MUNI
SCI

Mezibuněčná signalizace
–
úvod

doc. RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.
Ústav experimentální biologie PřF MU

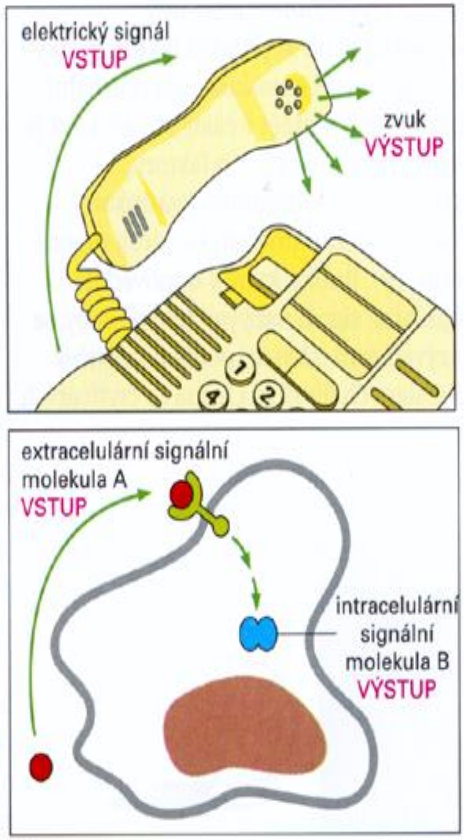
Bi7005 Buněčné regulace / 1 / 20.9.2023

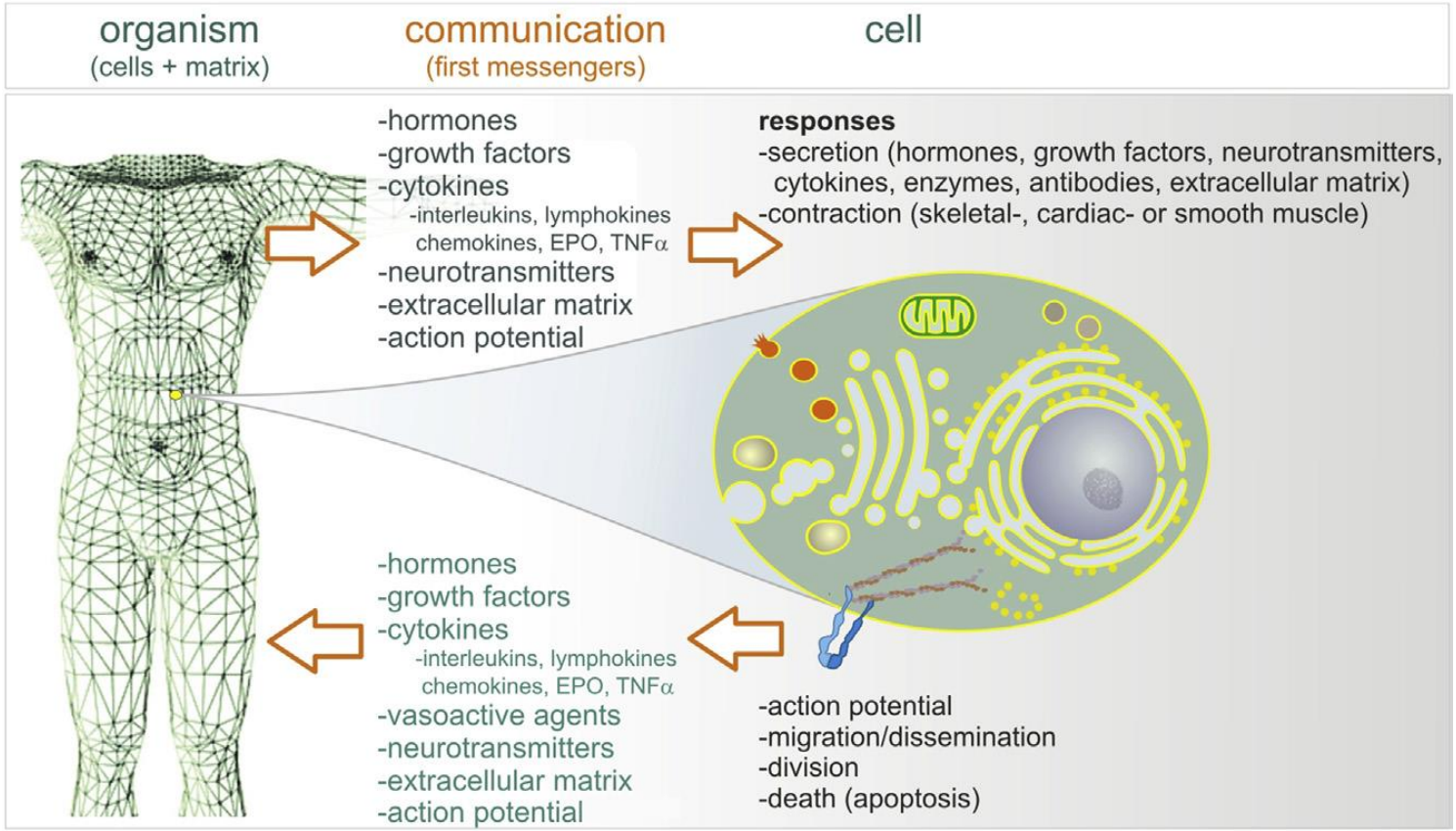
OSNOVA:

- Mezibuněčná komunikace
- Dosah signálů
- Reakce buňky na signál
- Druhy signálů
- Přenos signálů
- Signální kaskády
- Regulace signalizace

SIGNALIZACE ≈ KOMUNIKACE

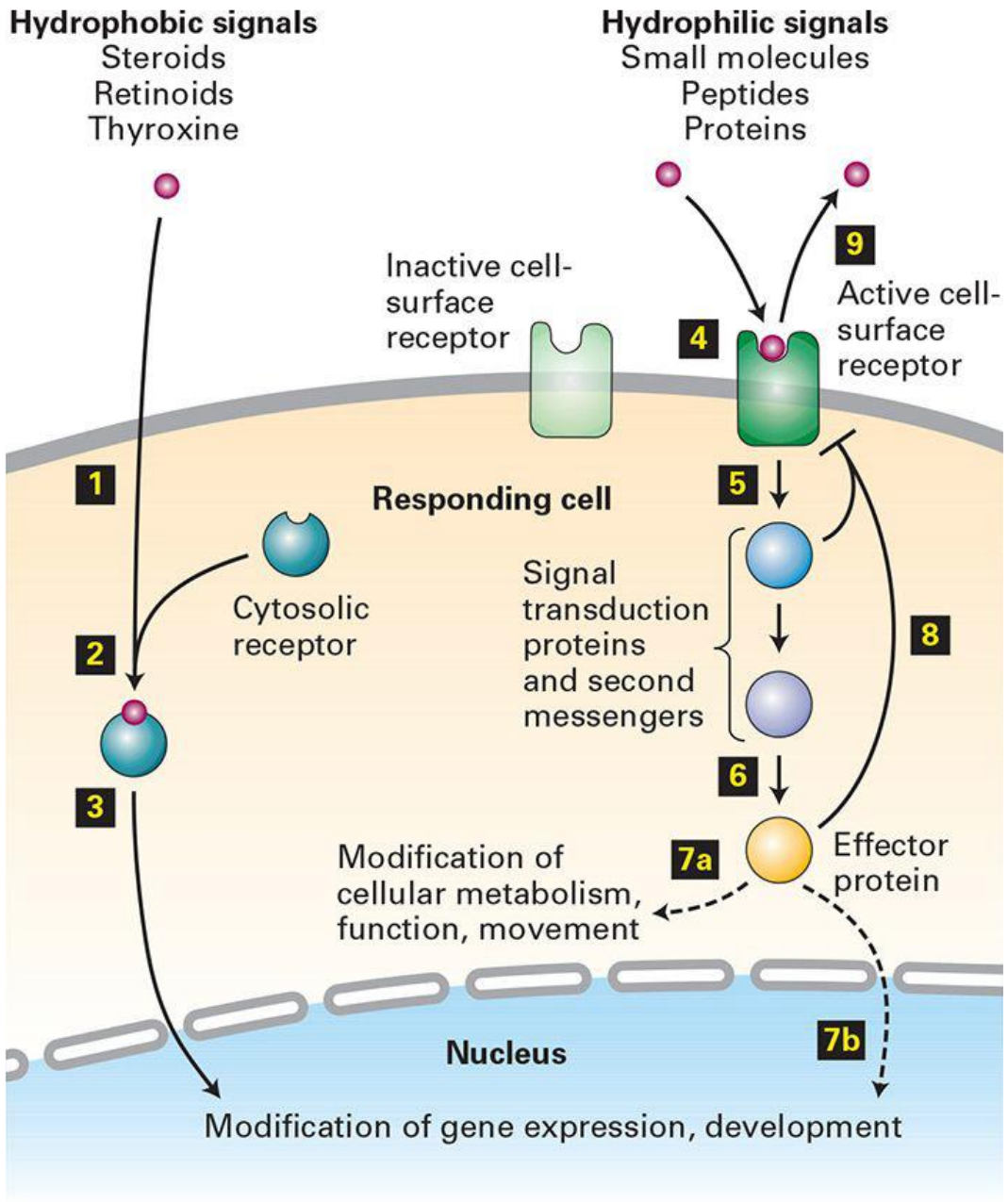
- Převod extracelulárních signálů na intracelulární odpověď
- Převádění jedné formy signálu na druhou = transdukce signálu
- Uplatnění v komunikace mezi buňkou organismem





KLÍČOVÍ HRÁČI SIGNALIZACE

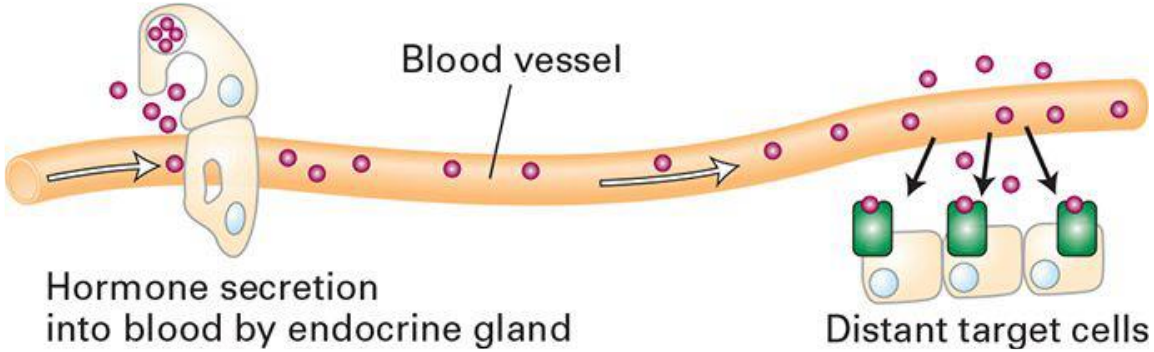
- Signální molekuly
  - hydrofobní
  - hydrofilní
- Receptory
  - membránové
  - cytosolické
- Přenašeče signalizace + druzí posli
- Efektorové proteiny
- Efekt
  - rychlý (modifikace proteinů)
  - pomalý (modifikace genové exprese)



DOSAH SIGNÁLŮ

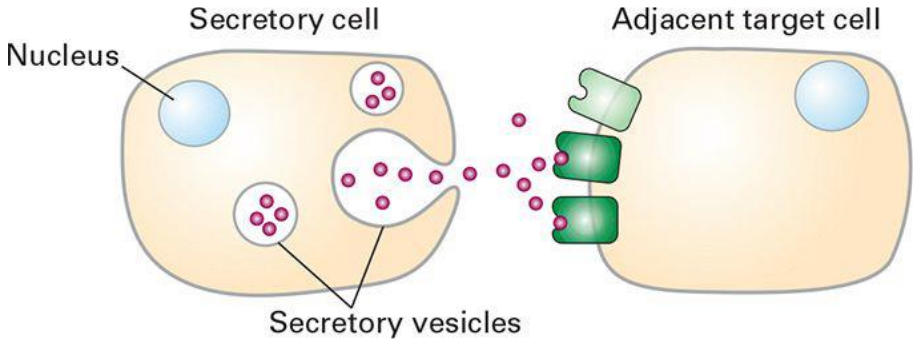
Endokrinní signalizace

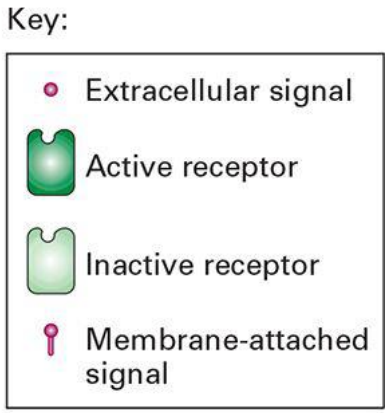
- Sekrece signální molekuly
- Typicky hormon v buňkách žlázy
- Transport cévní soustavou
- Působí ve vzdálené cílové buňce



Parakrinní signalizace

- Působení signální molekuly v blízkých/přilehlých buňkách
- Transport difuzí extracelulárním prostředím
- Např. neurotransmitery mezi neurony a svalovými buňkami
- Růstové faktory – tvorba gradientu – rozdílný efekt v závislosti na koncentraci

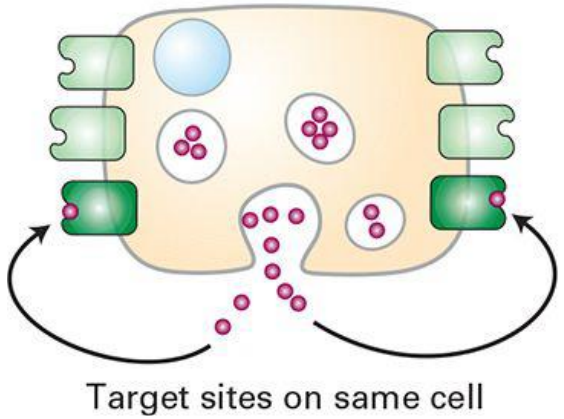


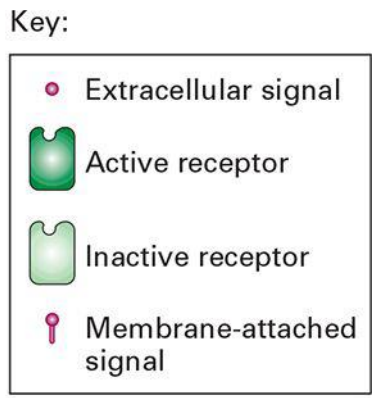


DOSAH SIGNÁLŮ

Autokrinní signalizace

- Odpověď buňky na vlastní signál
- Obvykle růstové faktory
- Např. buňky *in vitro* nebo nádorové buňky

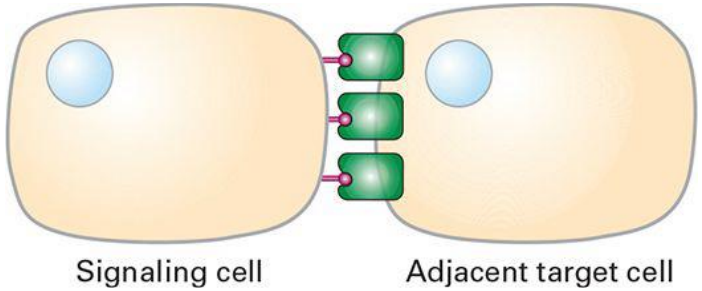




Přímá mezibuněčná (cell-cell) signalizace

- Mezi membránovými proteiny dvou buněk
- Receptor – ligand
- Proteolytické štěpení membránového proteinu

-> uvolněné extracelulární části jako solubilního ligandu



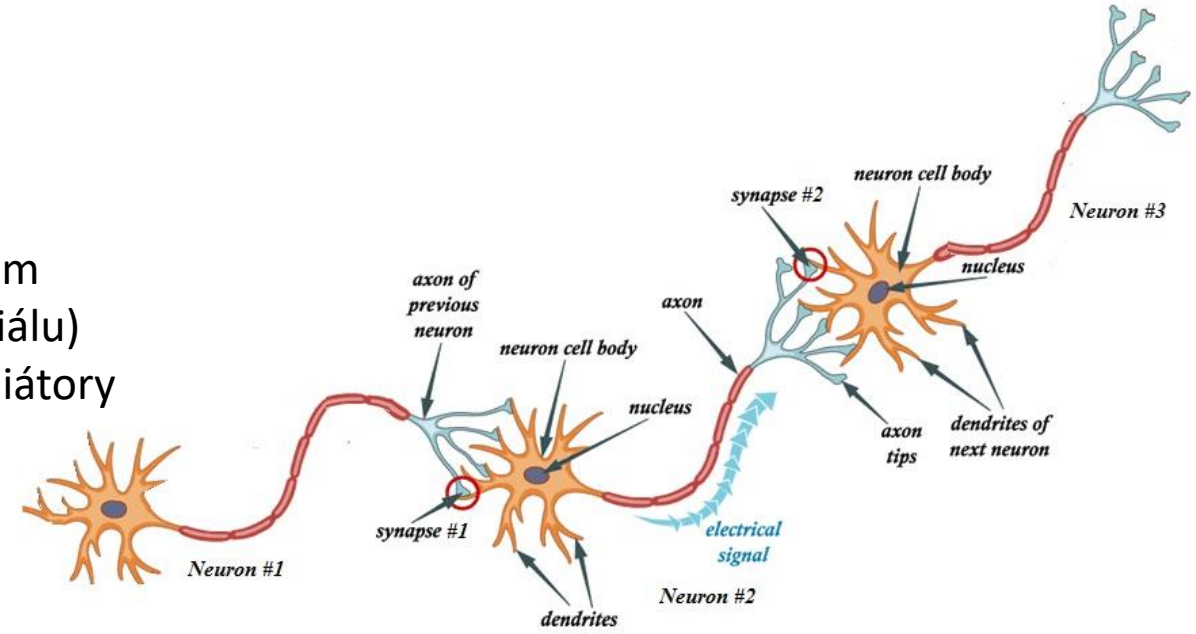
Kombinovaná signalizace

- Adrenalin – jako hormon (endokrinní) nebo jako neurotransmiter (parakrinní)
- EGFR – membránově vázaný (cell-cell) nebo solubilní (autokrinní nebo parakrinní)

DOSAH SIGNÁLŮ

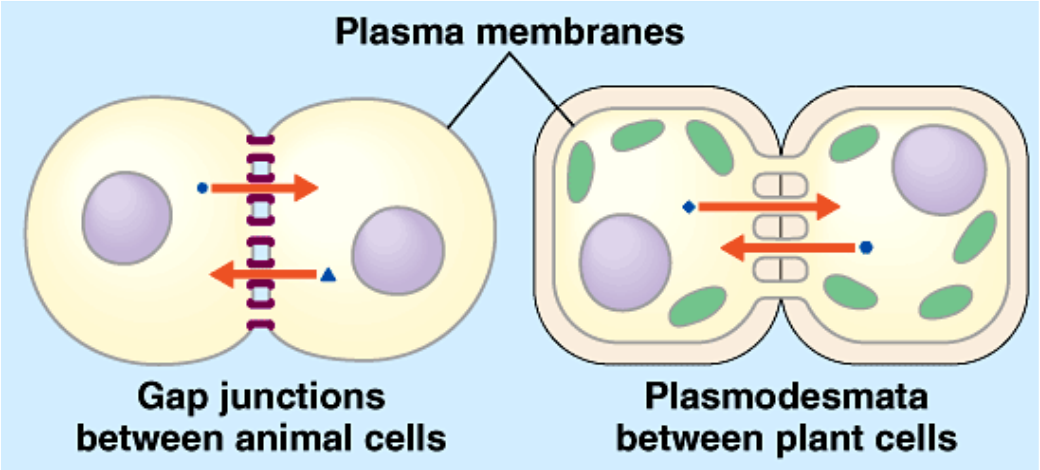
Signály nervové soustavy

- Působí na velké vzdálenosti (m)
- Směr signálu dán nervovým nebo svalovým vláknem
- Elektrické impulsy (změna membránového potenciálu) se na synapsích mění na parakrinní signalizaci mediátory



Propojení cytosolů buněk

- Přímá výměna molekul mezi buňkami
- Gap junctions (konexiny) – u živočišných buněk
- Plasmodesmata u rostlinných buněk



REAKCE BUŇKY NA SIGNÁL

- Žádná buňka v organismu není v izolaci
- Buňky musí vnímat stimuly okolního prostředí a odpovídat na ně

- Velké množství signálů různých druhů
  - Sekretované nebo navázané na membránu: hormony, růstové faktory, neurotransmitery, feromony…
  - Změna koncentrace metabolitů: plyny, živiny…
  - Změna fyzikálních podmínek: světlo, teplo, kontakt…

- Odpovídající velké množství receptorů

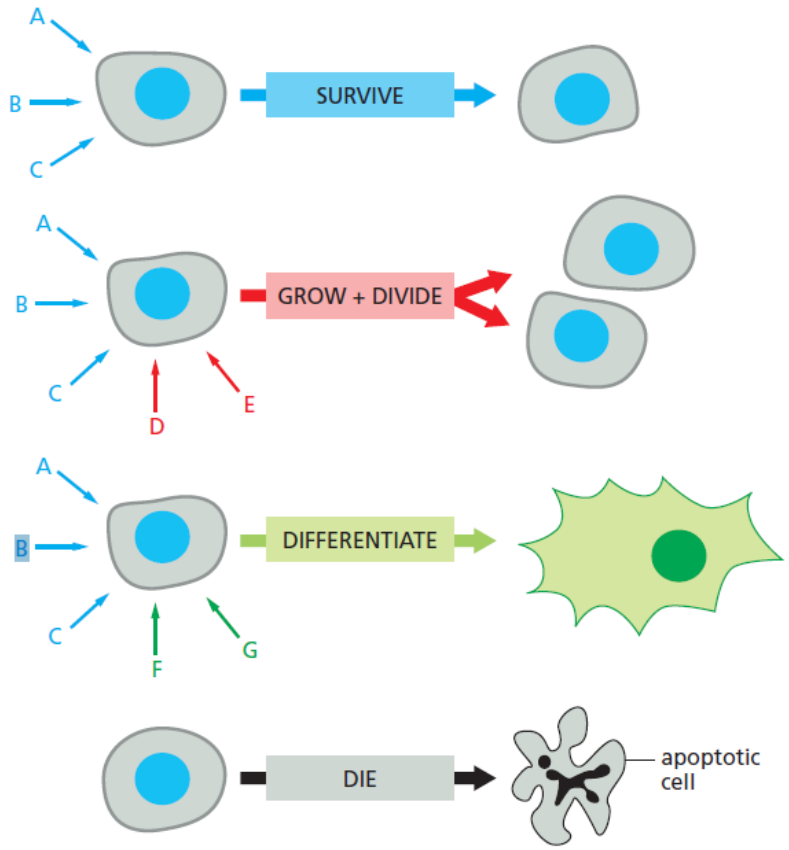
- Relativně málo nitrobuněčných přenašečů

- Buněčná odpověď - efekt

- Změna chování buněk
  - Aktivace syntézy DNA
  - Pohyb
  - Diferenciace
  - Smrt

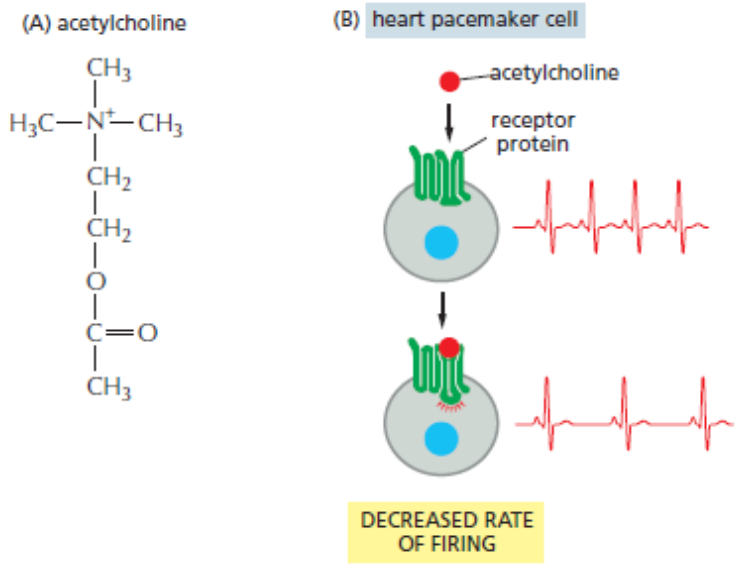
REAKCE BUŇKY NA SIGNÁL

- Citlivost je dána přítomností receptorů
- Z velkého množství exprimuje každá buňka jen některé
- Kombinace signálů – rozdílný efekt

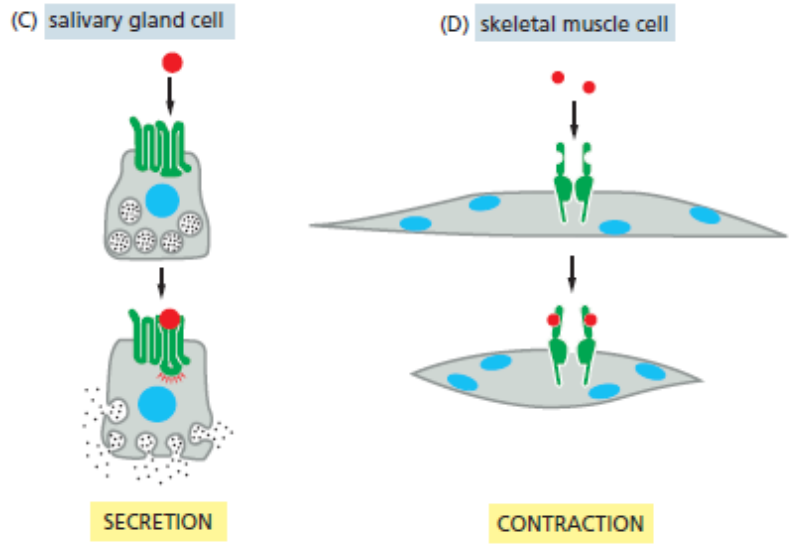


REAKCE BUŇKY NA SIGNÁL

- Různé typy buněk mohou exprimovat různé receptory pro stejný ligand -> různá odpověď
- Např.
  - Aktivace různých receptorů pro acetylcholin v srdečních, slinných a svalových buňkách



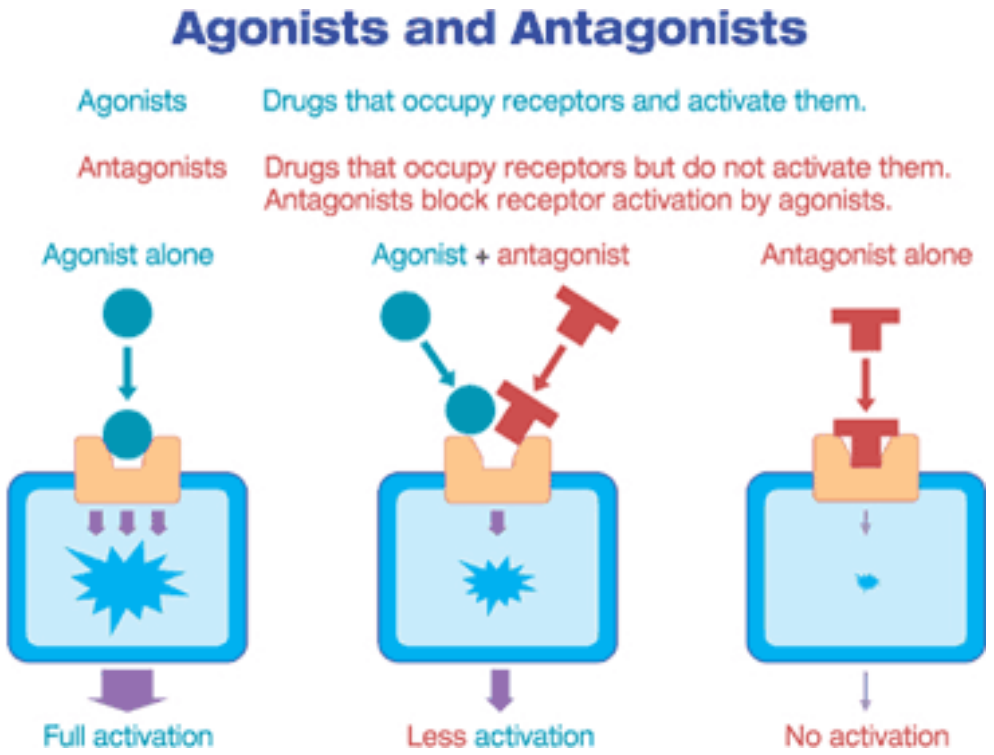
- Aktivace stejného receptoru na různých buňkách může vézt k jiným odpovědím = <u>efektorová specifita</u>
- Např.
  - Aktivace receptoru pro adrenalin u hepatocytů a svalových buňkách -> rozpad glykogenu na glukózu
  - Aktivace stejného receptoru u adipocytů -> hydrolýza a sekrece tuků



POUŽITÍ AGONISTŮ A ANTAGONISTŮ V MEDICÍNĚ

- Možnost ovlivnění různých signálních drah
- Aplikace syntetických analogů ligandů medicíně

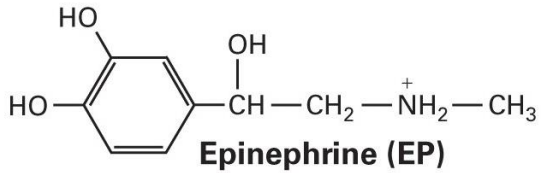
- Agonista (působí pozitivně) – stejná funkce jako ligand, vazba na receptor -> odpověď
- Antagonista (působí negativně) - vazba na receptor, blokuje vazbu ligandu -> bez odpovědi



POUŽITÍ AGONISTŮ A ANTAGONISTŮ V MEDICÍNĚ

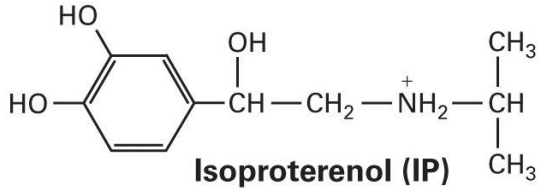
Příklad:

- Adrenalin (epinefrin) – produkce dření nadledvin



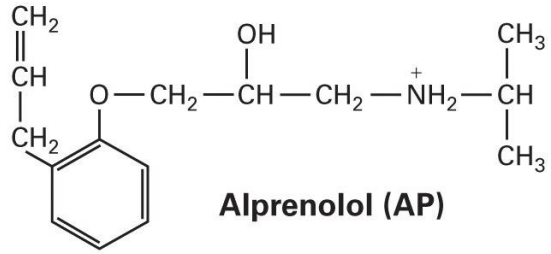
Epinephrine (EP)

- Agonista: isoproterenol – vazba (10x silnější než adrenalin) na adrenalinové receptory buněk hladkého svalstva průdušek -> dilatace -> léčba astma



Isoproterenol (IP)

- Antagonista: alprenolol – blokátor β-adrenalinových receptorů (β-blokátor) – vazba na adrenalinové receptory buněk srdečního svalstva -> zpomalení kontrakcí -> léčba arytmií a anginy pectoris



Alprenolol (AP)

SPECIFICITA vs. ROBUSTNOST SIGNALIZACE

- Velké množství různých signálních molekul
- Nutnost předejít chybné signalizaci
- Vysoká specificita a afinita mezi proteiny předávajícími si signál

  - ✓ Např. kinázy mají aktivní místo rozeznávající AMK sekvenci okolo fosforylačního rezidua na cílovém proteinu nebo signalizační enzymy obsahují dokovací místa (mimo místa enzymatické aktivity) pro interakci s komplementárním místem na cílovém proteinu
  - ✓ Redukce signálního šumu okolí je dána např. větším počtem míst fosforylace
  - ✓ Stálá -ale nízká- hladina aktivních fosfatáz
  - ✓ Aktivace musí být silná aby překonala fosfatázy

- Signální systém musí překonat variabilitu v koncentraci a aktivitě signálních molekul
- Často paralelní mechanismy aktivace cílového proteinu

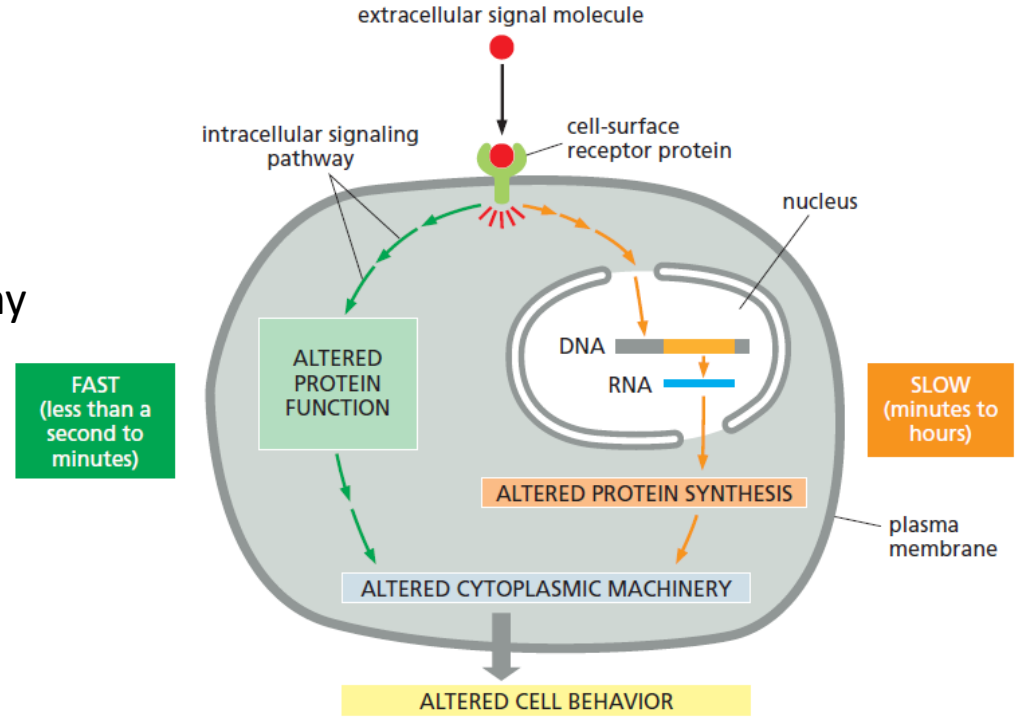
VARIABILITA VZTAHU SIGNÁL – ODPOVĚĎ

Rychlost odpovědi:

- Závislá na požadavku rychlosti získat odpověď a na typu intracelulárního přenašeče

- RYCHLÁ
  - Změna konformace iontového kanálu v synapsi –> změna membránového potenciálu: milisekundy
  - Změna fosforylace proteinů: sekundy – minuty

- POMALÁ
  - Změna exprese genů a jejich syntéza: minuty – hodiny
  - Řízení morfogeneze, dělení, růst: hodiny - dny



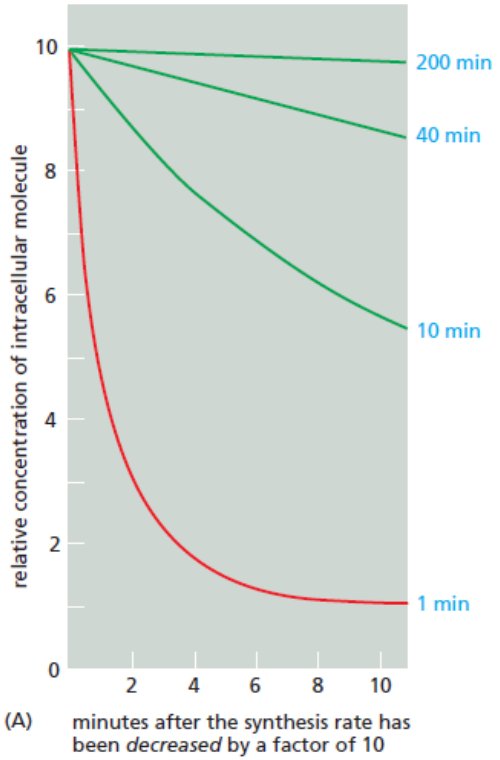
VARIABILITA VZTAHU SIGNÁL – ODPOVĚĎ

Přetrvání odpovědi:

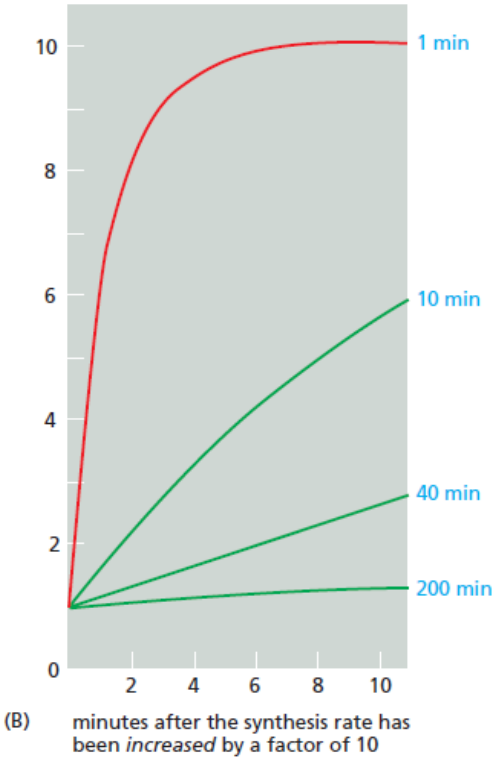
- Závislé na požadavku rychlosti udržet odpověď (synapse: přechodně; vývojové pochody: dlouhodobě)
- Role pozitivní a negativní zpětné vazby
- Závislé na obratu (turnover) konkrétního proteinu

- Proteiny s rychlým obratem (červené) se rychle degradují/syntetizují po zásahu do exprese
- Proteiny s pomalým obratem (zelené) se pomalu degradují/syntetizují po zásahu do exprese
- Poločas (half-life) proteinu je doba, za kterou dosáhnou ½ předpokládaného množství

10x snížená syntéza



10x zvýšená syntéza



VARIABILITA VZTAHU SIGNÁL – ODPOVĚĎ

Zpracování signálu:

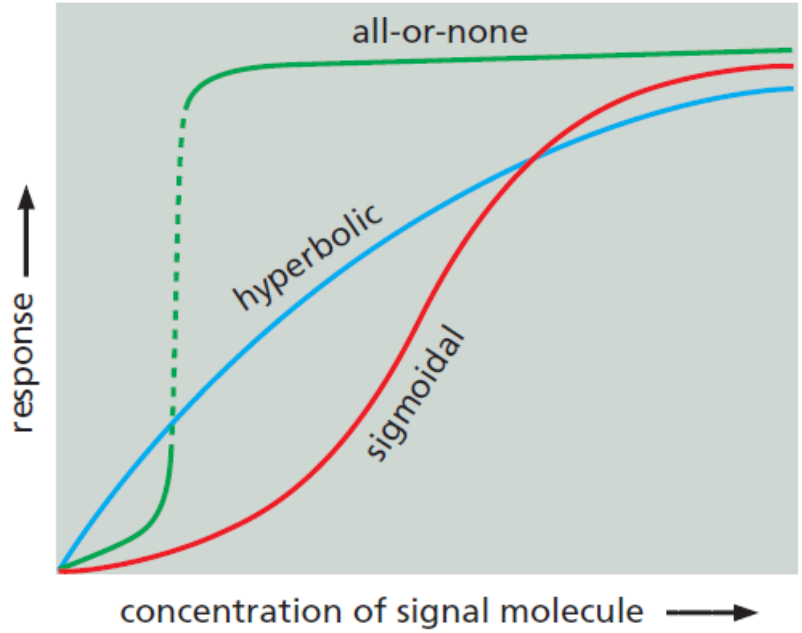
- Různorodý typ odpovědi:
  - jednoduchý signál -> složitá odpověď
  - jednoduchý signál -> opakující se odpověď

- Závislost odpovědi na koncentraci signálu

  - Narůstající intenzita odpovědi až do dosažení saturace signální dráhy (modrá), při regulaci hormony

  - Potlačení odpovědi při nízké koncentraci = potlačení signálního šumu, intenzivní nárůst odpovědi při střední koncentraci (červená), při násobné fosforylaci proteinu

  - Po překročení určité koncentrace, jednoznačná odpověď „všechno nebo nic“ (zelená), při výběru mezi dvěma stavy



VARIABILITA VZTAHU SIGNÁL – ODPOVĚĎ

Senzitivita k signálům:

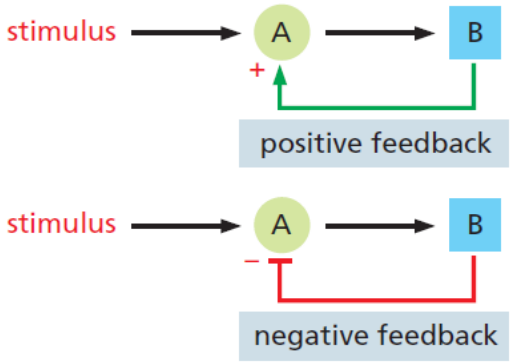
- Závisí na koncentraci ligandu (hormony: nízká koncentrace = citlivé receptory; neurotransmitery: vyšší lokální koncentrace = méně citlivé receptory)
- Vliv vnitrobuněčné amplifikace

Dynamické rozpětí signalizace:

- Závisí na senzitivitě a druhu buněčné odpovědi (vývojové pochody: úzké rozpětí koncentrace ligandu; metabolická odpověď na hormony: široké rozpětí závislé na koncentraci ligandu)

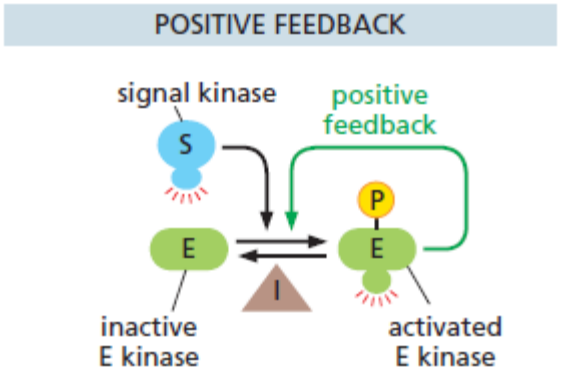
Regulace zpětnou vazbou – regulace většiny biologických procesů

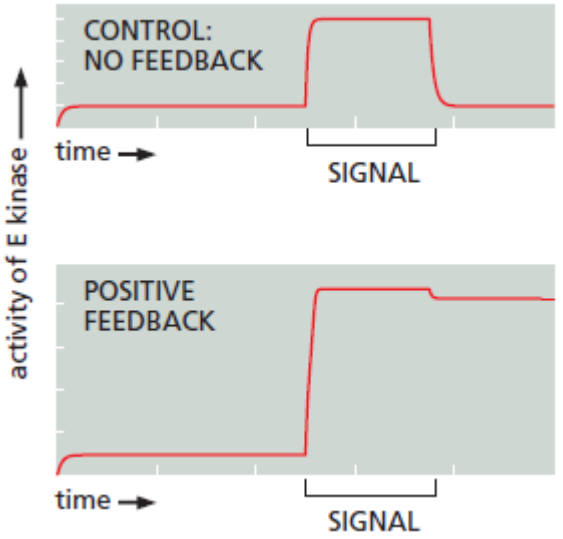
- Pozitivní zpětná vazba – výstup stimuluje svou produkci
- Negativní zpětná vazba – výstup inhibuje svou produkci



Pozitivní zpětná vazba

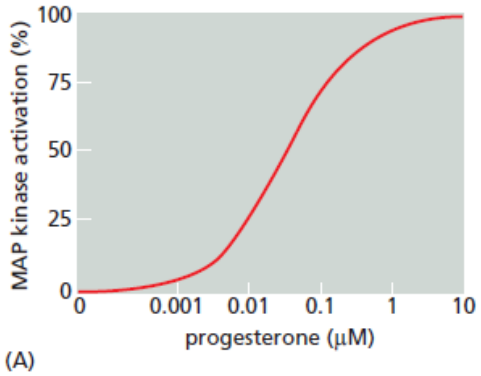
- Typicky pro sigmoidní a „všechno nebo nic“ odpověď
- Po spuštění odpovědi není původní signál už potřeba
- Systém má dvě pozice ON/OFF a signálem se zapíná
- Přechodný signál -> dlouhodobá odpověď
- Např. diferenciační kroky

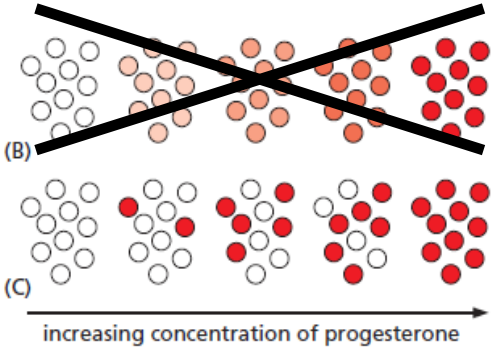




Zkreslení buněčné odpovědi vzhledem k buněčné populaci

- Odpověď „všechno nebo nic“ může být zkreslena populací
- Variabilita mezi buňkami
- Nutnost studia odpovědi na úrovni buňky
- Příklad: aktivace MAPK progesteronem u oocytů



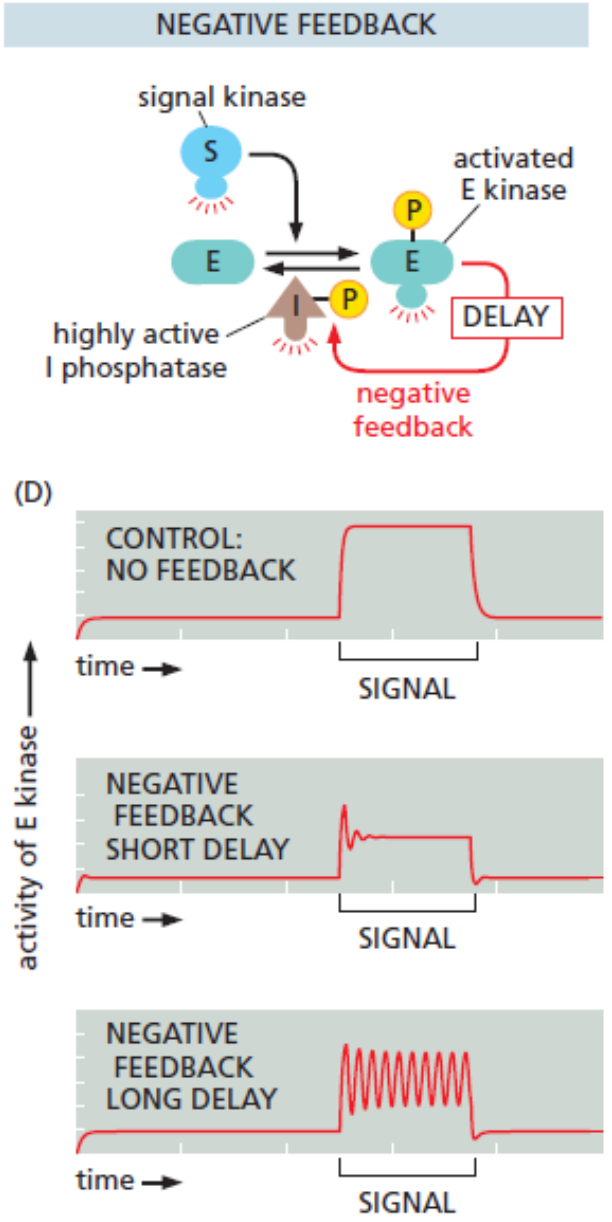


Negativní zpětná vazba

- Zkracuje a limituje hladinu odpovědi
- Účinnější proti výkyvům
- Různé způsoby zpětné vazby -> různá odpověď

- Krátké zpoždění zpětné vazby -> rychlé utlumení odpovědi
- Při vzrůstu intenzity signálu -> opět potlačení -> adaptace

- Dlouhé zpoždění zpětné vazby -> oscilace odpovědi
- Oscilace mají často jak negativní, tak pozitivní zpětnou vazbu

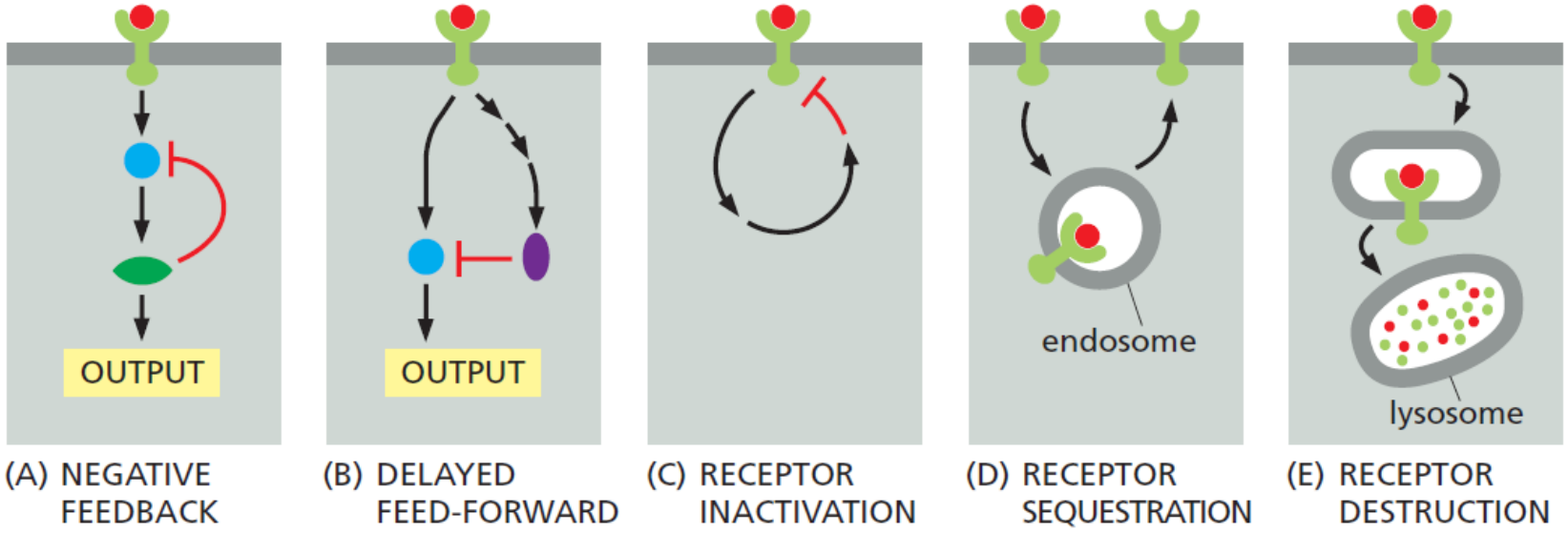


Adaptace (desenzitizace) = ukončení signálu

- umožňuje odpovídat na změny intenzity signálu spíš než na celkové množství signálu
  příklad: zprostředkování vidění, nezávisle v širokém rozmezí intenzity světla

- nutnost inhibice v průběhu signalizace -> redukce odpovědi

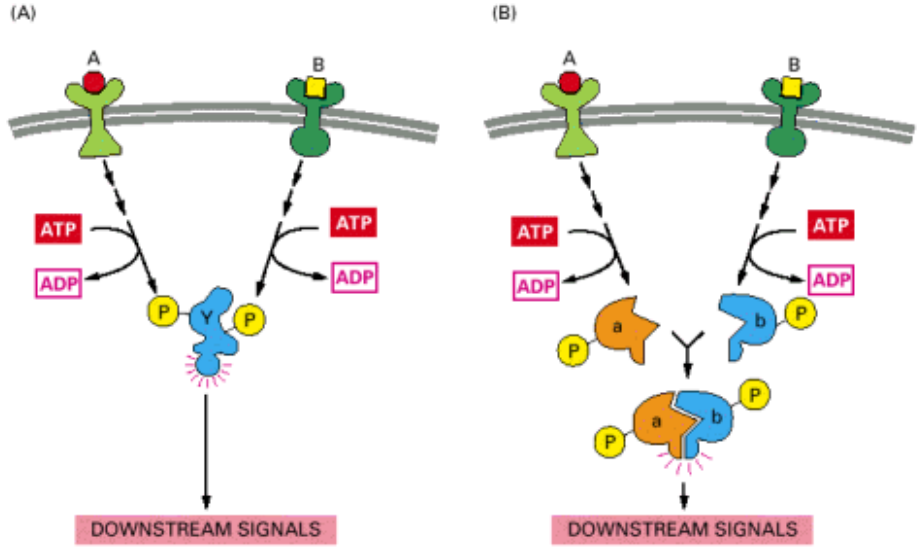
  - Negativní zpětná vazba s krátkým zpožděním – např. inhibice upstream kinázy
  - Stejný signál aktivuje současně i pomalejší inhibiční dráhu
  - Deaktivace receptoru – samovolně (vazba arrestinu blokuje G protein), endocytóza, destrukce



VARIABILITA VZTAHU SIGNÁL – ODPOVĚĎ

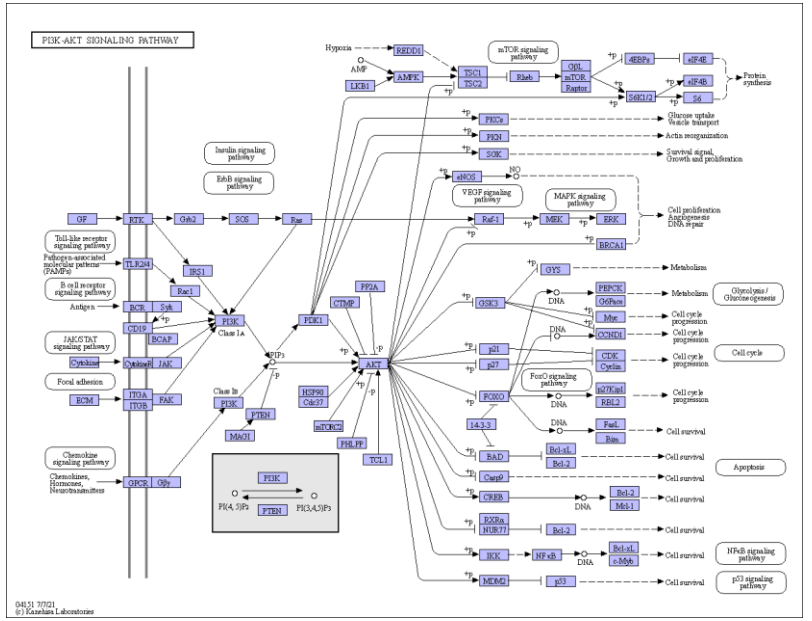
Integrace:

- odpověď se integruje z více signálů; závislost na vnitrobuněčných přenašečích; uplatnění pro složité buněčné procesy (růst, proliferace, diferenciace..)



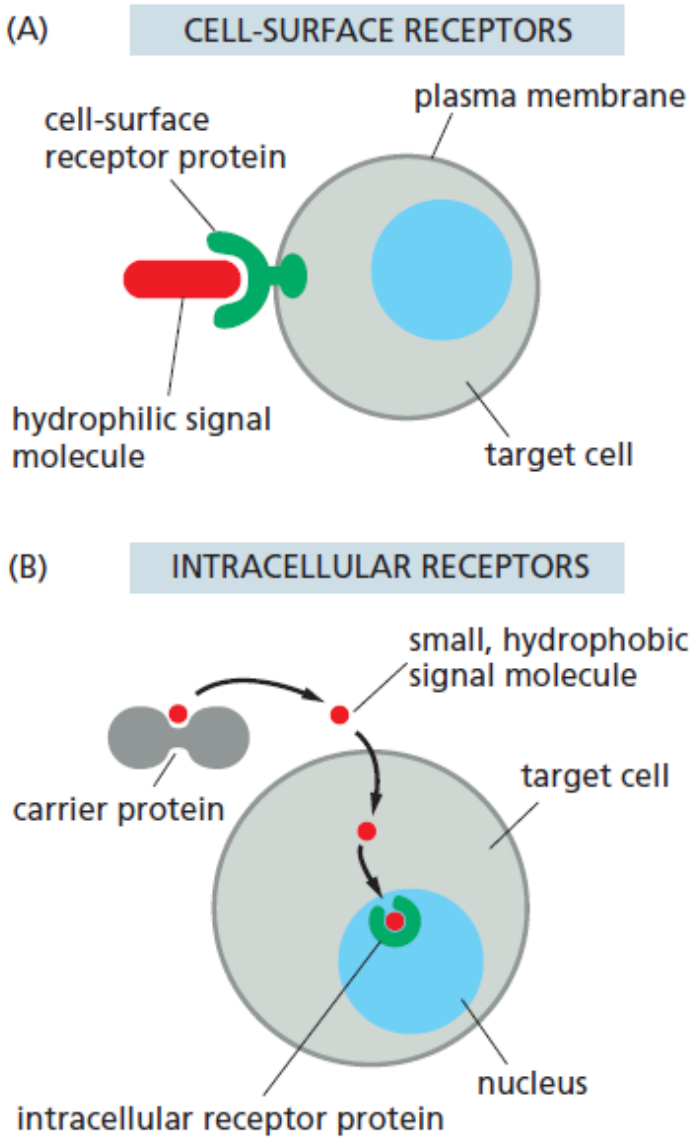
Koordinace:

- více buněčných procesů je řízeno jedním extracelulárním signálem; např. růstový faktor -> růst a dělení; nutnost distribuce signálu k různým efektorům -> tvorba signálních větví



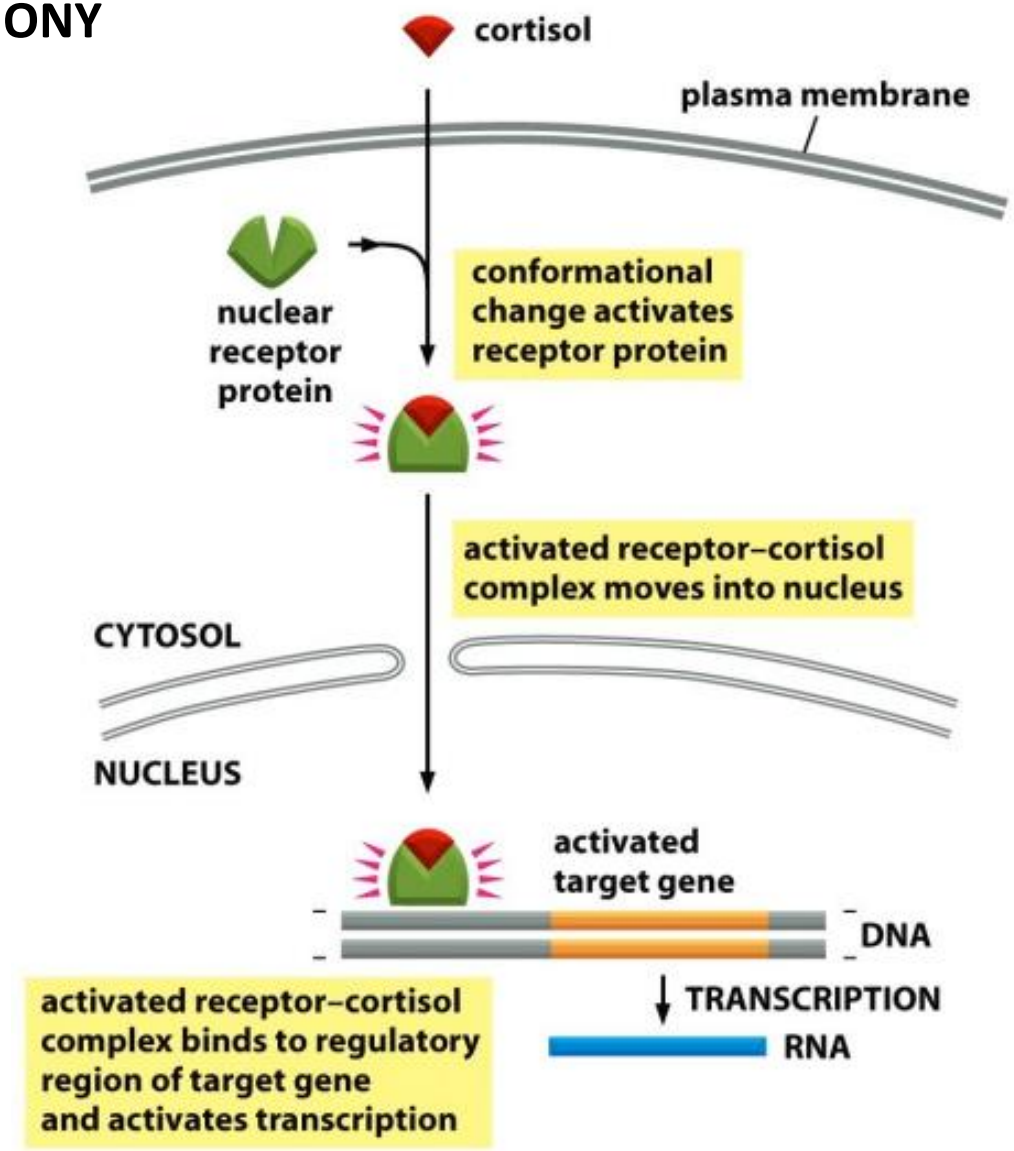
PRŮCHODNOST MEMBRÁNY PRO LIGANDY

- rozhoduje velikost a chemická povaha signální molekuly
- velké a hydrofilní molekuly nemohou membránou projít - aktivují povrchové receptory
- malé a hydrofobní molekuly difundují membránou a vážou se na nitrobuněčné receptory



SIGNALIZACE STEROIDNÍMI A THYROIDNÍMI HORMONY

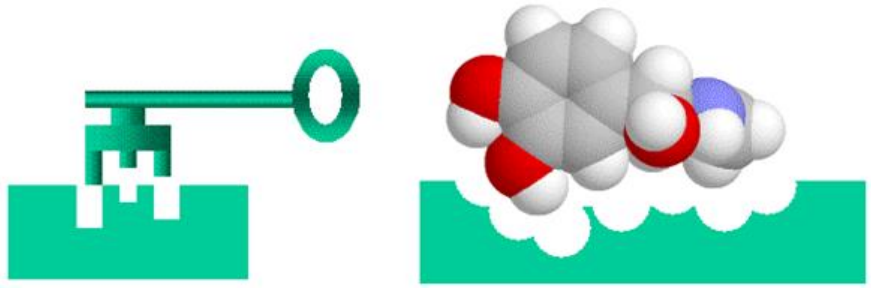
- hydrofobní a nízkomolekulární
- procházejí membránou
- vážou se na receptory v cytosolu nebo jádře
- jejich receptory fungují jako regulátory genové exprese závislé na ligandech
- vazba ligandu - změna konformace receptoru - změna schopnosti vazby DNA nebo aktivace exprese cílových genů

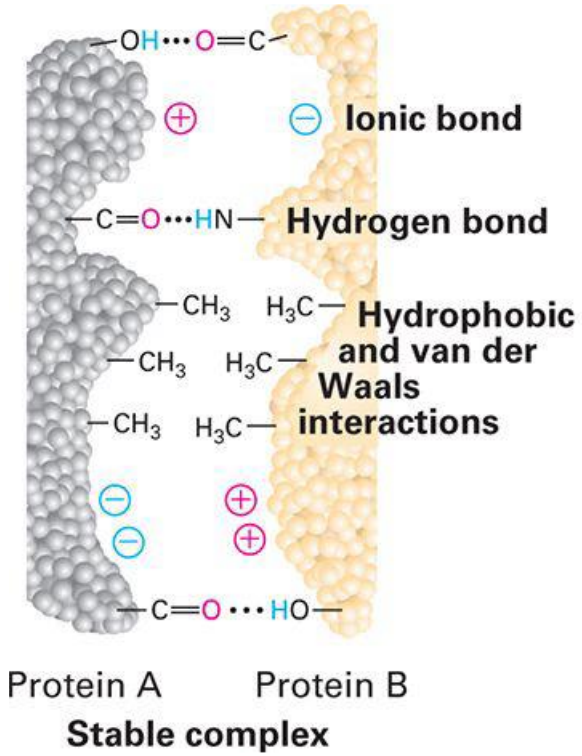


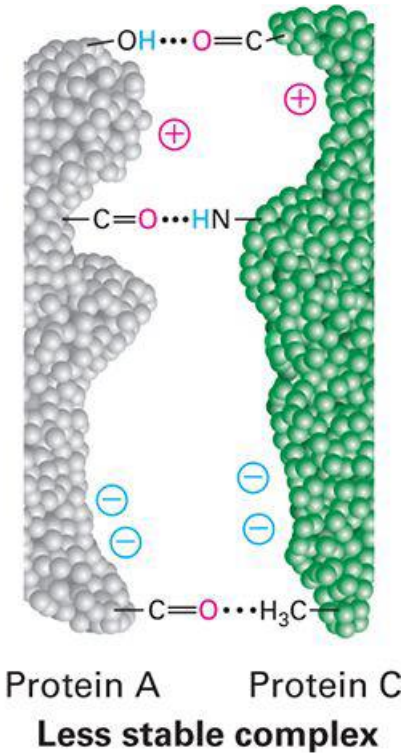
VAZBA LIGANDU NA RECEPTOR

- Molekulární komplementarita – definuje sílu interakce
  - ✓ Afinita (síla chemické vazby) - nekovalentní (slabá) vazba: iontová vazba, van der Waalsovy síly, hydrofobní interakce
  - ✓ Tvar molekul

- Vazebná specificita – udává schopnost receptoru vázat/nevázat podobné molekuly

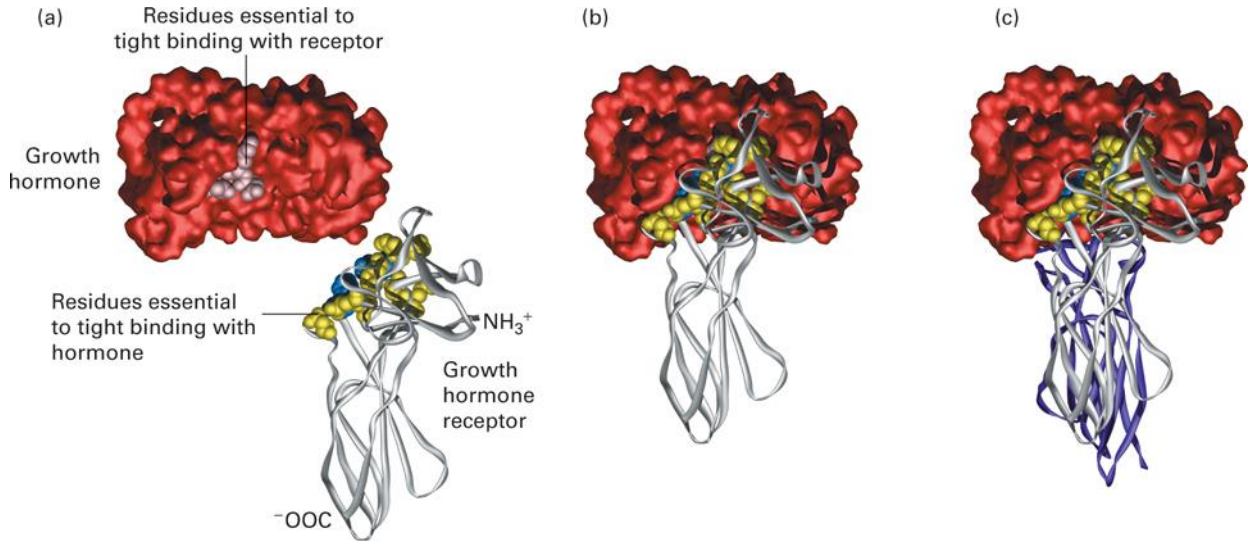






VAZBA LIGANDU NA RECEPTOR

- Vazba ligandu na extracelulární doménu/y (platí pro membránový receptor)
- Indukce konformačních změn v molekule receptoru
- Transformace na intracelulární signál
- Aktivace vnitrobuněčných přenašečů



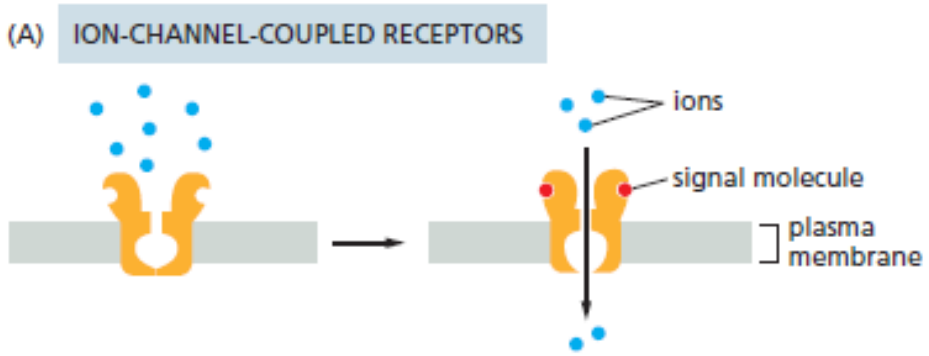
HLAVNÍ TYPY MEMBRÁNOVÝCH RECEPTORŮ

- Extracelulární signály - vazba na receptor - nepronikají do buňky
- Receptory fungují jako přenašeče signálu (signal tranducers)
- Změna z extracelulárního signálu na intracelulární

- ❑ Receptory spřažené s iontovými kanály (Ion-channel-coupled receptors, ionotropní receptory)
- ❑ Receptory spřažené s G-proteiny (G-protein-coupled receptors, GPCRs)
- ❑ Receptory spřažené s enzymem (Enzyme-coupled receptors)

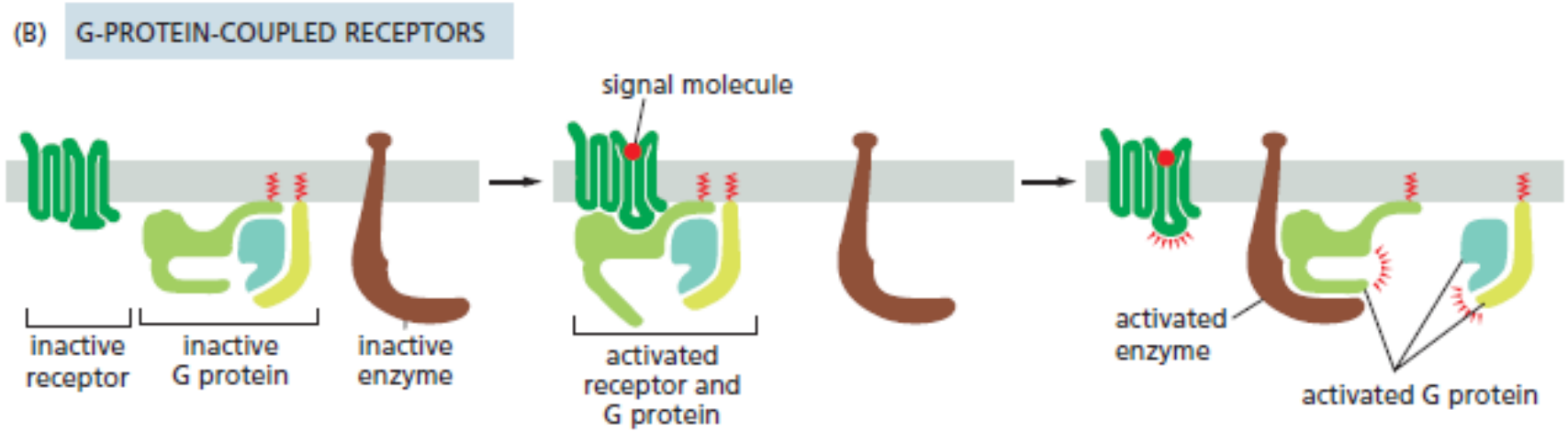
Receptory spřažené s iontovými kanály

- Rychlá signalizace na synapsích pomocí neurotransmiterů
- Přechodné otevření/zavření iontového kanálu
- Změna permeability membrány mění excitabilitu postsynaptické cílové buňky



Receptory spřažené s G-proteiny

- Nemá vlastní enzymatickou aktivitu
- Řídí aktivitu dalších membránových proteinů:
  - enzymů
  - iontových kanálů
- Prostřednictvím membránového G-proteinu (GTP-binding regulatory protein)
- Aktivace cílového proteinu:
  - mění koncentraci intracelulárních signálních molekul
  - permeabilitu membrány

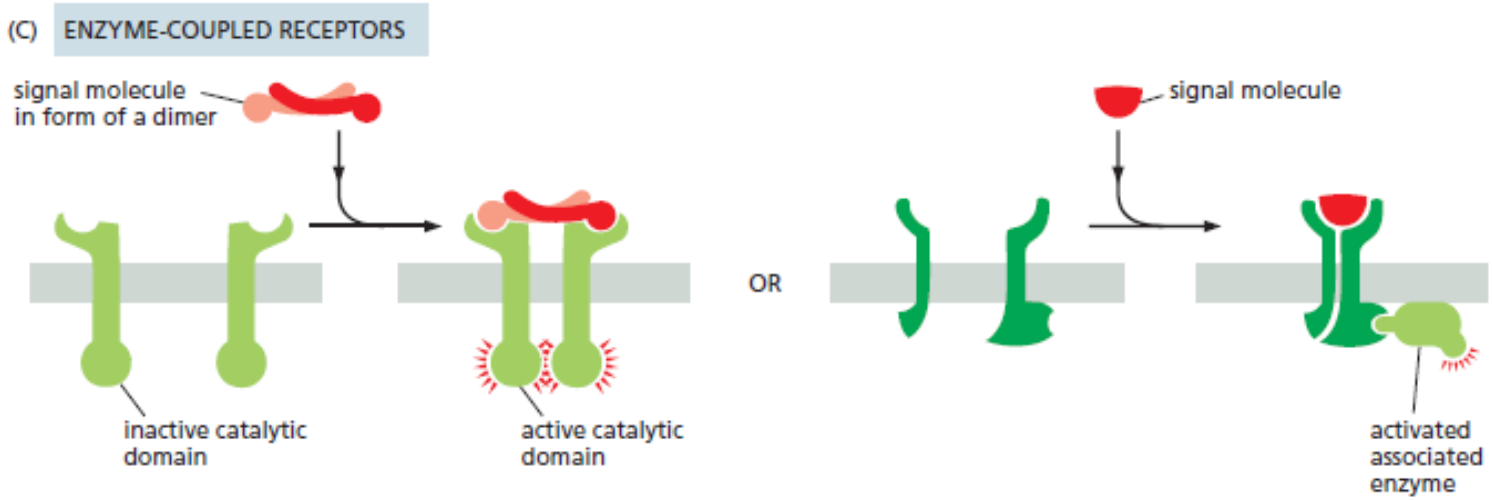


Receptory spřažené s enzymem

- Mají vlastní enzymatickou aktivitu nebo jsou přímo spojeny s enzymaticky aktivním proteinem

- Obecná struktura:
  - extracelulární doména: vazba ligandu
  - transmembránová doména: většinou jen 1x
  - intracelulární doména: vlastní katalytická aktivita nebo vazba enzymu

- Často funkce proteinkinázy nebo spojení s proteinkinázou
- Transdukce signálu fosforylací

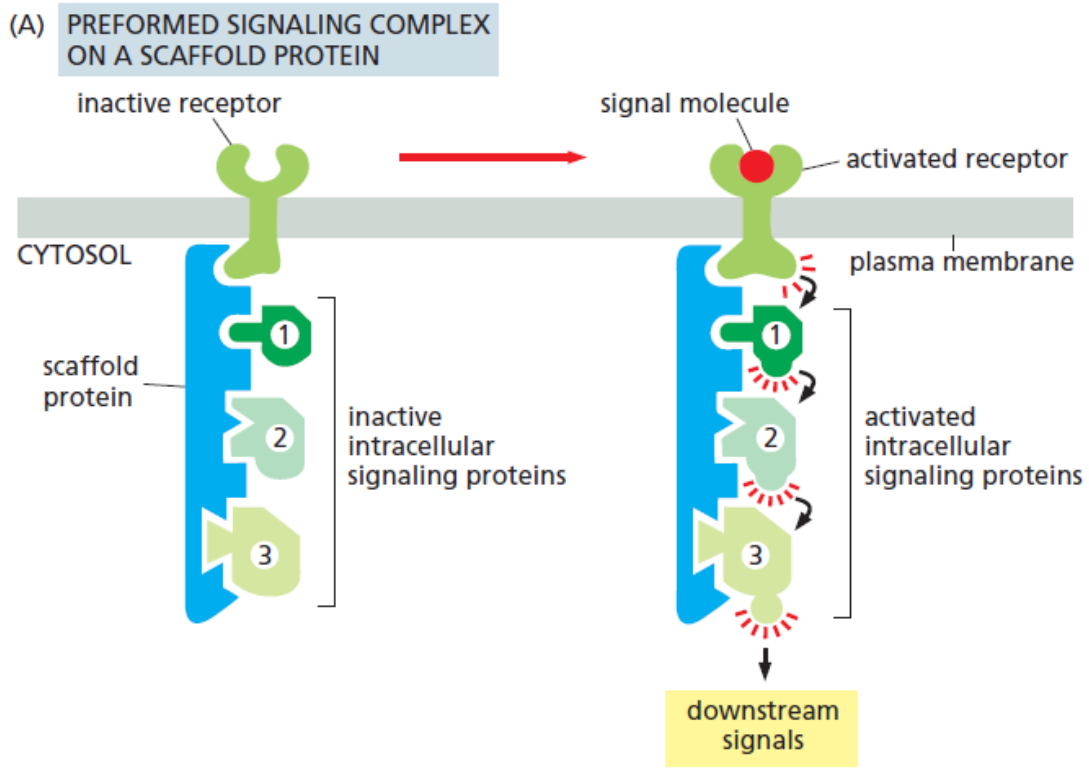


INTRACELULÁRNÍ SIGNALIZAČNÍ KOMPLEXY NAVAZUJÍCÍ NA MEMBRÁNOVÉ RECEPTORY

- Velké proteinové komplexy v blízkosti/na receptorech
- Proteiny jsou blízko sebe –> zvýšení specificity interakce
- Interakce především mezi sebou –> snížení signálního šumu okolí
- Např.: sestavení na „scaffold“ proteinech, sestavení na receptorech, sestavení na fosfoinositidových dokovacích místech

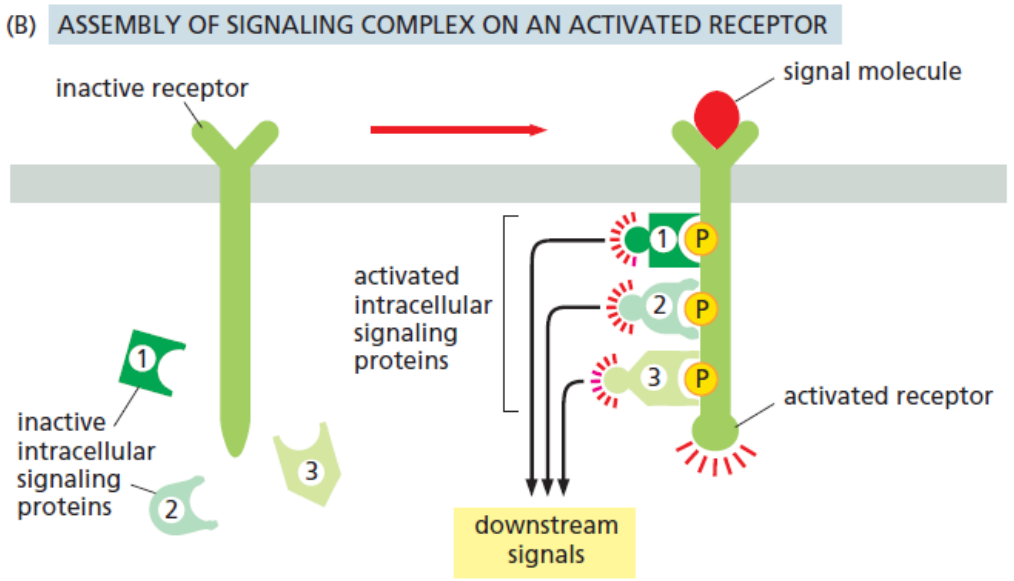
Sestavení signalizačního komplexu na „scaffold“ proteinech

- Tvorba signálních komplexů ještě před přijetím signálu
- Receptor + navazující signální proteiny
- Vysoká lokální koncentrace zapojených proteinů
- Specificita signalizace



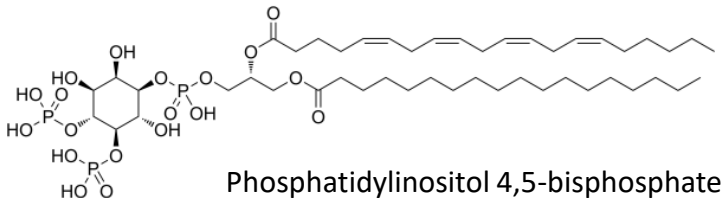
Sestavení signalizačního komplexu na receptoru

- Přechodné sestavení
- Závislé na extracelulárním signálu
- Tvorba přímo na receptoru
- Vazba proteinů na fosforylovaná rezidua receptoru
- Rozpad po odeznění signálu

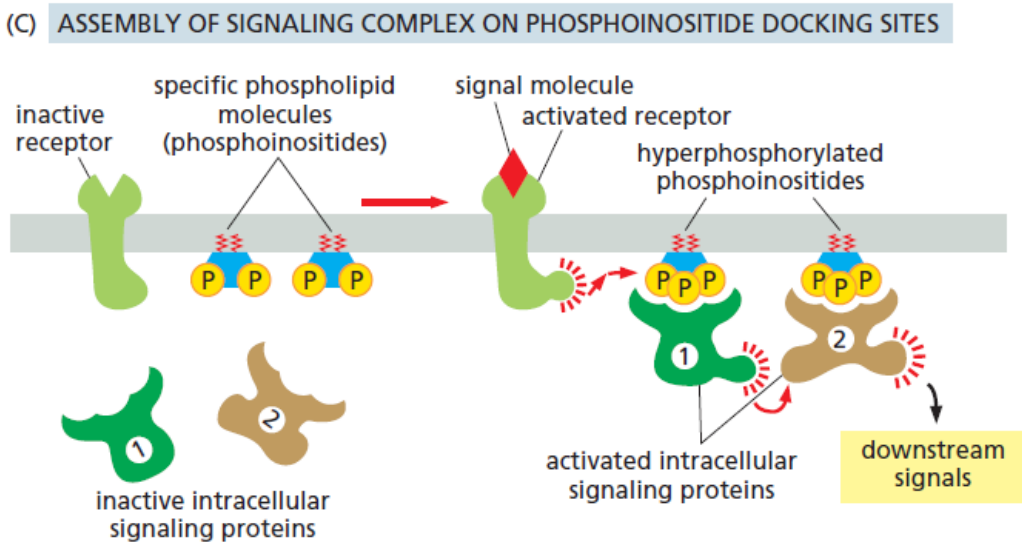


Sestavení signalizačního komplexu na fosfoinositidových dokovacích místech

- Aktivace receptoru modifikuje membránové fosfolipidy
- Fosfoinositidy (fosfatidylinositol-mono/di/tri-fosfáty)
- Vazba a aktivace signálních molekul



Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate



INTERAKCE MEZI SIGNÁLNÍMI PROTEINY POMOCÍ MODULÁRNÍCH DOMÉN

- Při tvorbě signalizačního komplexu – těsná interakce proteinů
- Sestavení komplexu závisí na malých, vysoce konzervovaných doménách = moduly
- Vazba modulu jednoho proteinu na odpovídající strukturální motiv druhého proteinu nebo lipidu
- Motiv: peptidová sekvence, kovalentní modifikace (fosforylace AMK), proteinová doména…
- Využití interakce modulárních domén -> evoluce nových signálních drah
- Zařazení modulu/ů bez poškození funkce -> nové interakce -> zařazení do nové signální dráhy

INTERAKCE MEZI SIGNÁLNÍMI PROTEINY POMOCÍ MODULÁRNÍCH DOMÉN

- Velké množství různých domén
- Vazba proteinů mezi sebou nebo na membránu

- Příklady domén:

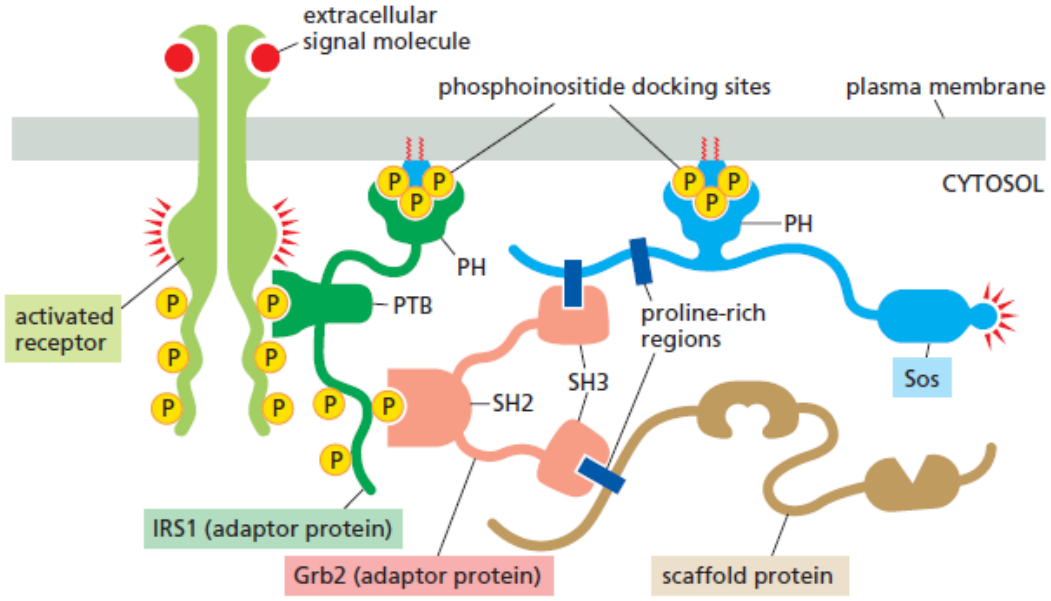
- Src homology 2 (SH2) a phosphotyrosine-binding (PTB)
- Vazba na fosforylované tyroziny aktivovaných proteinů

- Src homology 3 (SH3)
- Vazba na aminokyselinové sekvence bohaté na prolin

- Pleckstrin homology (PH)
- Vazba na polární části membránový fosfoinositidů

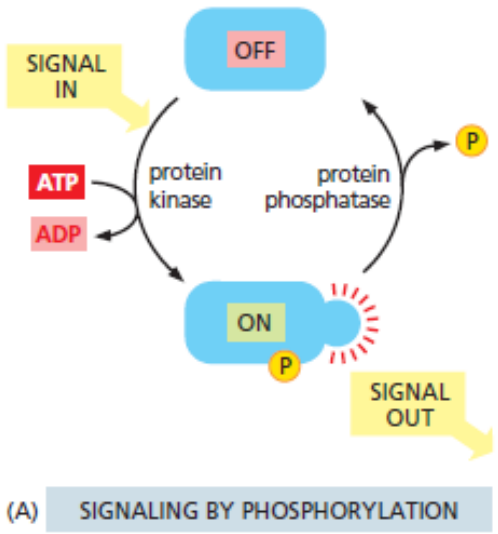
- Adaptorové proteiny
- Dvě a více domén
- Propojení proteinů do dráhy
- Někdy vlastní signální aktivita

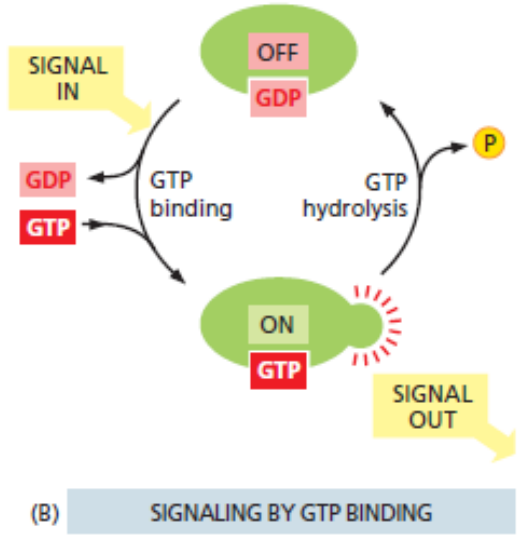
Signální komplex navázaný na insulinový receptor



TRANSDUKCE SIGNÁLU – MOLEKULÁRNÍ PŘEPÍNAČE (molecular switches)

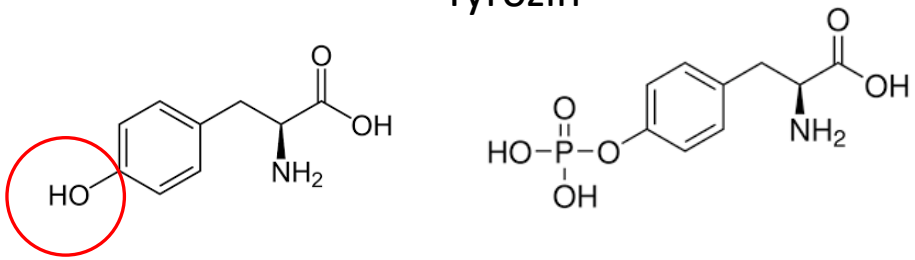
- Přenos intracelulárního signálu často skrze „přepínací“ proteiny
- Dvě pozice ON/OFF
- Signál převádí stav přenašeče z neaktivního do aktivního stavu
- proteinkinázy/fosfatázy - připojení nebo odpojení zbytku kyseliny fosforečné
- GTPázy - připojení nebo odpojení GTP/GDP



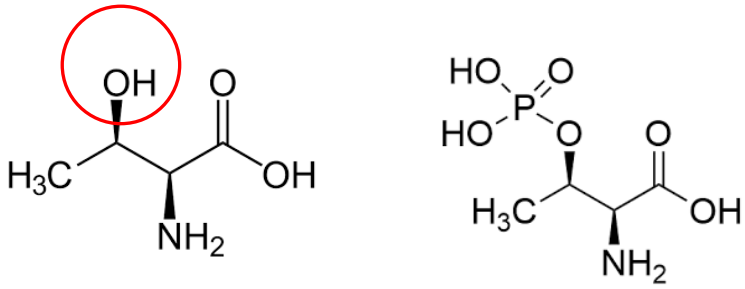


TRANSDUKCE SIGNÁLU – PROTEINKINÁZY/FOSFATÁZY

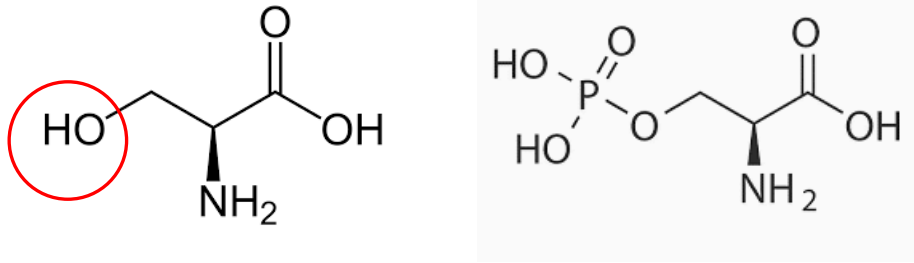
Tyrozin



Threonin



Serin



Proteinkinázy:

- Enzymy - fosforylují cílový protein
- Rozpoznání cílového reziua a okolních aminokyselin
- Kovaletní vazba fosfátové skupiny na –OH specifické aminokyseliny
- Tyrozin (Tyr, Y), serin (Ser, S), treonin (Thr, T)
- Vznik fosfo-proteinu
- Změna náboje, popř. konformace -> vliv na lokalizaci, aktivitu, stabilitu, vazbu s jinými proteiny či DNA, tvorbu komplexů, schopnost podléhat dalším modifikacím
- Lidský genom: ≈ 500-600 proteinkináz = kinom
- Několik velkých skupiny podle příbuznosti

https://www.cellsignal.com/learn-and-support/protein-kinases/human-protein-kinases-overview?_requestid=2628551

TRANSDUKCE SIGNÁLU – PROTEINKINÁZY/FOSFATÁZY

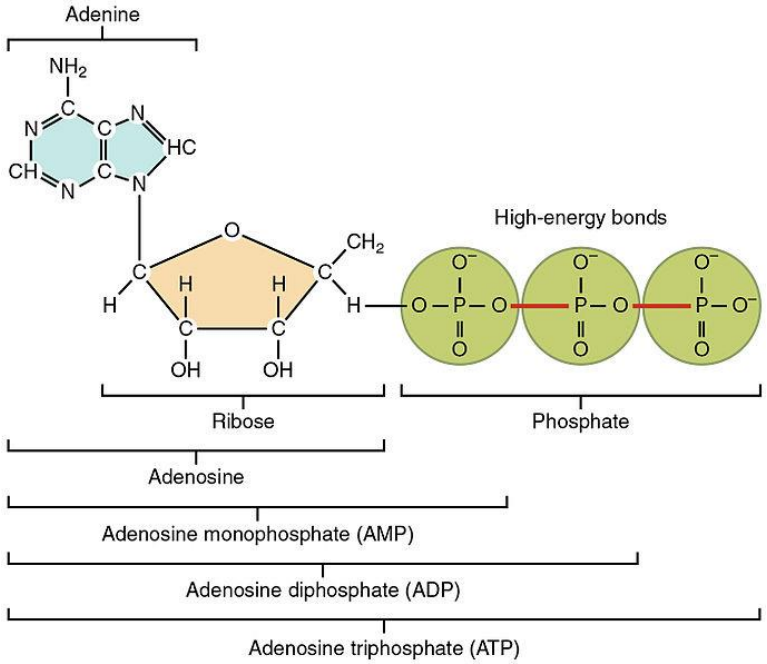
Fosfatázy:

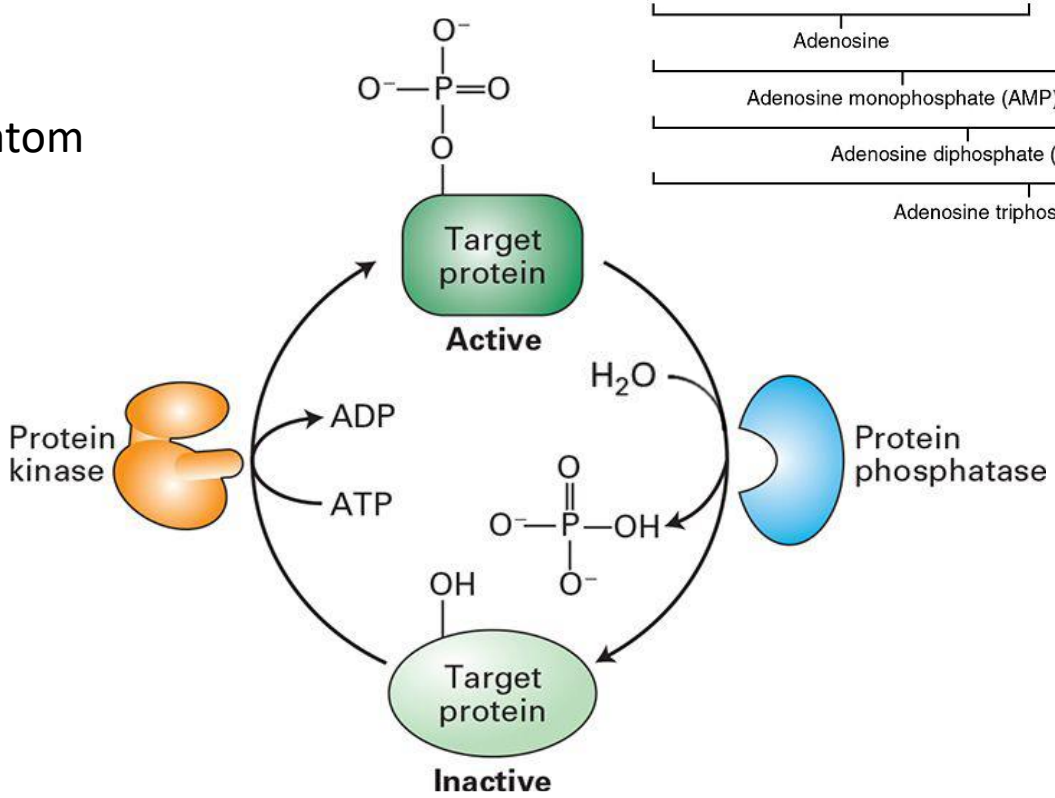
- Enzymy - hydrolyzují fosfátové skupiny
- Protihráč proteinkináz
- Lidský genom ≈ 100 fosfatáz = fosfatom

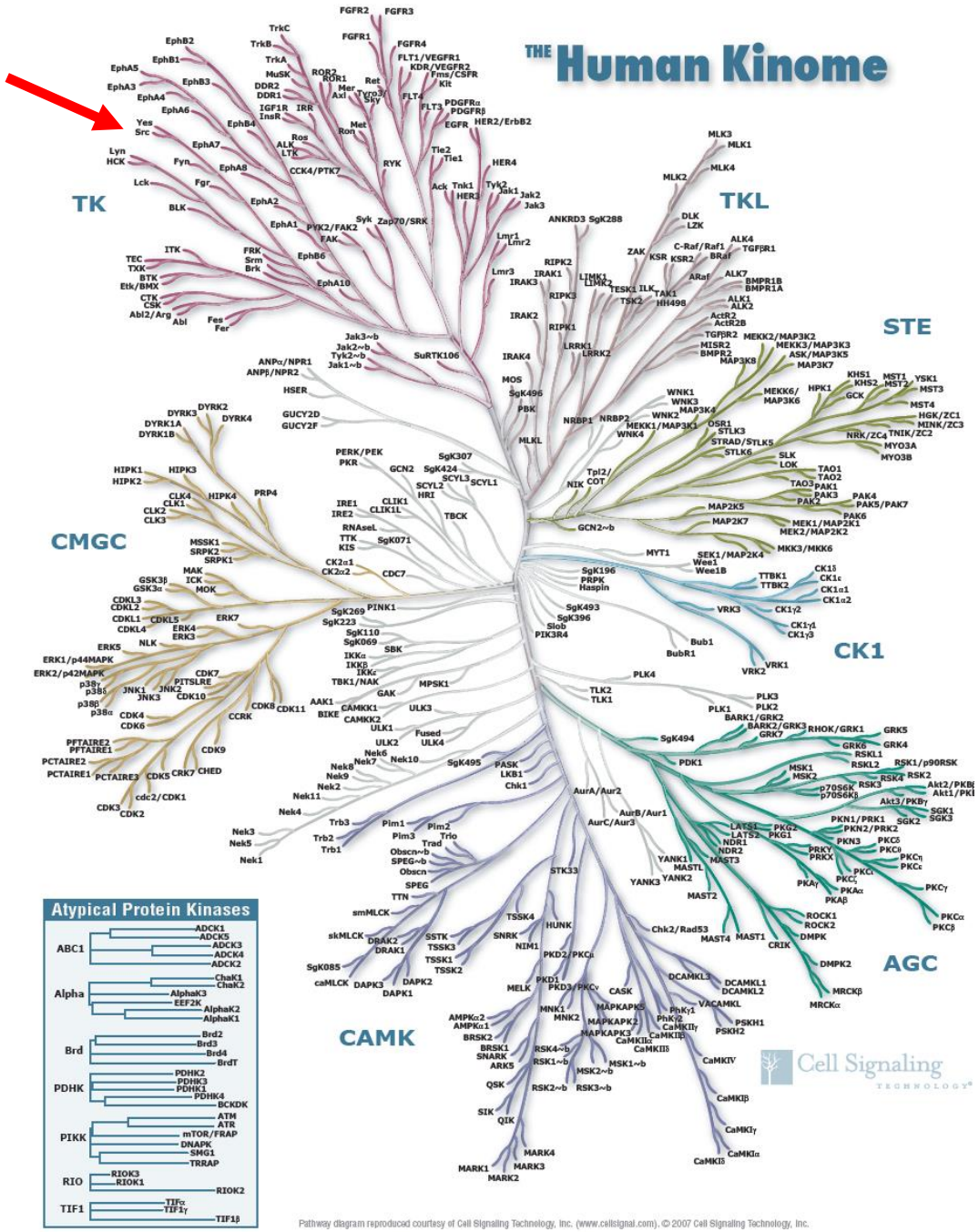
  http://phosphatome.net/3.0/

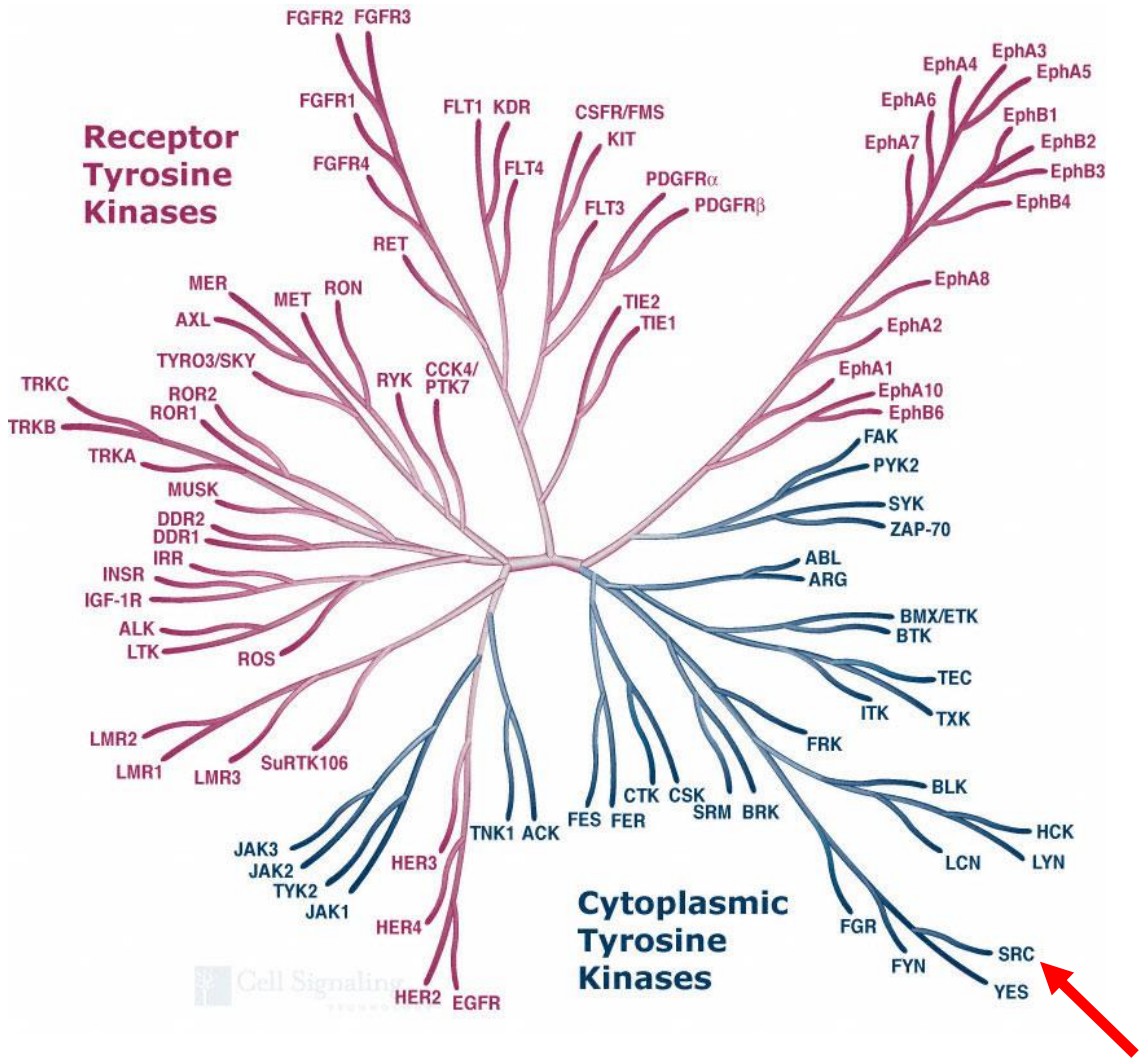
Společně:

aktivace/deaktivace cílového proteinu






THE Human Kinome
TK
TKL
STE
CMGC
CK1
AGC
CAMK
Atypical Protein Kinases
ABC1
Alpha
Brd
PDHK
PIKK
RIO
TIF1
Cell Signaling TECHNOLOGY
Pathway diagram reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com). © 2007 Cell Signaling Technology, Inc.


Receptor Tyrosine Kinases
FGFR2 FGFR3
FGFR1
FGFR4
FLT1 KDR
FLT4
CSFR/FMS
KIT
FLT3
PDGFRα
PDGFRβ
RET
MER
MET
RON
AXL
TIE2
TIE1
TYRO3/SKY
RYK
CCK4/ PTK7
TRKC
TRKB
TRKA
ROR2
ROR1
MUSK
DDR2
DDR1
IRR
INSR
IGF-1R
ALK
LTK
ROS
LMR2
LMR1
LMR3
SuRTK106
EphA4
EphA3
EphA5
EphA6
EphB1
EphA7
EphB2
EphB3
EphB4
EphA8
EphA2
EphA1
EphA10
EphB6
FAK
PYK2
SYK
ZAP-70
ABL
ARG
BMX/ETK
BTK
TEC
ITK
TXK
FRK
BLK
HCK
LCN
LYN
FGR
SRC
FYN
YES
JAK3
JAK2
TYK2
JAK1
HER3
HER4
HER2
EGFR
TNK1 ACK
FES FER
CTK CSK
SRM BRK
Cytoplasmic Tyrosine Kinases
Cell Signaling

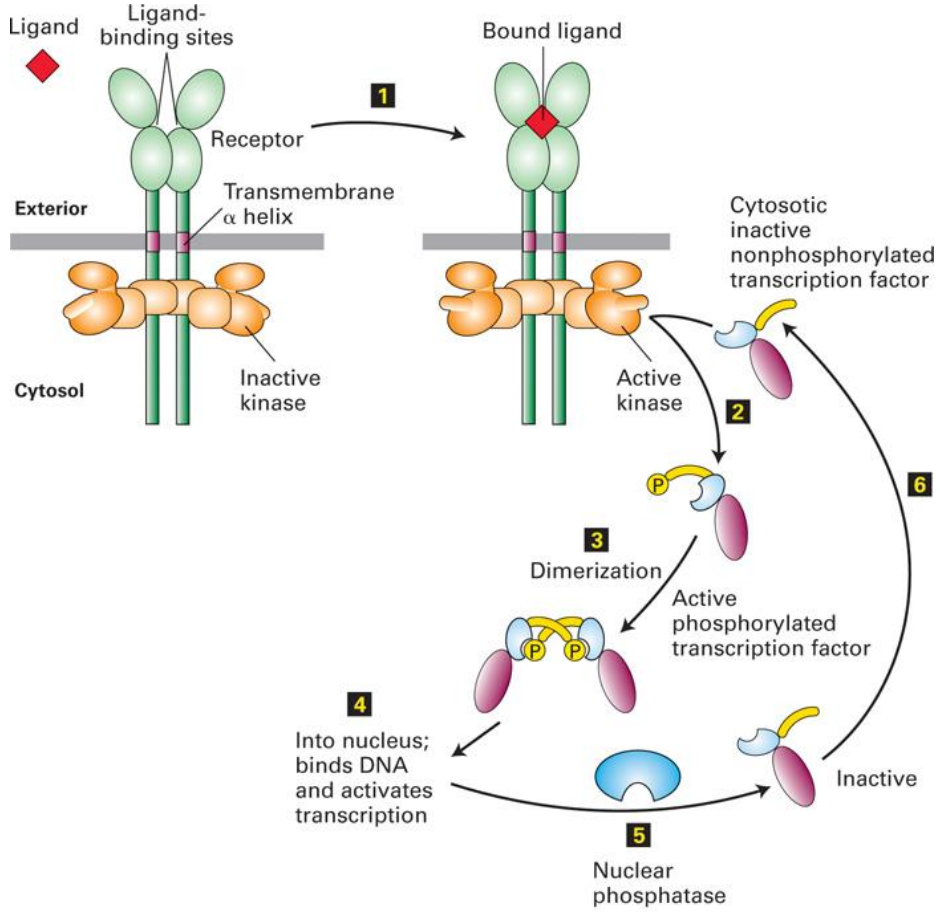
PhosphoSitePlus® v6.7.1.1
Powered by Cell Signaling Technology
Feedback | Contact | Login
Home Search Browse Tools Downloads About
Home > Protein > Src human
New Protein Search: Submit
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
Total number of references
Residue number
SH3_1
SH2
PK_Tyr_Ser-Thr
Show on y-axis
References (HTP + LTP)
References (LTP)
References (HTP)
log2 Transformation
Filter PTM sites
Minimum 5 References
Add Disease Variants
Somatic Cancer Mutations
Germline Disease SNPs
Legend: PTM sites
Phosphorylation
Acetylation
Ubiquitylation
Other

TRANSDUKCE SIGNÁLU ZPROSTŘEDKOVANÁ KINÁZAMI

Model:

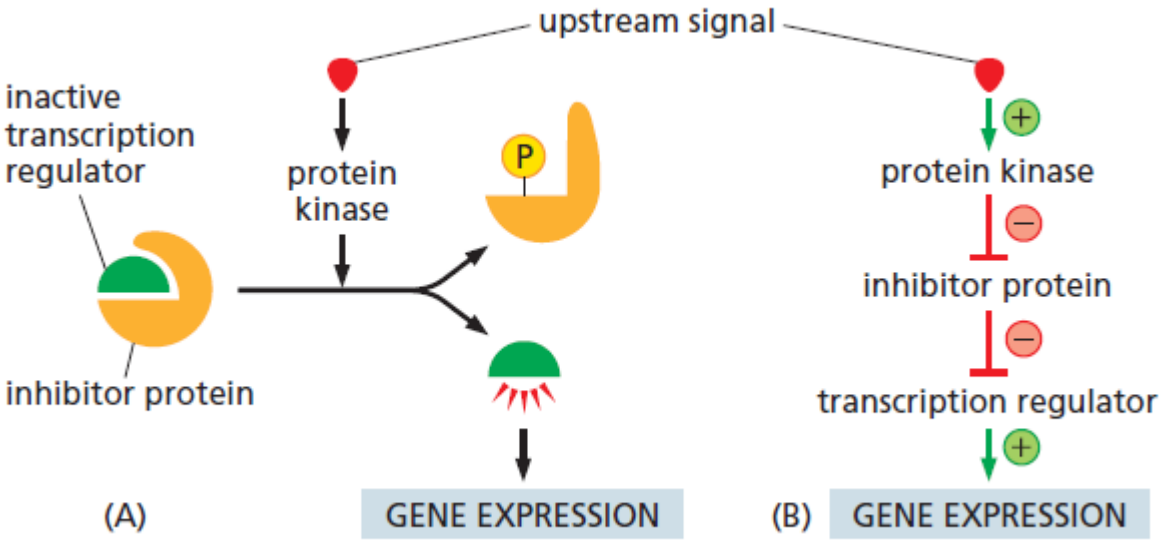
- Proteinkináza navázaná na receptor
- Cílový protein - transkripční faktor

1) Vazba ligandu -> aktivace receptoru -> aktivace kinázy
2) Aktivace kinázy -> fosforylace cílového proteinu
3) Fosforylace cílového proteinu -> dimerizace
4) Dimerizace -> transport do jádra -> efekt
5) Efekt -> aktivace jaderné fosfatázy -> konec efektu
6) Konec efektu -> inaktivní cílový protein do cytoplasmy



REGULACE SIGNÁLU ZPROSTŘEDKOVANÁ KINÁZAMI

- Signální dráha = řada aktivačních kroků
- Většina kroků je regulovatelná/inhibovatelná
- Dva inhibiční kroky po sobě -> aktivace



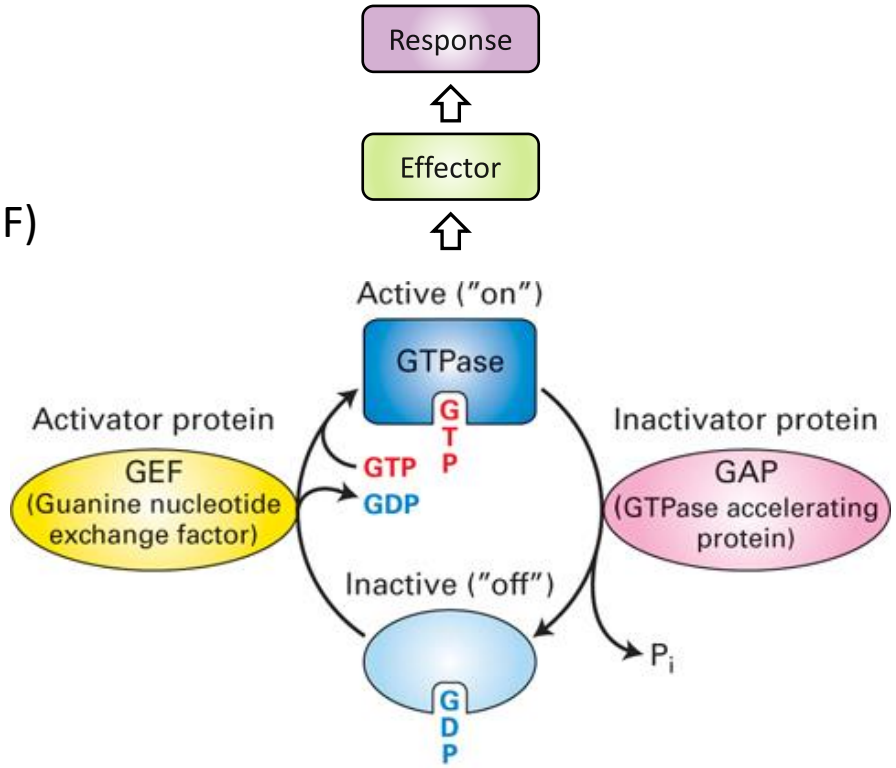
Např.: ligandem aktivovaná kináza může inhibovat protein (fosforylací), který inhibuje určitou buněčnou odpověď

TRANSDUKCE SIGNÁLU – GTPázy (GTP FOSFOHYDROLÁZY)

- Velká superrodina proteinů: heterotrimerické G proteiny, malé GTPázy, translační faktory, a další…
- Regulují funkce: syntéza proteinů, transport proteinů, tvorba váčků, fúze váčků, reorganizace cytoskeletu…
- Fungují jako přepínač ON/OFF
- Váží GTP (guanozintrifosfát) = aktivní forma (ON)

  – mění aktivitu cílového proteinu
- Hydrolyzují GTP na GDP (guanozindifosfát) = inaktivní forma (OFF)

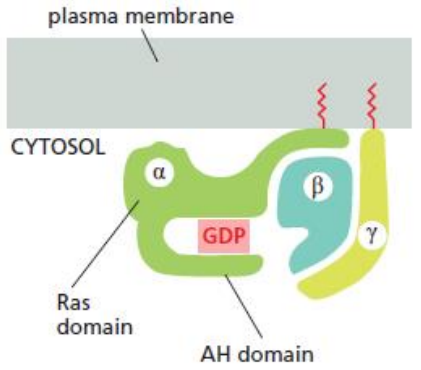
  – nemění aktivitu cílového proteinu
- Délka aktivace - závisí na GTPázové aktivitě

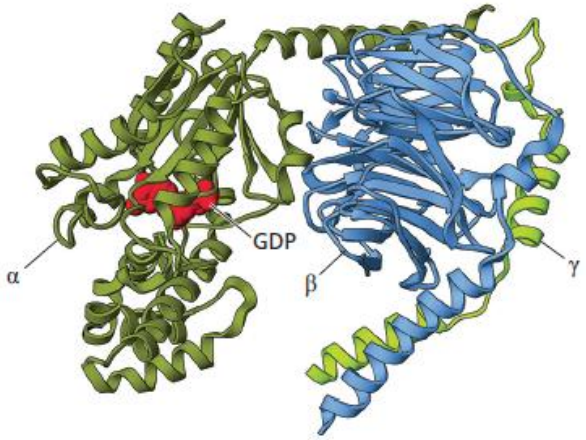


<u>Regulační proteiny</u>

- GEF (guanine nucleotide-exchange factors) - podporují aktivitu
- GAP (GTPase-activating proteins) - podporují hydrolýzu GTP

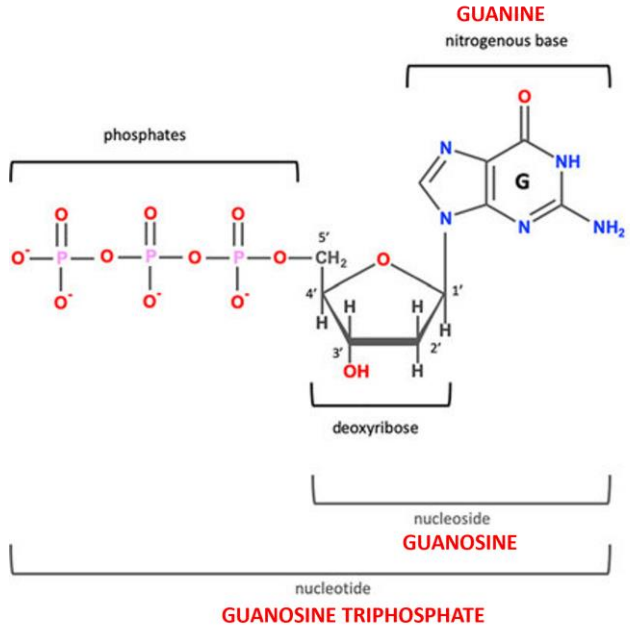
GTPázy (GTP FOSFOHYDROLÁZY)





Heterotrimerické G proteiny

- Složené ze 3 podjednotek
- α, β, γ (všechny mají několik variant)
- Navázané na receptor (transmembránový) – funguje jako GEF
- Aktivace receptorem
- Po aktivaci – uvolňují GDP, váží GTP



Malé monomerické G proteiny

- Homologní k alfa podjednotce
- Např. Ras, Ras-like
- Interakce s receptorem přes adaptorové proteiny a GEFs
- Změny v konformaci po navázání GTP/ hydrolýze

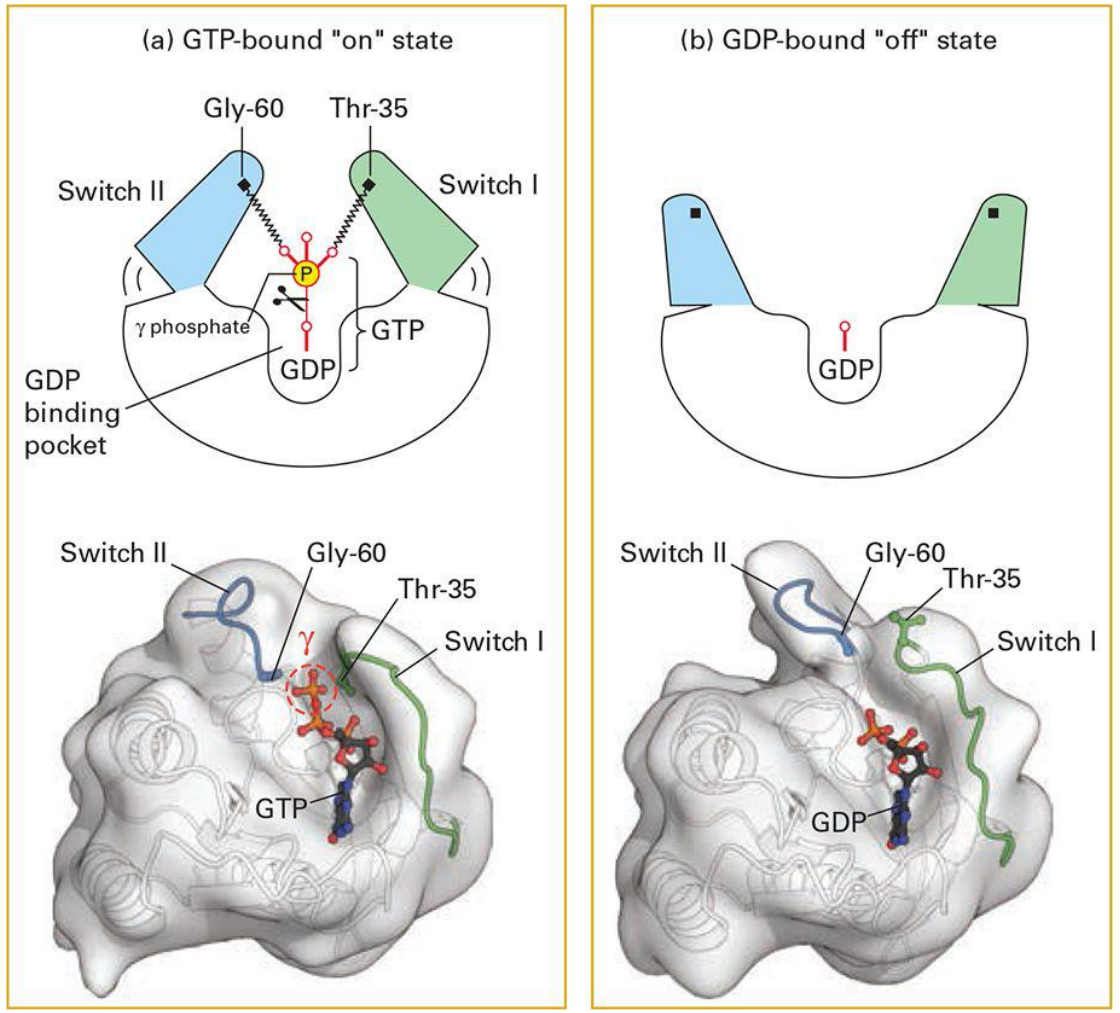
PŘEPÍNÁNÍ MONOMERNÍHO G PROTEINU (RAS)

ON:

- 2 domény (Switch I a II) – vazba s fosfátem GTP
- Konformační změna proteinu
- Domény Switch interagují s cílovým proteinem

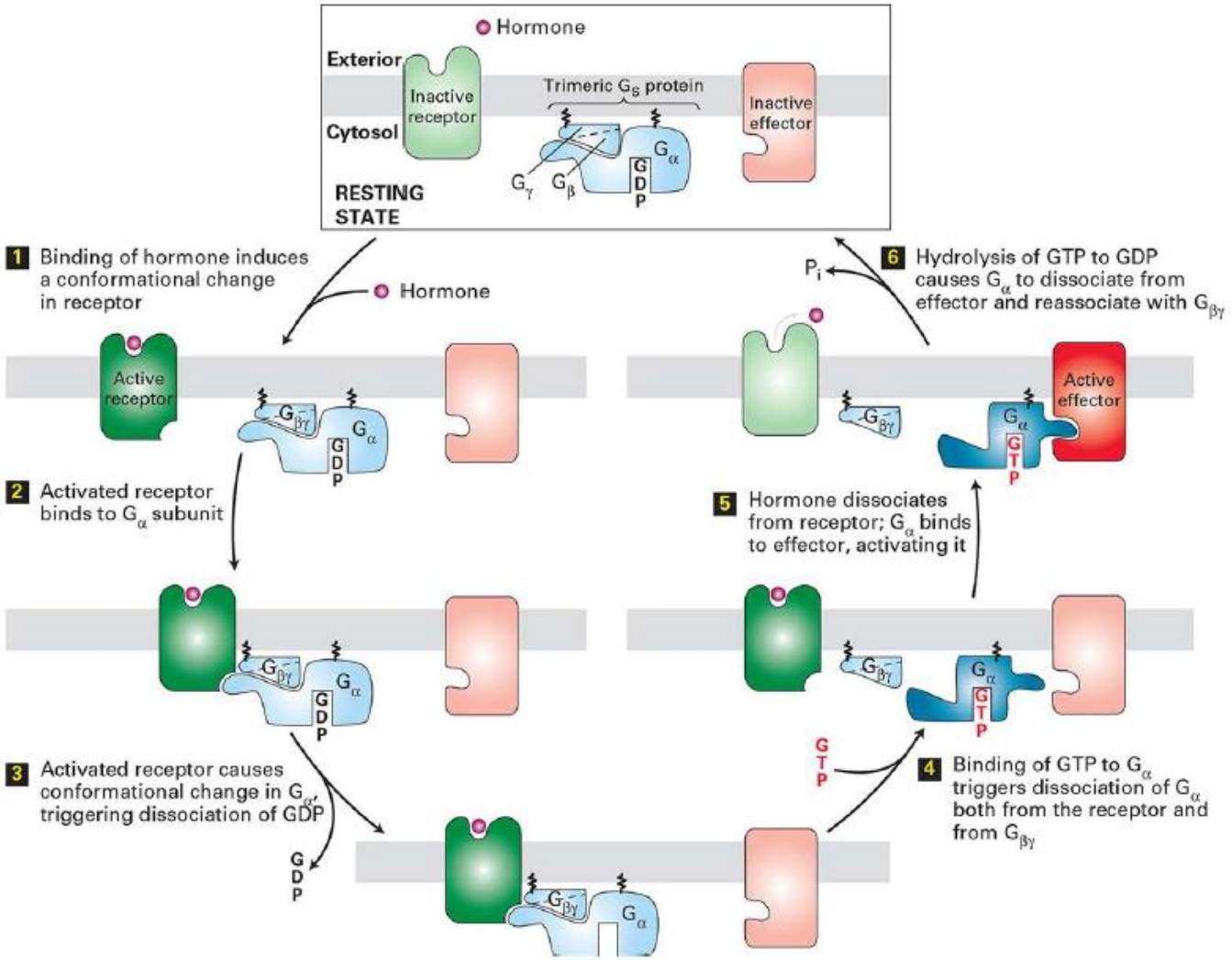
OFF:

- Po hydrolýze fosfátu –relaxace Switch domén
- Konformační změna proteinu
- Domény Switch NEinteragují s cílovým proteinem

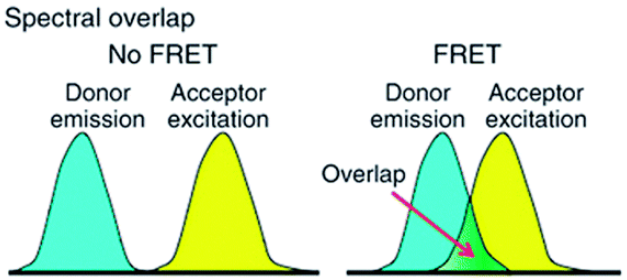


AKTIVACE HETEROTRIMERICKÉHO G PROTEINU

- Může být s receptorem přímo asociovaný nebo až po aktivaci receptoru
- 3 podjednotky: α, β, γ
- V neaktivní stavu – G_α váže GDP
- Po aktivaci receptor funguje jako GEF (guanine nucleotide-exchange factors)
- Výměna GTP za GDP
- Konformační změna α podjednotky
- Uvolnění G proteinu od receptoru
- Disociace G_α od dimeru $G_{\beta\gamma}$
- G_α aktivuje efektorový protein
- $G_{\beta\gamma}$ také může přenášet signál
- Hydrolýza GTP -> GDP uvolní G_α z efektoru
- Znovusestavení G proteinu

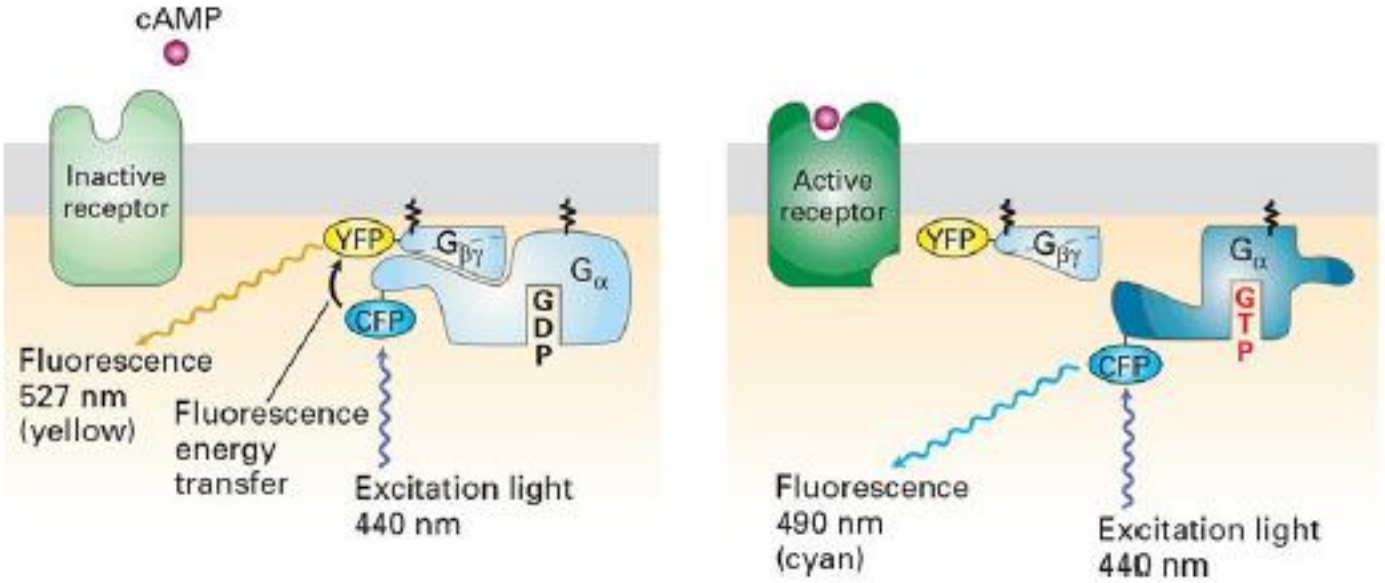


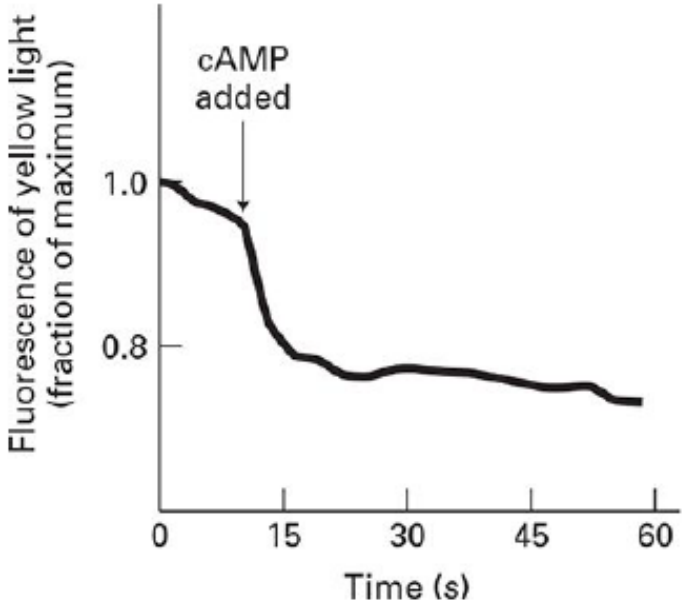
EXPERIMENTÁLNÍ PRŮKAZ RYCHLOSTI AKTIVACE G PROTEINU



Pomocí metody FRET - Förster (Fluorescence) Resonance Energy Transfer

- studium interakce fluorescenčně značených molekul
- měření nanometrových vzdáleností a jejich změn mezi molekulami (1-10 nm)
- 2 fluorofory: donorový + akceptorový navázané na 2 proteiny
- Podmínka: překryv emisního spektra donoru s excitačním spektrem akceptoru





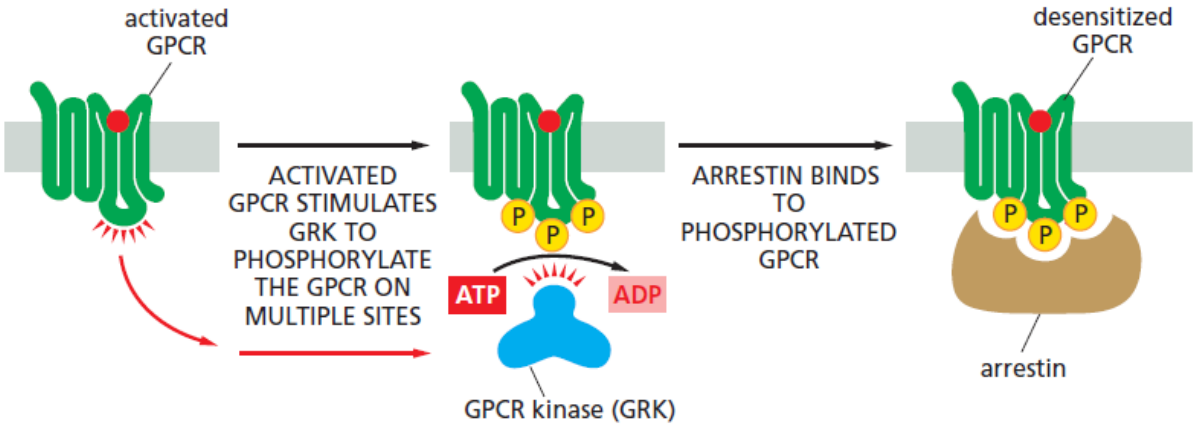
UKONČENÍ SIGNALIZACE

Desenzitizace G proteinu

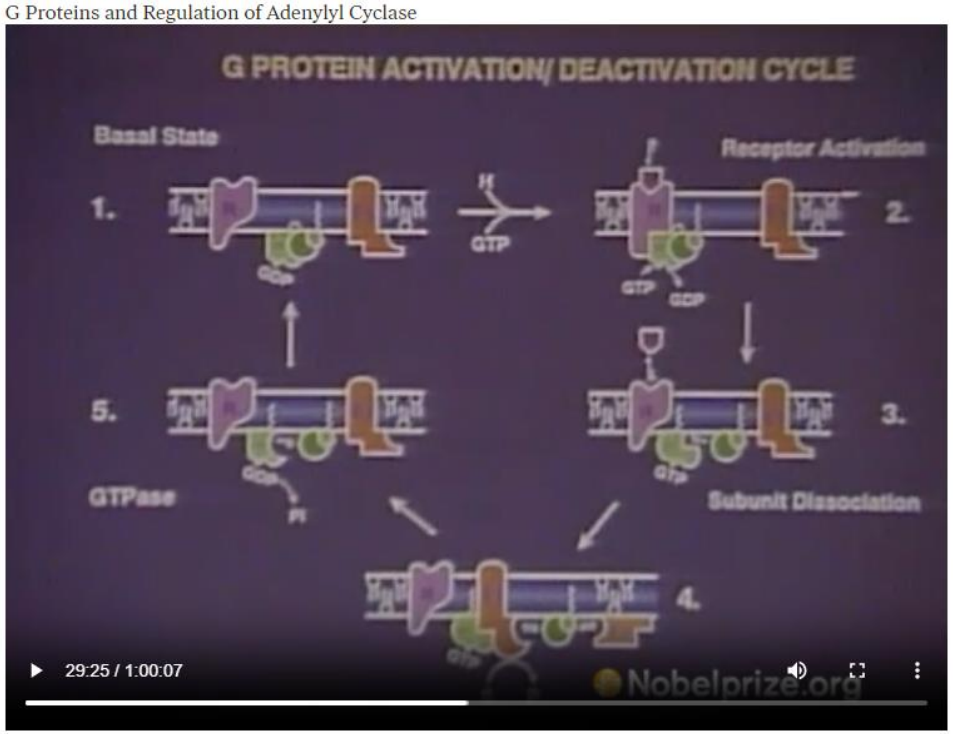
- Vazba regulačních proteinů (např. RGS , regulator of G protein signaling)
- Urychluje GTPázovou aktivitu, ukončuje signalizaci

Desenzitizace receptoru

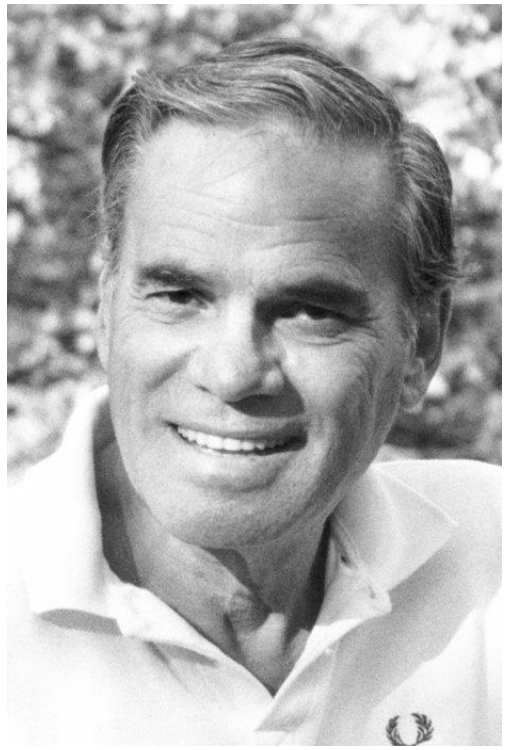
- Fosforylace kinázami (PKA, PKC, GPCR kinázy)
- Vazba arrestinu
- Zabraňuje interakci s G proteinem, váže proteiny pro endocytózu



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1994



Alfred G. Gilman



Martin Rodbell

"for their discovery of G-proteins and the role of these proteins in signal transduction in cells"

Receptory spřažené s G-proteiny jako cíle léčiv

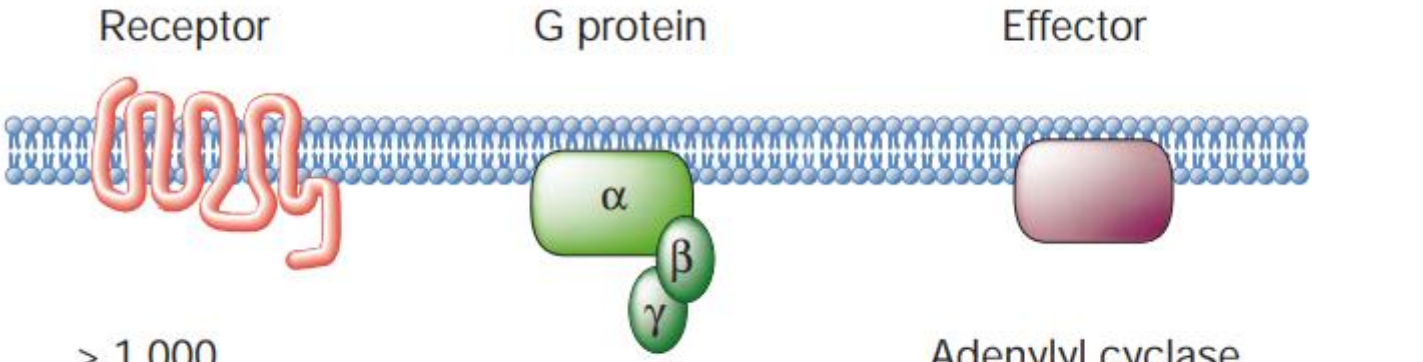
- Velké množství receptorů reguluje velké množství buněčných procesů
- Podíl na různých patologiích
- Cíle léčby: použití antagonistů i agonistů

TABLE 15-1 Human G Protein–Coupled Receptors of Pharmaceutical Importance

Receptor	Natural Ligand	Location	Physiological Function	Drug	Medical Use
Histamine H_2 receptor	Histamine	Acid-secreting cells of the stomach	Stimulates acid secretion	Cimetidine (Tagamet) Ranitidine (Zantac) (antagonists)	Prevent acid stomach; treat peptic ulcers
Histamine H_1 receptor	Histamine	Smooth muscles, vascular endothelial cells	Increases vascular permeability and causes symptoms of allergy	Fexofenadine (Allegra) Loratadine (Claritin) (antagonists)	Reduce symptoms of allergy
Serotonin $5HT_{2A}$	Serotonin	Central nervous system	Synaptic transmission between neurons	Clozapine, risperidone (antagonists)	Treat schizophrenia
Serotonin $5HT_{1a}$	Serotonin	Central nervous system	Synaptic transmission between neurons	Buspirone (BuSpar) (agonist)	Treat depression, general anxiety disorder
Angiotensin AT_1	Angiotensin II	Vascular smooth muscle cells	Constrict blood vessels and increase blood pressure	Losartan (Cozarr) (antagonist)	Reduce hypertension
β_2-adrenergic receptor	Epinephrine	Smooth muscle cells lining the airway	Facilitate respiration	Salmeterol (Severent) (agonist)	Treatment of asthma, chronic obstructive pulmonary disease
$CysLT_1$	Leukotrienes	Lungs, bronchial tubes, mast cells	Contracts smooth muscles	Montelukast (Singulair) (antagonist)	Treatment of asthma, seasonal allergies

EFEKTOROVÉ PROTEINY G PROTEINŮ

- iontové kanály
- membránové enzymy zodpovědné za tvorbu sekundárních přenašečů



> 1,000
Adrenergic
Dopaminergic
Opioid
Sensory – rhodopsin, olfactory, taste
Glycoprotein hormones
Lipids and other small molecules

21 α-subunits
6 β-subunits
12 γ-subunits

Adenylyl cyclase
Phospholipases C & A_2
cGMP phosphodiesterase
Potassium channels
Calcium channels

NAPOJENÍ G PROTEINŮ NA MEMBRÁNOVÉ ENZYMY

- Transdukce signálu do cytosolu – tvorba druhých poslů
- Typ G_α určuje typ efektoru

- Enzymy:
  - Adenylátcykláza – cyklický adenosinmonofosfát (↑↓ cAMP)
  - Fosfolipáza C – inositoltrifosfát (↑IP_3), diacylglycerol (↑DAG)
  - cGMP fosfodiesteráza – cyklický guanosinmonofosfát (↓cGMP)

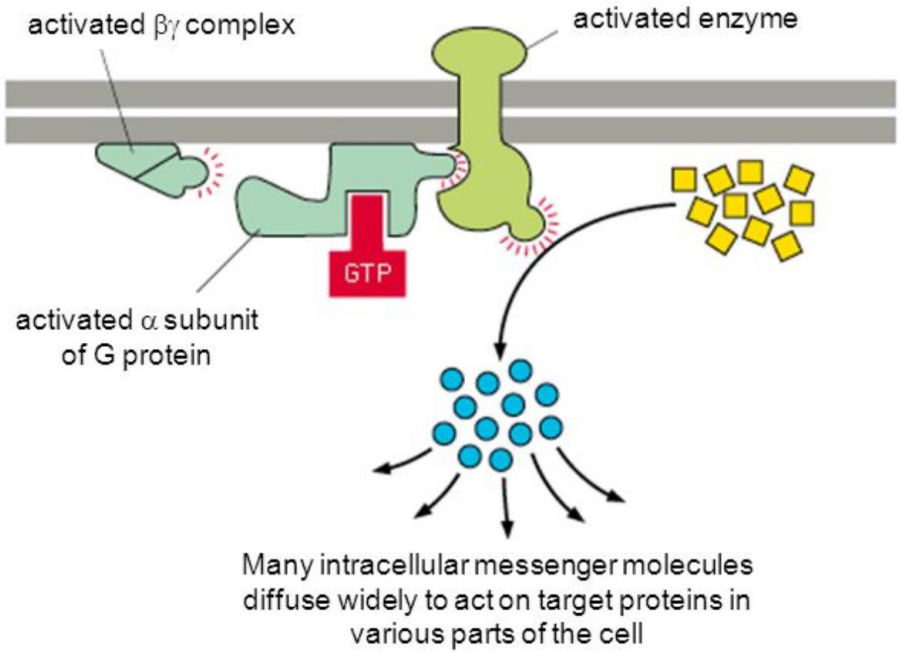


TABLE 15-1 Major Classes of Mammalian Trimeric G Proteins and Their Effectors*

G_α Class	Associated Effector	2nd Messenger	Receptor Examples
$G_{\alpha s}$	Adenylyl cyclase	cAMP (increased)	β-Adrenergic (epinephrine) receptor; receptors for glucagon, serotonin, vasopressin
$G_{\alpha i}$	Adenylyl cyclase K^+ channel ($G_{\beta\gamma}$ activates effector)	cAMP (decreased) Change in membrane potential	α_2-Adrenergic receptor Muscarinic acetylcholine receptor
$G_{\alpha olf}$	Adenylyl cyclase	cAMP (increased)	Odorant receptors in nose
$G_{\alpha q}$	Phospholipase C	IP_3, DAG (increased)	α_1-Adrenergic receptor
$G_{\alpha o}$	Phospholipase C	IP_3, DAG (increased)	Acetylcholine receptor in endothelial cells
$G_{\alpha t}$	cGMP phosphodiesterase	cGMP (decreased)	Rhodopsin (light receptor) in rod cells

*A given G_α subclass may be associated with more than one effector protein. To date, only one major $G_{\alpha s}$ has been identified, but multiple $G_{\alpha q}$ and $G_{\alpha i}$ proteins have been described. Effector proteins commonly are regulated by G_α but in some cases by $G_{\beta\gamma}$ or the combined action of G_α and $G_{\beta\gamma}$. IP_3 = inositol 1,4,5-trisphosphate; DAG = 1,2-diacylglycerol.

TABLE 15–3 Four Major Families of Heterotrimeric G Proteins*

Family	Some family members	Subunits that mediate action	Some functions
I	G_s	α	Activates adenylyl cyclase; activates Ca^{2+} channels
	G_{olf}	α	Activates adenylyl cyclase in olfactory sensory neurons
II	G_i	α	Inhibits adenylyl cyclase
		βγ	Activates K^+ channels
	G_o	βγ	Activates K^+ channels; inactivates Ca^{2+} channels
		α and βγ	Activates phospholipase C-β
	G_t (transducin)	α	Activates cyclic GMP phosphodiesterase in vertebrate rod photoreceptors
III	G_q	α	Activates phospholipase C-β
IV	$G_{12/13}$	α	Activates Rho family monomeric GTPases (via Rho GEF) to regulate the actin cytoskeleton

*Families are determined by amino acid sequence relatedness of the α subunits. Only selected examples are included. About 20 α subunits and at least 6 β subunits and 11 γ subunits have been described in humans.

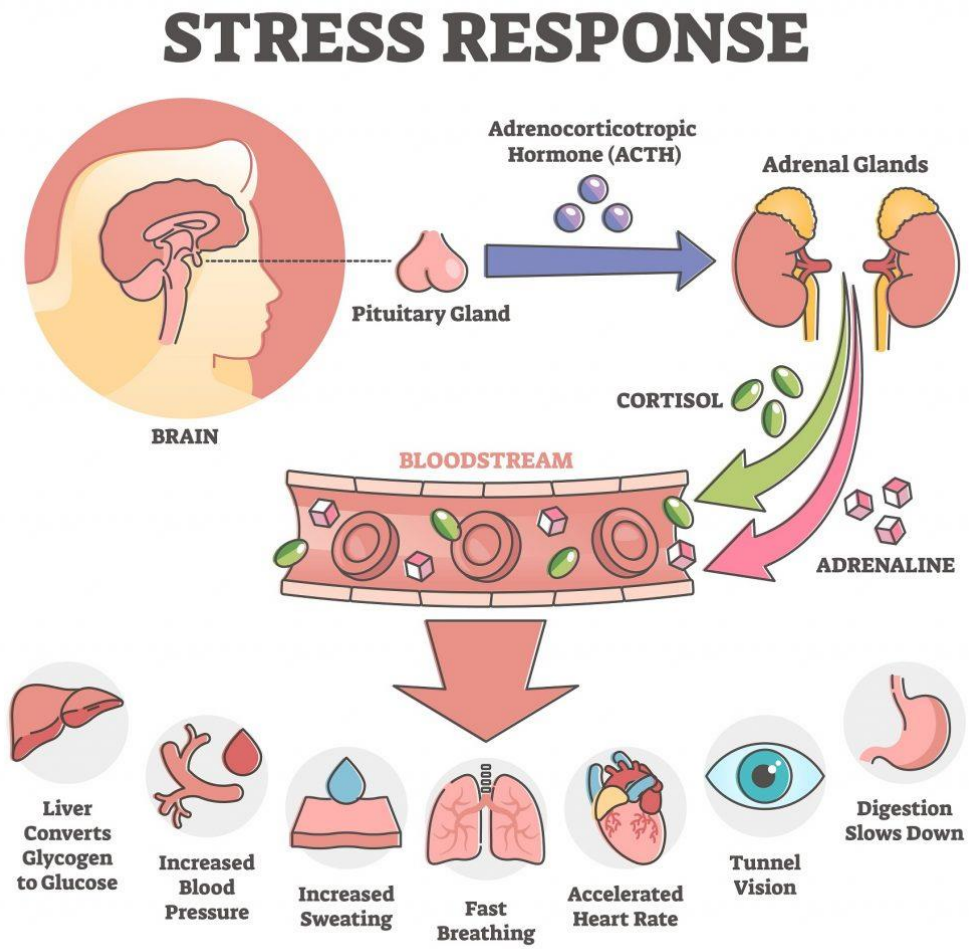
AMP (increased)	β-Adrenergic (epinephrine) receptor; receptors for glucagon, serotonin, vasopressin
cAMP (increased)	Odorant receptors in nose
cAMP (decreased) Change in membrane potential	α_2-Adrenergic receptor Muscarinic acetylcholine receptor
IP_3, DAG (increased)	Acetylcholine receptor in endothelial cells
cGMP (decreased)	Rhodopsin (light receptor) in rod cells
IP_3, DAG (increased)	α_1-Adrenergic receptor

RECEPTOR A G-PROTEIN URČUJE BUNĚČNOU ODPOVĚĎ

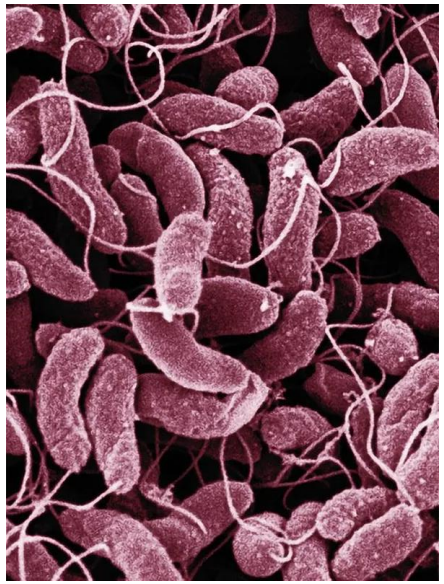
Adrenalin a stresová reakce organismu "fight-or-flight"

- Adrenalin se váže na různé receptory různých buněk
- Aktivace β1-adrenergního receptoru buněk srdeční svaloviny -> $G_{\alpha s}$ -> tvorba cAMP -> zvýšení kontrakce a krevního zásobení
- Aktivace α1-adrenergního receptoru buněk hladké svaloviny v trávící soustavě, kůži a ledvinách -> $G_{\alpha q}$ -> tvorba druhých poslů DAG a IP3 -> zúžení cév, snížení průtoku krve, rozpad glykogenu
- Aktivace α2-adrenergního receptoru u jiných skupin somatických buněk -> $G_{\alpha i}$ -> inhibice tvorby druhého posla cAMP

Integrovaná odpověď organismu s cílem zásobovat svaly energií, ostatní tkáně omezeny, srdeční stimulace, mobilizace cukrů a tuků, roztažení dýchacích cest



BAKTERIÁLNÍ TOXINY JAKO INHIBITORY FUNKCE G PROTEINŮ



Cholera toxin

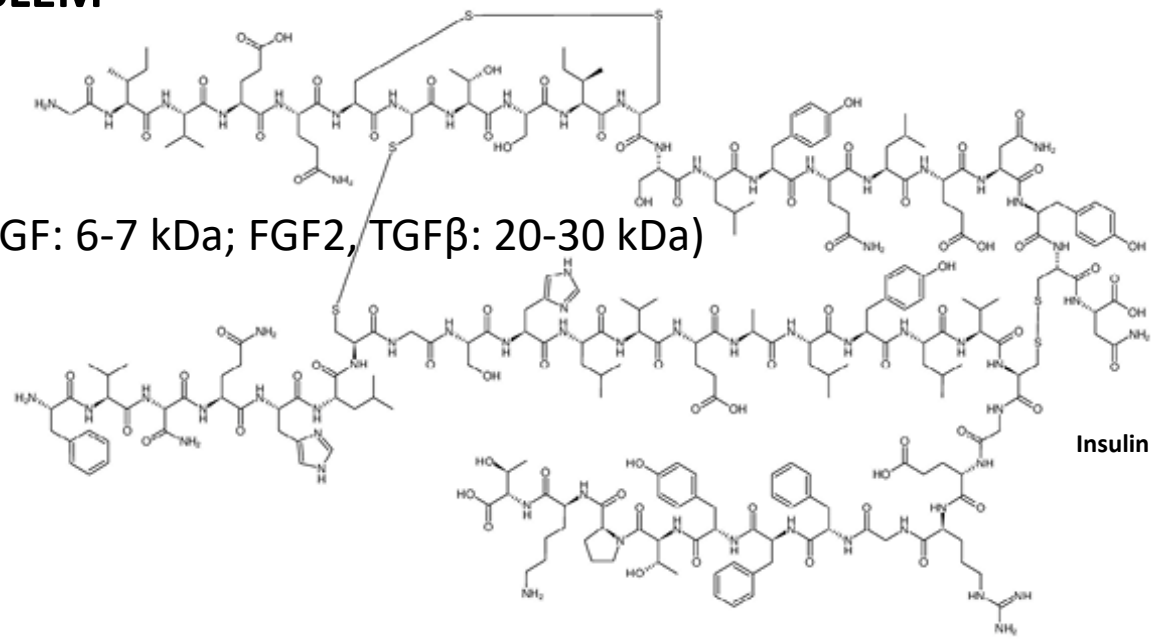
- produkován původcem cholery *Vibrio cholerae*
- prochází plasmatickou membránou epiteliálních střevních buněk
- Katalyzuje kovalentní změny $G_{\alpha s}$
- $G_{\alpha s}$ stále aktivní –> aktivuje adenylát cyklázu bez aktivace receptoru
- Neustále zvýšená produkce cAMP -> ztráta iontů (Cl^-) a vody z buněk do střeva
- Průjem = typický příznak cholery

Pertusový toxin

- produkován původcem černého kašle *Bordetella pertussis*
- prochází plasmatickou membránou buněk epitelu dýchacích cest
- Modifikuje $G_{\alpha i}$ - brání uvolnění GDP
- $G_{\alpha i}$ zůstává v inaktivním stavu -> neinhibuje adenylát cyklázu
- Neustále zvýšená produkce cAMP -> ztráta iontů a vody z buněk, tvorba hlenu
- Dávivý kašel = typický příznak černého kašle

- Oba toxiny – použití ve výzkumu, zjištění, zda jde signalizace přes $G_{\alpha s}$ nebo $G_{\alpha i}$

TRANSDUKCE SIGNÁLU PRVNÍM A DRUHÝM POSLEM



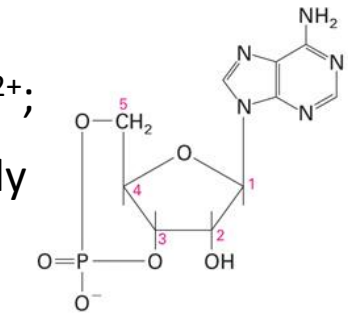
Insulin

První posel (1st messenger)

- Extracelulární ligand – relativně velký protein (INS, EGF: 6-7 kDa; FGF2, TGFβ: 20-30 kDa)
- Velký počet různých ligandů
- Vazba na membránový receptor

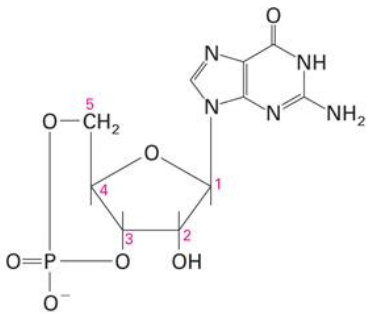
Druhý posel (2nd messenger)

- Malé molekuly (Ca: 40 Da; fosfoinositidy: ≈1 kDa)
- Omezený počet (6 u živočichů)
- cAMP; cGMP; 1,2-diacylglycerol (DAG); Ca^{2+};
- inositol 1,4,5-trisphosfát (IP_3); fosfoinositidy
- Rychlá difuze cytoplasmou k cílům
- Usnadňuje amplifikaci signálu



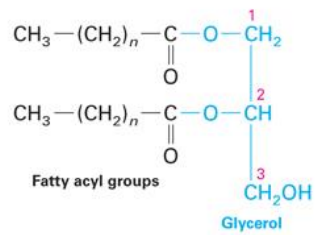
3′,5′-Cyclic AMP (cAMP)

Activates protein kinase A (PKA)



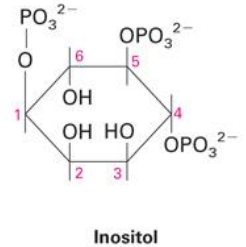
3′,5′-Cyclic GMP (cGMP)

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



1,2-Diacylglycerol (DAG)

Activates protein kinase C (PKC)

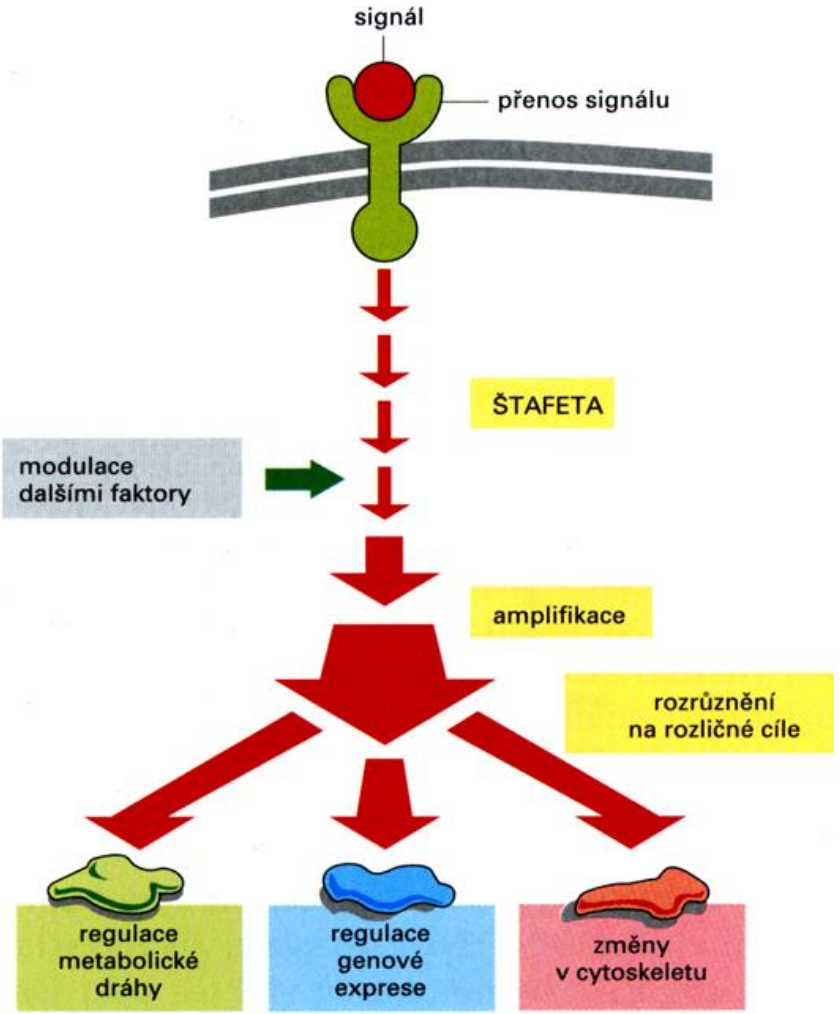


Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3)

Opens Ca^{2+} channels in the endoplasmic reticulum

TRANSDUKCE A AMPLIFIKACE SIGNÁLU

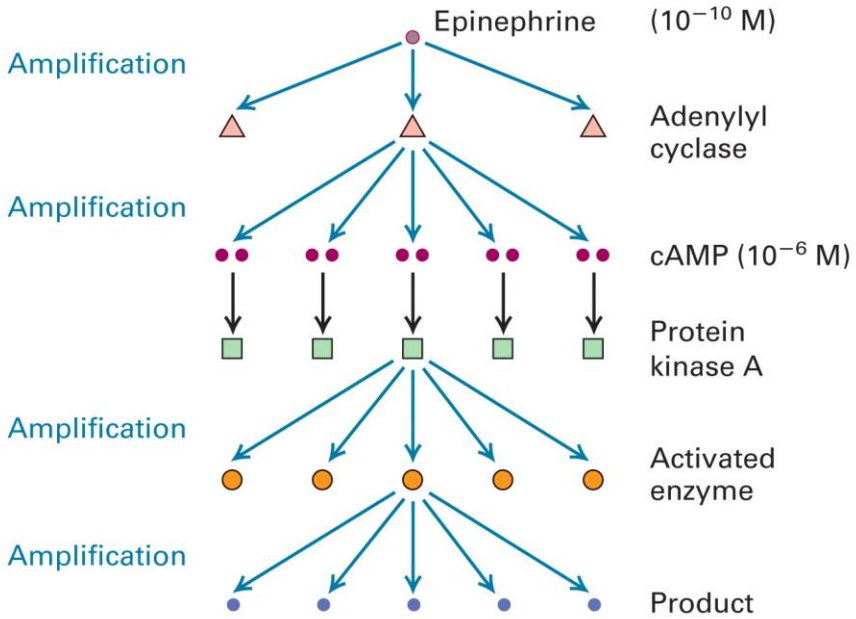
- Signální dráha – kombinace signálních proteinů
- Každý stupeň transdukce může amplifikovat signál
- Vznik amplifikační kaskády
- Aktivace/inhibice velkého množství cílového proteinu

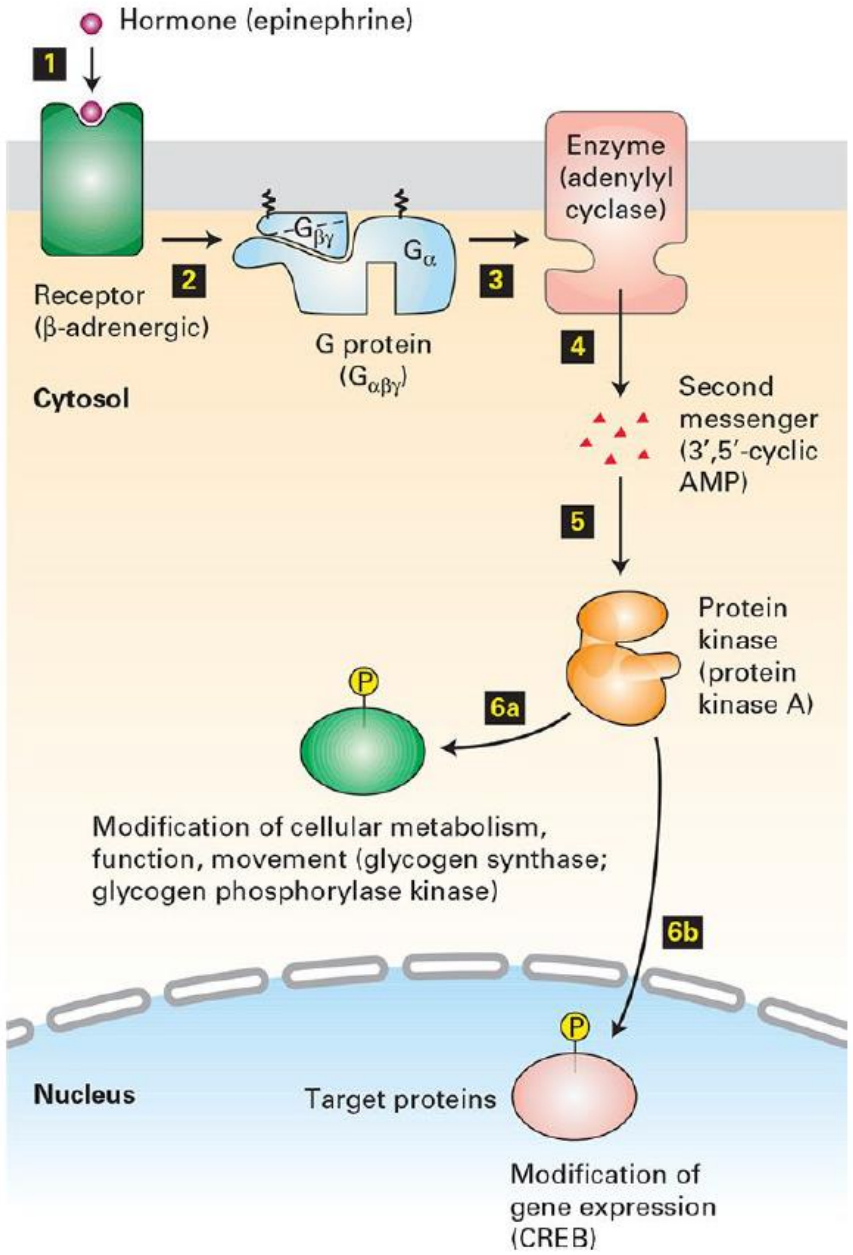


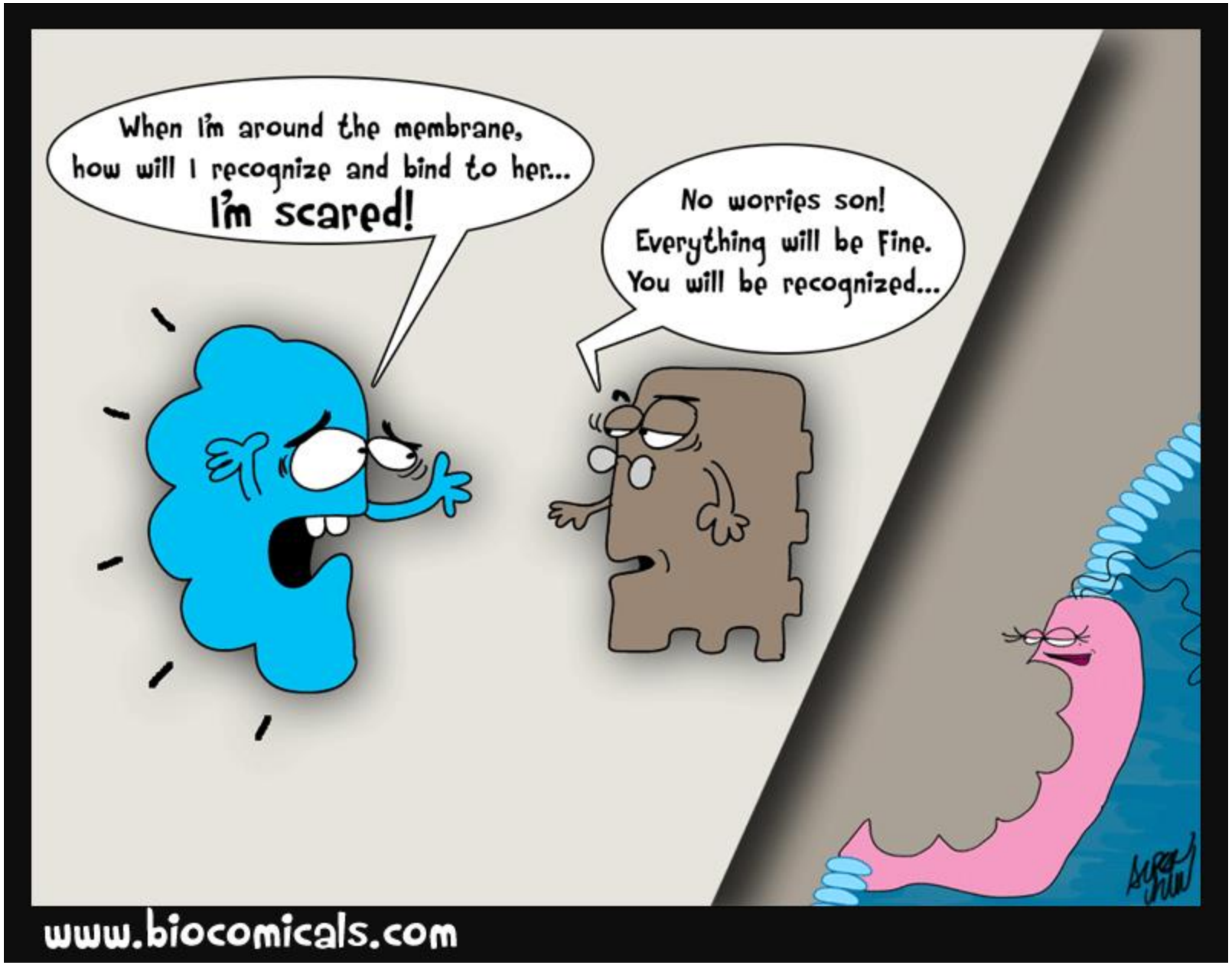
TRANSDUKCE A AMPLIFIKACE SIGNÁLU

Příklad: Adrenalinová signalizace -> glykogenolýza v hepatocytech

- Adrenalin (epinefrin) - velmi nízká koncentrace v krvi
- Vazba na β-adrenergní receptor (spřažený s G-proteinem)
- Aktivace adenylátcyklázy
- Syntéza cAMP (druhý posel) - 10.000x víc molekul než signálu
- Další 3 katalytické kroky - 10.000x zesílení
- Celkem: 10^8 x zesílení signálu -> štěpení glykogenu -> produkce glukózy






When I'm around the membrane, how will I recognize and bind to her... I'm scared!
No worries son! Everything will be Fine. You will be recognized...
www.biocomicals.com