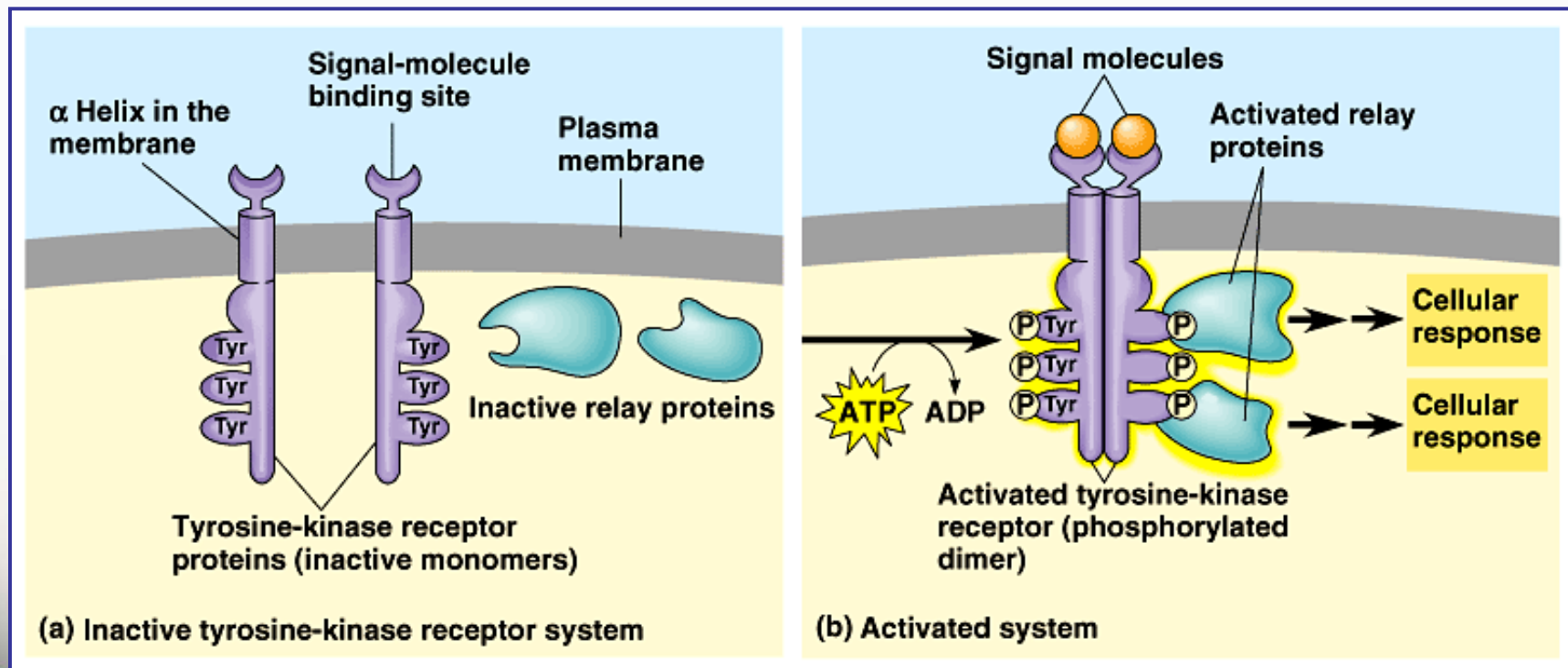
Receptorové tyrozinkinázy

- cytoplazmatická doména má tyrozinkinázovou aktivitu závislou na vazbě ligandu
- většinou polypeptidový řetězec, který prochází membránou jediným α -helixem (možnost laterálního pohybu membránou)
- vazba ligandu vyvolá dimerizaci receptoru, následkem je transfosforylace partnerské podjednotky

K fosforylovaným AK zbytkům se doménami **SH2** váže řada různých proteinů

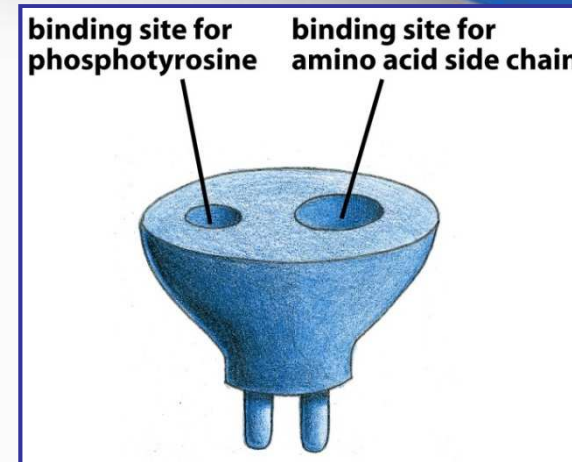


Přenos signálu receptorovými PTK



Doména SH2

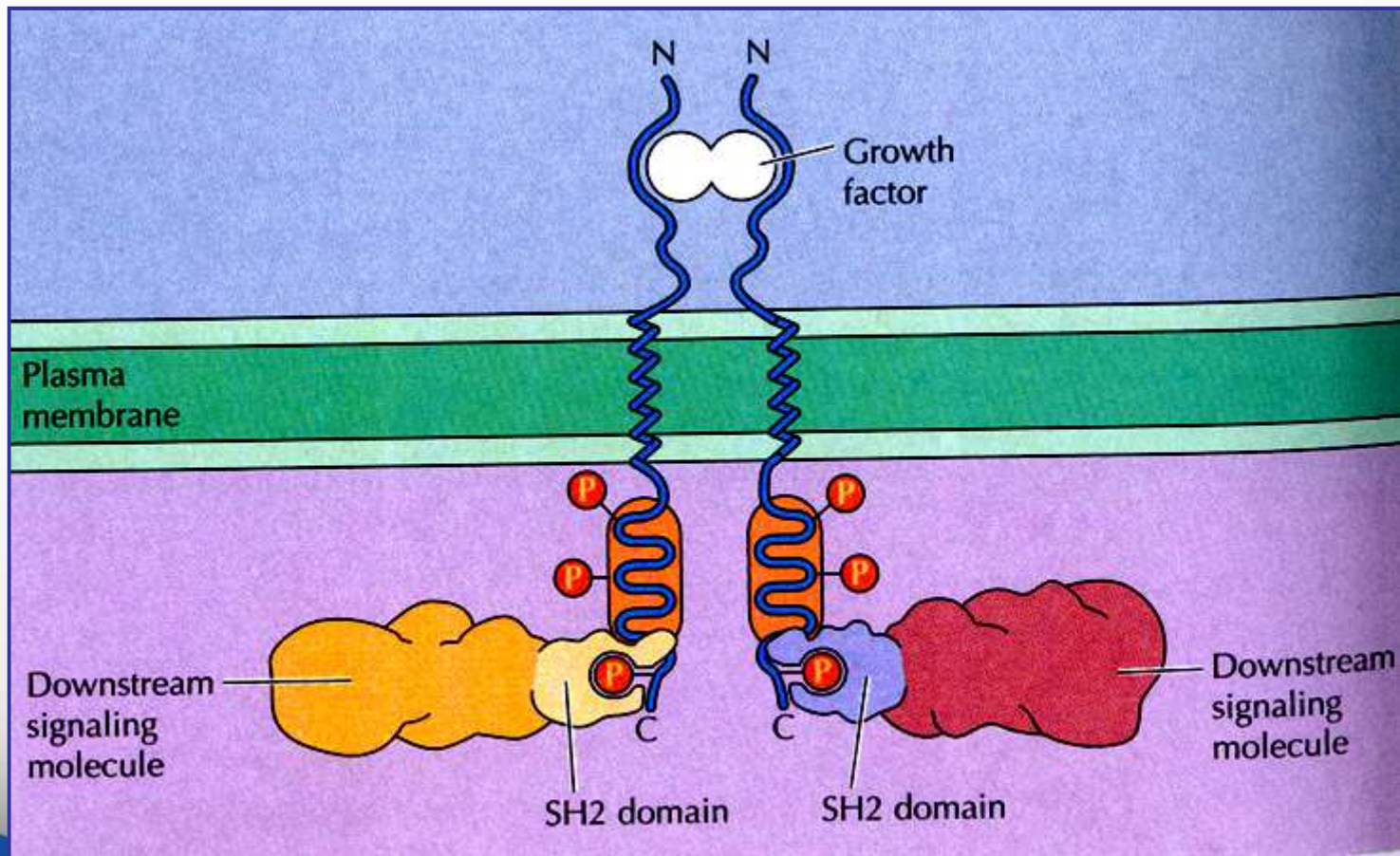
- „**S**rc **h**omology“
- velikost cca 100 aminokyselin
- nitrobuněčný „receptor“, který je součástí struktury některých proteinů
- rozeznává a váže proteinové domény, které obsahují specifické fosfotyrosinové zbytky a krátký specifický oligopeptid dlouhý 3 – 6 zbytků AK, který s fosfotyrosinem sousedí



Význam:

- zajišťuje protein-proteinovou interakci
- následkem je aktivace další části signální dráhy

Doména SH2 v signálních drahách



Doména SH2 v signálních drahách

- transfosforylace receptoru vede k vytvoření specifické řady fosforylovaných tyrozinů v cytozolické doméně
- fosfotyroziny vyhledány různými cytoplazmatickými proteiny s doménami SH2: enzymy metabolismu fosfolipidů (fosfolipáza C), proteiny G (Grb2, Shc, Ras), transkripčními faktory (STAT)
- po spojení s receptorem mohou být tyto substráty receptorovou kinázou fosforylovány

Důsledky interakce domény SH2 s fosfotyrozinem

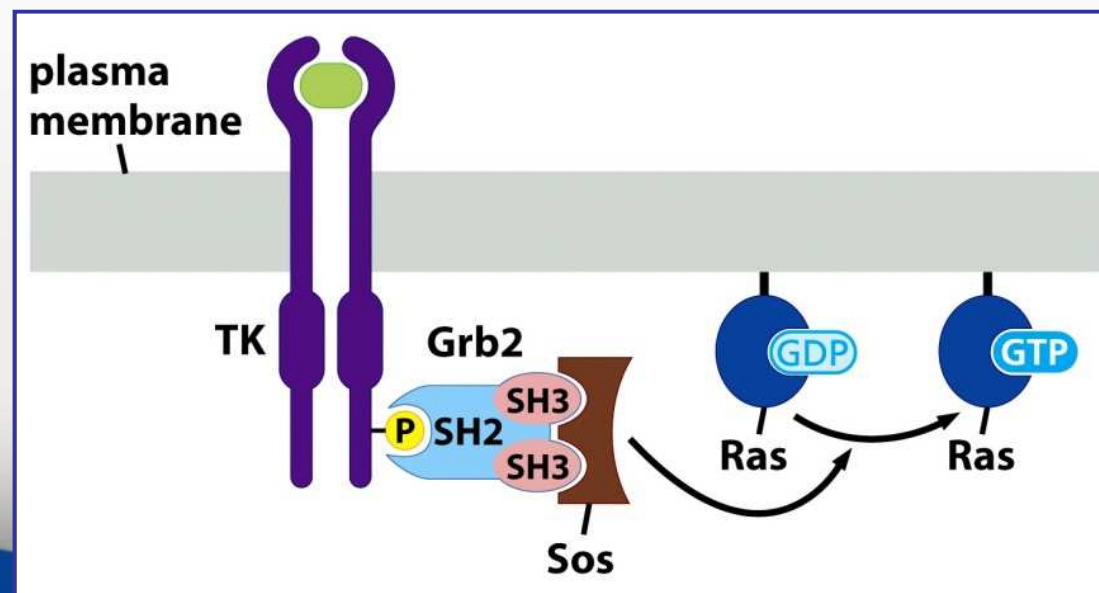
závisí na povaze cílového proteinu

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

Příklad zapojení domény SH2 do signalizací: dráha Ras

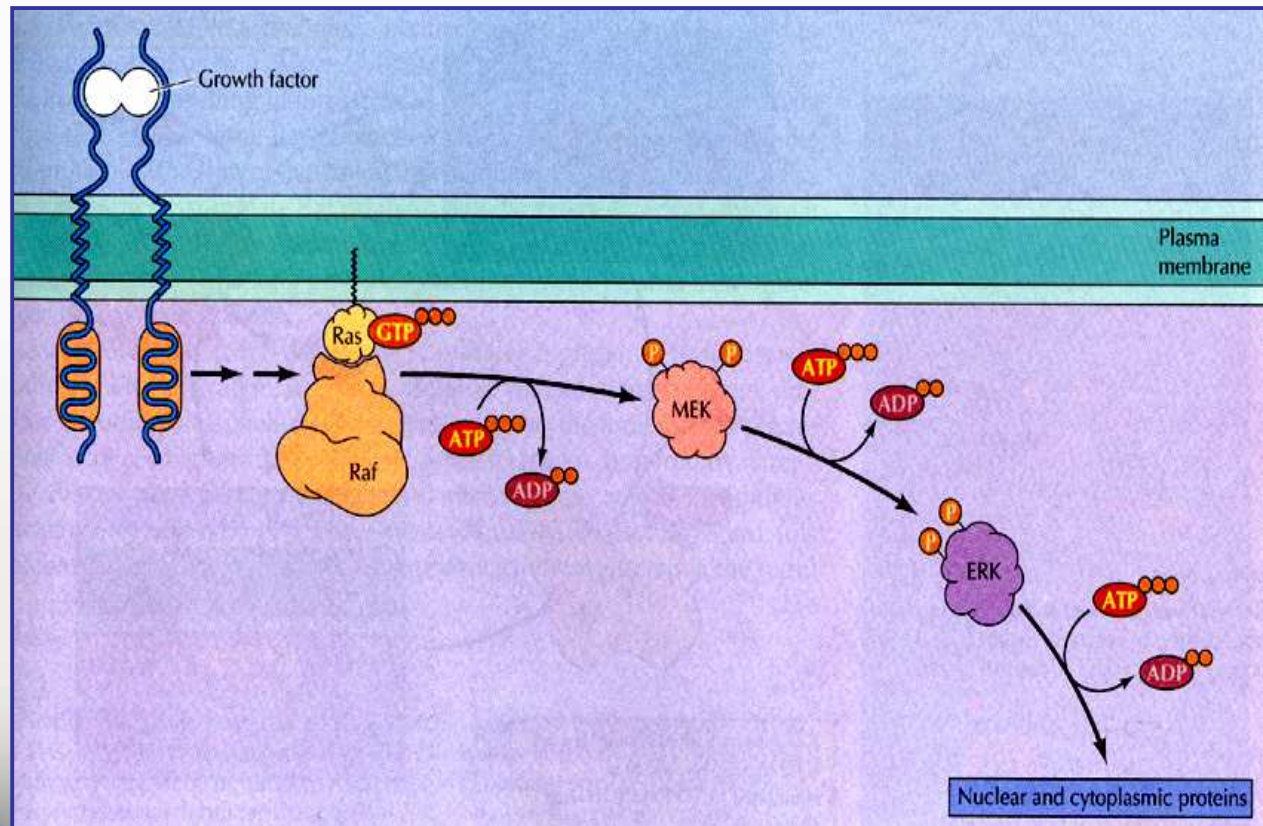
součást mitogenní signální kaskády – **ligand/receptor-Grb2-Sos-Ras**

- adaptérový protein **Grb2** obsahuje domény SH2 a SH3
- doménou SH2 se spojuje s aktivovanou receptorovou PTK
- doménou SH3 se spojuje s proteinem **Sos**
- **Sos je GEF protein** - zajišťuje výměnu GDP za GTP na proteinu **Ras**



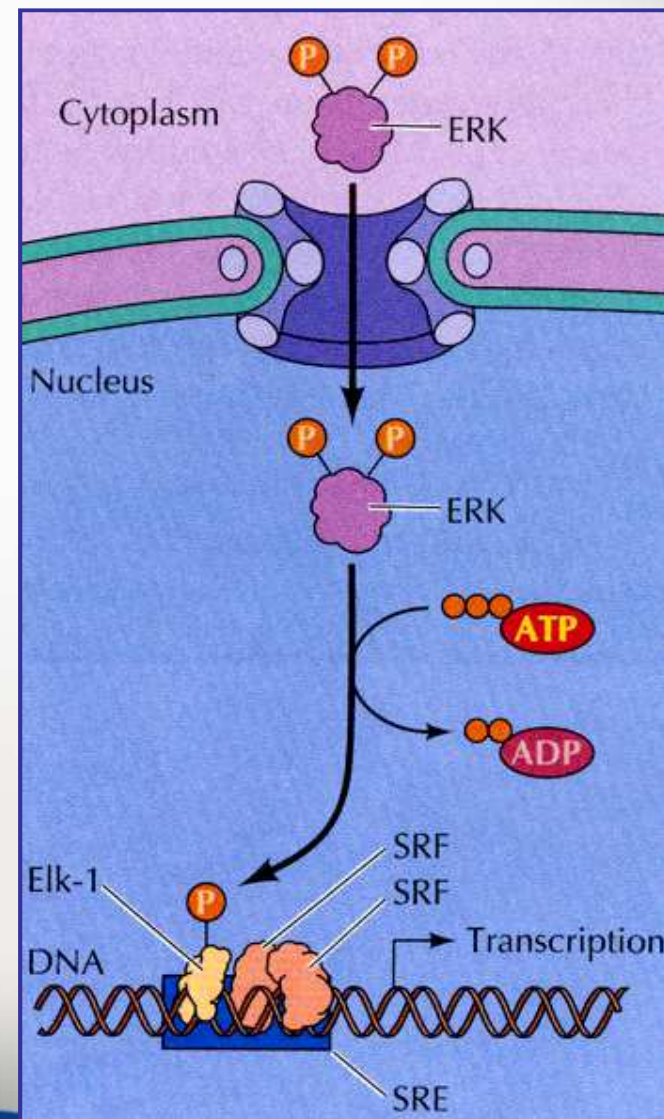
Ras: součást signální dráhy MAP

- aktivovaný Ras váže a aktivuje efektory - Raf, fosfoinositid kinázu 3, Ral
- **Raf** je serin-treonin kináza, která spouští kaskádu kináz **MAP (Raf-MEK-ERK)**

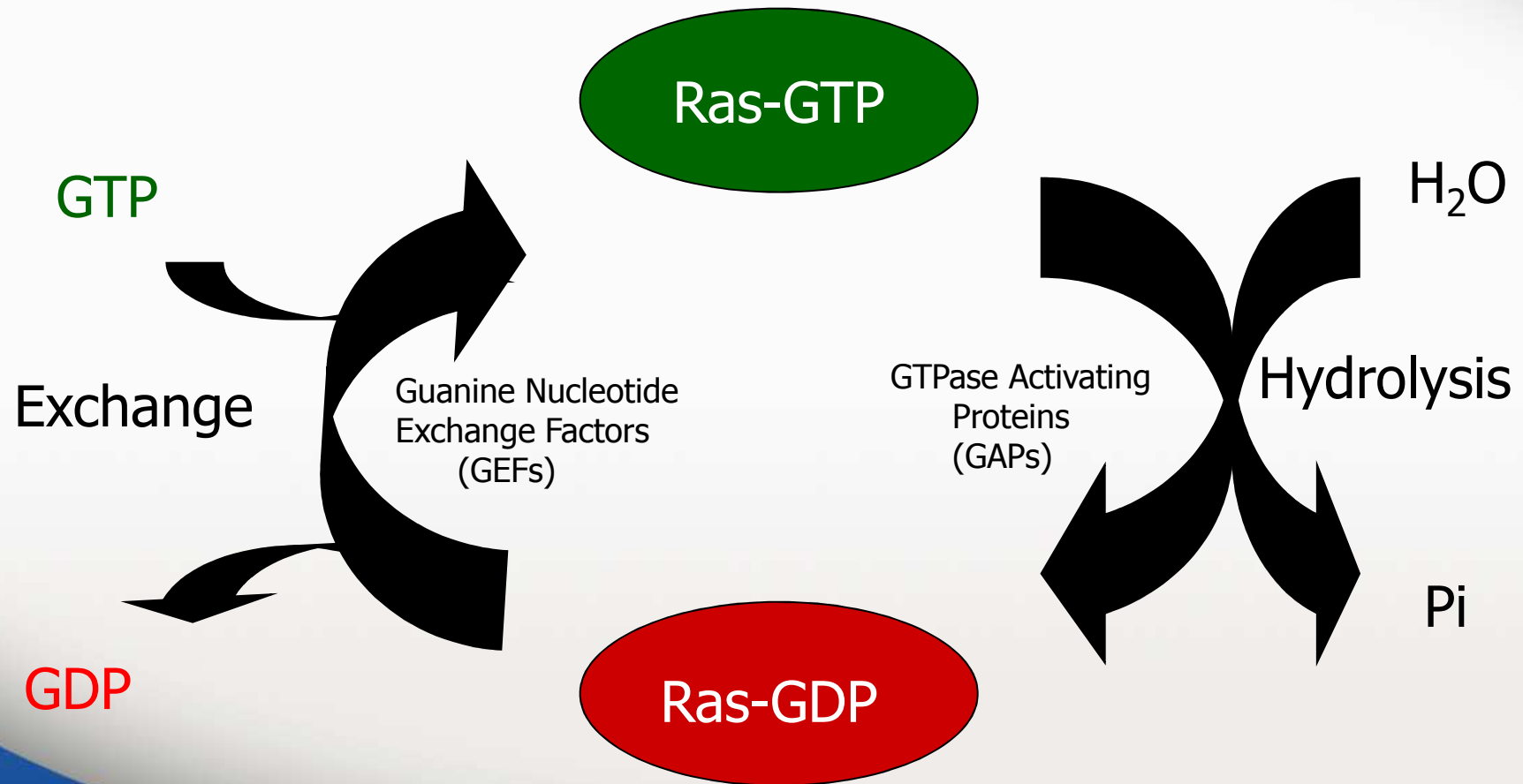


Ras: součást signální dráhy MAP

- aktivovaná kináza **ERK** přechází do jádra, kde fosforyluje např. transkripční faktor **Elk-1**
- Elk-1 **indukuje transkripci** genů potřebných pro proliferaci buňky

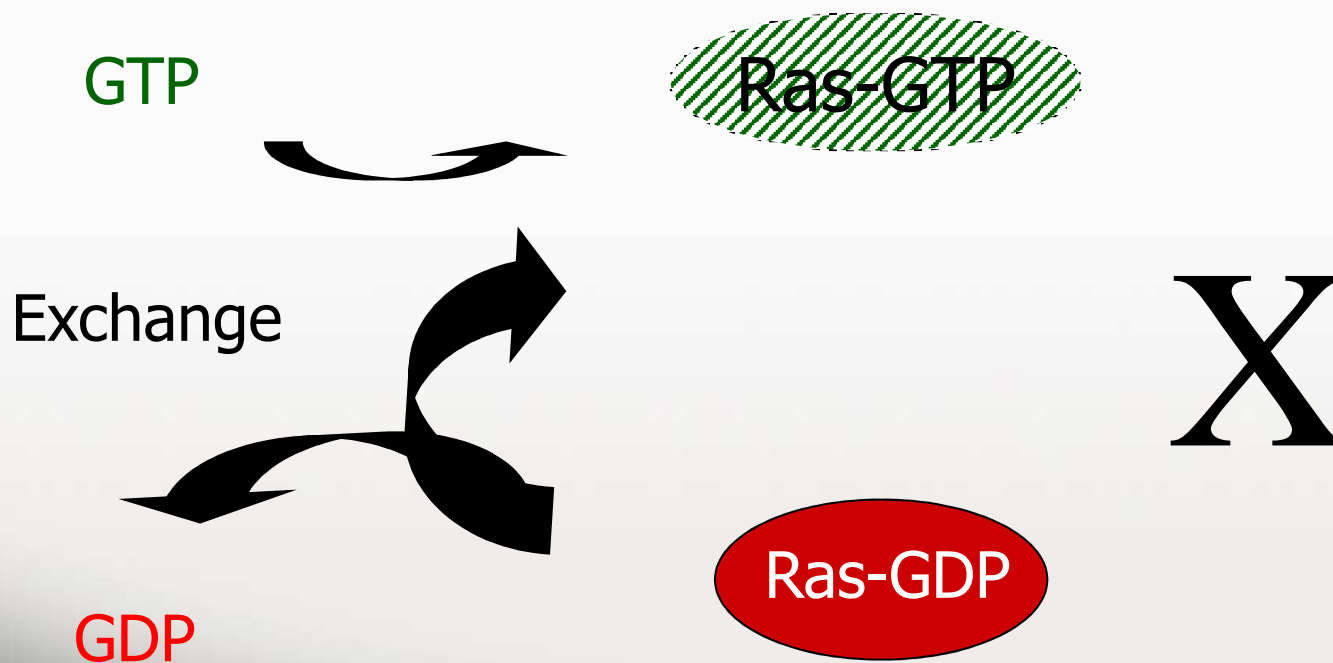


Aktivace a inaktivace Ras



Ras a nádory

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

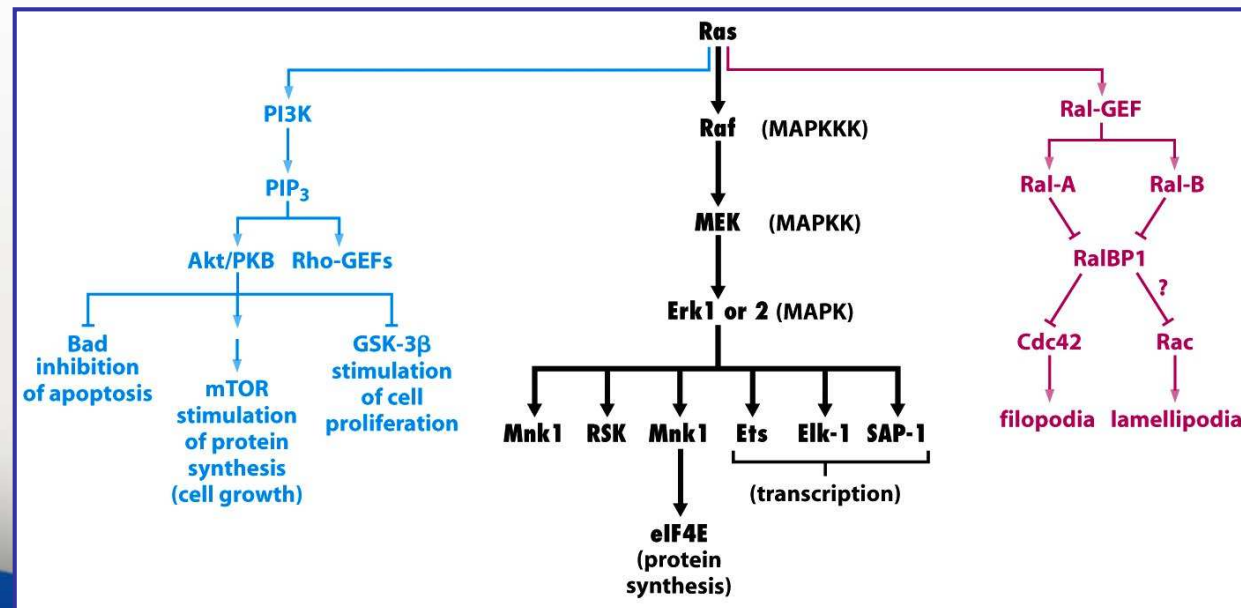


Kinázová kaskáda MAP

- **MAPK („mitogen-activated protein kinases“)**
- rodina serin/treonin proteinových kináz
- vysoká konzervativnost v eukaryontních buňkách
- účast na procesech proliferace, diferenciace, pohybu a buněčné smrti
- MAPK (ERK) jsou fosforylovány a aktivovány kinázami MAPK (MAPKK, MEK)
- MAPKK jsou fosforylovány a aktivovány kinázami kináz MAPK (MAPKKK, Raf)
- MAPKKK jsou aktivovány interakcí s malými G-proteiny (např. Ras) nebo jinými kinázami, které jsou napojeny na povrchové receptory

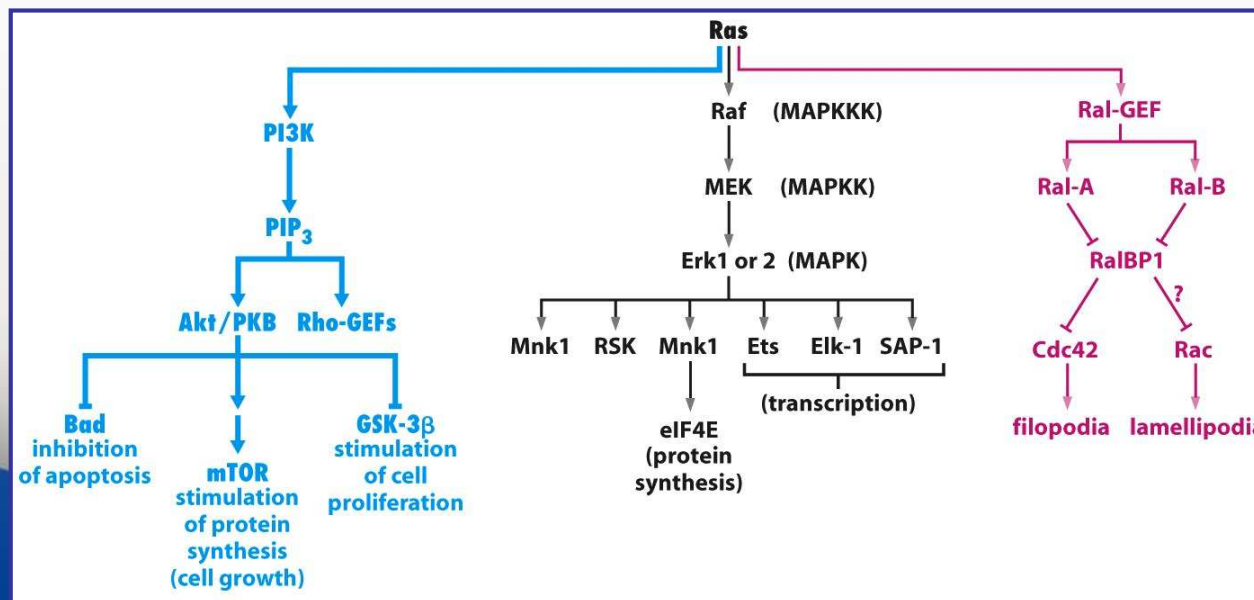
Efektory Ras: kináza Raf (MAPKKK)

- **Ras** přitahuje cytozolickou kinázu **Raf (MAPKKK)** a aktivuje ji
- kináza Raf fosforyluje kinázu **MEK (MAPKK)**
- kináza MEK fosforyluje 2 další kinázy **Erk1** nebo **Erk2 (MAPK)**
- kinázy Erk fosforylují své substráty: transkripční faktory (**Ets, Elk-1, SAP-1**) nebo další kinázy (**Mnk1**).
- Ets řídí expresi genů kódujících cyklin D1, Fos, atd.)



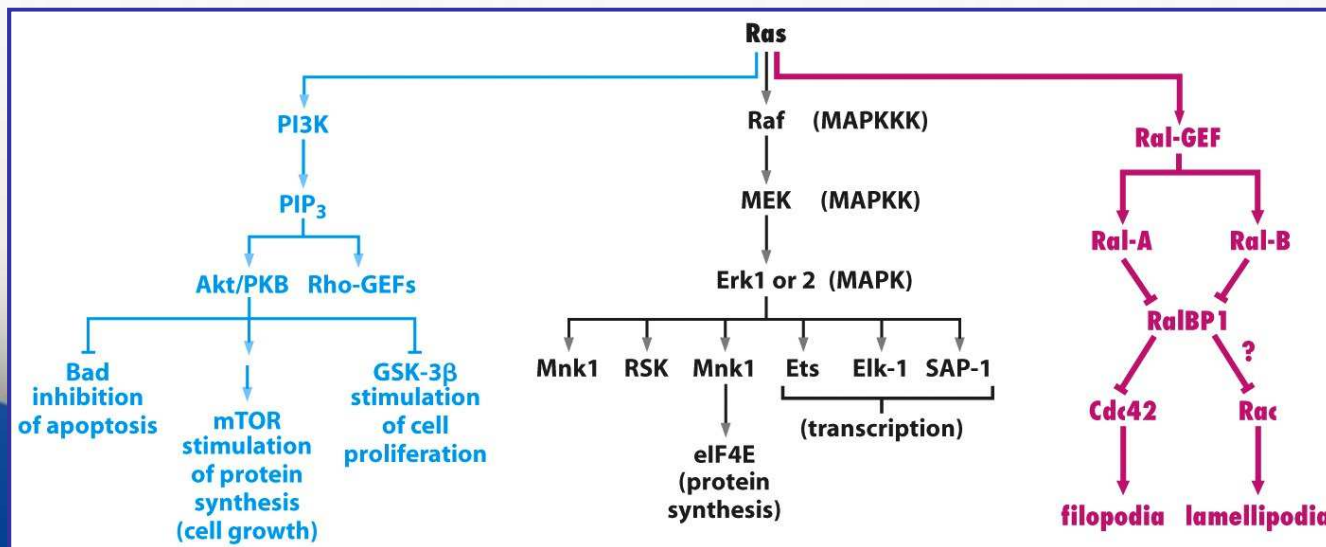
Efektory Ras: Fosfatidylinositol 3 kináza

- Ras aktivuje **fosfatidylinositol 3 kinázu (PI3K)**: vzniká **fosfatidylinositol 3 fosfát (PIP₃)**, který přitahuje proteiny s doménou PH („pleckstrin **h**omology“): např. **kinázu Akt** (tj. protein kinázu B), která se tímto aktivuje a ovlivní aktivitu svých substrátů, které řídí životaschopnost, růst a proliferaci buněk
- další substráty s PH doménou: **rodina malých proteinů typu Rho vážoucích GTP** (ovlivňují dynamiku cytoskeletu)



Efektory Ras: proteiny Ral

- **Ral-A** a **Ral-B** mají vysokou homologii s Ras
- aktivace Ral je založena na výměně GDP za GTP
- asociace s Ras způsobuje konformační změnu Ral-GEF vedoucí k aktivaci GEF a následnému přenosu GTP na Ral
- aktivované proteiny Ral-A a Ral-B ovlivňují své substráty, např. inhibují **Cdc42** a **Rac** (tj. členy rodiny Rho ovlivňující buněčnou polaritu, adhezi, migraci, proliferaci, aktinový cytoskelet a vezikulární transport)



Efektory Ras: Rac a Cdc42

- **Cdc42** kontroluje organizaci aktinových vláken a filopodií (malých extensí cytoplazmy, kterými si buňka „osahává“ své okolí)
- **Rac** kontroluje tvorbu lamelipodií (rozsáhlých výběžků cytoplazmy, které se tvoří v souvislosti s pohybem buněk)

<https://www.youtube.com/watch?v=vAaQ4WS8QhI>

https://www.youtube.com/watch?v=t3u2_pAEB94

Objev onkogenu *ras*: rok 1982

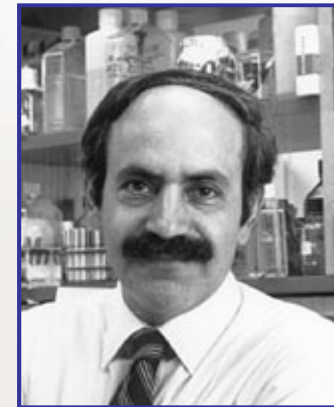


Mariano Barbacid



Courtesy of Cold Spring Harbor Laboratory.
Noncommercial, educational use only.

Michael Wigler

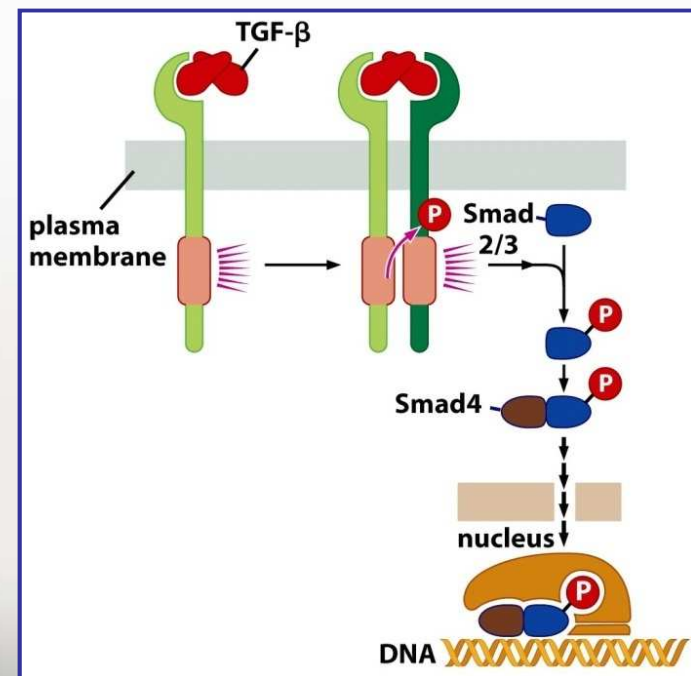


Robert Weinberg

Receptorové serinové/treoninové kinázy

- složené ze dvou odlišných podjednotek, každá z nich má cytoplazmatickou doménu se serin/treonin-kinázovou aktivitou
- aktivaci zajišťuje dvojice spojených ligandů (**ligandový dimer**)
- obě podjednotky receptoru se podílejí na aktivaci transkripčních faktorů **Smad**
- proteiny Smad regulují expresi genů, jejichž produkty řídí buněčnou proliferaci a diferenciaci

Příklady ligandů:
transformující růstový faktor β
aktivin
kostní morfogenní proteiny



Ligandy pro receptorové serinové/treoninové kinázy

TGF- β

- inhibuje proliferaci buněk
- stimuluje tvorbu extracelulární matrix – kolagenu, proteoglykanů, a adhezivních glykoproteinů – podmínka správného vývoje orgánů

Ztráta receptoru pro TGF- β : vznik některých nádorů, ztráta schopnosti reagovat na TGF- β zastavením růstu buněk

Aktivin

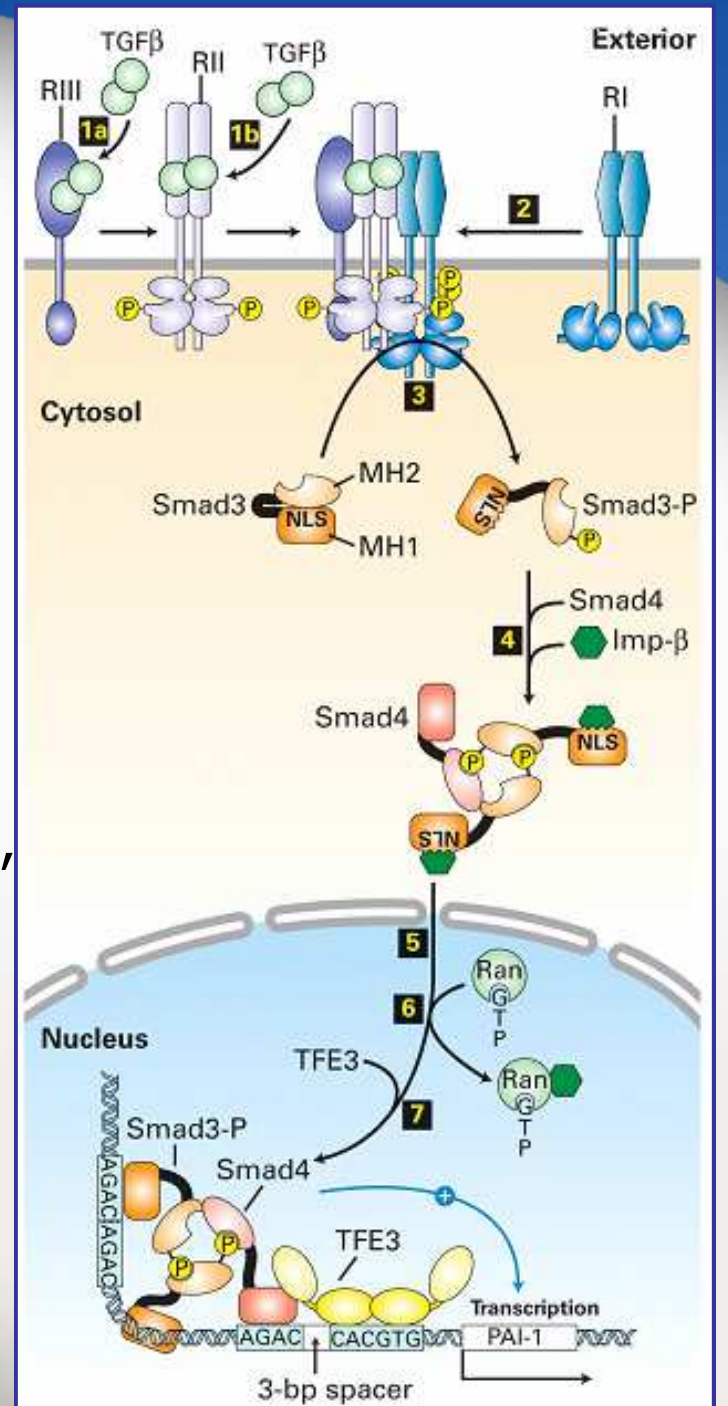
ovlivňuje diferenciaci raných embryonálních buněk při formování zárodečných vrstev

Kostní morfogenní proteiny

ovlivňují diferenciaci osteoblastů (a dalších buněk)

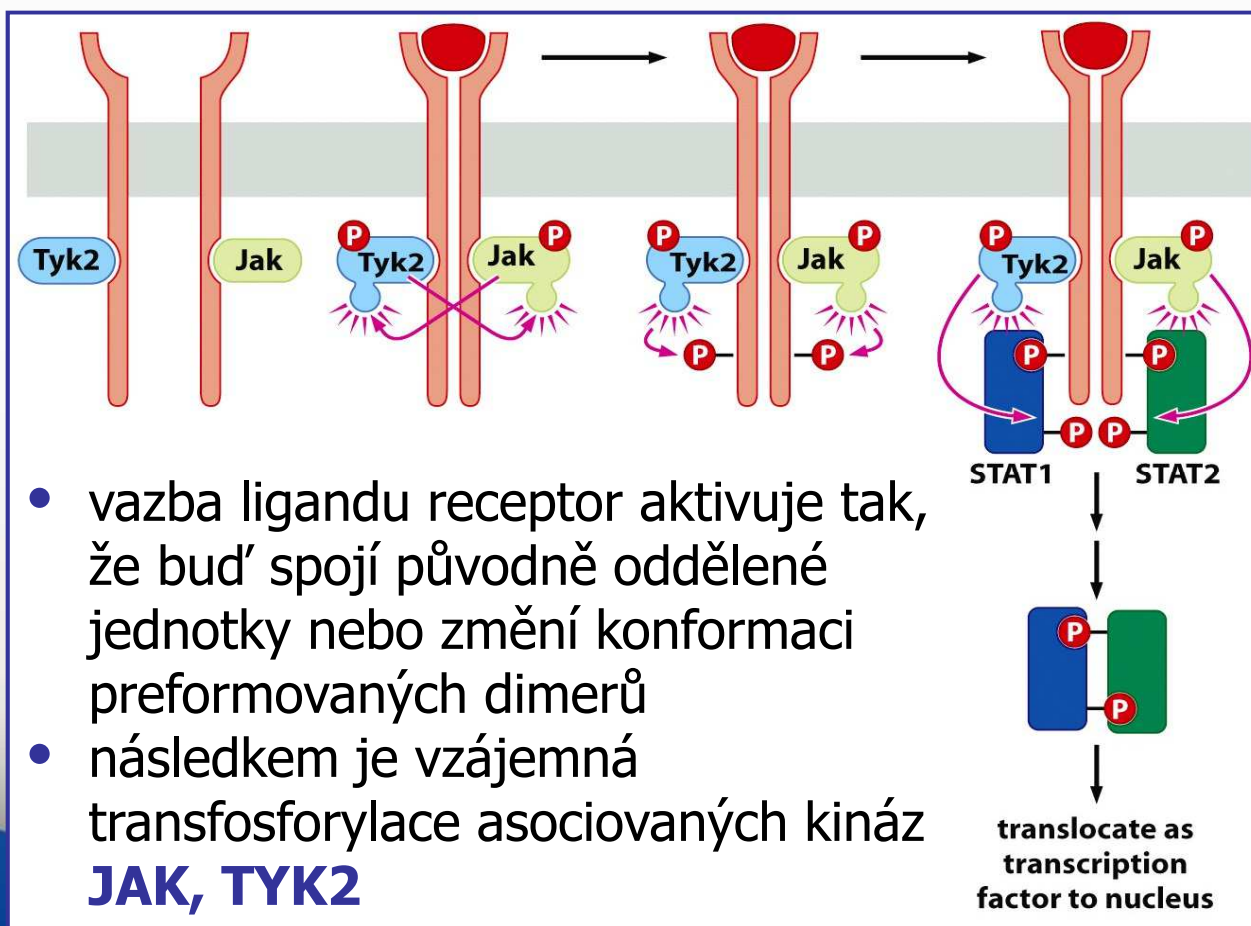
Signalizace TGF β

- seskupení receptorů TGF β RI-RIII
- aktivovaný RI fosoryluje transkripční faktor
- **Smad3** nebo jiný R-Smad („receptor-regulated Smad“): změna konformace, která obnaží jaderný lokalizační signál **NLS**
- 2 fosforylované molekuly Smad3 interagují s proteinem **Smad4** a **importinem β**
- vzniklý cytozolový komplex přechází do jádra, kde se importin uvolňuje
- Smad3/Smad4 se spojí s transkripčním faktorem **TFE3**: aktivační komplex, který se váže na regulační sekvence cílových genů



Receptory pro cytokiny

cytoplazmatická doména nemá enzymovou aktivitu, ale nekovalentně váže tyrozinové kinázy **Jak/Tyk**



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, lokalizovány v cytoplazmě

Signalizace:

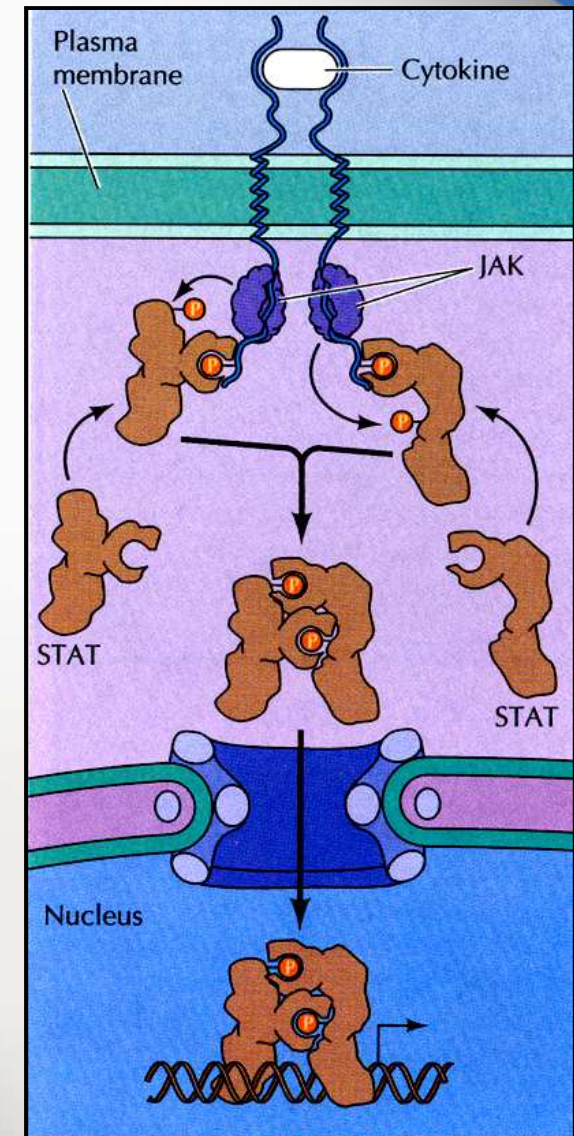
- Jak fosforyluje STAT a stimuluje tak jeho translokaci do jádra, kde aktivuje transkripci genů
- systém zajišťuje přímé spojení mezi povrchem buňky a jádrem

Signální dráha Jak/STAT

Jak se konstitutivně asociuje s receptorem

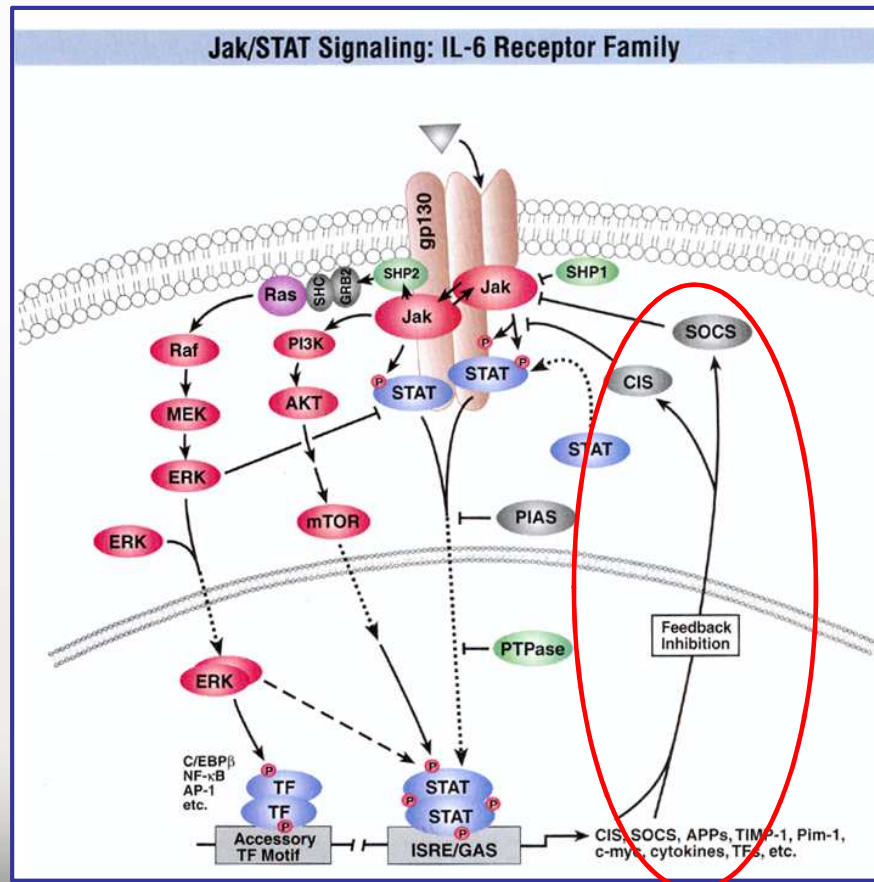
- stimulace receptoru **cytokinem**
- **dimerizace** receptoru
- **aktivace** kináz **Jak, Tyk2**
- **fosforylace** receptoru
- fosforylovaný receptor **interaguje s** doménou SH2 proteinu **STAT**
- **Jak/Tyk2 fosforyluje STAT**
- fosforylovaný **STAT** se odděluje od receptoru, dimerizuje a **přechází do jádra**
- v jádře STAT zajistí **aktivaci transkripce** cílových genů

Jak fosforylují i jiné signální proteiny – propojení různých signálních drah



Signální dráha Jak/STAT

proteiny **SOCS** ("suppressors of cytokine signaling") a fosfatáza **SHP1** tlumí signální dráhu JAK/STAT **zpětnou vazbou**



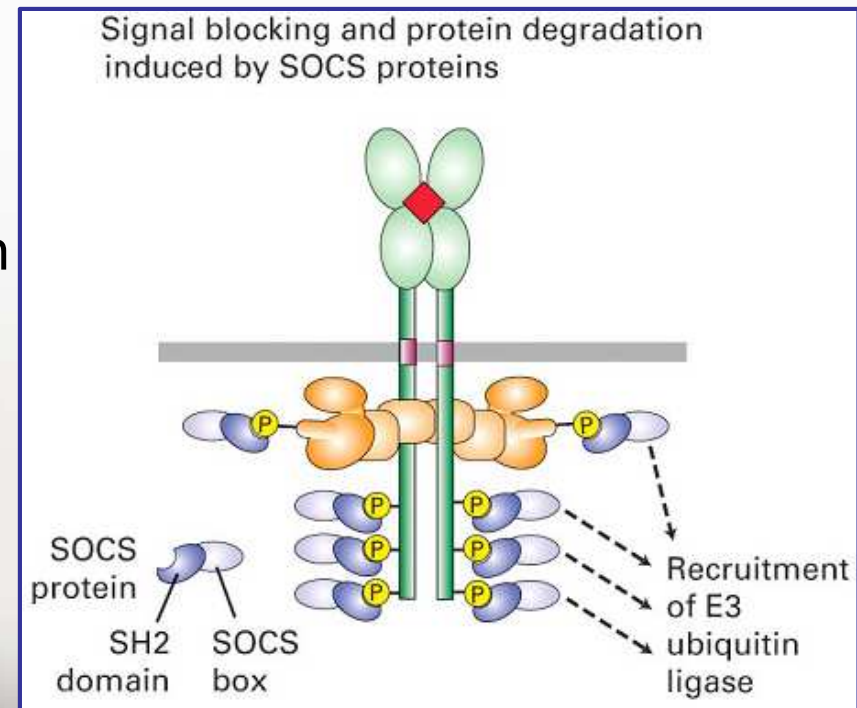
Negativní regulace signalizace dráhy Jak/STAT

Proteiny SOCS

- negativní regulátory signalizace cytokiny
- kódovány geny, jejichž transkripce je indukována proteiny STAT

2 mechanismy:

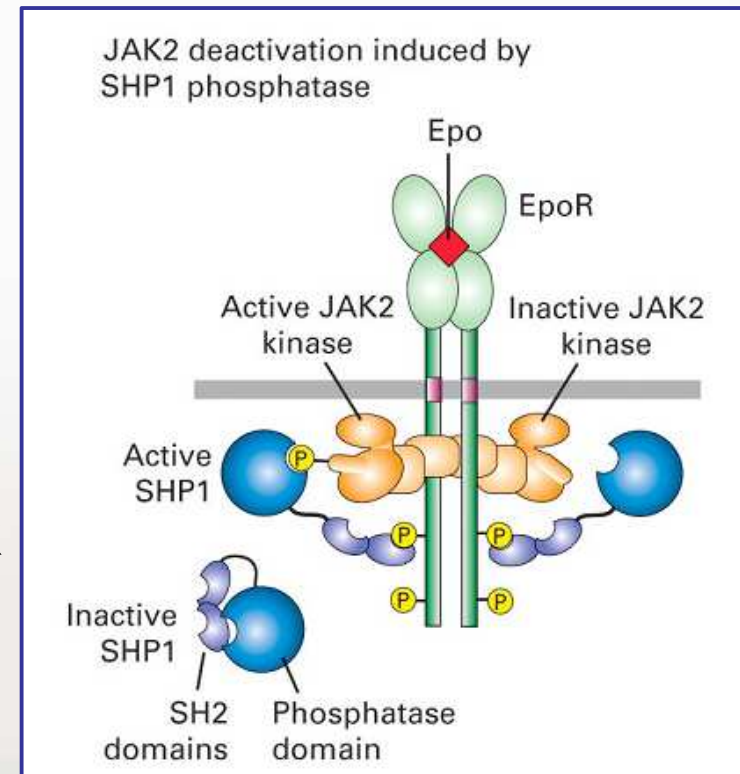
- **doménou SH2** se proteiny SOCS vážou na fosfotyroziny aktivovaných receptorů: znemožnění vazby dalších proteinů
- **doménou SOCS box** je zajištěna interakce SOCS s ubikvitin ligázou: polyubikvitinace a likvidace JAK proteazomem



Negativní regulace signalizace dráhy Jak/STAT

Fosfatázou SHP1

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



Receptory pro cytokiny

Příklady ligandů:

Růstový hormon řídí růst a vývoj těla (mutace receptoru způsobují růstovou nedostatečnost)

Erythropoietin reguluje proliferaci a diferenciaci prekurzorů červených krvinek (mutace receptoru způsobují poruchy tvorby erytrocytů)

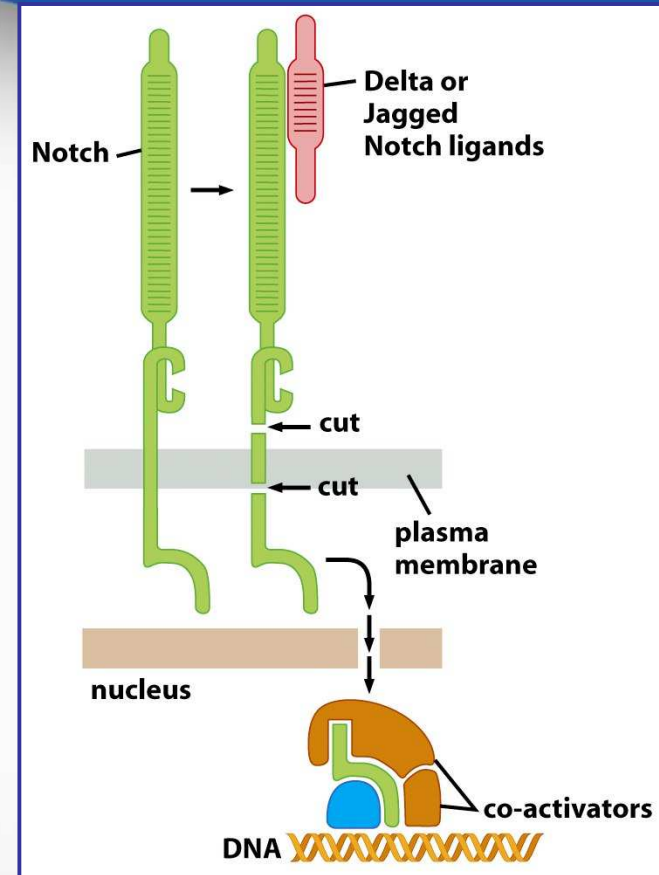
Interleukiny řídí buňky imunitního systému (mutace receptoru způsobují imunodeficienci)

Signalizace Notch

- zapojené do signalizací spojených s raným embryonálním vývojem
- jako ligandy slouží proteiny Delta (u much) obecně NotchL
- po aktivaci ligandem receptory Notch aktivují signální dráhu ovlivňující **vývoj** organismu

Struktura:

- několik extracelulárních domén typu EGF, jedna transmembránová doména, nitrobuněčná doména bez enzymové aktivity
- po aktivaci dochází ke 2 proteolytickým reakcím (1x v ektodoméně, 1x v transmembránové doméně), produkt štěpení ztrácí ukotvení k membráně, uvolňuje se do cytozolu a později do jádra, kde ovlivňuje transkripci



Signalizace Hedgehog

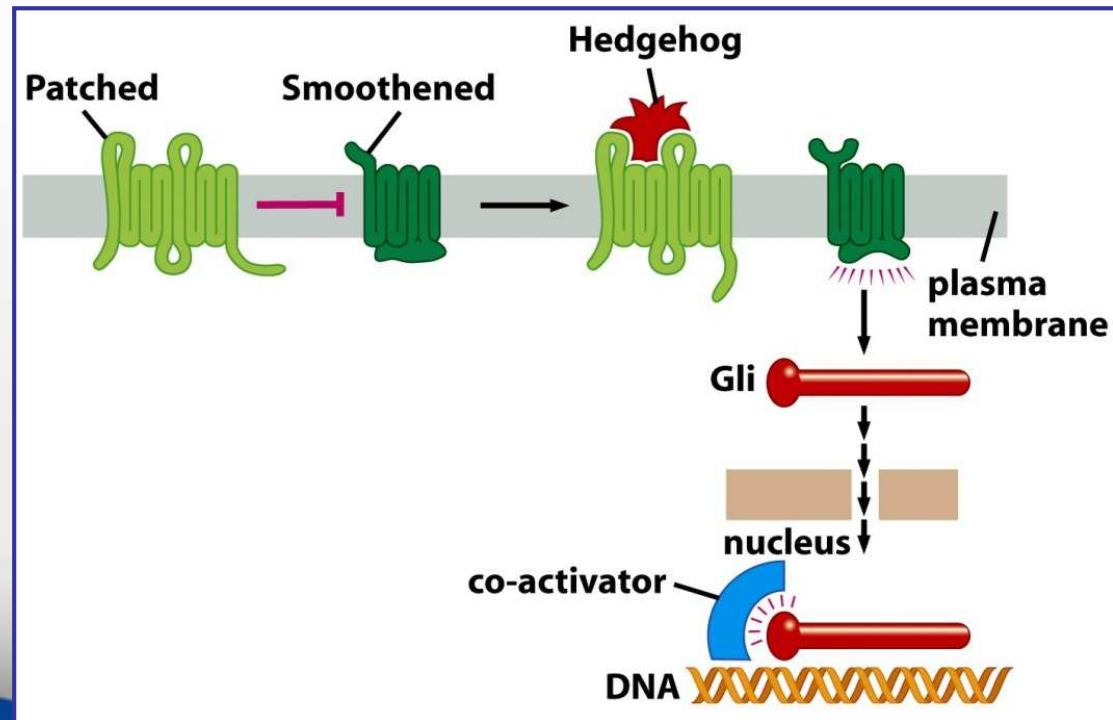
- **Hedgehog** je proteinový ligand objevený u drozofily
- na přijetí signálu Hedgehog se podílejí membránové proteiny **Patched** (receptor) a **Smoothened**

Funkce:

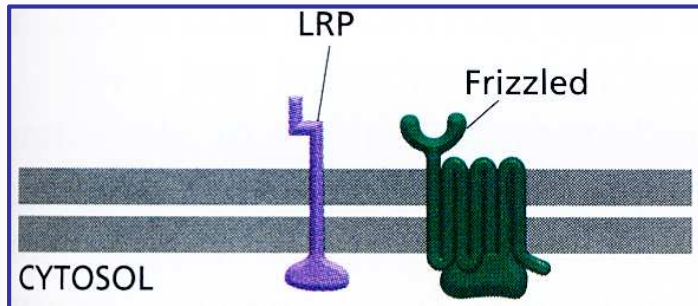
- nezbytný pro segmentování embrya
- homologní struktury jsou popsány u člověka: řídí diferenciaci mnoha tkání, např. nervového systému
- mutace v jednom ze tří známých genů hedgehog způsobují závažné vývojové poruchy
- mutace v genu patched způsobují karcinom kůže

Signalizace Hedgehog

- za nepřítomnosti ligandu Hedgehog: Patched inhibuje Smoothened
- za přítomnosti **Hedgehog**: naváže se na **Patched**, který uvolňuje **Smoothened**
- uvolněný Smoothened stabilizuje protein **Gli**
- Gli se transportuje do jádra, kde se podílí na tvorbě funkčních transkripčních faktorů



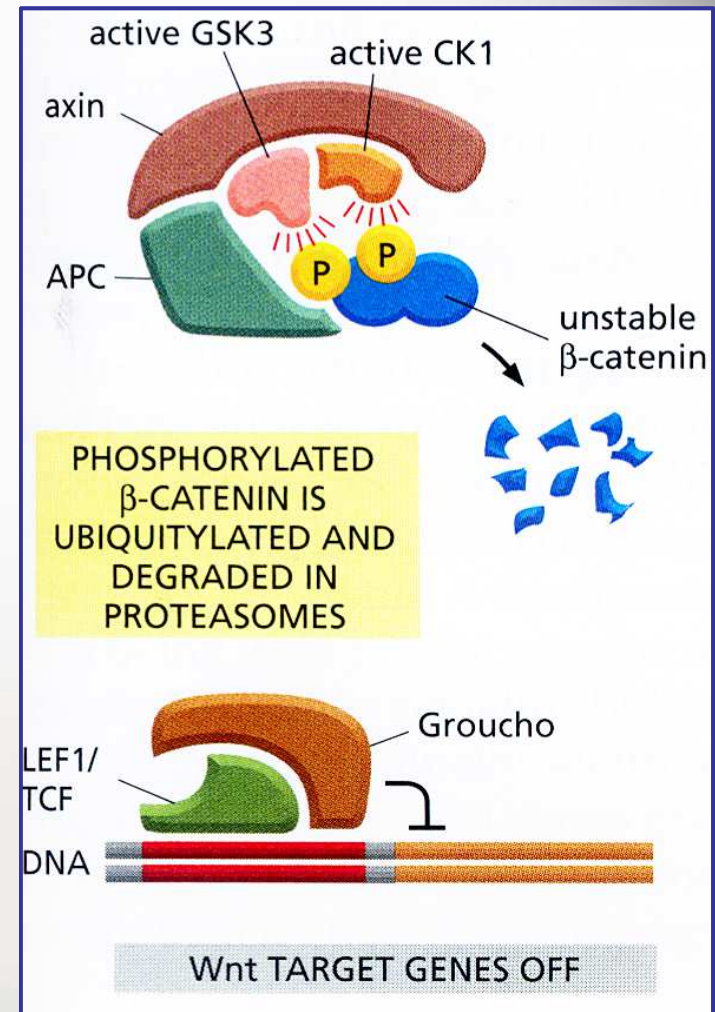
Signalizace Wnt



- proteiny **Wnt** jsou signální molekuly ovlivňující embryonální vývoj
- vážou se na povrchové receptory rodiny **Frizzled** a koreceptor **LRP**
- aktivované receptory Frizzled přes protein **Dishevelled** signál předávají dále do buňky – rozhodují o hladině volného **β -kateninu**

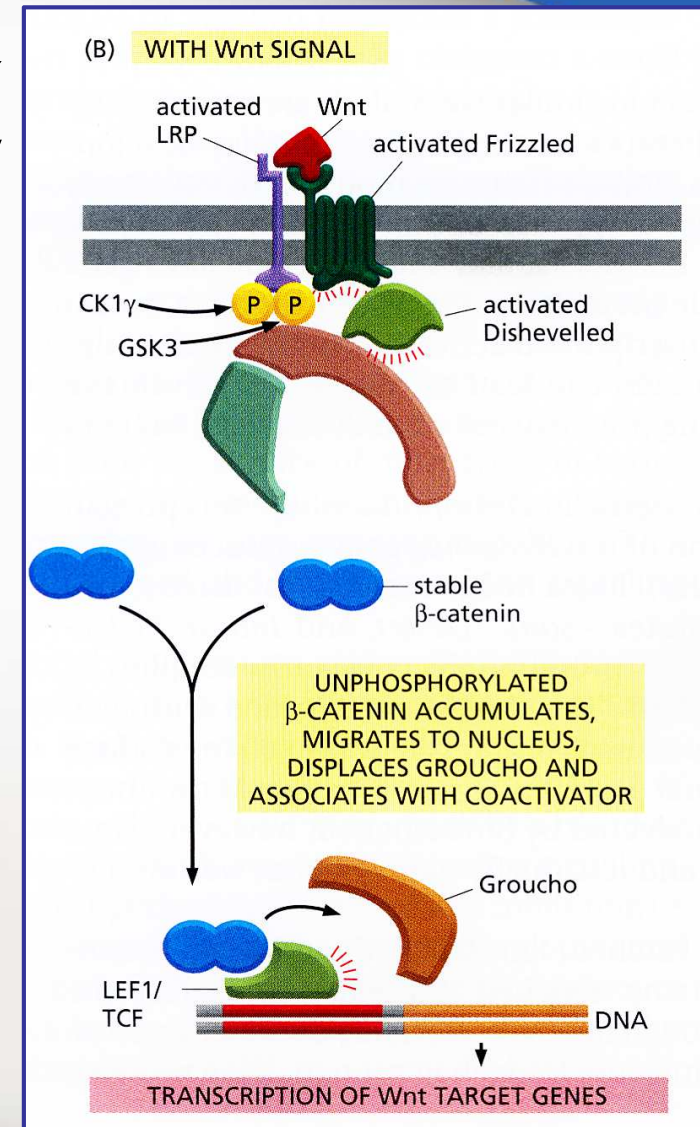
β-katenin

- v embryonálních buňkách obvykle vázán s kadheriny, účast na mezibuněčných spojích
- pokud není spojen s kadheriny, podléhá rychlé degradaci v degradačním komplexu složeném z proteinů: casein kinase 1 (CK1), glycogen synthase kinase 3 (GSK3), axin a Adenomatous polyposis coli (APC), kde fosforylace β-kateninu kinázou CK1 umožňuje jeho následnou fosforylaci kinázou GSK3, čímž je umožněna jeho ubikvitinace a degradace v proteozomu



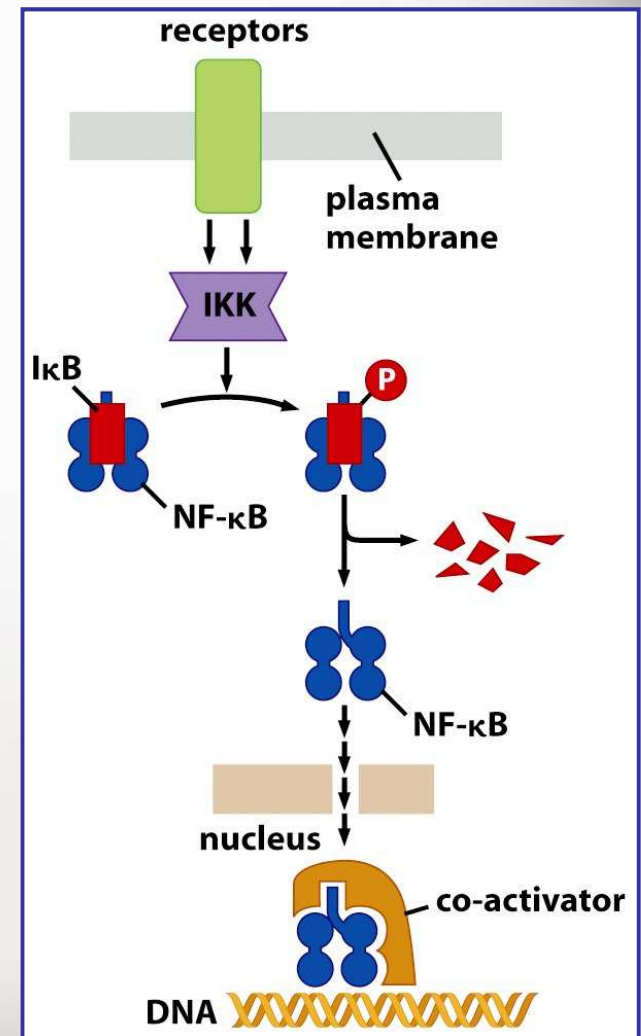
β-katenin a Wnt

- když se naváže Wnt na Frizzled a LRP, vytvoří oba receptory komplex s axinem a APC, který je s pomocí aktivovaného Dishevelled fosforylován kinázami GSK3 a CK1
- komplex je tím inaktivován, β-katenin se nefosforyluje a tím zůstává stabilní
- β-katenin se hromadí, přechází do jádra, kde ovlivní genovou expresi
- mezi geny aktivované Wnt patří např. protoonkogen *c-myc* (stimuluje proliferaci buněk)
- mutace v genu *APC* jsou velmi časté u střevních nádorů (inhibují schopnost proteinu APC vázat β-katenin, který se pak hromadí a ovlivněním genové exprese přispívá k maligní transformaci buněk)



Receptory zajišťující fosforylaci I κ B

- transkripční faktory rodiny NF κ B jsou regulovány na úrovni translokace do jádra
- inhibitory I κ B zadržují NF κ B v cytoplasmě
- řada receptorů po aktivaci ligandem dokáže aktivovat kinázu IKK, fosforylující I κ B
- fosforylovaný I κ B je předurčen k proteolytické degradaci



Souhrn

- buňky komunikují prostřednictvím signálních molekul
- signály buňky zachycují signály specifickými receptory na povrchu nebo uvnitř buněk
- rozmanitými nitrobuněčnými signálními drahami se signál o interakci ligandu s receptorem dostává k buněčným efektorům, který zajistí adekvátní reakci buňky
- schopnost produkovat a/nebo detekovat signály a adekvátně na ně reagovat je podmínkou řádného vývoje embrya i udržování homeostáze dospělého organismu v proměnlivém prostředí

