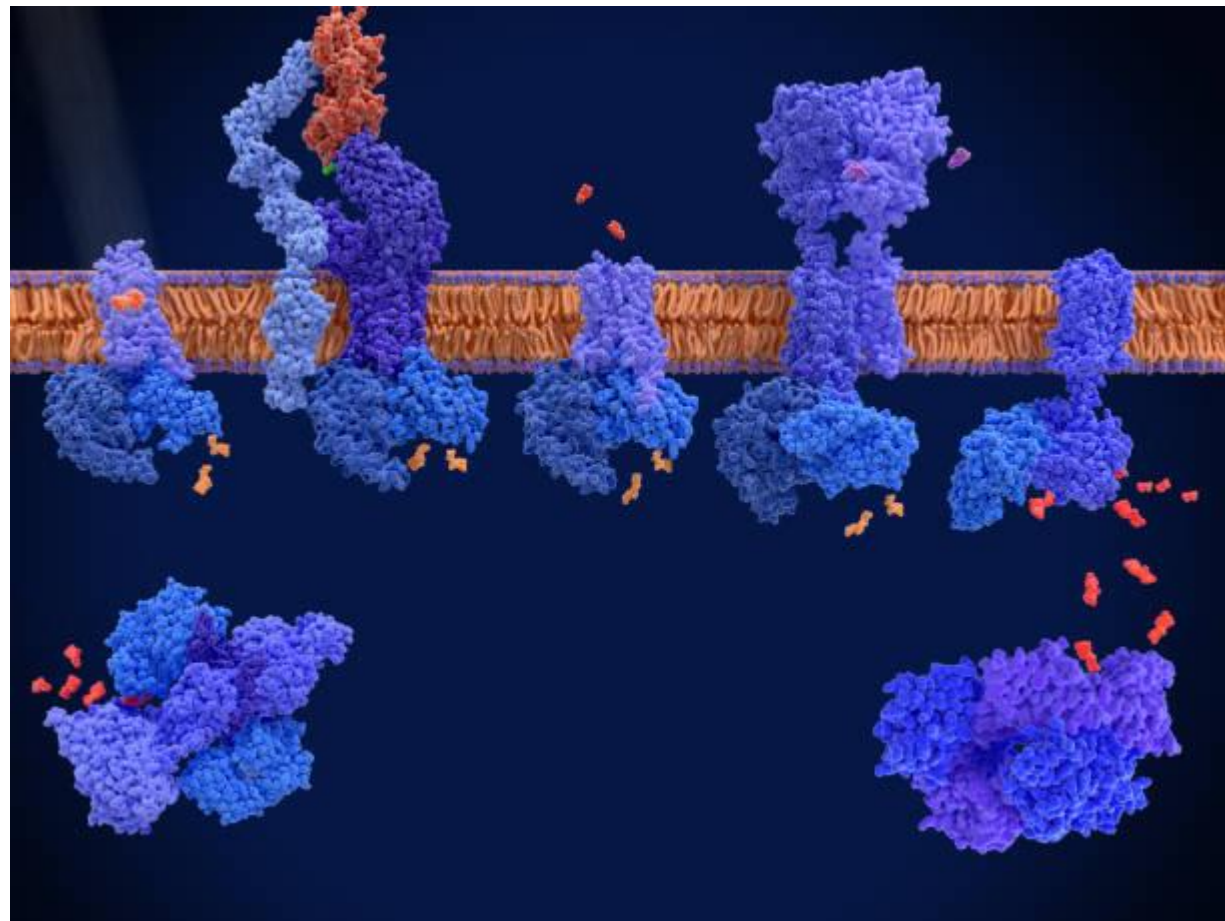


M U N I
S C I

Mezibuněčná signalizace membránovými receptory

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

Bi7005 Buněčné regulace / 2 / 27.9.2023



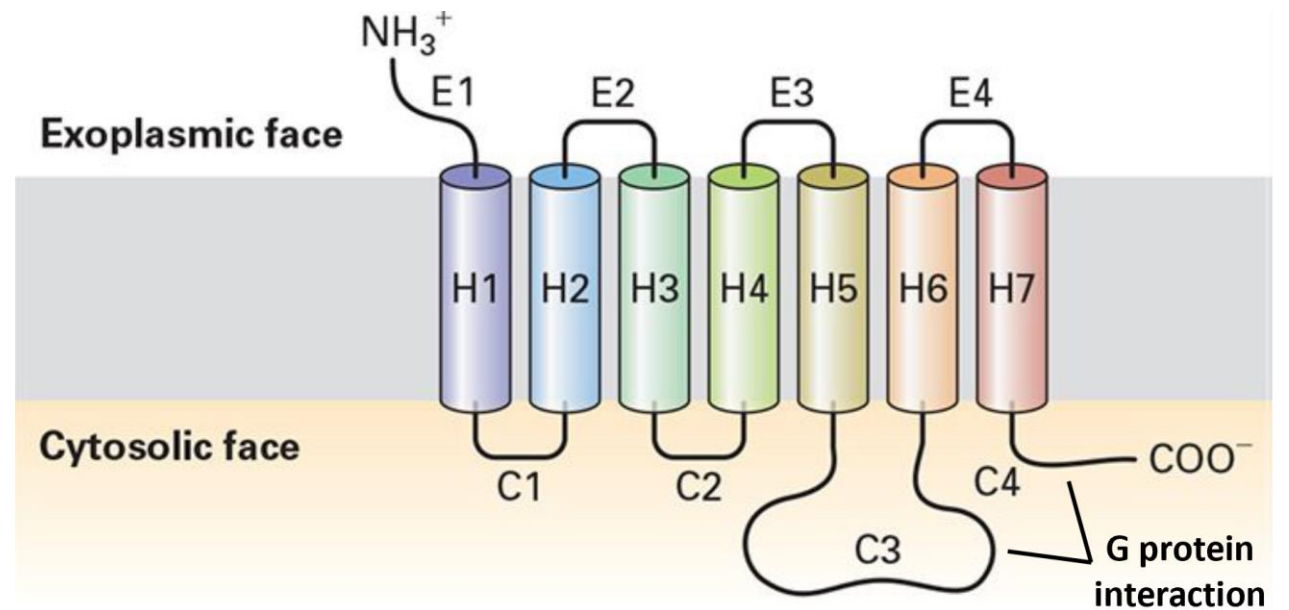
OSNOVA:

- Receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs)
- GPCRs a jejich napojení na iontové kanály
- GPCRs a jejich napojení na enzymy
- Role druhých poslů
- Receptory spřažené s enzymy
- Cytoplasmatické kinázy

Receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs)

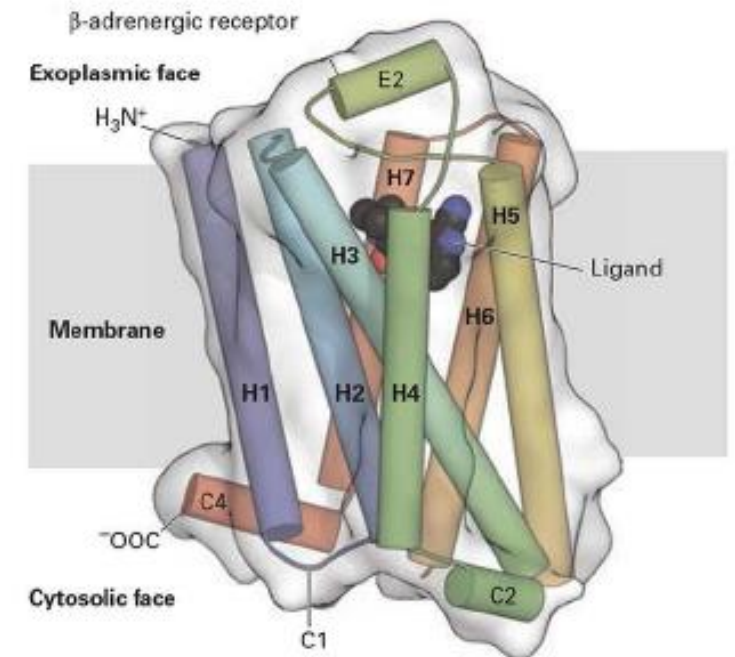
RECEPTORY SPŘAŽENÉ S G-PROTEINY (G protein-coupled receptors, GPCRs)

- 7x transmembránová α -helix doména (H1-H7)
- 4x extracelulární segment (E1-E4)
- 4x cytosolický segment (C1-C4)
- N-konec extracelulárně
- C-konec intracelulárně



RECEPTORY SPŘAŽENÉ S G-PROTEINY (G protein-coupled receptors, GPCRs)

- Největší skupina receptorů u eukaryot (lidský genom \approx 800)
- Vazba malých molekul, peptidů, proteinů
- Receptory: vidění, chutí, vůní, pro neurotransmitery, pro hormony
- Rychlé změny buněčných funkcí i změna genové exprese
- Hormon/ligand vázající doména – extracelulárně nebo v membráně
- Aktivovaný receptor po vazbě ligandu aktivuje asociovaný heterotrimerický G-protein
- Interakce pomocí C3 a C4 cytoplasmatických regionů
- G-protein interaguje s efektorovým proteinem vázaným na membráně

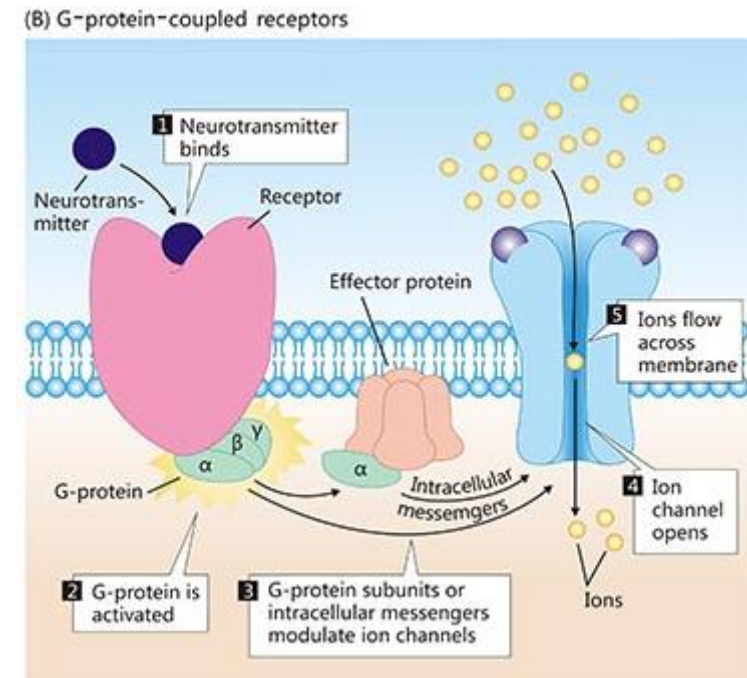
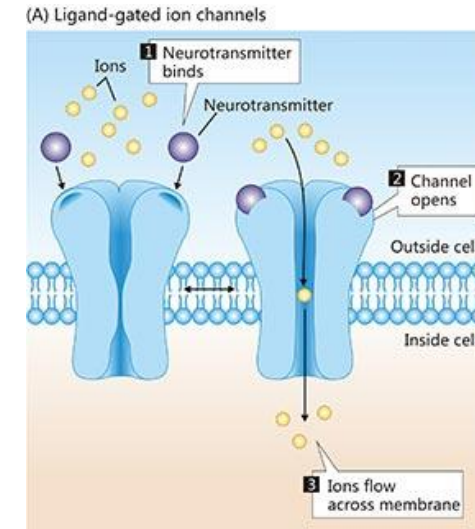


Receptory spřažené s G-proteiny a jejich napojení na iontové kanály

NAPOJENÍ GPCR NA IONTOVÉ KANÁLY

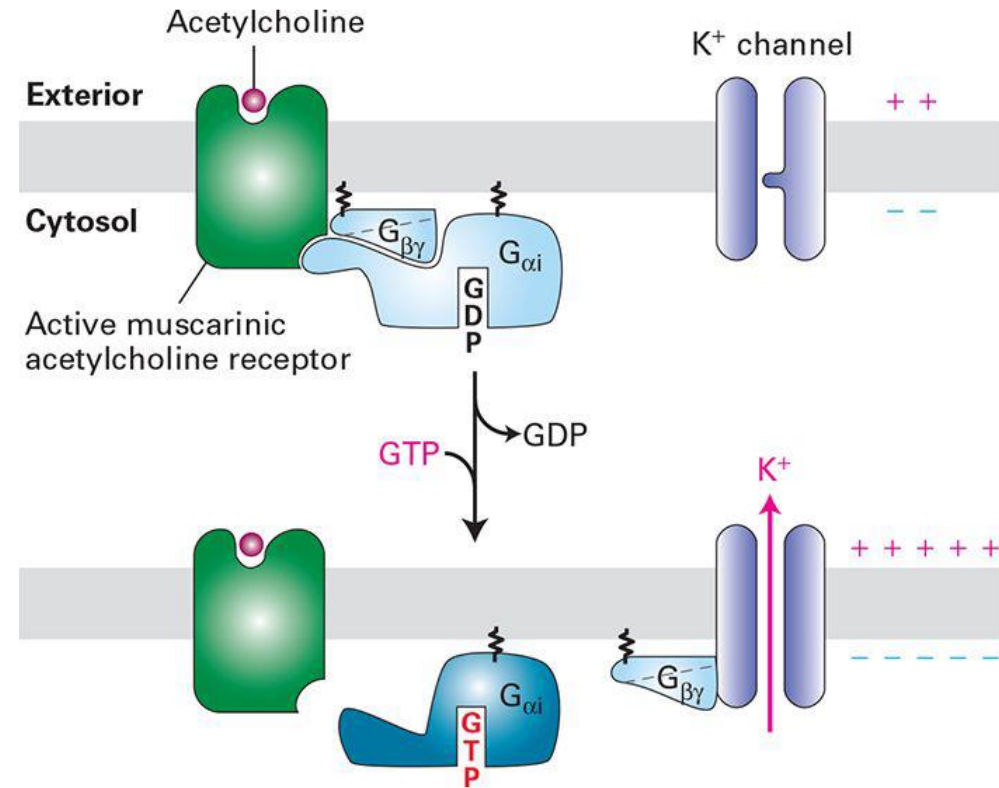
POZOR! - nejde o receptory spřažené s iontovými kanály, kdy se kanál otevírá po navázání ligandu, popsané pro některé neurotransmitery (např. acetylcholin na synapsích)

- Komplikovanější přenos signálu – přes G proteiny
- Aktivují Na^+ nebo K^+ kanály/pumpy
- Ovládají zapnutí/vypnutí funkce kanálu
- Regulovány receptory pro neurotransmitery
- Přímá regulace:
např. muskarinový acetylcholinový receptor v srdečních buňkách
- Nepřímá regulace:
Navíc role druhých posílů, např. rhodopsin v tyčinkách v oku



PŘÍMÁ REGULACE IONTOVÉHO KANÁLU G PROTEINEM

- Muskarinový acetylcholinový receptor
- V buňkách srdeční svaloviny
- Aktivace receptoru -> transdukce signálu dimerem $G_{\beta\gamma}$
- Otevření K^+ kanálu -> eflux K^+ -> hyperpolarizace membrány
- Zpomalení činnosti srdce
- Další agonista = muskarin
- Houbový toxin (strmělky, vláknice, m. červená)
- Antagonista = atropin
- Toxin rulíku
- Zrychlení činnosti srdce



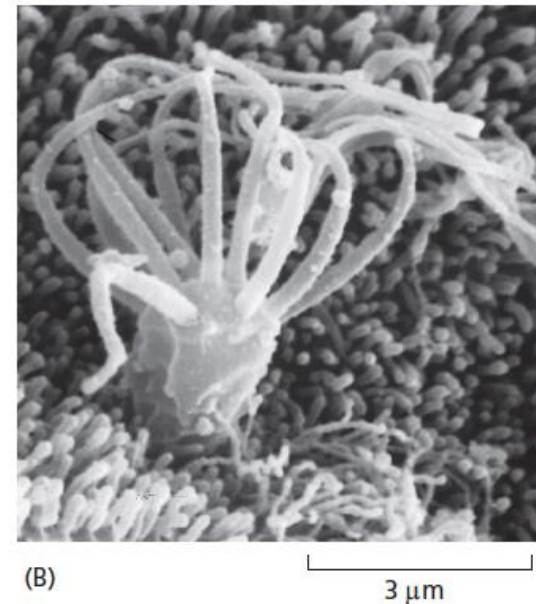
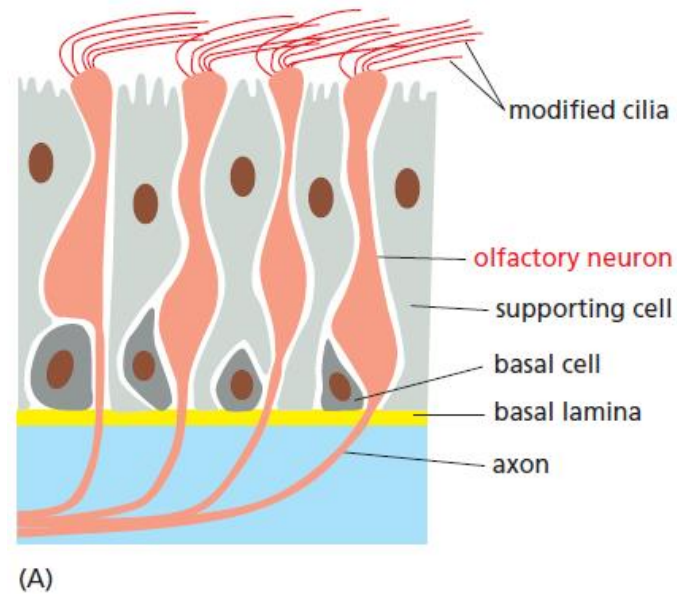
Amanita muscaria

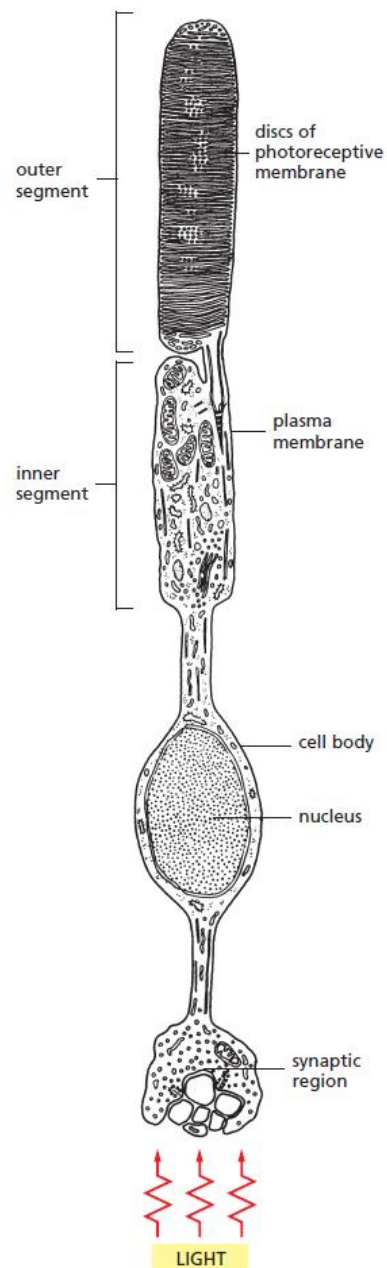


Atropa bella-donna

NEPŘÍMÁ REGULACE IONTOVÉHO KANÁLU G PROTEINEM – RECEPTORY PACHŮ

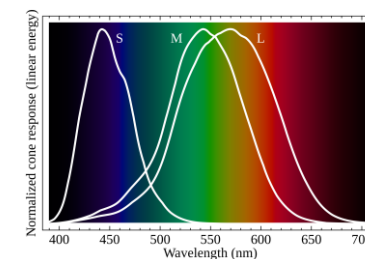
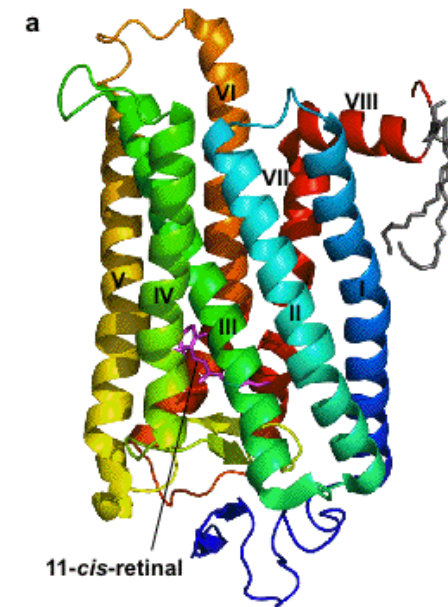
- Lidé - schopnost vnímat 10.000 pachů, 350 druhů čichových receptorů = 350 druhů čichových neuronů
- Olfaktorické (čichové) neurony exprimují na povrchu cilií olfaktorické receptory spřažené s G proteiny
- Aktivace G proteinu ($G_{\alpha\text{olf}}$) -> aktivace adenylátcyklázy -> \uparrow cAMP
- cAMP otvírá Na^+ kanály -> depolarizace membrány -> vznik vzruchu





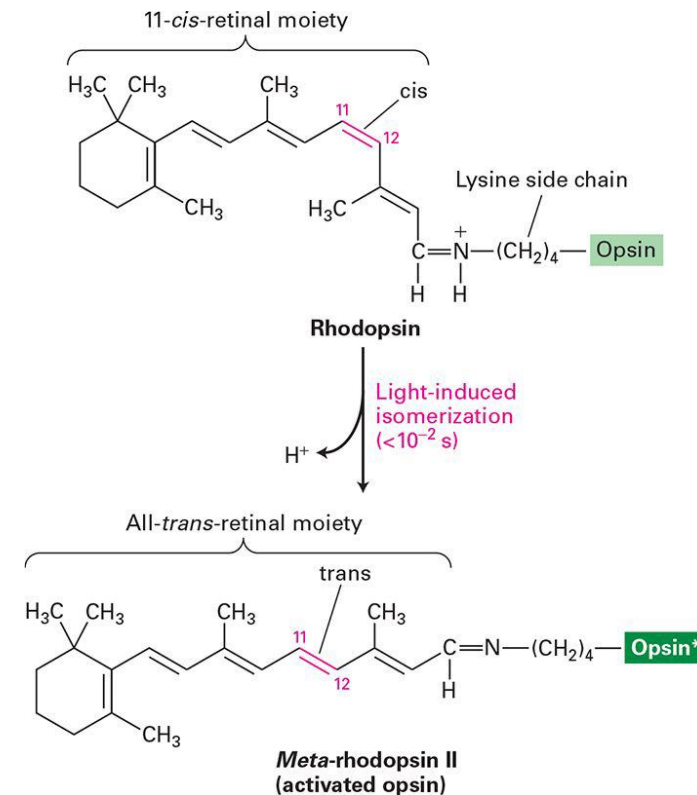
NEPŘÍMÁ REGULACE IONTOVÉHO KANÁLU G PROTEINEM – RECEPTORY SVĚTLA

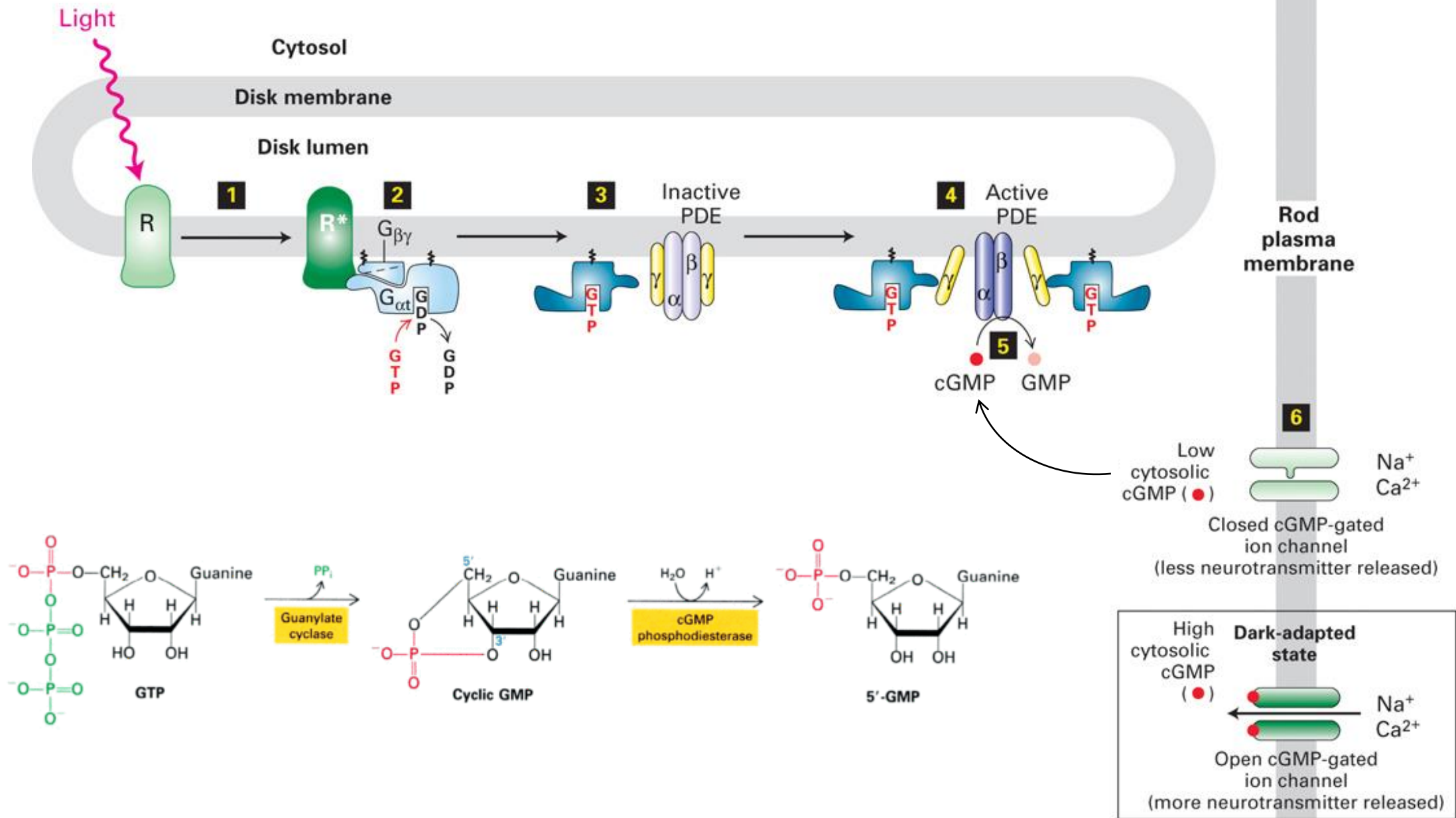
- Vnímání: slabého světla – tyčinky / barevného světla – čípky
- RHODOPSIN = s G proteinem spřažený receptor světla v tyčinkách sítnici oka
- Navázaný na membránové disky vnějšího segmentu tyčinky (40×10^6 / buňka)
- Obsahuje protein OPSIN – struktura 7 transmembránových domén
- RETINAL = světlo absorbující pigment – vazba na opsin
- TRANSDUCIN = G protein
- Čípky – u lidí 3 druhy, různé fotopsiny (modrá, zelená, žlutá)



NEPŘÍMÁ REGULACE IONTOVÉHO KANÁLU G PROTEINEM – SIGNALIZACE VIDĚNÍ

- Signálem je foton -> konverze 11-*cis*-retinalu na *all-trans*-retinal ->
- konformační změna opsinu -> aktivace G proteinu
- $G_{\alpha t}$ podjednotka aktivuje cGMP fosfodiesterázu (PDE) -> hydrolýza cGMP
- Klesá koncentrace cGMP vázaného na iontové kanály
- Zavírání kanálů v plasmatické membráně -> přechodná hyperpolarizace
- Souhrnně: světelný signál $\approx \approx \approx$ změna elektrického signálu



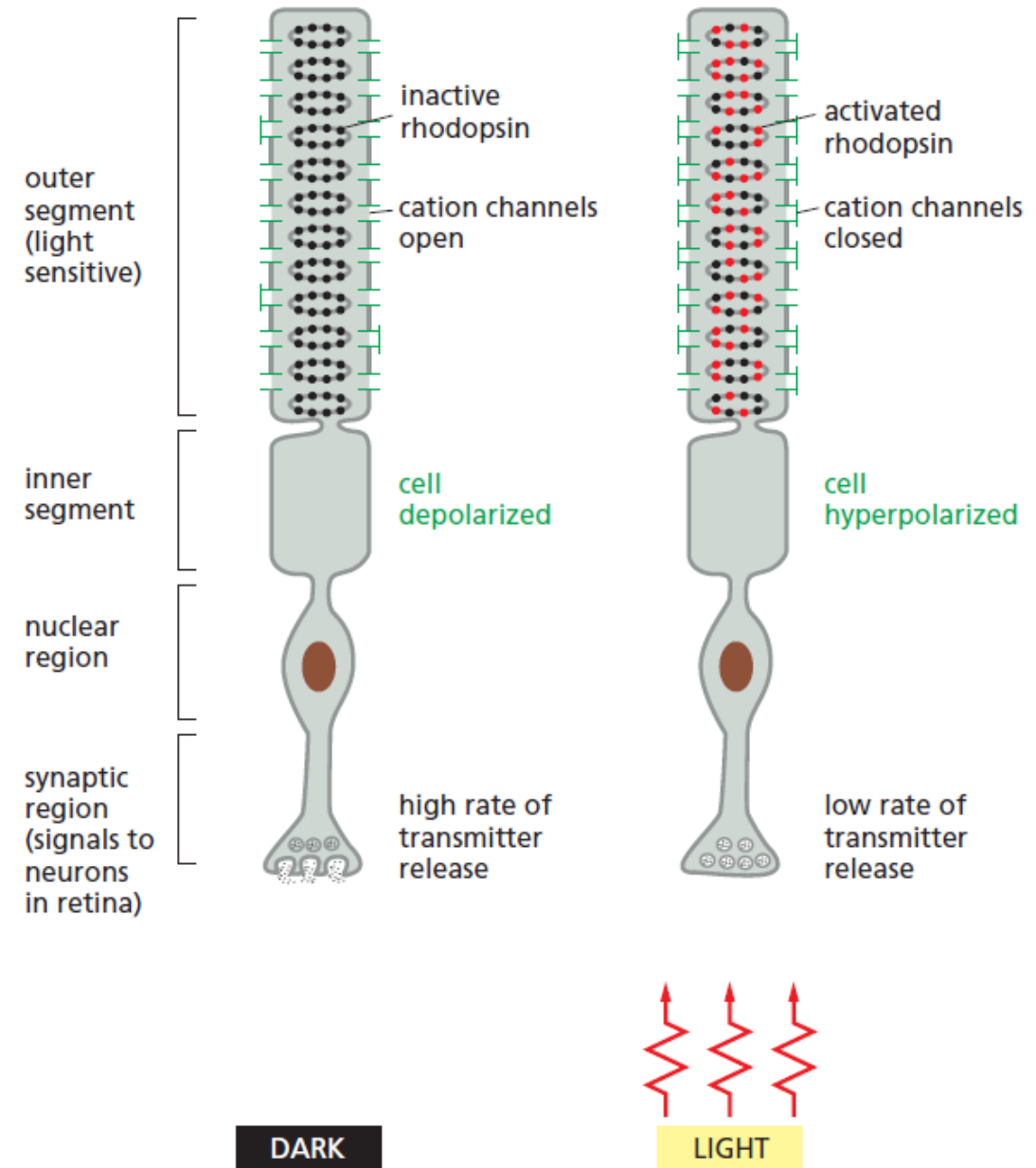


Bez světla:

- Membránový potenciál tyčinek relativně vysoký -30mV
- Ostatní neurony -60 až -90mV
- Probíhá signalizace druhým poslem cGMP
- Stálé otevření nespécifických kanálů pro Na^+ a Ca^{2+}
- Influx kationtů
- Membrána je depolarizovaná
- Soustavná sekrece neurotransmiterů
- Nepřetržitá stimulace neuronů v synapsi

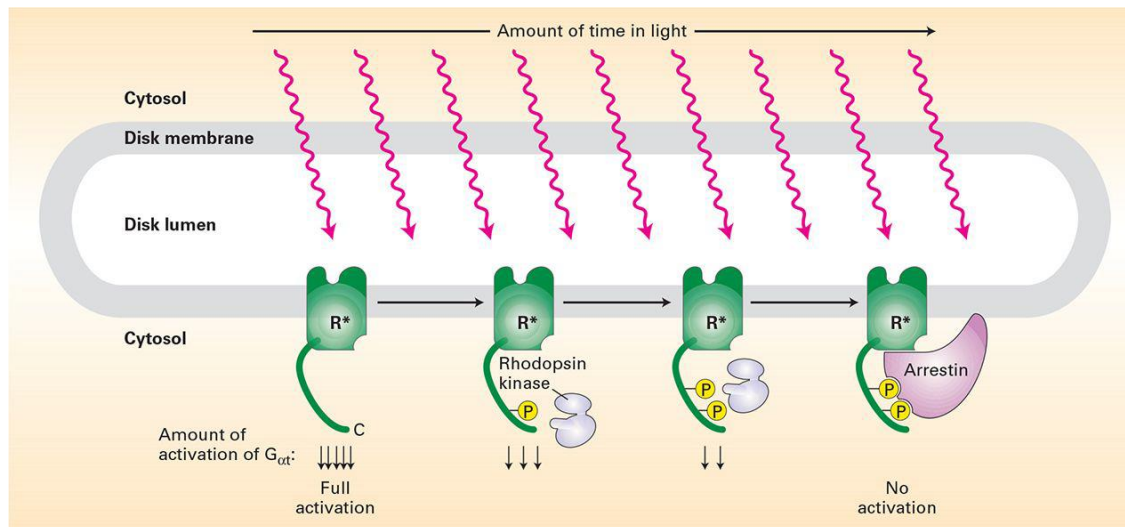
Za světla:

- Neprobíhá signalizace druhým poslem cGMP
- Zavření nespécifických kanálů pro Na^+ a Ca^{2+}
- Membrána je hyperpolarizovaná
- Velmi nízká sekrece neurotransmiterů



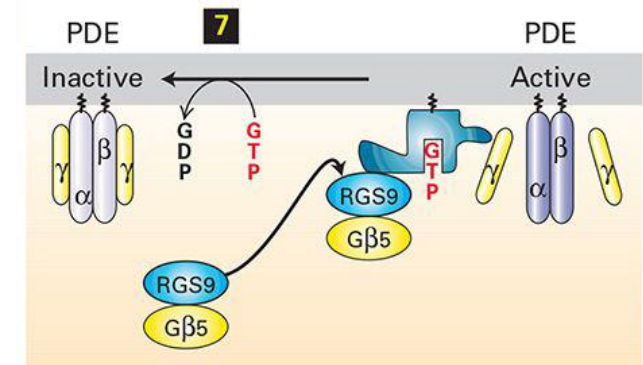
Součinnost několika mechanismů pro ukončení signalizace

- Hydrolýza GTP na $G_{\alpha t}$ -> konec aktivace cGMP fosfodiesterázy -> \uparrow cGMP
- Pokles Ca^{2+} iontů -> stimulace guanylátcyclázy -> \uparrow cGMP
- Aktivace rhodopsin kinázy -> fosforylace rhodopsinu -> vazba arrestinu



Rekonstrukce signální dráhy – příprava na přijetí dalšího signálu

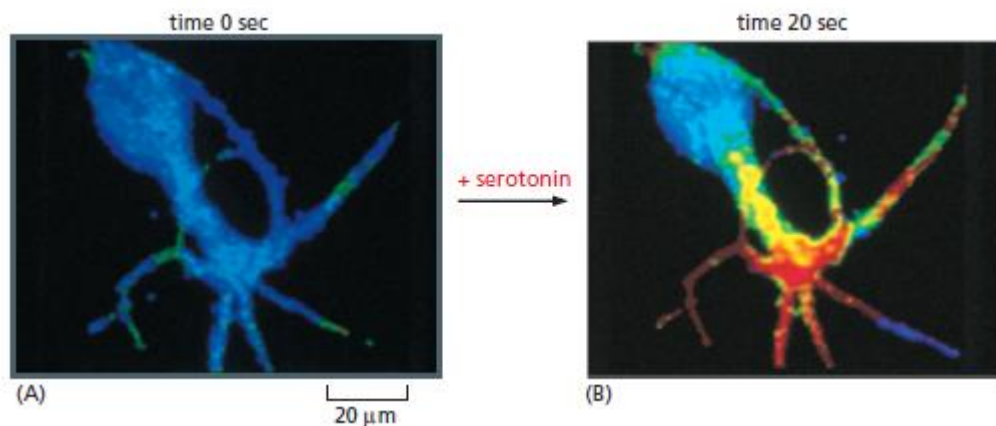
- Konverze *all-trans*-retinalu na 11-*cis*-retinal -> spojení s opsinem
- Odstranění arrestinu z rhodopsinu



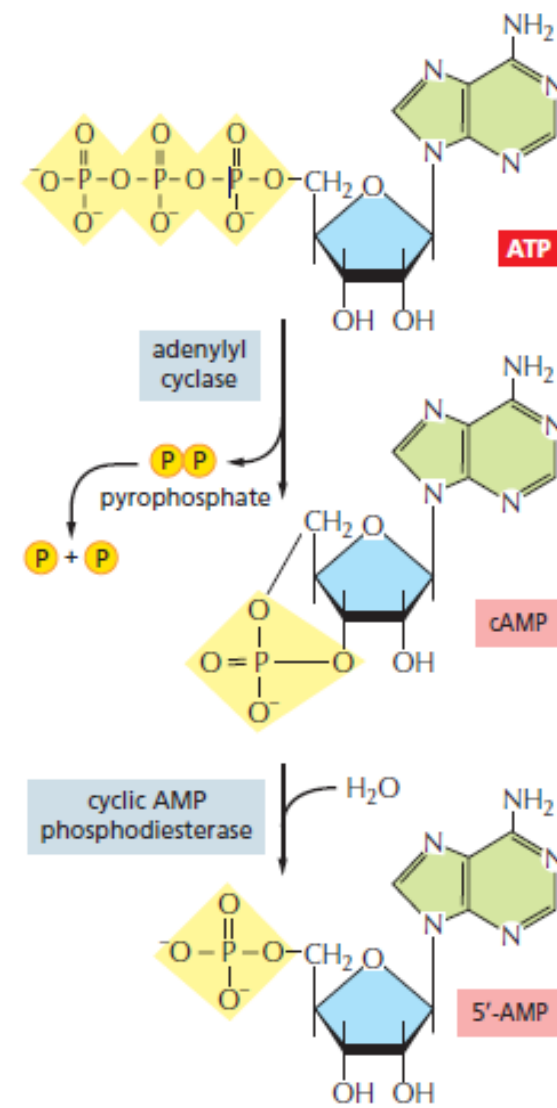
Receptory spřažené s G-proteiny a jejich napojení na enzymy

CYKLIKÝ ADENOSINMONOFOSFÁT (cAMP) JAKO DRUHÝ POSEL

- Syntéza cAMP z ATP: adenylátcykláza (inducibilní)
- Štěpení cAMP na AMP: cAMP-fosfodiesteráza (konstitutivní)
- cAMP je rozpustný ve vodě, snadno difunduje cytosolem
- Rychlý nárůst (až 20x/s)
- Regulace metabolismu cukrů a tuků, syntéza a sekrece hormonů, svalová kontrakce...

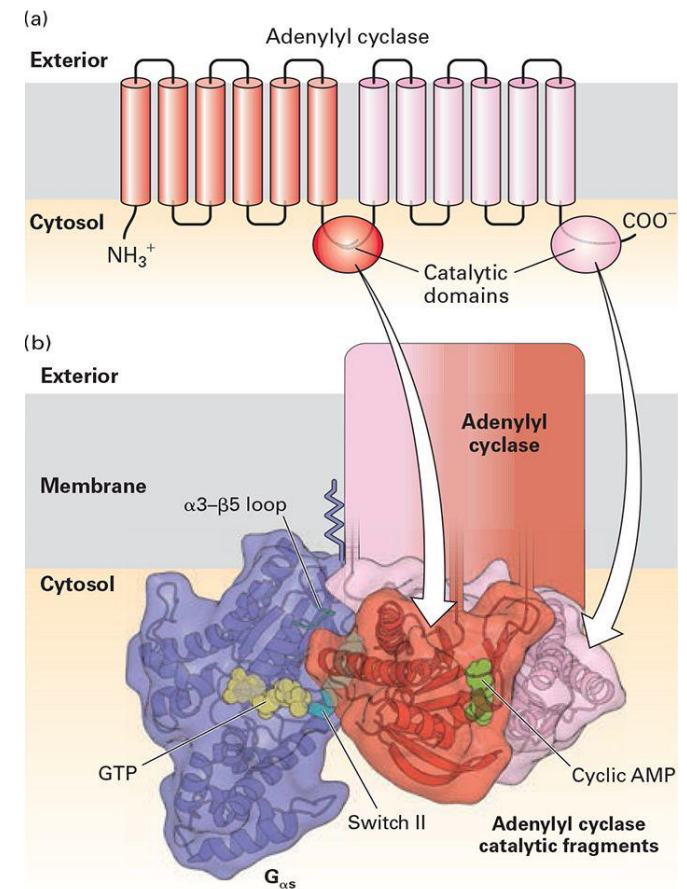
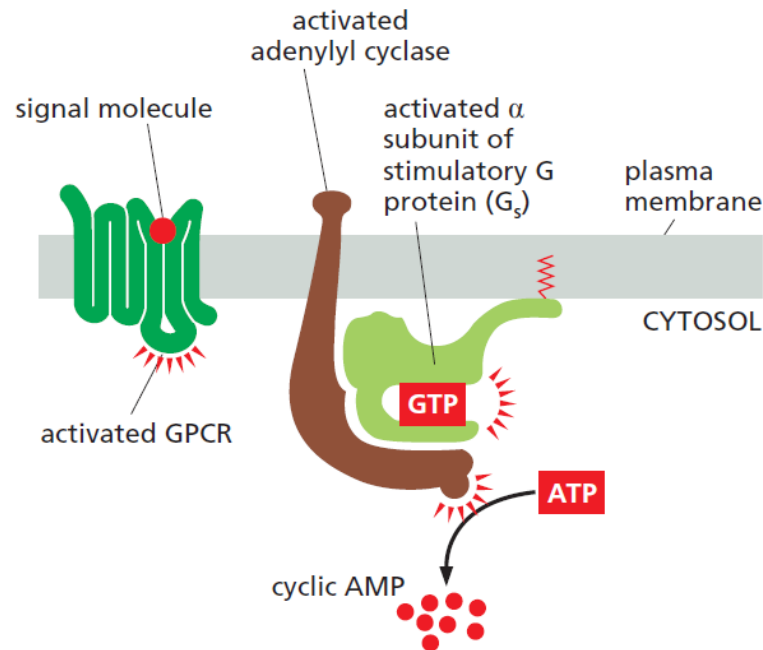


Neurony reagující na serotonin. Signalizace zvyšuje koncentraci cAMP. Detekováno pomocí fluorescenční sondy.



GPCR SPOJENÉ S ADENYLÁTCYKLÁZOU

- Navázání ligandu na receptor -> aktivace G proteinu -> aktivace adenylátcyklázy ->
- \uparrow cAMP -> aktivace kinázy (proteinkináza A) -> fosforylace cílového proteinu
- Funkce závisí na receptoru a typu G proteinu
- U savců > 30 GPCRs aktivujících G_{α_s} a adenylátcyklázu
- Buňky exprimují jeden či více typů současně



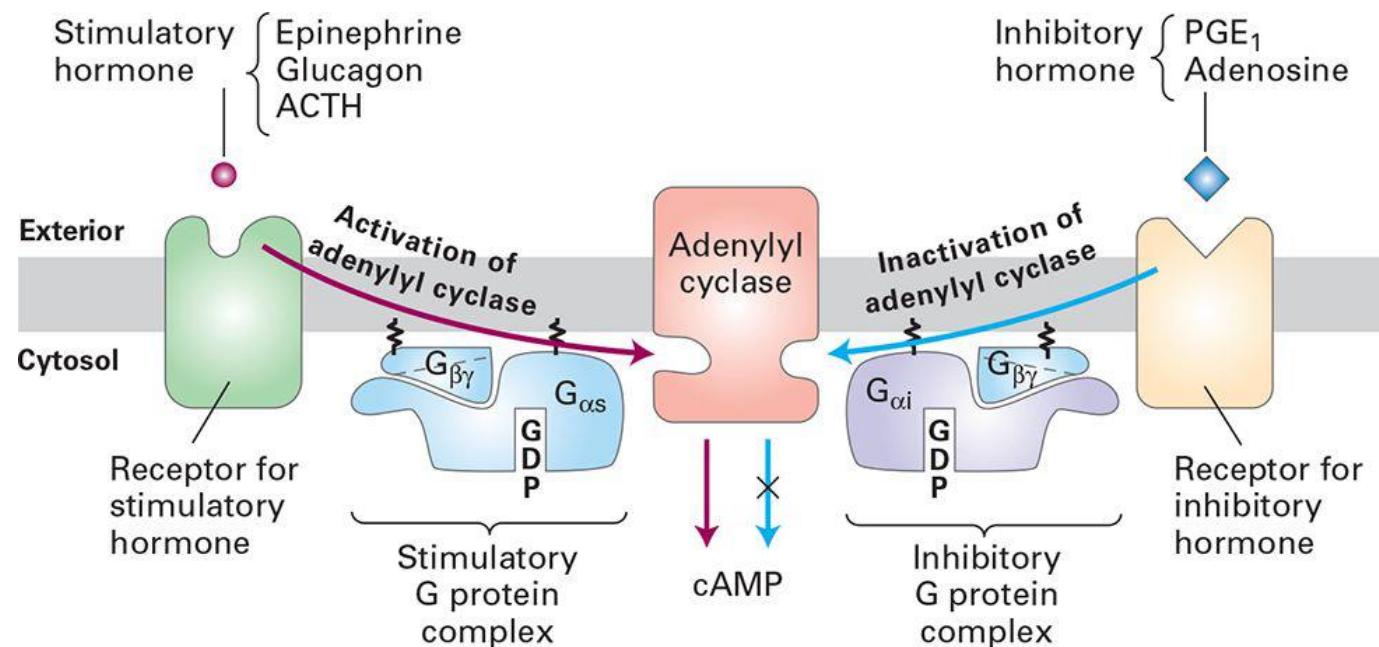
REGULACE AKTIVITY ADENYLÁTCYKLÁZY

- Závislost na aktivaci příslušného receptoru a G proteinu
- Regulace mezi aktivací a inhibicí adenylátcyklázy

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

PŘÍKLAD AKTIVACE/INHIBICE ADENYLÁTCYKLÁZY

- Buňky tukové tkáně exprimují různé GPCR regulující adenylátcyklázu
- Adrenalin, glukagon, adrenokortikotropní hormon → stimulují adenylátcyklázu → rozklad tuků
- Prostaglandin E a adenosin → inhibují adenylátcyklázu → rozklad tuků neprobíhá



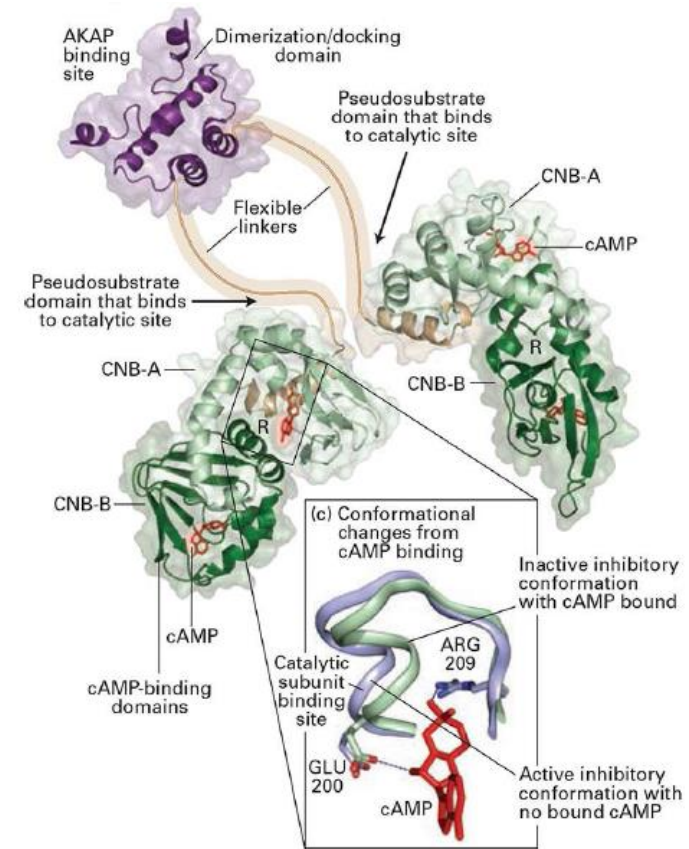
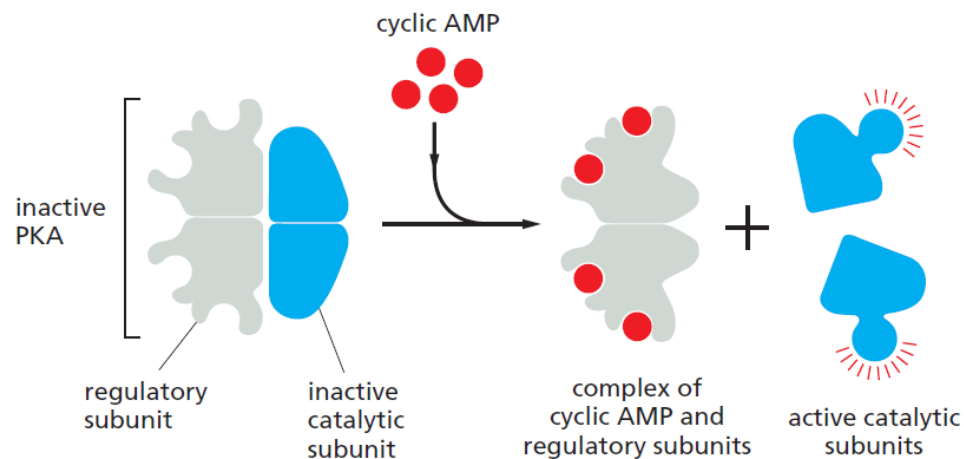
Hormony zprostředkovaná signalizace regulovaná cAMP

- Široké spektrum buněčných odpovědí
- Genetické defekty v G_{α} podjednotce → snížená odpověď na hormony → metabolické abnormality

TABLE 15-1 Some Hormone-induced Cell Responses Mediated by Cyclic AMP		
Target tissue	Hormone	Major response
Thyroid gland	Thyroid-stimulating hormone (TSH)	Thyroid hormone synthesis and secretion
Adrenal cortex	Adrenocorticotrophic hormone (ACTH)	Cortisol secretion
Ovary	Luteinizing hormone (LH)	Progesterone secretion
Muscle	Epinephrine	Glycogen breakdown
Bone	Parathyroid hormone	Bone resorption
Heart	Epinephrine	Increase in heart rate and force of contraction
Liver	Glucagon	Glycogen breakdown
Kidney	Vasopressin	Water resorption
Fat	Epinephrine, ACTH, glucagon, TSH	Triglyceride breakdown

cAMP AKTIVUJE PROTEINKINÁZU A (PKA)

- PKA – hlavní cíl pro cAMP, v neaktivním stavu heterotetramer
- 2x katalytická podjednotka, 2x regulační (inhibiční) podjednotka
- Regulační podjednotky váží A-kinase anchoring proteins (AKAPs)
- AKAPs – vazbou na cytoskelet nebo organely určují buněčnou lokalizaci PKA
- Po vazbě cAMP na regulační podjednotku → změna konformace → uvolnění z komplexu
- Katalytické podjednotky se fosforylují a následně aktivují (fosforylují) cílové proteiny s typickým motivem (Arg-Arg-X-Ser/Thr)



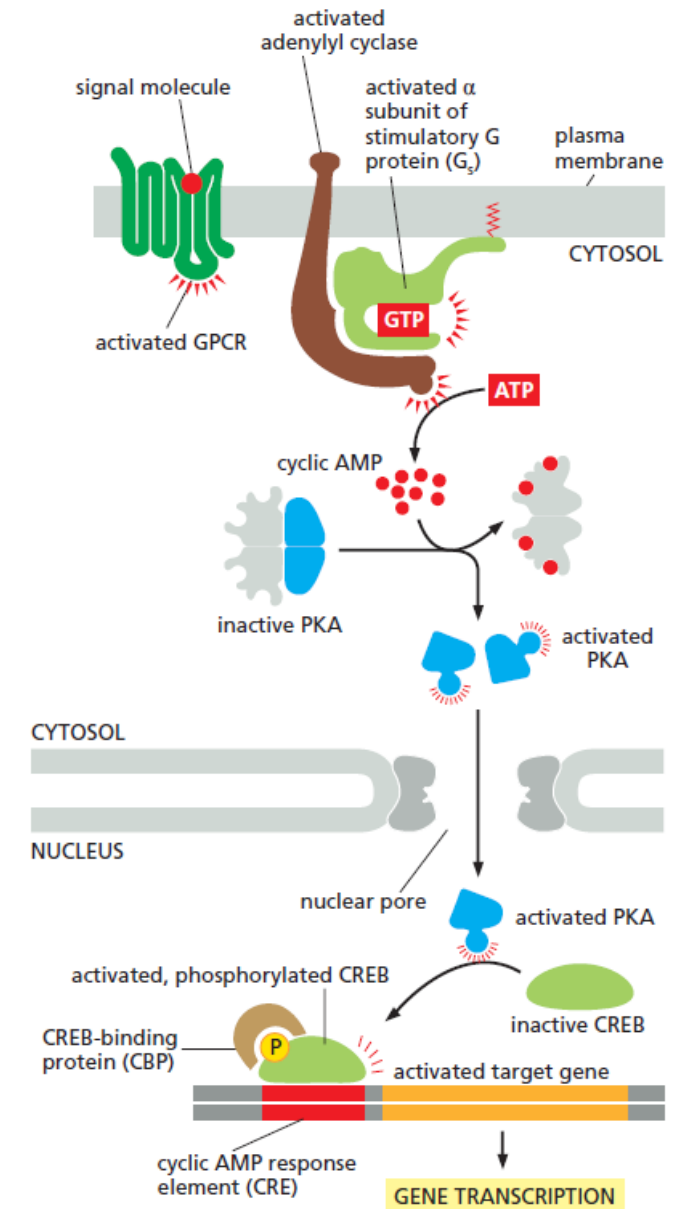
Struktura regulační podjednotky

POMALÁ ODPOVĚĎ NA cAMP

- Buněčná odpověď v řádu minut až hodin
- Regulace genové exprese
- Aktivovaná PKA fosforyluje jaderný protein CREB (CRE-binding)
- pCREB vykazují DNA vazebnou aktivitu
- Vazba na CRE element (cAMP responzivní element)
- Společně s dalšími transkripčními faktory + RNA Pol II → transkripce

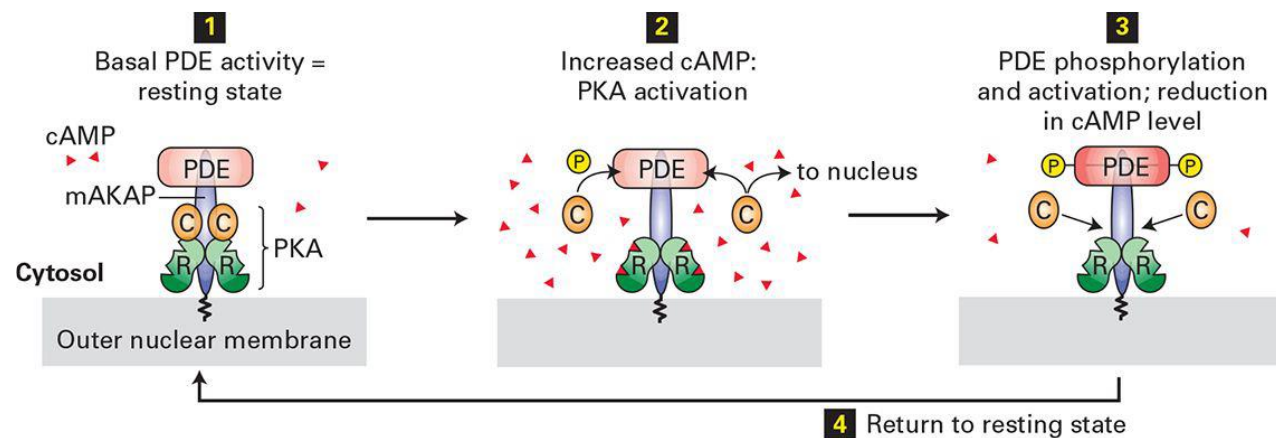
Příklady signalizací s pomalou odpovědí na cAMP

- Játra - syntéza proteinů pro glukoneogenezi
- Mozek - učení a paměť



DOWN REGULACE SIGNALIZACE ŘÍZENÉ cAMP

- Pomocí různých mechanismů na různých úrovních signální dráhy
- Uvolnění hormonu z receptoru
- Desenzitizace receptorů kinázami
- Endocytóza receptoru
- Hydrolýza GTP na G_{α} podjednotce
- Hydrolýza cAMP pomocí cAMP fosfodiesterázy (PDE)



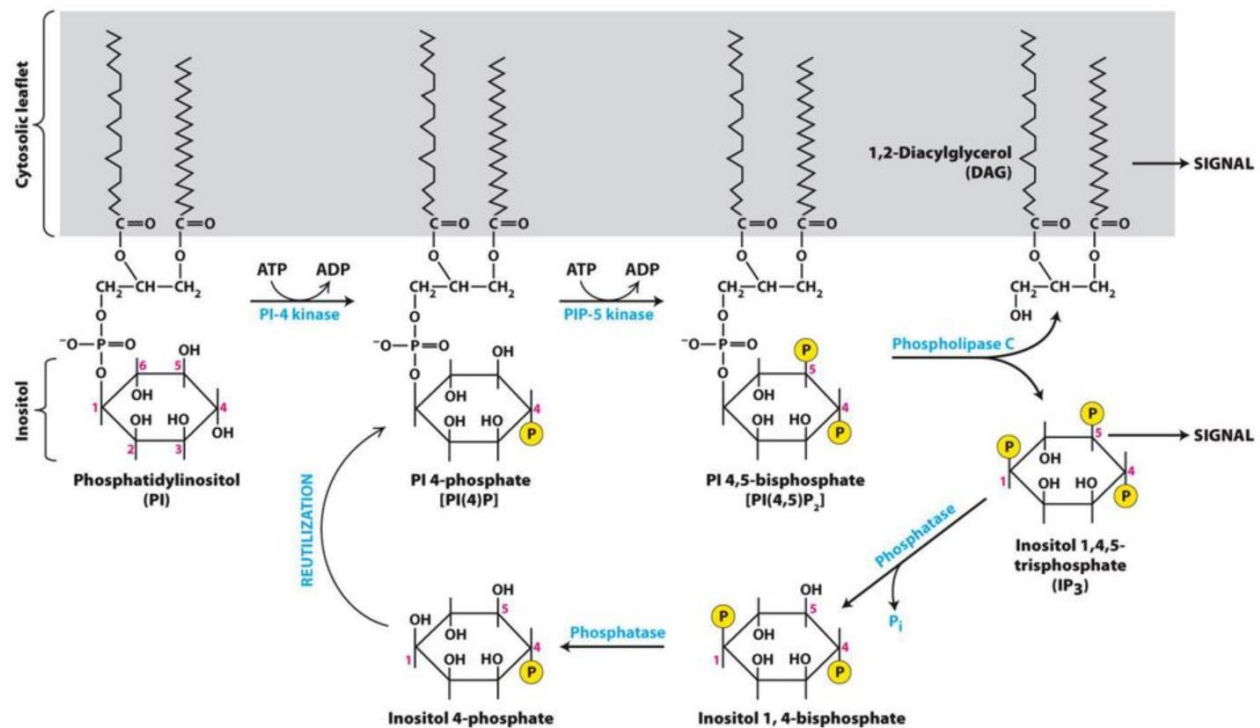
jaderná membrána kardiomyocytu

Příklad regulace signalizace pomocí cAMP zpětnou vazbou

- Protein AKAP (A-kinase anchoring proteins) – váže jadernou membránu, PKA a PDE
- Aktivovaná PKA přechází do jádra a současně aktivuje PDE → snížení cAMP → konec signalizace

INOSITOLTRIFOSFÁT (IP₃) A DIACYLGLYCEROL (DAG) JAKO DRUZÍ POSLI

- Obě molekuly vznikají díky aktivitě fosfolipázy C-β (PLCβ)
- Aktivace PLCβ přes receptor spřažený s G proteinem třídy G_q
- Substrátem PLCβ je - fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát [PI(4,5)P₂; PIP₂]
- Lokalizovaný ve vnitřní vrstvě plasmatické membrány

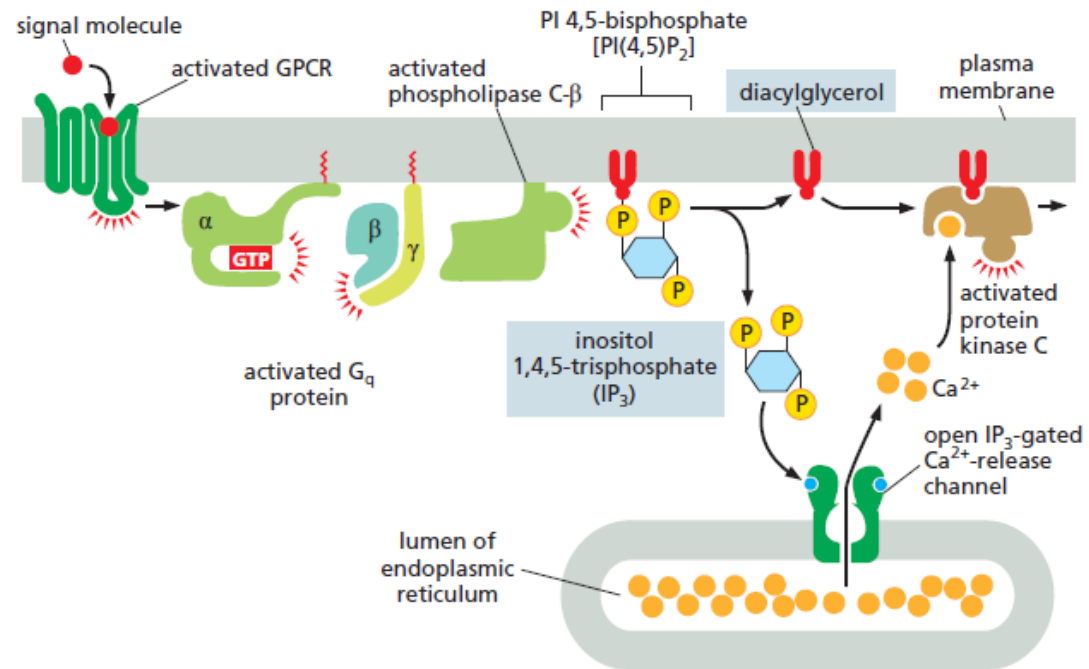


ACTIVATES
PROTEIN KINASE C

RELEASES Ca²⁺
FROM THE
ENDOPLASMIC
RETICULUM

INOSITOLTRIFOSFÁT (IP₃)

- Ve vodě rozpustný, difunduje cytosolem do endoplasmatického retikula
- Zde vazba na IP₃ receptor v membráně retikula
- IP₃ receptor je membránový iontový kanál pro Ca²⁺
- Po vazbě IP₃ otevření kanálu vyplavení Ca²⁺ z endoplasmatického retikula
- Zvýšení intracelulární koncentrace Ca²⁺ >10x



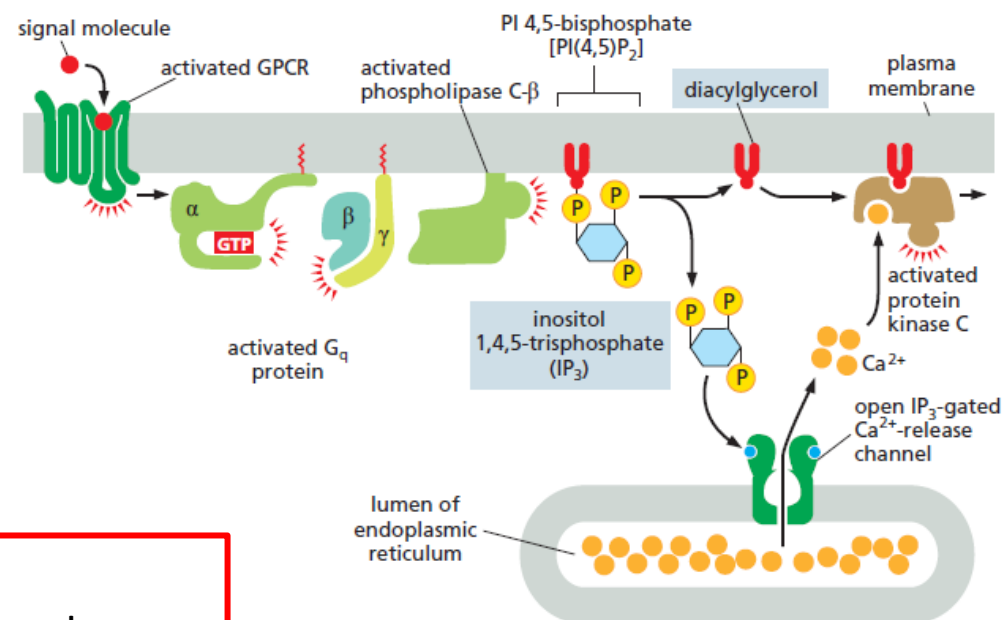
DIACYLGLYCEROL (DAG)

- Zůstává ukotvený v membráně
- Aktivuje proteinkinázu C (PKC) – „C“ jako Ca^{2+} dependentní
- Translokace PKC z cytosolu na membránu
- PKC aktivována vápníkem, spojením s DAG a fosfatidylserinem
- Aktivace způsobuje fosforylaci
- Následuje fosforylace cílových proteinů
- Další štěpení DAG → arachidonová kyselina (AA)
- Rozvětvený metabolismus → eikosanoidy

AA → Lipoxygenáza → leukotrieny

AA → Cyklooxygenázy (COX1 a COX2) → prostaglandiny a tromboxany
 Cyklooxygenázy jsou cílem nesteroidních antiflogistik (brufen, aspirin)

Fosfatidylserin na VNĚJŠÍ straně membrány funguje jako „eat me“ signál pro makrofágy během regulace buněčné smrti



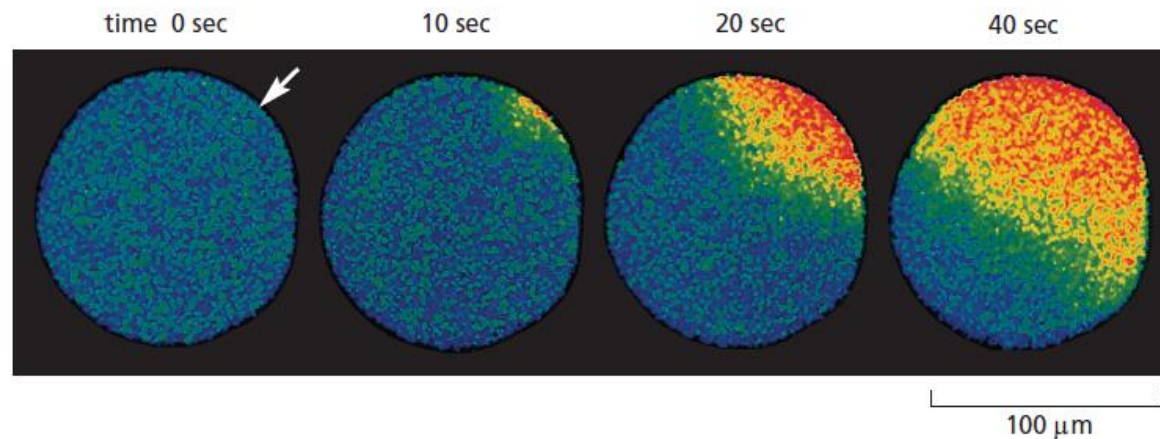
ÚLOHA VÁPENATÝCH IONTŮ (Ca^{2+})

- Role Ca^{2+} v signalizaci u všech živočichů
- V cytosolu udržovaná nízká hladina volného Ca^{2+} ($\approx 10^{-7}$ M), extracelulárně až $\approx 10^{-3}$ M
- Vápníkové ATP pumpy \rightarrow přenos Ca^{2+} do endoplasmatického retikula nebo ven z buňky
- Velký gradient Ca^{2+} vzhledem k cytosolu
- Signál (depolarizace, natažení membrány, ligand) \rightarrow otevření kanálů na membráně
- Signál (druhý posel) \rightarrow IP_3 receptory + ryanodinové receptory \rightarrow otevření kanálů z ER
- \rightarrow intenzivní zvýšení koncentrace v cytosolu (10x-100x)
- Zvýšení koncentrace lokálně v buňce \rightarrow efekt v daném místě
- Receptory s funkcí kanálu na retikulu jsou citlivé na Ca^{2+}
- Ca^{2+} otevřením kanálů \uparrow konc. Ca^{2+} - pozitivní zpětná smyčka

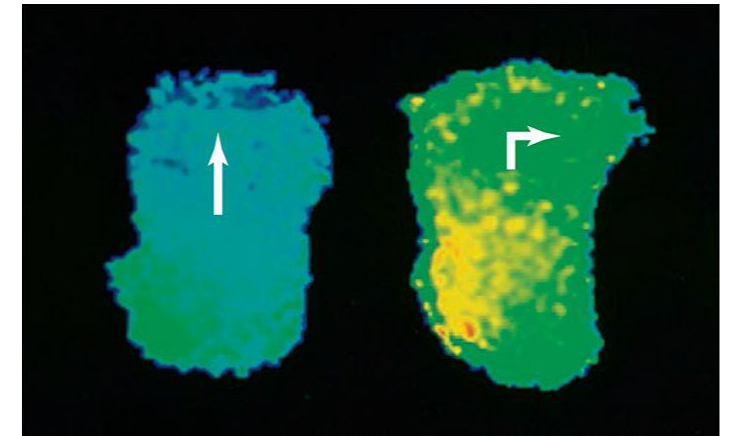
Ryanodinové receptory (RyR 1-3)
- senzitivní na alkaloid ryanodin
- lokalizace na retikulu
- závislé na Ca^{2+}
- fce jako iontový kanál

REGULACE BUNĚČNÝCH PROCESŮ Ca^{2+}

- Chemoatrakce/pohyb buňky
- Kontrakce svalových buněk
- Exocytóza sekrečních váčků s hormony nebo neurotransmitery
- Fertilizace oocytu



Vápník vizualizovaný fluorescenční značkou v oocytu. Lokalizace v místě průniku spermie. Postupné uvolňování vápníku z ER. Následně kortikální reakce oocytu zabraňující polyspermii.



Vápník vizualizovaný pomocí Fura-2 v leukocyty. Lokalizace v místě kortikální kontrakce. Při změně směru pohybu, změna gradientu vápníku.

POZITIVNÍ A NEGATIVNÍ REGULACE KONCENTRACE Ca^{2+}

Velmi nízká koncentrace signálu

- otevření malého množství kanálů na ER
- striktně lokalizované $\uparrow \text{Ca}^{2+}$, omezená difuze

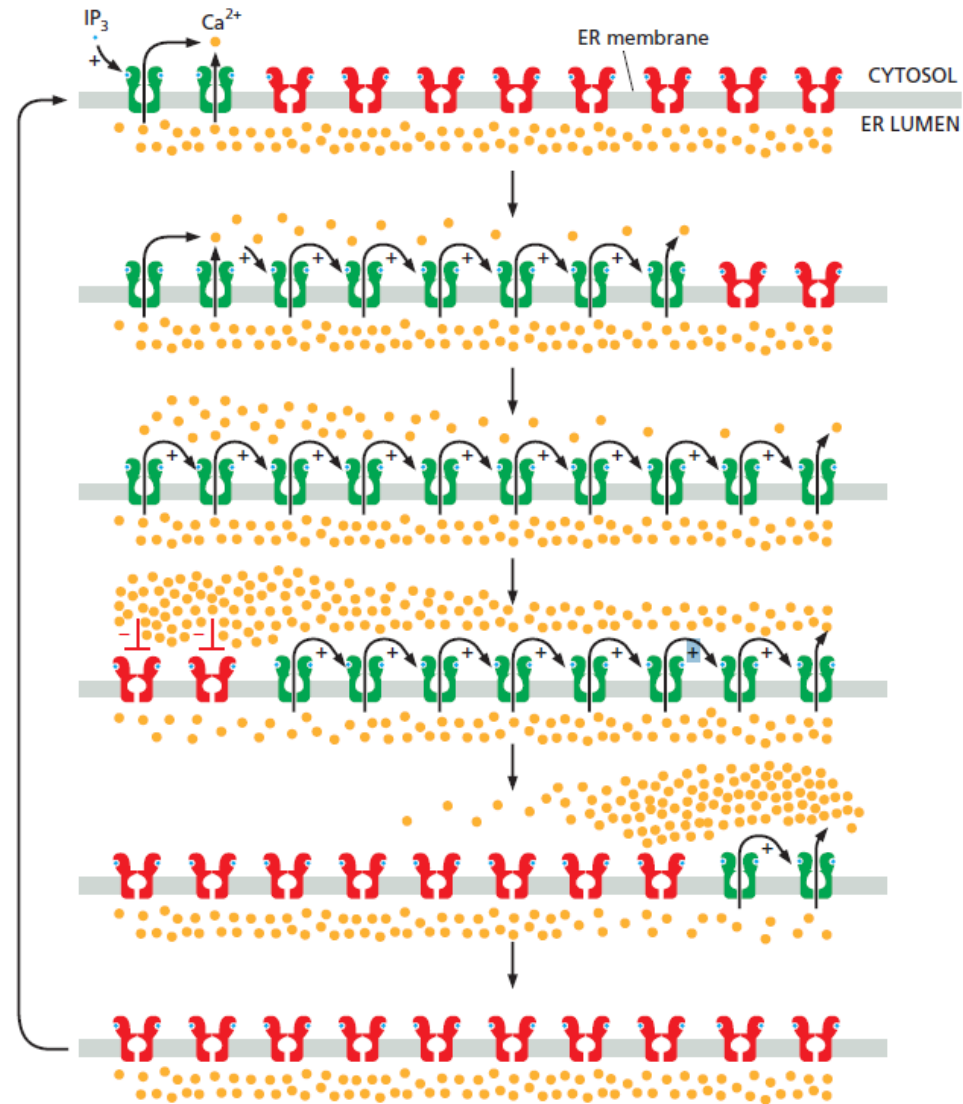
Vyšší koncentrace signálu

- postupné otvírání vyššího množství kanálů na ER
- Vlna $\uparrow \text{Ca}^{2+}$ v cytosolu, pozitivní smyčka

Vysoká koncentrace Ca^{2+}

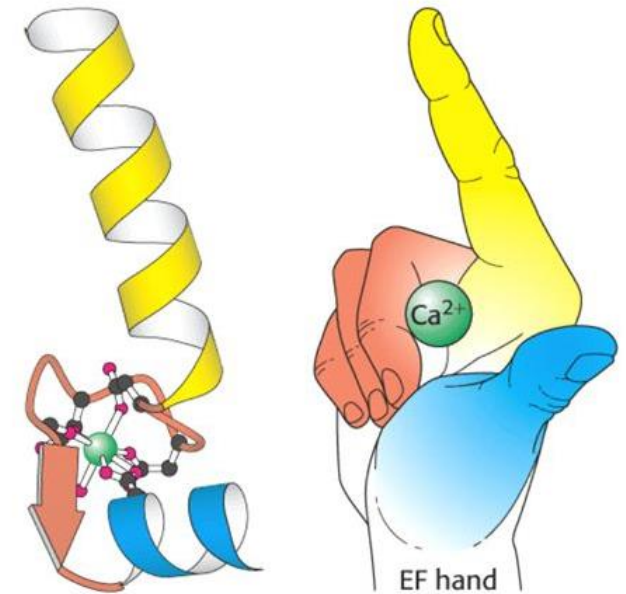
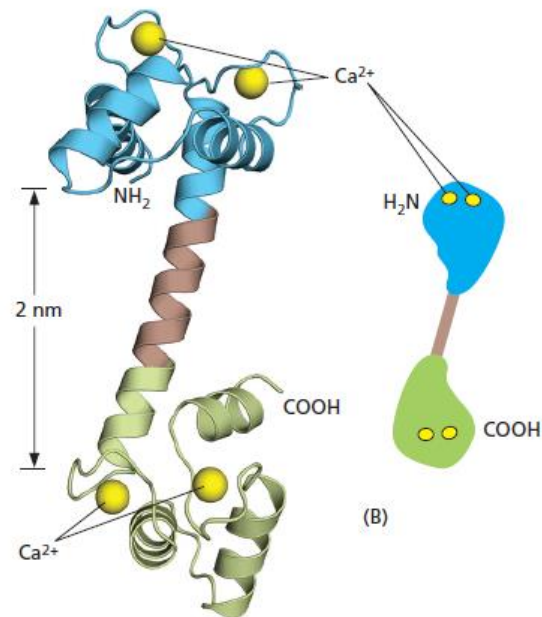
- Inhibuje funkci kanálů na ER
- Aktivuje funkci ATP pump
- Vlna $\downarrow \text{Ca}^{2+}$ v cytosolu, negativní smyčka

Střídání pozitivní a negativní regulace \approx oscilace signalizace



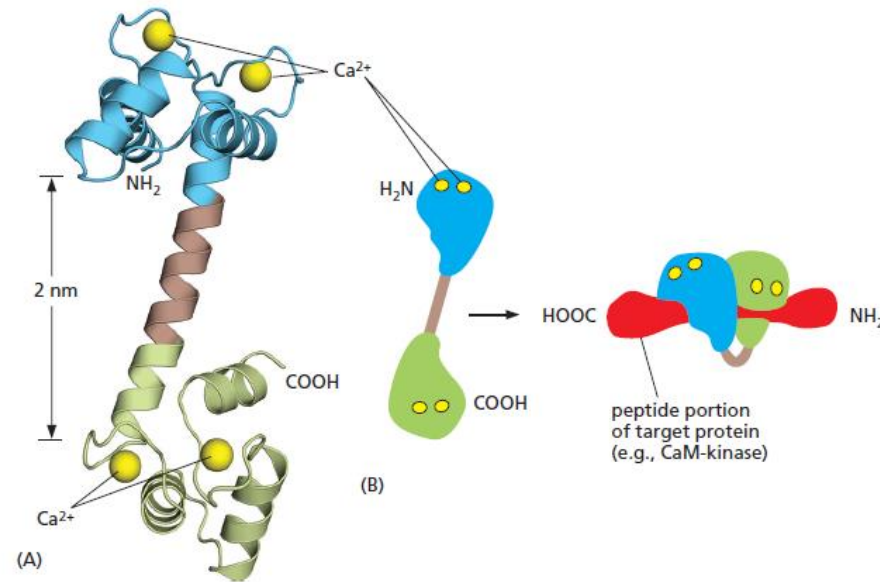
PRINCIP FUNKCE Ca^{2+} JAKO DRUHÉHO POSLA

- Ca^{2+} interaguje s vazebnými proteiny
- „EF hand“ rodina proteinů – motiv helix-loop-helix
- nejvýznamnější kalmodulin
 - ✓ 1 % buněčné masy
 - ✓ Tvar činky – 2 globulární domény
 - ✓ 4 vazebná místa na Ca^{2+}

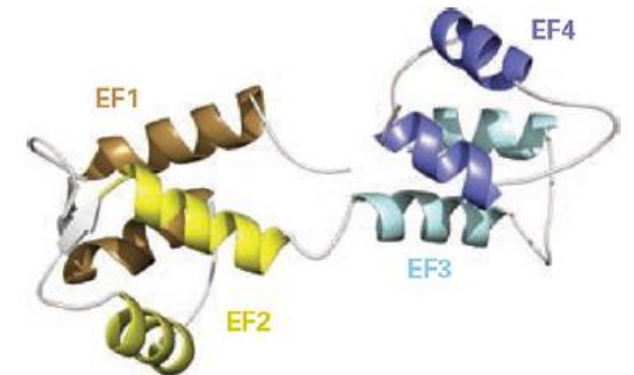


CÍLE KALMODULIN/ Ca^{2+} KOMPLEXU

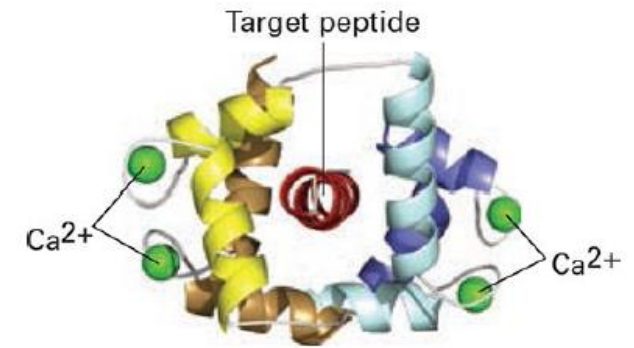
- Vazba Ca^{2+} na kalmodulin \rightarrow konformační změna \rightarrow vazba na cílový protein
- Zanutí/vypnutí cílového proteinu – fce jako switch protein
- Regulace různých enzymů a membránových proteinů
 - ✓ Vápníková ATP pumpa - eflux Ca^{2+} z buňky - negativní smyčka
 - ✓ CaM-kinázy (Ca²⁺/calmodulin dependent kinases) – fosforylace TF



(a)

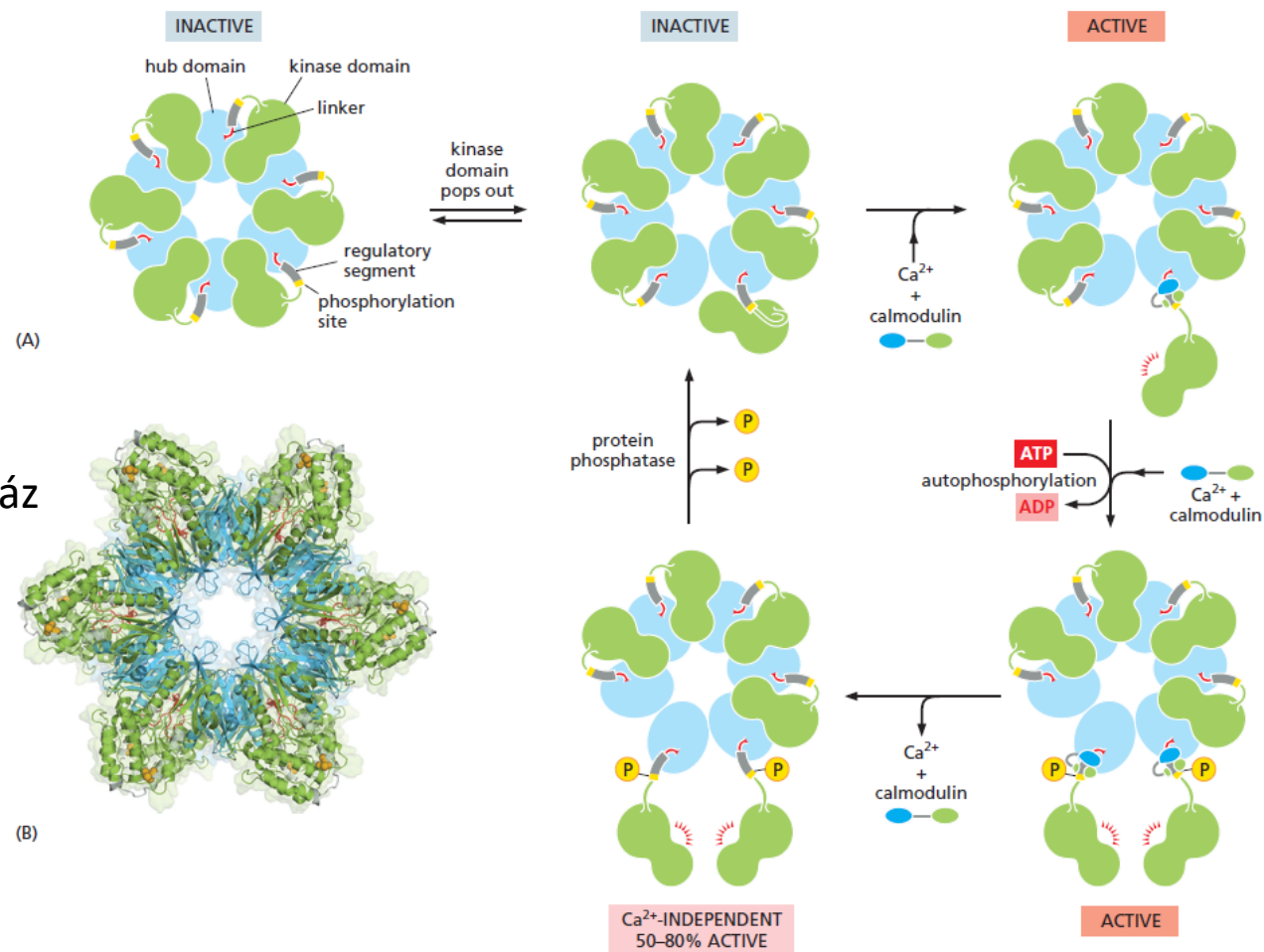


(b)



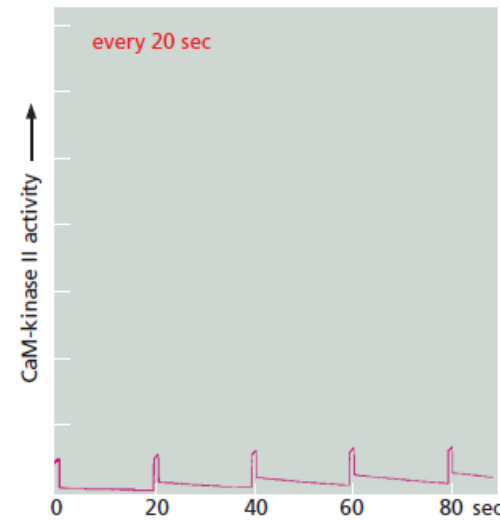
ROLE CaM KINÁZY II V NERVOVÉM SYSTÉMU

- Vysoká koncentrace v buňkách savčího mozku
- Primárně na synapsích
- Struktura: 12 molekul enzymu ve dvou prstencích
- Kinázová doména vně + regulační segment
- Fce jako molekulární paměť
- Aktivace Ca^{2+} /kaldmodulinem \rightarrow autofosforylace kináz
- Udržení aktivity i bez Ca^{2+} /kaldmodulinu
- „paměťová stopa“ předchozího Ca^{2+} signálu
- Vypnutí aktivity pomocí fosfatáz
- Uplatnění v paměti a učení savců
- KO mozkové formy CaM II u myši \rightarrow poruchy paměti

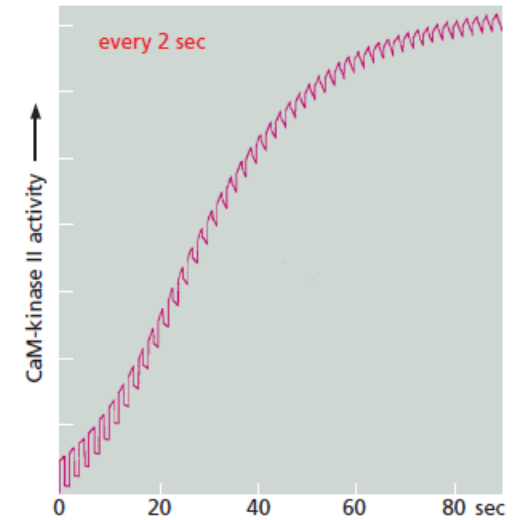


ROLE CaM KINÁZY II V NERVOVÉM SYSTÉMU

- Využití molekulární paměti pro vnímání frekvence Ca^{2+} /kalmodulin signálů
- Při současné přítomnosti fosfatázy a opakovaných Ca^{2+} /kalmodulin signálů
- Aktivita CaM II závislá na frekvenci signálů
- Nízká frekvence → opakovaně stejně nízká aktivita kinázy
- Vysoká frekvence → vzrůstající aktivita kinázy → postupná autofosforylace všech podjednotek →
→ po maximální aktivaci kinázy může frekvence signálů poklesnout - aktivita přetrvává
- Uplatnění v postsynaptických buňkách →
dlouhodobé změny v buněčné odpovědi



(A) low-frequency Ca^{2+} oscillations



(B) high-frequency Ca^{2+} oscillations

Odhalení role vápníku: Sydney Ringer, 1883

Vliv vápníku na kontrakce izolovaných krysích srdcí

Roztok NaCl:

- v destilované vodě: slabé kontrakce
- v kohoutkové vodě: silné kontrakce (obsah Ca^{2+})

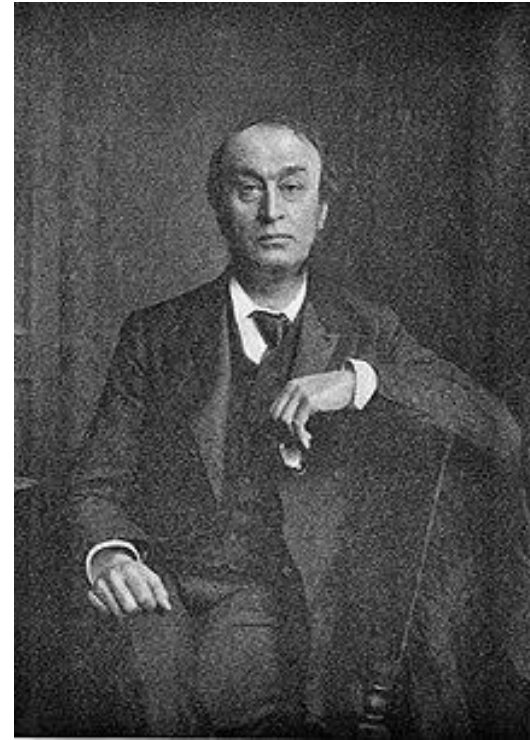
A FURTHER CONTRIBUTION REGARDING THE INFLUENCE OF THE DIFFERENT CONSTITUENTS OF THE BLOOD ON THE CONTRACTION OF THE HEART. By SYDNEY RINGER, MD., *Professor of Medicine at University College, London.* (Plate I.)

AFTER the publication of a paper in the JOURNAL OF PHYSIOLOGY, Vol. III., No. 5, entitled "Concerning the influence exerted by each of the Constituents of the Blood on the Contraction of the Ventricle," I discovered, that the saline solution which I had used had not been prepared with distilled water, but with pipe water supplied by the New River Water Company. As this water contains minute traces of various inorganic substances, I at once tested the action of saline solution made with distilled water and I found that I did not get the effects described in the paper referred to. It is obvious therefore that the effects I had obtained are due to some of the inorganic constituents of the pipe water.

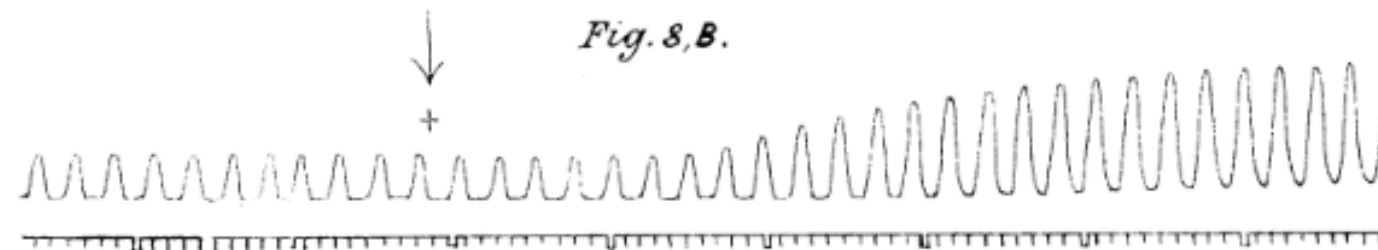
Water supplied by the New River Water Company contains 278·6 parts of solids per million.

They consist of:

Calcium	38·3 per million.
Magnesium	4·5 "
Sodium	23·3 "
Potassium	7·1 "
Combined Carbonic Acid	78·2 "
Sulphuric Acid	55·8 "
Chlorine	15 "
Silicates	7·1 "
Free Carbonic Acid	54·2 "



Sydney Ringer (1835 – 1910)



Receptory spřažené s enzymy

RECEPTORY SPŘAŽENÉ S ENZYMY (enzyme-coupled receptors)

- Transmembránové proteiny, 3 domény
- Extracelulární – vazba ligandu
- Transmembránová – 1x prochází skrz membránu
- Intracelulární – vlastní enzymatická aktivita nebo přímá asociace s enzymem
- Často aktivace podobných drah jako přes GPCR

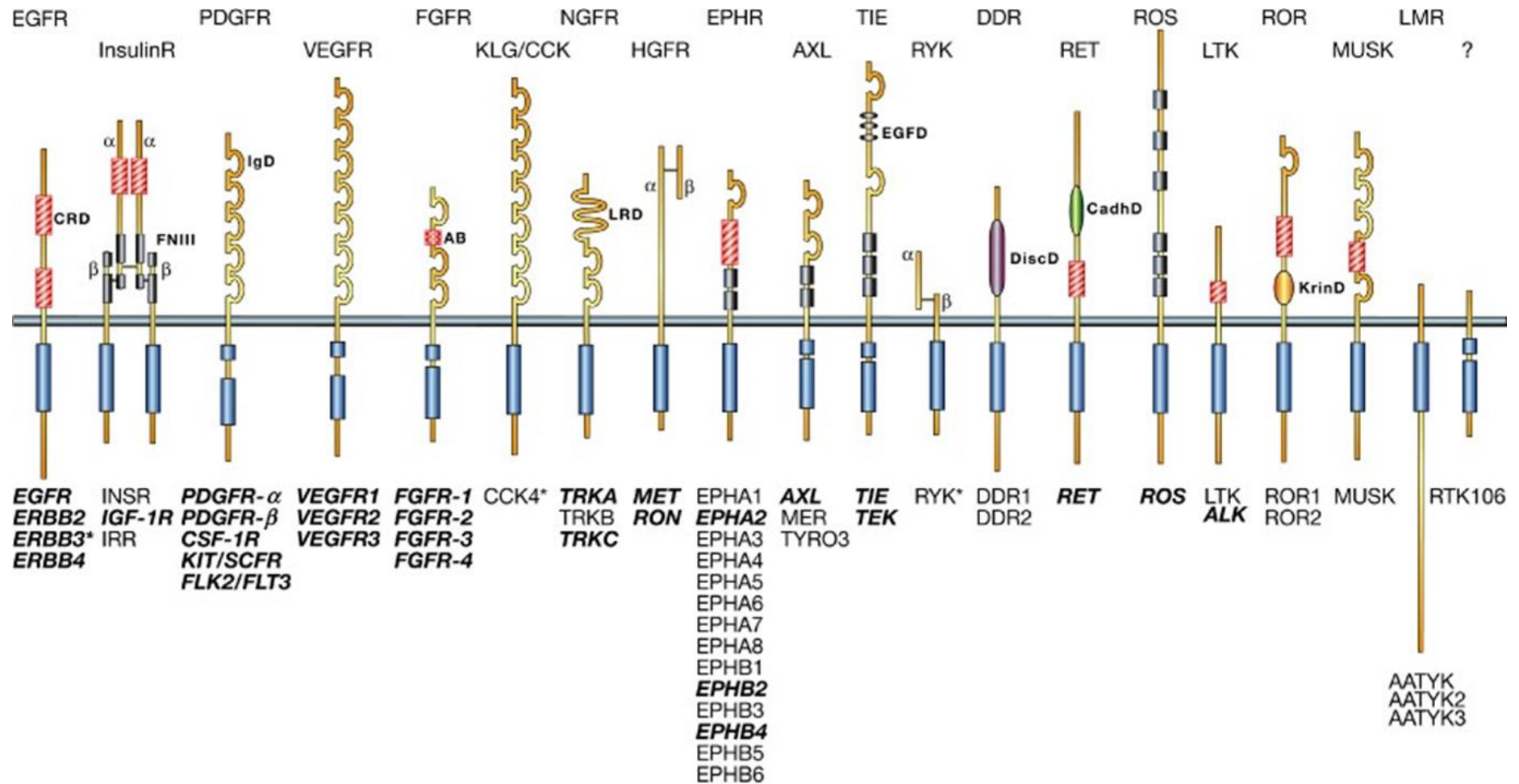
- Nejtypičtější – receptorové tyrozinkinázy (RTKs)
- Funkce: regulace proliferace, diferenciaci, metabolismu, aj.
- Ligandy pro RTK - sekretované nebo na membráně navázané proteiny

PŘÍKLADY EXTRACELULÁRNÍCH LIGANDŮ PRO RTKs

TABLE 15–4 Some Extracellular Signal Proteins That Act Via RTKs		
Signal protein family	Receptor family	Some representative responses
Epidermal growth factor (EGF)	EGF receptors	Stimulates cell survival, growth, proliferation, or differentiation of various cell types; acts as inductive signal in development
Insulin	Insulin receptor	Stimulates carbohydrate utilization and protein synthesis
Insulin-like growth factor (IGF1)	IGF receptor-1	Stimulates cell growth and survival in many cell types
Nerve growth factor (NGF)	Trk receptors	Stimulates survival and growth of some neurons
Platelet-derived growth factor (PDGF)	PDGF receptors	Stimulates survival, growth, proliferation, and migration of various cell types
Macrophage-colony-stimulating factor (MCSF)	MCSF receptor	Stimulates monocyte/macrophage proliferation and differentiation
Fibroblast growth factor (FGF)	FGF receptors	Stimulates proliferation of various cell types; inhibits differentiation of some precursor cells; acts as inductive signal in development
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	VEGF receptors	Stimulates angiogenesis
Ephrin	Eph receptors	Stimulates angiogenesis; guides cell and axon migration

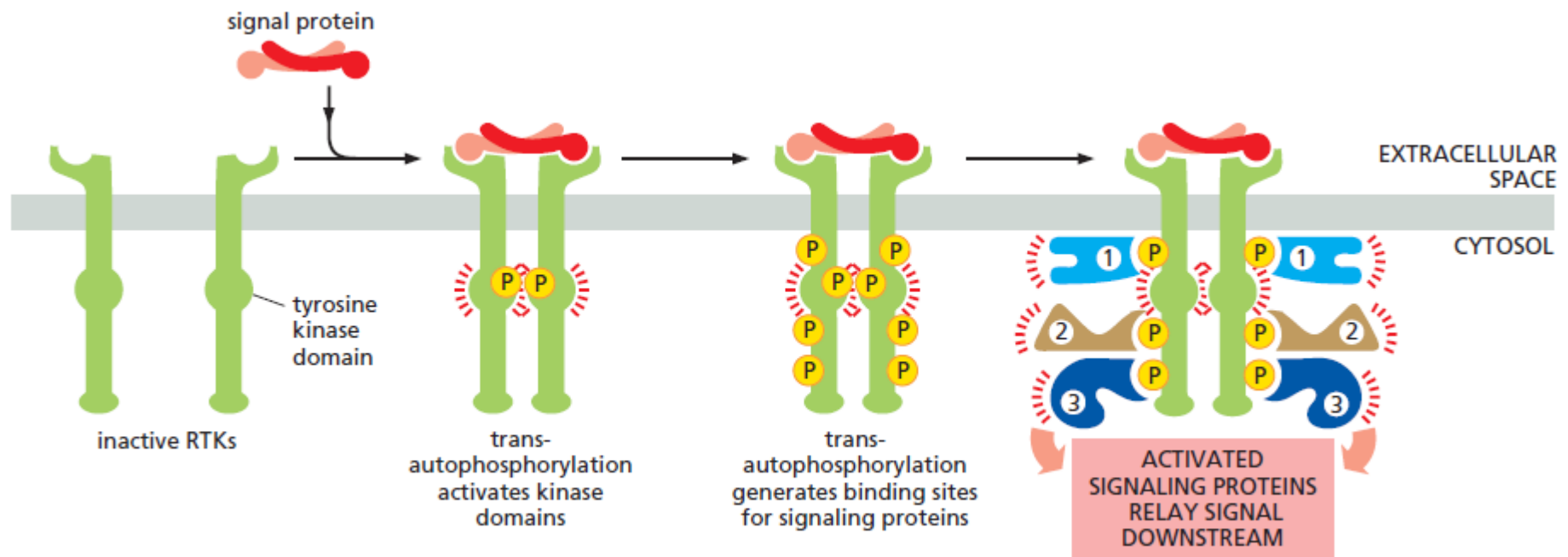
RODINY RTKs

- lidský genom: 59 genů (+alternativní sestřih), 20 strukturálních rodin



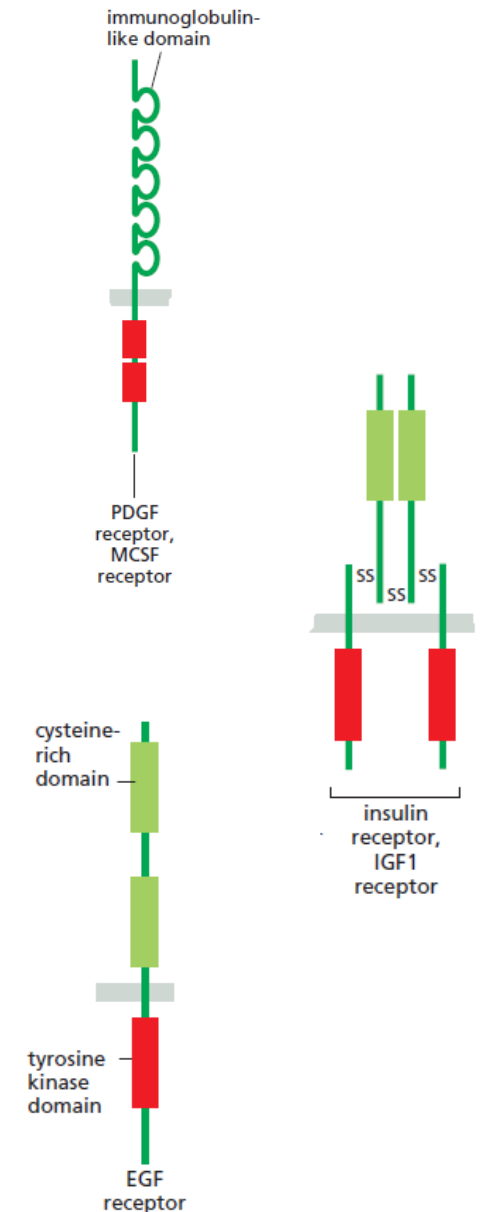
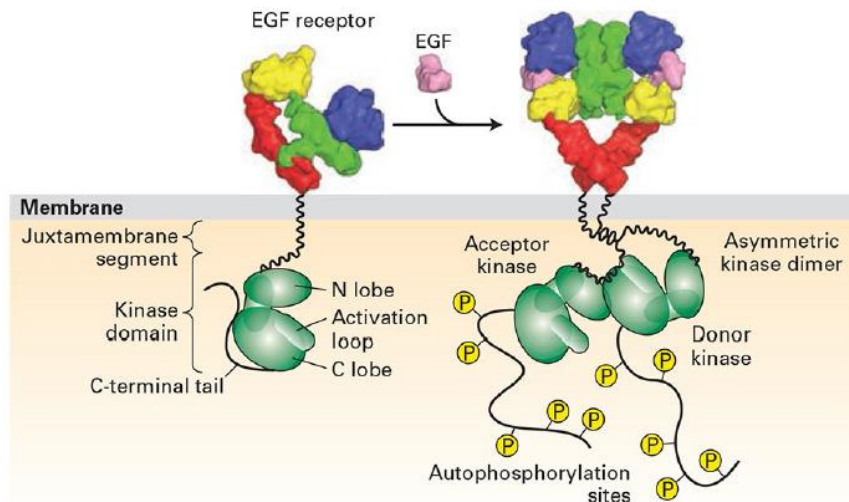
TRANSDUKCE SIGNÁLU PŘES RTKs

- Vazba růstového faktoru/ligandu na extracelulární doménu
- Přiblížení a následná dimerizace receptorů
- Konformační změna
- Cross-autofosforylace
- Stimulace katalytické aktivity tyrozinkinázové domény
- Tvorba vazebných (fosforylovaných) míst pro domény adaptorových proteinů



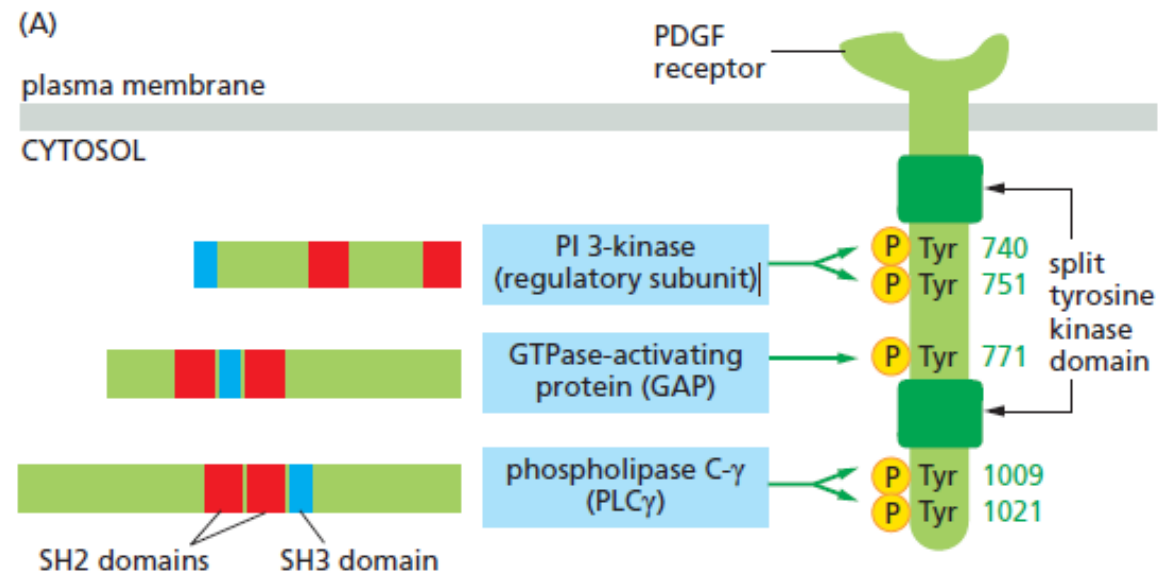
PRINCIP AKTIVACE KINÁZOVÉ DOMÉNY

- Závisí na typu RTK
 - V neaktivním stavu je aktivační smyčka (activation loop domain) nefosforylovaná a konformačně blokuje kinázovou aktivitu = brání vazbě ATP nebo substrátu
- Stačí přiblížení kinázových domén ve správné orientaci → cross-autofosforylace obou (např. PDGFR)
 - Pokud je receptor dimerem (např. InsR) → po vazbě ligandu současná změna orientace extracelulární i intracelulární domény → cross-autofosforylace obou
 - Kinázová podjednotka je aktivována konformačními změnami díky vzájemné interakci – ale mimo aktivní (fosforylační) místa (např. EGFR)



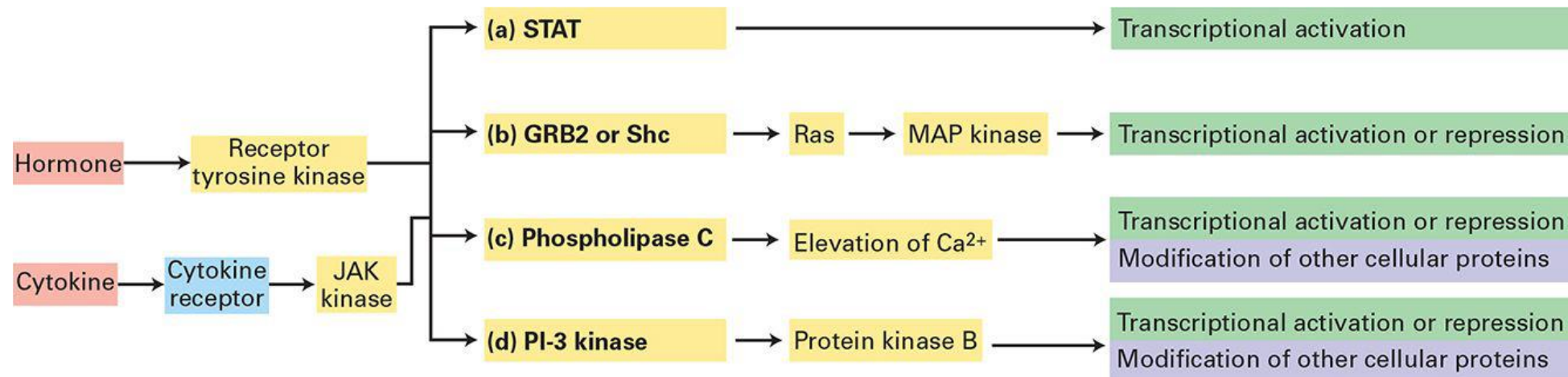
TVORBA DOKOVACÍCH MÍST PRO INTRACELULÁRNÍ SIGNÁLNÍ PROTEINY

- Po aktivaci kinázové domény → fosforylace dalších reziduí (Tyr) mimo kinázovou doménu
- Představují specifická místa pro intracelulární signální proteiny
- Ty obsahují fosfotyrosin-vazebnou doménu – rozeznávají p-Tyr a jeho okolní aminokyseliny
- Po vazbě na RTK se signální proteiny fosforylují/aktivují
- Fosforylace RTK funguje jako spínač sestavení intracelulárních signálních komplexů
- Proteiny v komplexech určují směr transdukce signálu a buněčnou odpověď



INTRACELULÁRNÍ SIGNÁLNÍ PROTEINY

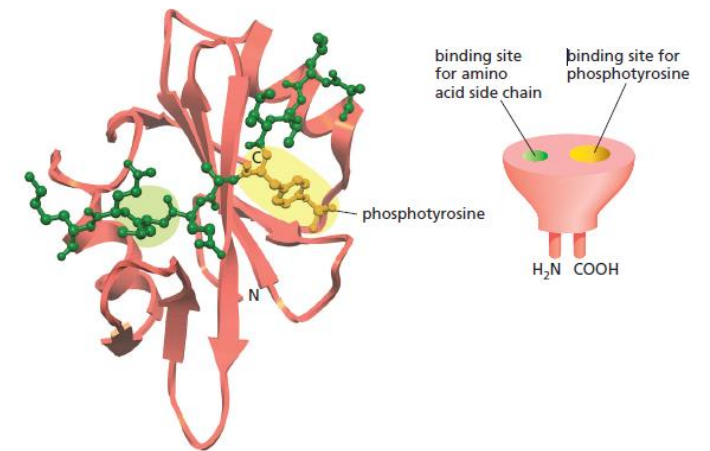
- Velké množství + další proteiny pomocí protein-proteinových interakcí - role modulárních domén
- Fosfolipáza C γ (PLC γ): Stejná role jako při aktivaci receptoru s G proteinem – nárůst koncentrace Ca²⁺ a aktivace PKC
- Cytoplasmatická tyrozinkináza Src – fosforylace dalších cytoplasmatických proteinů
- Adaptorové proteiny – aktivace Ras/MAP kinázové dráhy
- Fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K) – fosforyluje spíše lipidy - fosfolipidy dokují signální proteiny na membráně



INTRACELULÁRNÍ SIGNÁLNÍ PROTEINY

Pro všechny signální proteiny platí:

- Přítomnost fosfotyrosin-vazebné domény: SH2 (Src homology 2) nebo PTB (phosphotyrosine-binding)
- Přítomnost dalších vazebných domén (např. SH3 – vazba na „prolin rich“ motiv) – interakce s dalšími proteiny - transdukce signálu
- Možný i tlumící efekt = negativní zpětná vazba, např. ubikvitinligáza Cbl – katalyzuje ubikvitinaci receptoru → endocytóza + degradace v lysozomu. Mutace v genu *Cbl* prodlužuje odstraňování - podíl na rozvoji nádorových onemocnění
- Endocytóza (společně s ligandem) nemusí tlumit signalizaci – pokračuje v jiném buněčném kompartmentu, např. ligand NGF + receptor TrkA z konce neuritu přesun signalizace pro přežití do centra buňky
- Významná účast adaptorových proteinů – mají SH2 a SH3 domény – spojují RTKs se signálními proteiny, které SH2 nemají (např. napojení na Ras GTPázu)



3D struktura SH2 domény

MONOMERICKÁ GTPÁZA RAS NAVAZUJE NA VĚTŠINU RTKS

- Ras superrodina – široké spektrum regulací
- Ras a Rho – transdukce z membránových receptorů
- Ras připojený na membránu lipidovými skupinami
- Primární fce v regulaci TF – řízení proliferace a diferenciace
- Driverová mutace v *Ras* – hyperaktivita enzymu – 30 % nádorů
- Rezistentní k GAPs (GTPase-activating proteins) – zamčený v aktivním stavu s navázaným GTP
- Standardní aktivace pomocí GEF (guanine nucleotide-exchange factors) – jejich lokalizace určuje jaká GTPáza a kde bude aktivovaná

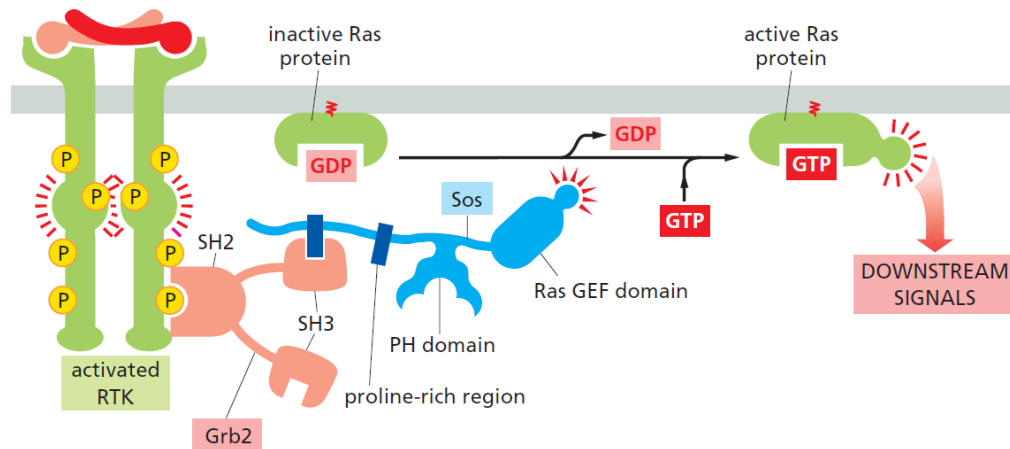
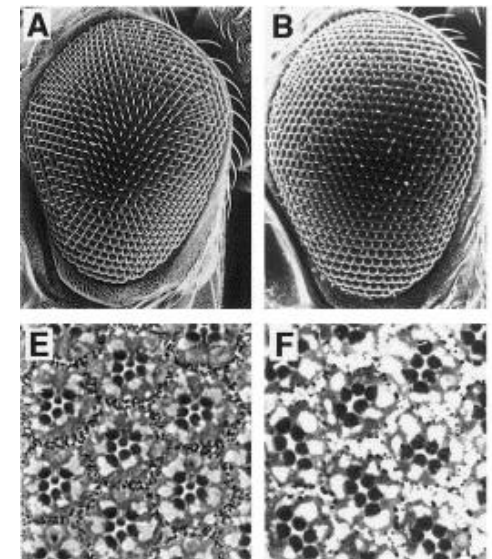


TABLE 15-5 The Ras Superfamily of Monomeric GTPases

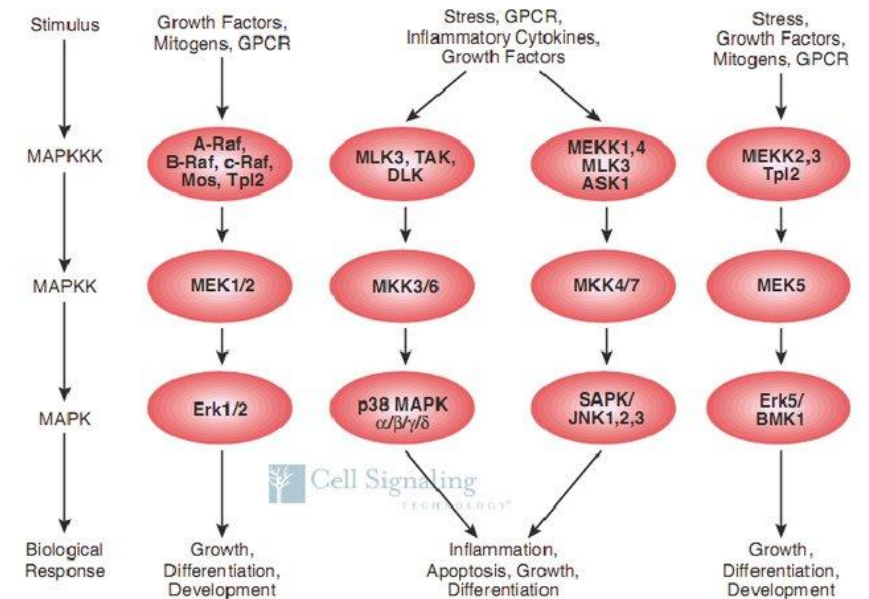
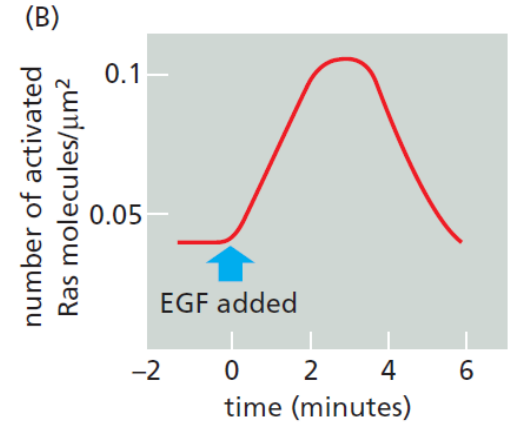
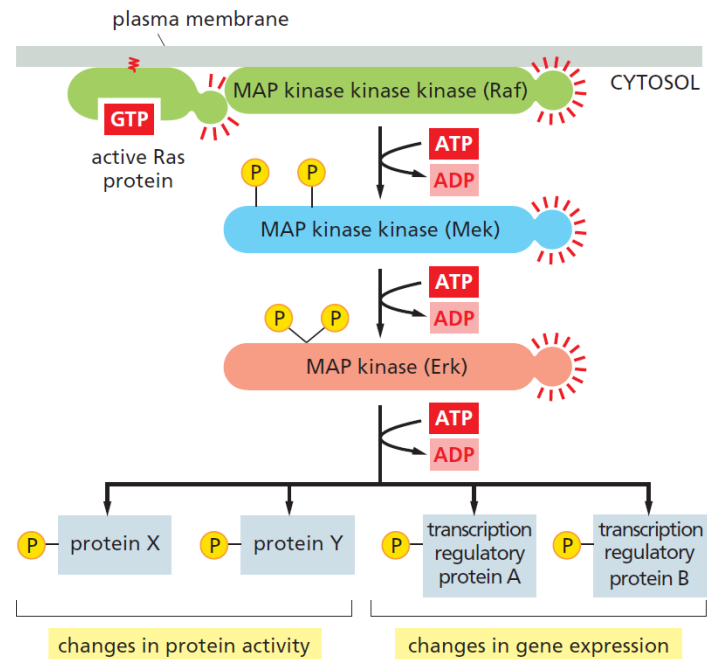
Family	Some family members	Some functions
Ras	H-Ras, K-Ras, N-Ras	Relay signals from RTKs
	Rheb	Activates mTOR to stimulate cell growth
	Rap1	Activated by a cyclic-AMP-dependent GEF; influences cell adhesion by activating integrins
Rho*	Rho, Rac, Cdc42	Relay signals from surface receptors to the cytoskeleton and elsewhere
ARF*	ARF1-ARF6	Regulate assembly of protein coats on intracellular vesicles
Rab*	Rab1-60	Regulate intracellular vesicle traffic
Ran*	Ran	Regulates mitotic spindle assembly and nuclear transport of RNAs and proteins



Sos (Son-of-sevenless) – homolog RTK Sev u *Drosophily*, podílí se na vývoji oka, mutace = ztráta fotoreceptorové buňky

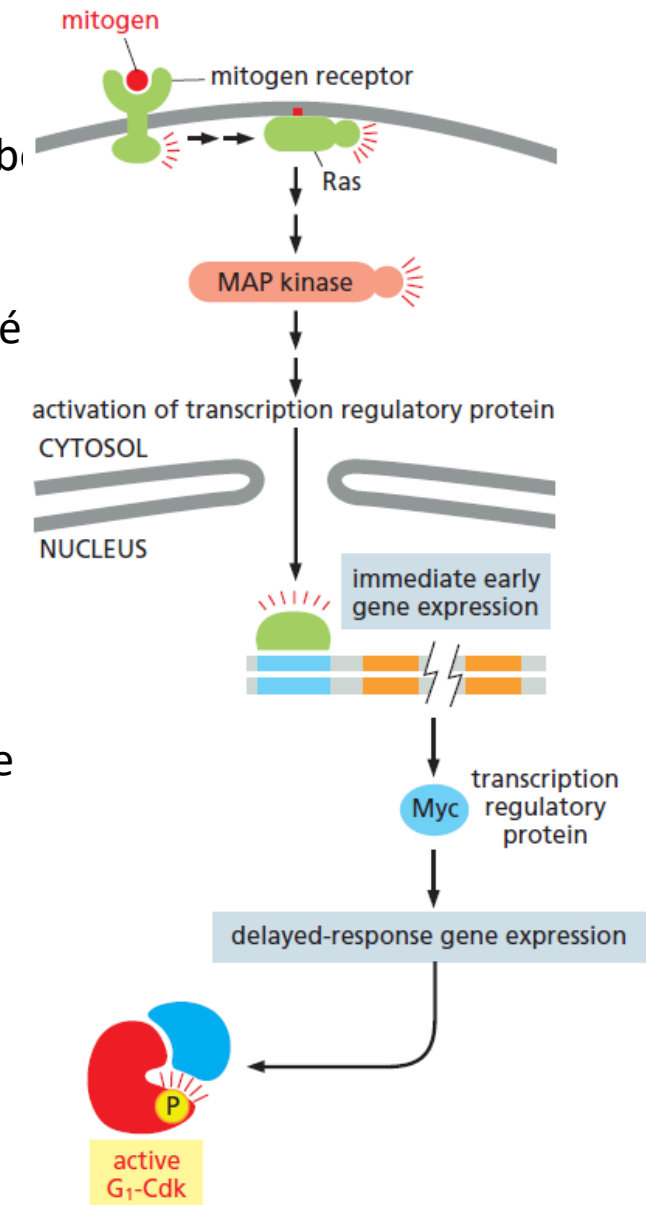
RAS AKTIVUJE MAP KINÁZOVOU DRÁHU

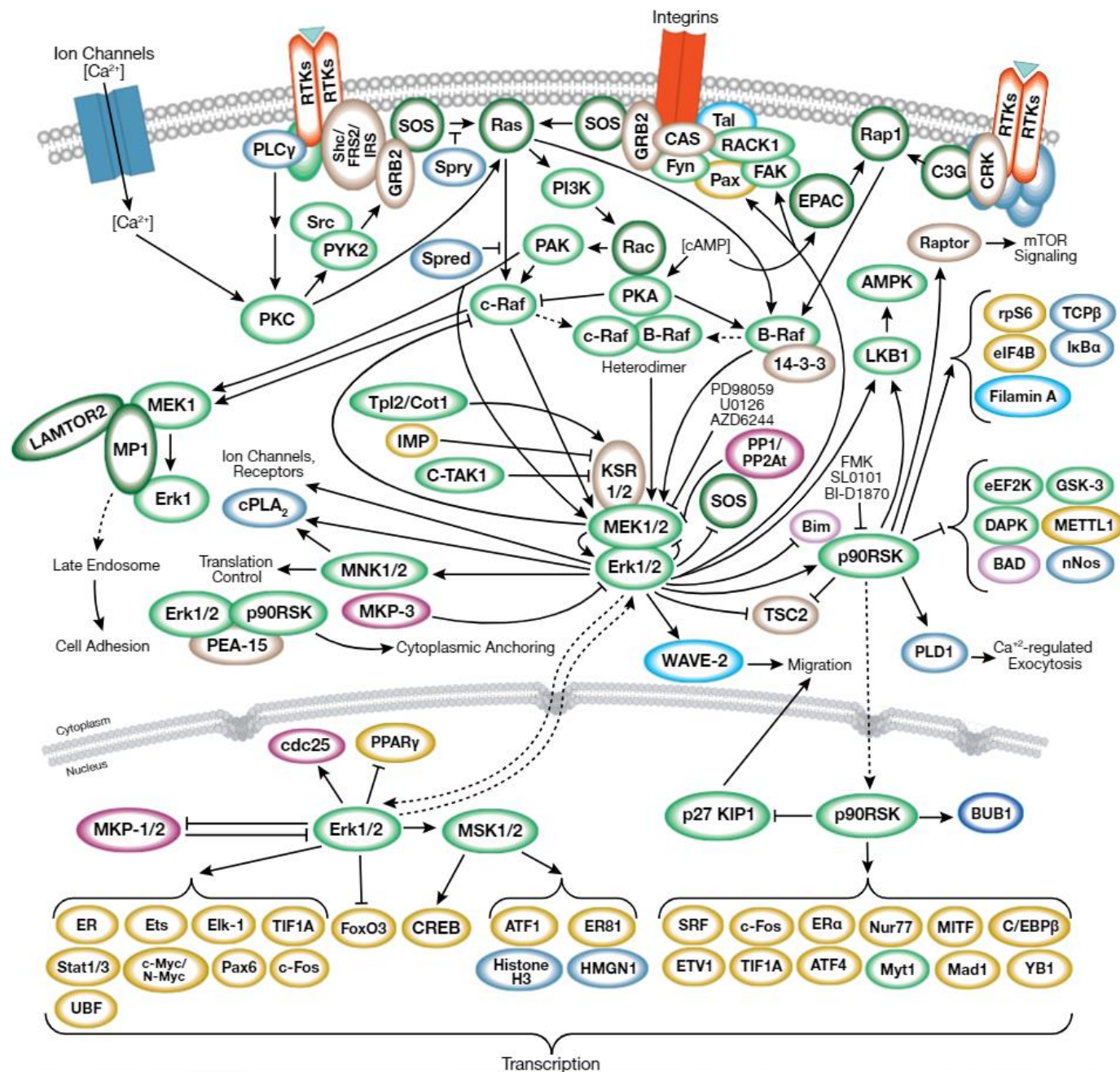
- Vlastní aktivace RTKs a Ras rychle mizí (fosfatázy + GAPs)
- Pro dlouhodobé buněčné odezvy - nutné prodloužení signalizace
- Evolučně zakonzervovaný MAP kinázový komplex
- Návaznost 3 proteinkináz (serin/threoninových)
- MAPKKK → MAPKK → MAPK (= Raf, MEK, ERK)
- Spojení pomocí scaffold proteinů – zamezení cross-talku



MAP KINÁZOVÁ DRÁHA

- Fosforylované MAPK – změna konformace – dimerizace – aktivita v cytosolu nebo translokace do jádra
- Následná fosforylace různých cílů vč. transkripčních faktorů → vyvolání buněčné odpovědi
- Transkripce genů včasné odpovědi (early response genes), hlavně transkripční faktory (např. c-fos, c-myc)
- Následná transkripce genů stimulující proliferaci (např. G1 cykliny)
- Mitogenní signalizace: růstový faktor → receptor → MAPK dráha → proliferace
- Délka aktivace MAPK dráhy určuje buněčnou odpověď
- Např. Působení na neurální prekurzor:
 - ✓ EGF → EGFR → ERK aktivní 5 min → proliferace
 - ✓ NGF → TrkA → ERK aktivní x hodin → diferenciaci





NEGATIVNÍ REGULACE

MAPK DRÁHY

Fosfatázy:

- Defosforylace signálních molekul
- Transkripčně regulované
- Stabilizace proti degradaci

Inaktivační fosforylace:

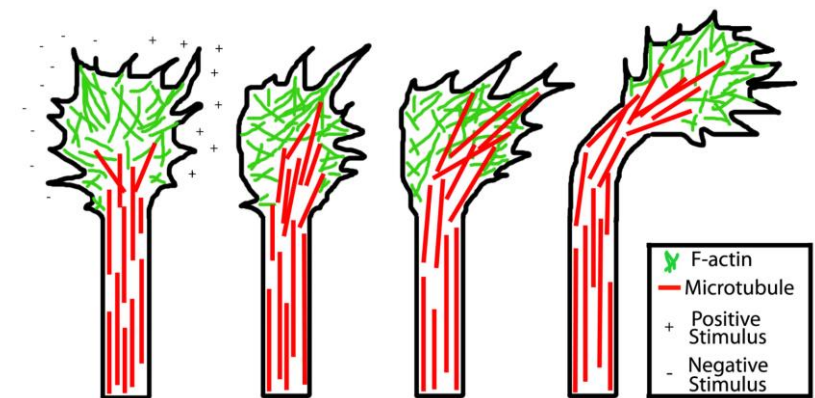
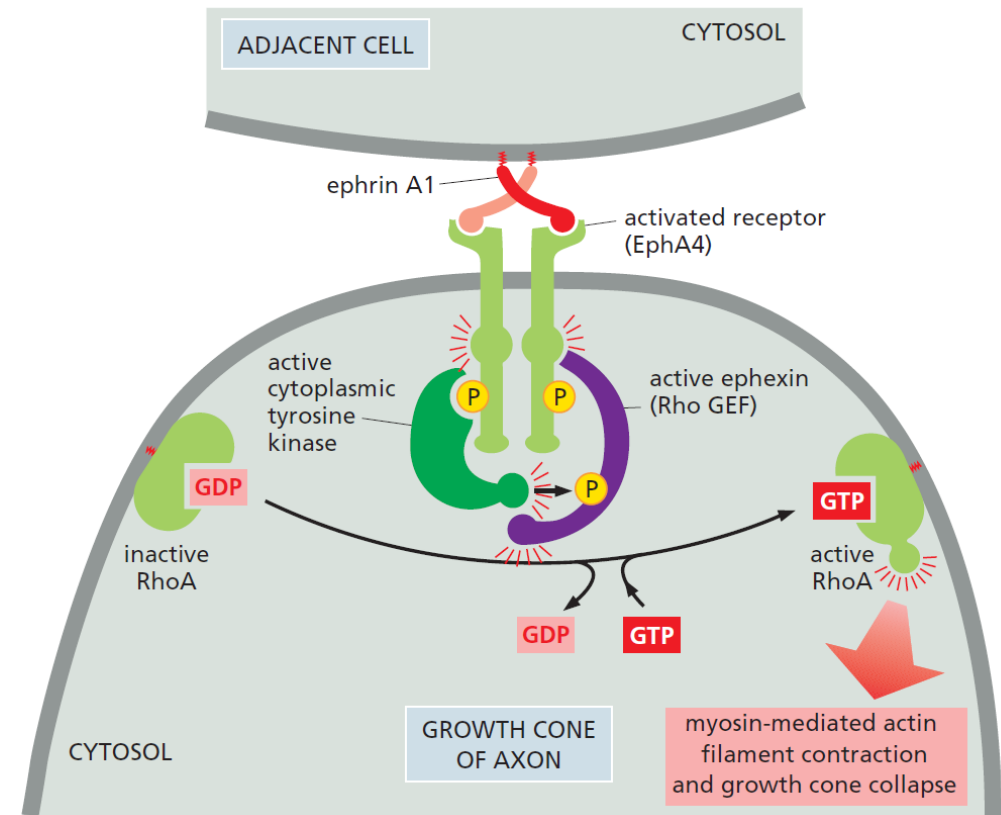
- ERK → MEK
- ERK → SOS
- MEK → Raf

PŘÍMÁ MEZIBUNĚČNÁ SIGNALIZACE – RTK/Rho

- Rho = rodina monomerních GTPáz (Rho, Rac, Cdc42)
- Regulace aktinového cytoskeletu (tvar, polarita, pohyb, adheze)
- Regulace buněčného cyklu, transkripce, transportu

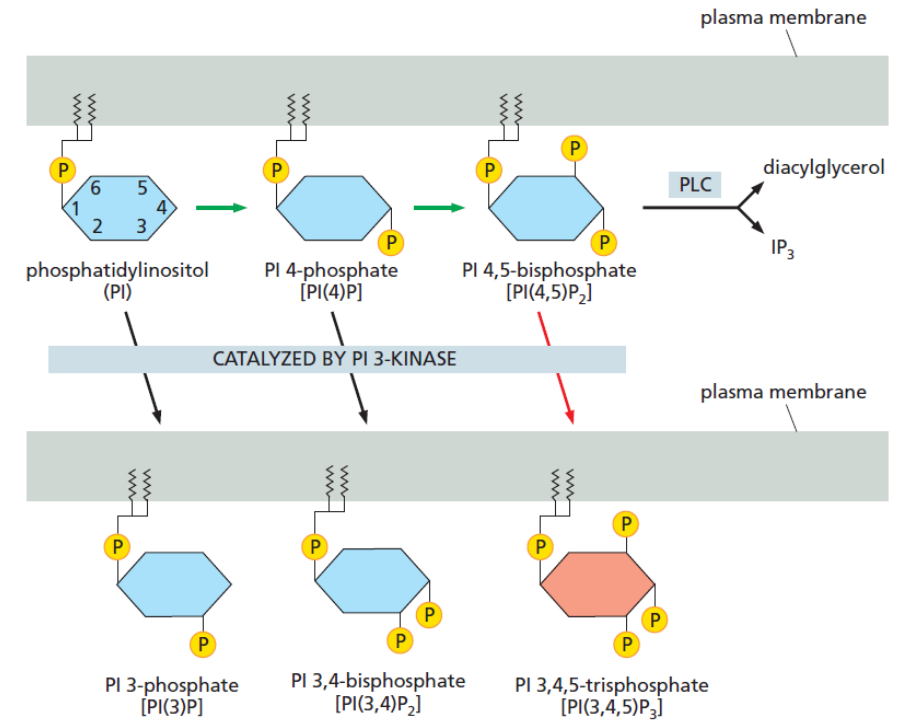
Role v růstu axonů

- Vazba ephrinů na ephrinové receptory (EphA 1-10, EphB 1-6)
- Eph receptor na povrchu motorických neuronů – navádění konce axonu ke svalu
- Vazba ephrinu na Eph receptor → aktivace RhoA → kontrakce aktin/myozinových komplexů → zastavení růstu axonu → změna směru růstu



FOSFOINOSITIDOVÁ SIGNALIZACE NAVAZUJÍCÍ NA RTK

- Hlavní dráha regulující růst a přežití buněk
- PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza) aktivovaná pomocí RTKs fosforyluje inositidy -> připravuje dokovací místa na membráně
- Typicky PIP_3 – POZOR není solubilní jak druhý posel IP_3
- Deaktivace fosfatázou PTEN
- Mutace v *PTEN* – onkogenní - prodlužuje signalizaci

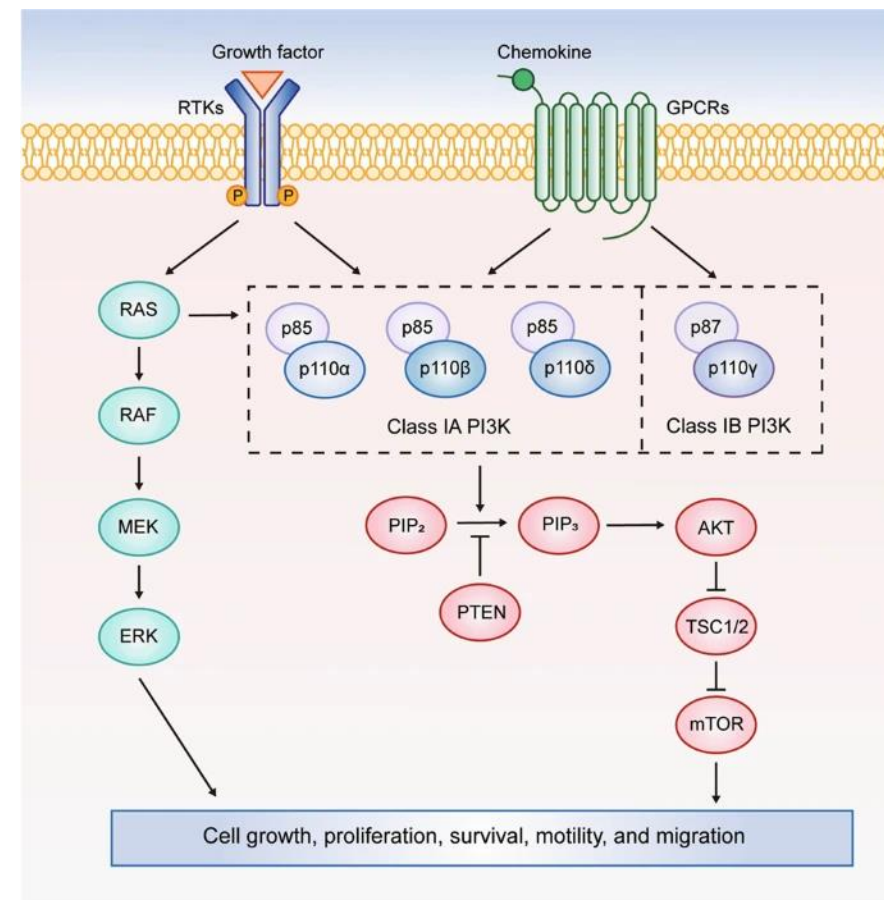


FOSFOINOSITIDOVÁ SIGNALIZACE NAVAZUJÍCÍ NA RTK

- PI3K – 3 třídy, často heterodimerické
- Regulační podjednotka se váže na pRTK nebo na GPCR
- Katalytická tvoří PIP₃
- Na PIP₃ se váží proteiny PH doménou (pleckstrin homology)
- PH doménu má > 200 proteinů (např. SOS, Akt)
- Serin/threoninová kináza Akt
- PI3K/AKT dráha - hlavní regulátor přežívání a růstu u buněk obratlovců i bezobratlých

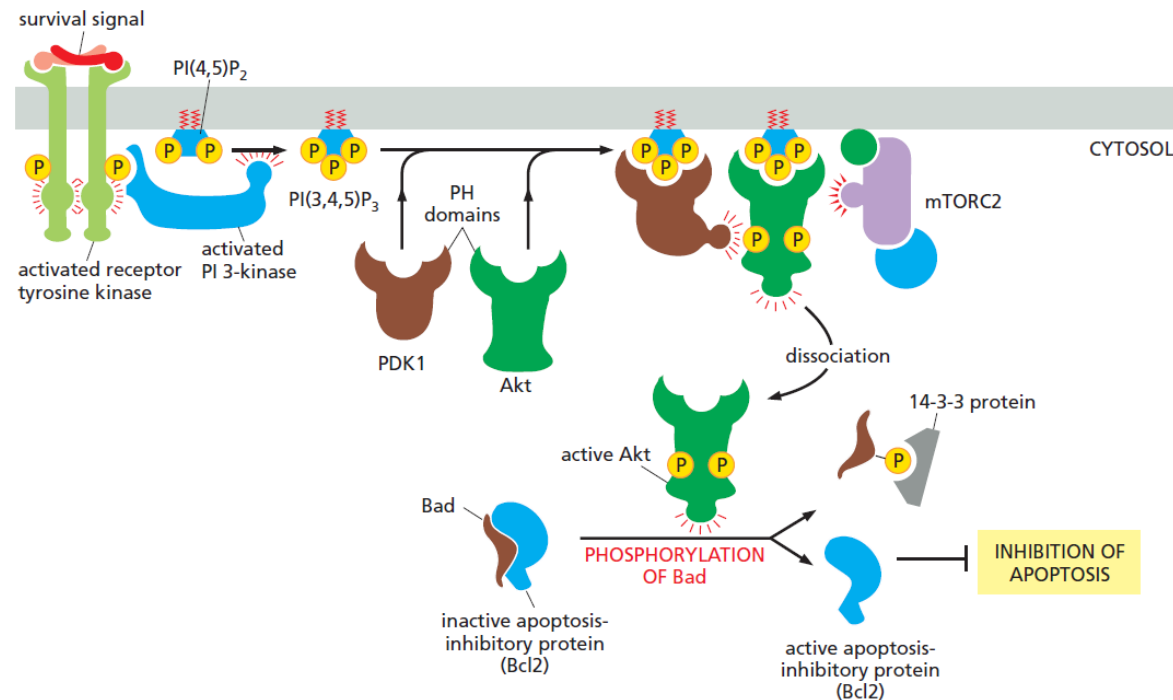
		Catalytic subunit	Regulatory subunit	Lipid Substrate <i>in vivo</i>	Main expression
Class I	A	p110 α p110 β p110 δ	p85	PtdIns(4,5)P ₂	Ubiquitous
	B	p110 γ	p101 p87		Haematopoietic system
Class II		PI3K-C2 α PI3K-C2 β PI3K-C2 γ		PtdIns PtdIns(4)	Ubiquitous Liver
Class III		Vps34	Vps15	PtdIns	Ubiquitous

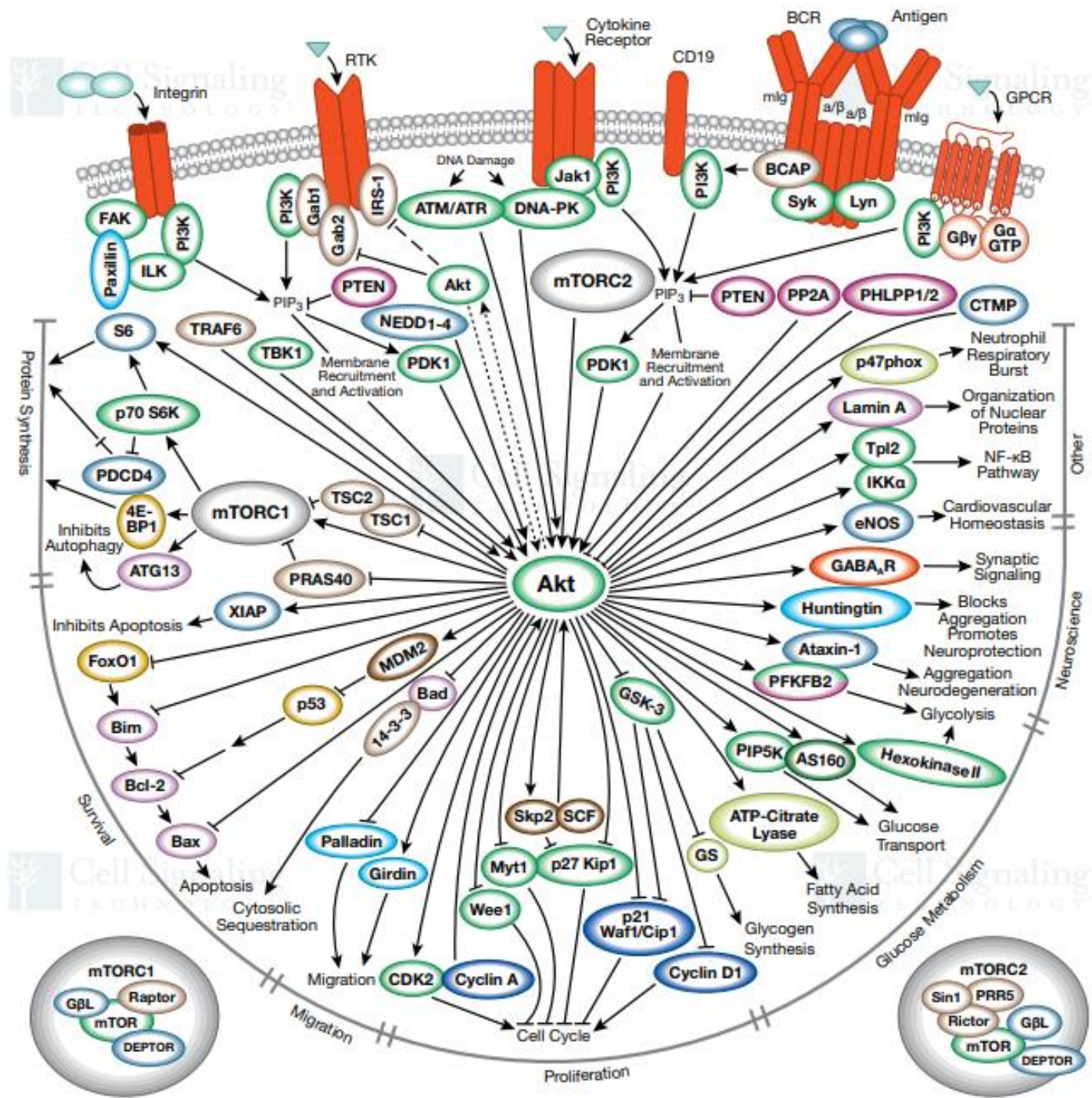
Třídy PI3 kináz



PI3K/AKT DRÁHA STIMULUJE PŘEŽITÍ A RŮST BUNĚK

- Přežití buněk \neq proliferace
- Typickým signálem insulin nebo IGFs (insulin-like growth factors), ale i jiné růstové faktory
- Na PIP_3 se současně váže PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1) a Akt
- Akt po aktivaci fosforyluje cílové proteiny na membráně, v cytosolu a v jádře
- Často je fosforylace inaktivující (např. Bad – inhibitor antiapoptotického Bcl2)



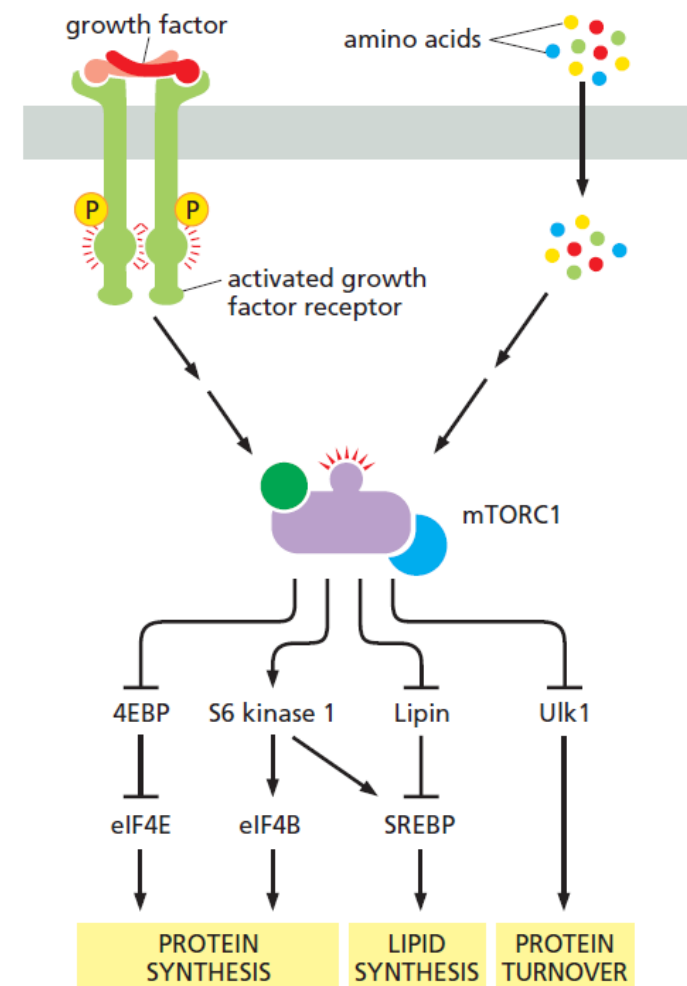


Pathway Diagram Key

- | | | | |
|--|--------------------------------|--|----------------|
| Acetylase | Apoptosis/ Autophagy Regulator | Deacetylase or Cytoskeletal Protein | GTPase/GAP/GEF |
| Adaptor | Cell Cycle Regulator | Growth Factor/Cytokine/ Development Protein | Kinase |
| <p>— Direct Process - - - Tentative Process ····· Translocation Process</p> | | | |
| © 2003–2020 Cell Signaling Technology, Inc. | | | |
| Metabolic Enzyme | Phosphatase | Ubiquitin/SUMO Ligase or Deubiquitinase | Receptor |
| Methyltransferase or G-protein | Protein Complex | Transcription Factor or Transcription Factor | Other |
| <p>▶ Stimulatory Modification — Inhibitory Modification — Transcriptional Modification</p> | | | |

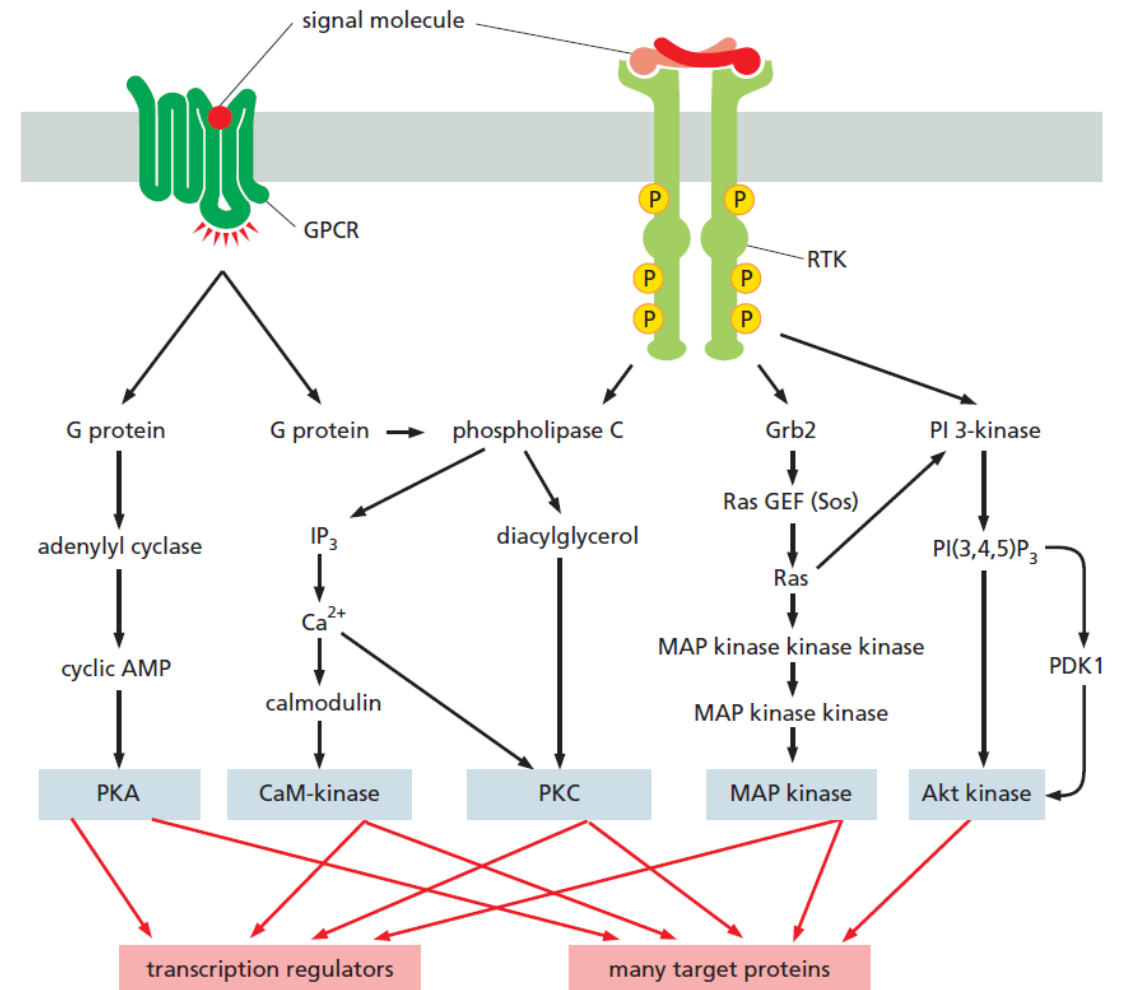
PI3K/AKT/mTOR DRÁHA STIMULUJE PŘEŽITÍ A RŮST BUNĚK

- Růst buněk závislý na aktivaci kinázy mTOR (mammalian target of rapamycin)
- Rapamycin = bakteriální toxin, inhibuje kinázy, imunosupresivní a protinádorová funkce (komerčně dostupný Sirolimus)
- Kináza se vyskytuje ve dvou multiproteinových komplexech mTORC1 a mTORC2
- mTORC1 – obsahuje protein Raptor – komplex je senzitivní na rapamycin – stimuluje buněčný růst
- mTORC2 – obsahuje protein Rictor – komplex není senzitivní na rapamycin – stimuluje buněčné přežití aktivací Akt kinázy a reguluje aktinový cytoskelet
- Aktivace mTOTRC1 – růstovými faktory a živinami (AMK)



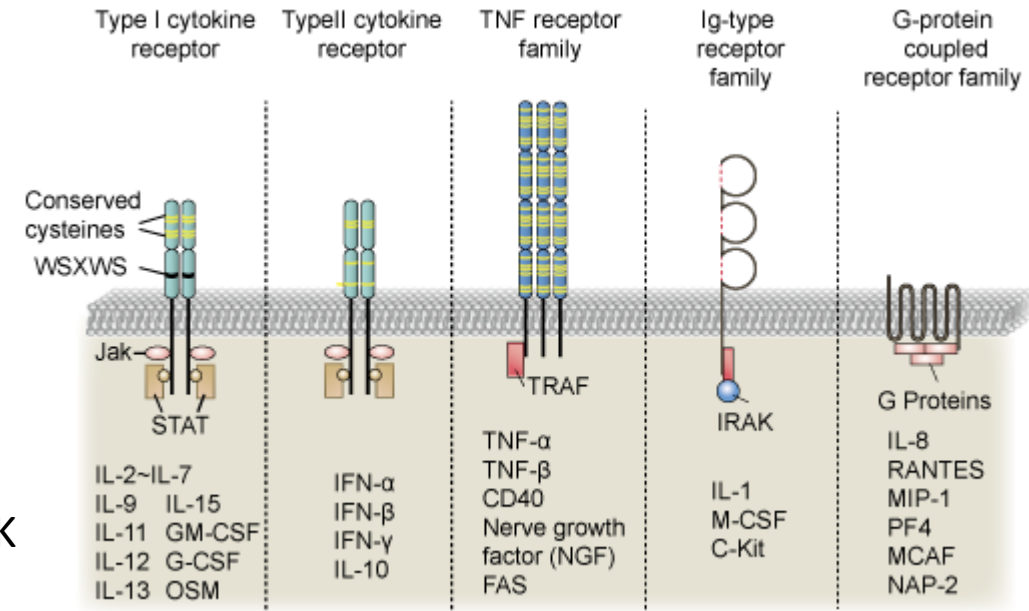
PŘEKRYV SIGNÁLNÍCH DRAH AKTIVOVANÝCH GPCR A RTK

- Společná aktivace (např. PLC γ)
- Aktivace rozdílných drah \rightarrow stejné cílové proteiny
- Interakce mezi dráhami umožňuje různým signálům koordinovat navzájem svůj efekt



CYTOKINY A JEJICH RECEPTORY

- Receptorů pro cytokiny je několik skupin (často dimery, trimery)
- Různé ligandy - interleukiny, interferony, růstové faktory...
- Typ I a II – asociované s cytoplasmatickými tyrozinkinázami JAK
- JAKs (pův. „just another kinases“) → Janus kinases - dle římského boha, mají dvě podobné domény - kinázovou a inhibiční
- JAKs fosforylují a aktivují transkripční regulátory STAT (signal transducers and activators of transcription)

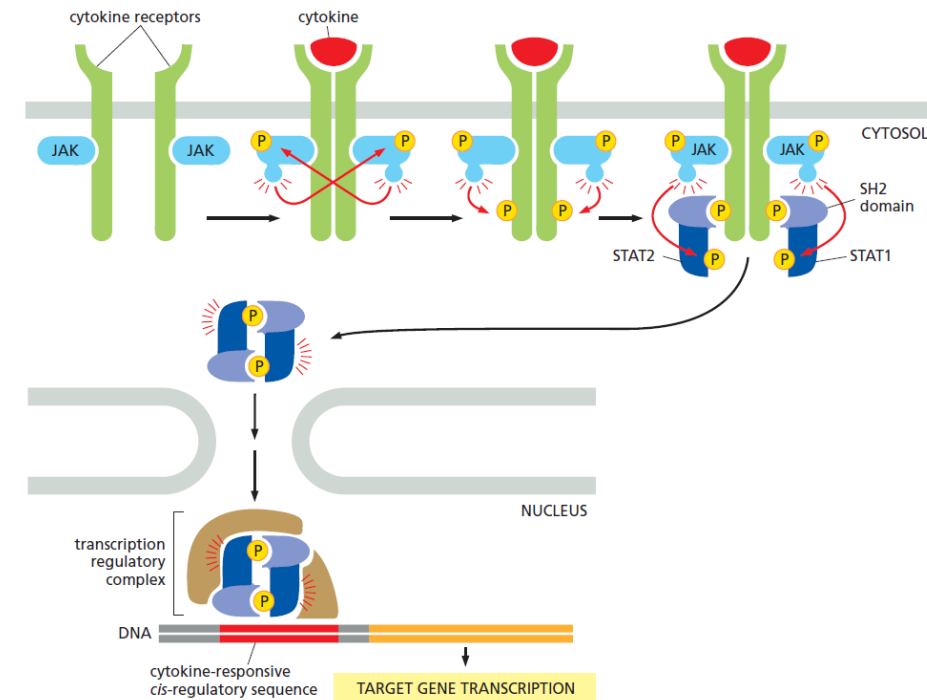


RECEPTORY PRO CYTOKINY AKTIVUJÍ JAK-STAT SIGNÁLNÍ DRÁHU

- Po nasednutí ligandu → crossfosforylace JAKs → fosforylují cytoplasmatickou část receptoru → vytvoří dokovací místo pro STAT
- Po fosforylaci se STAT disociuje a může homo/hetero-dimerizovat díky SH2
- Následná translokace dimeru do jádra – vazba na odpovídající DNA element – iniciace transkripce cílových genů
- Regulace signalizace: transkripce inhibitorů

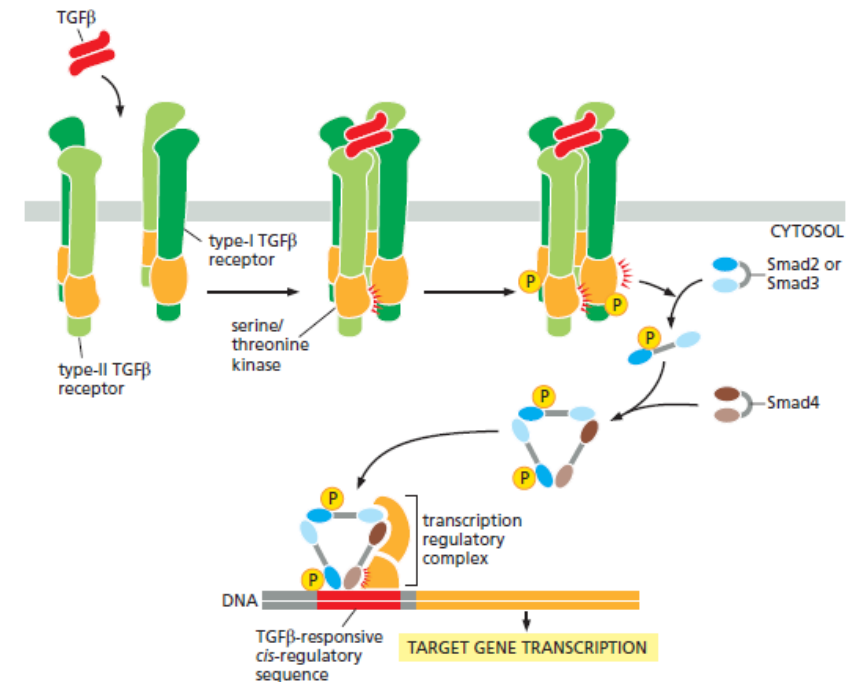
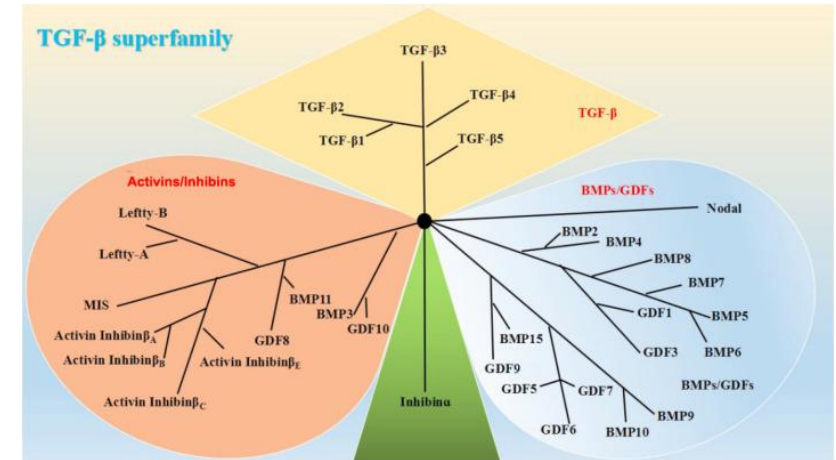
TABLE 15–6 Some Extracellular Signal Proteins That Act Through Cytokine Receptors and the JAK–STAT Signaling Pathway

Signal protein	Receptor-associated JAKs	STATs activated	Some responses
Interferon- γ (IFN γ)	JAK1 and JAK2	STAT1	Activates macrophages
Interferon- α (IFN α)	Tyk2 and JAK2	STAT1 and STAT2	Increases cell resistance to viral infection
Erythropoietin	JAK2	STAT5	Stimulates production of erythrocytes
Prolactin	JAK1 and JAK2	STAT5	Stimulates milk production
Growth hormone	JAK2	STAT1 and STAT5	Stimulates growth by inducing IGF1 production
Granulocyte–macrophage–colony–stimulating factor (GMCSF)	JAK2	STAT5	Stimulates production of granulocytes and macrophages

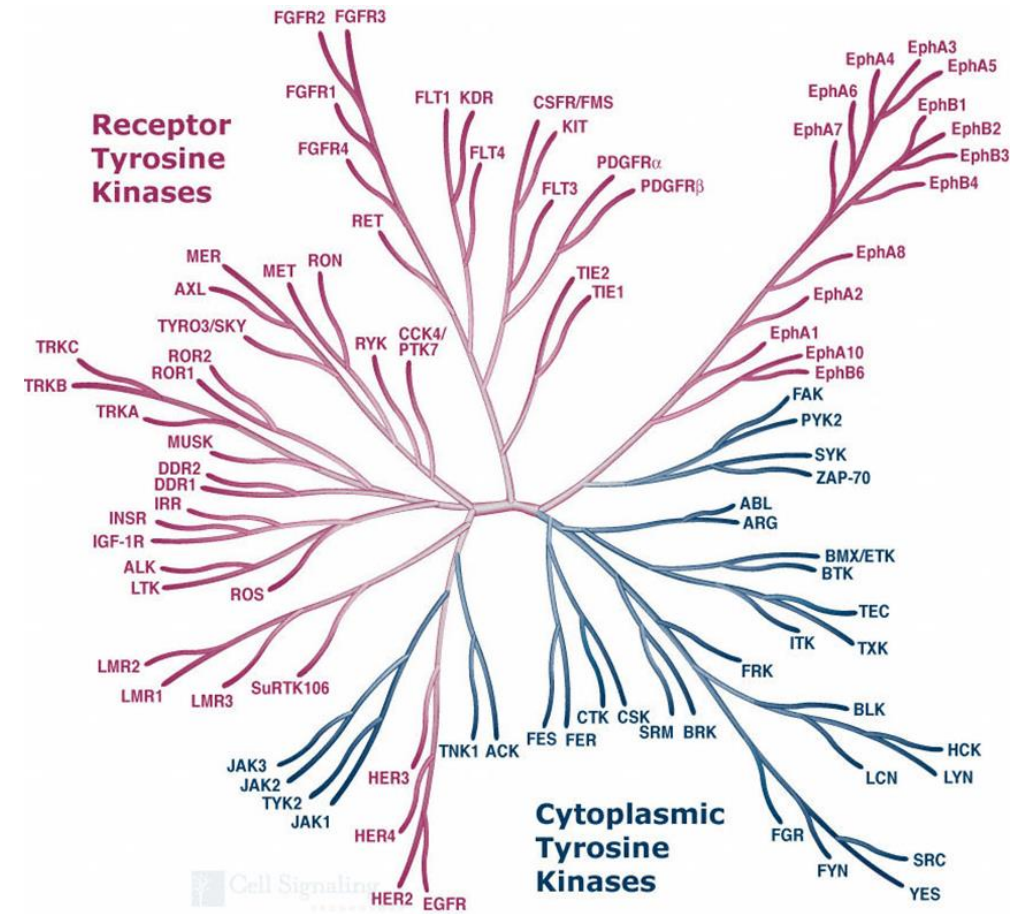


RECEPTORY PRO LIGANDY Z TGF β SUPERRODINY AKTIVUJÍ PROTEINY SMAD

- TGF β superrodina, > 30 strukturálně příbuzných dimerických proteinů
- Podrodiny: TGF β , Aktiviny/Inhibiny, BMPs
- Regulace širokého spektra biologických funkcí
- Během vývoje: proliferace, diferenciace, smrt, produkce ECM..
- V dospělosti: hojení tkání, imunitní odpověď, ..
- Receptory (typ I a II) mají serin/threoninovou kinázovou doménu
- Dimer ligandu se váže na heterotetramerický komplex receptorů
- Aktivace kinázové domény (typ II fosforyluje typ I)
- Následná vazba a fosforylace Smad proteinu
- Fosforylovaný Smad se spojí s dalšími Smad molekulami a translokuje do jádra
- V závislosti na dalších transkripčních regulátorech – různé cílové geny



Cytoplasmatické tyrozinkinázy



CYTOPLASMATICKÉ TYROZINKINÁZY

- Receptory nemající vlastní tyrozinkinázovou doménu
- Asociují s cytoplasmatickou tyrozinkinázou – fosforylace cílových proteinů (včetně receptoru)
- Cytoplasmatická tyrozinkináza je nekovalentně navázaná na receptor
- Příklady: receptory pro antigen a interleukiny u lymfocytů, integriny, receptory pro hormony a cytokiny
- Častá kooperace s rodinou cytoplasmatických kináz Src (Src, Yes, Fgr, Fyn, Lck, Lyn, Hck, a Blk)
- Obsahují SH2 a SH3 domény – vazba na receptor a na lipidové řetězce
- Aktivují se po vazbě ligandu na receptor
- Můžou se vázat i na RTK – následně vzájemná aktivace – zesílení a prodloužení signalizace
- Asociace s integriny – spojené s ECM – podíl na tvorbě fokálních adhezí
- FAK (focal adhesion kinase) – navazuje na cytoplasmatickou část integrinů – fosforyluje se a tvoří dokovací místo pro Src – fosforylace cílových proteinů včetně cílů RTK signalizace
- Společná signalizace: adheze k vhodnému podkladu kde může přežít, růst, dělit se...

c-Src

- První objevená tyrozinkináza (1979)
- Homologní k v-Src (Rous sacoma virus)
- V neaktivní formě vazba na mastnou kyselinu (myristovou) a membránu
- Aktivace pomocí RTK (EGFR, HGFR), GPCRs nebo receptory bez kinázové domény
- Následně: odstranění fosfátu z c-konce + vazba aktivačního proteinu na SH3 + fosforylace
- Funguje jako signalizační integrátor – musí nastat více aktivačních kroků
- Kooperace s dalšími dráhami – MAPK, STAT, AKT.. -regulace proliferace, přežití, pohybu
- Mutace -> ≈ 50 % of nádorů střeva, jater, plic, prsa, pankreas

