

Mezibuněčná signalizace – úvod

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

Bi7005 Buněčné regulace / 1 / 25.9.2024

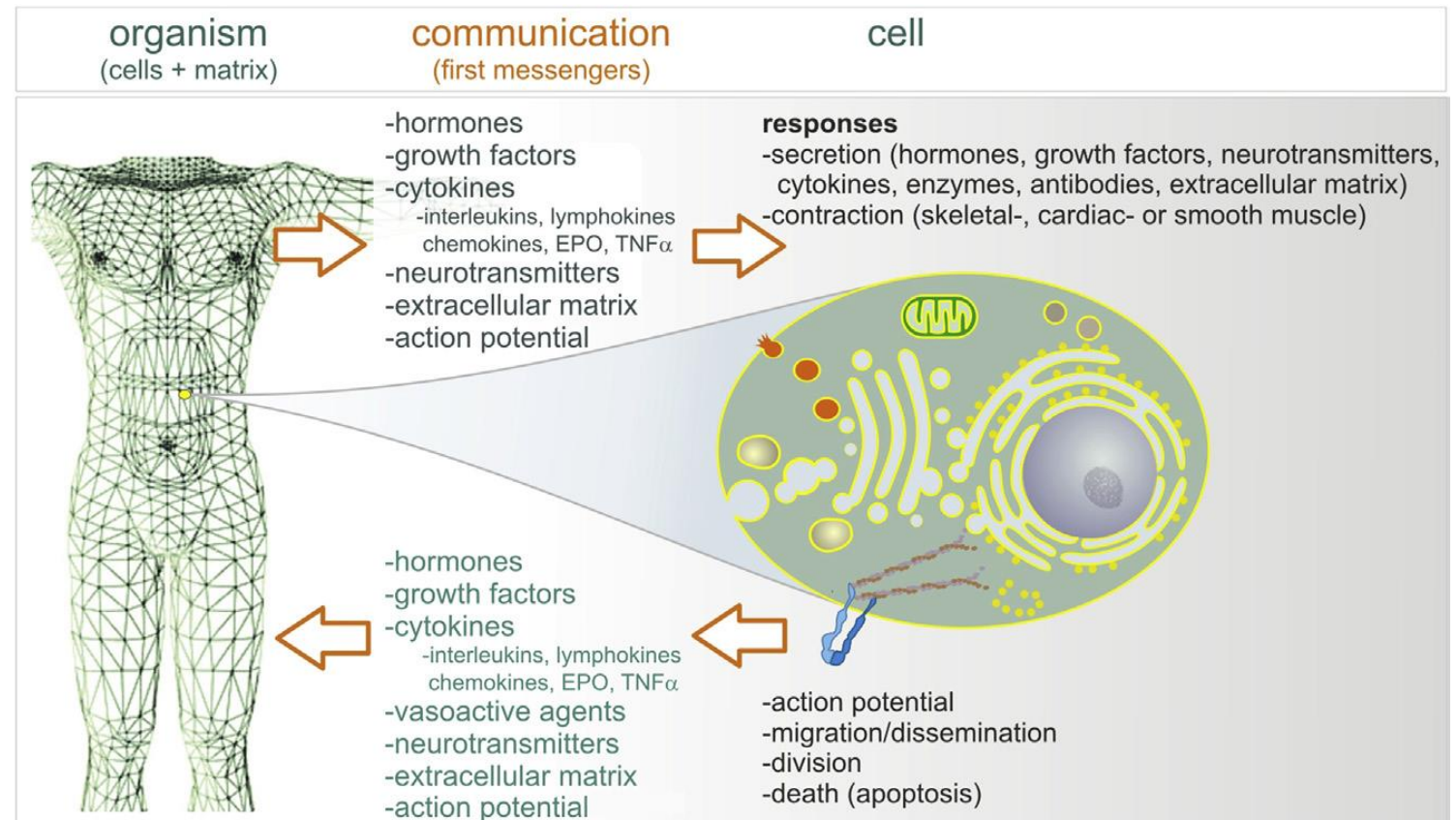
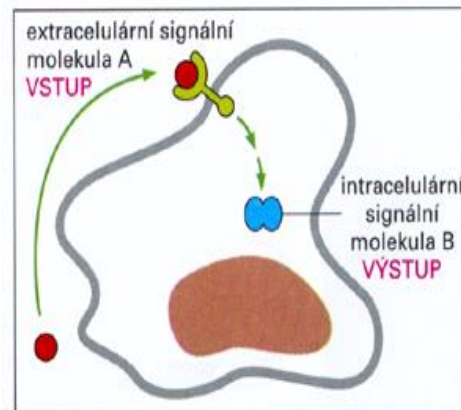
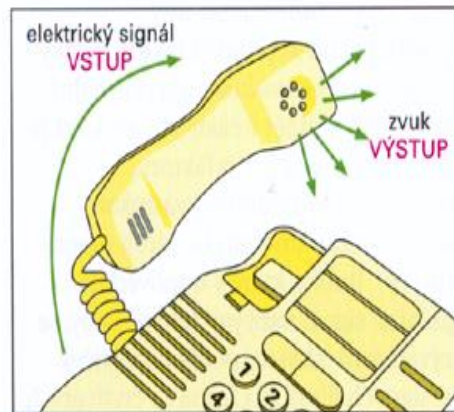


OSNOVA:

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

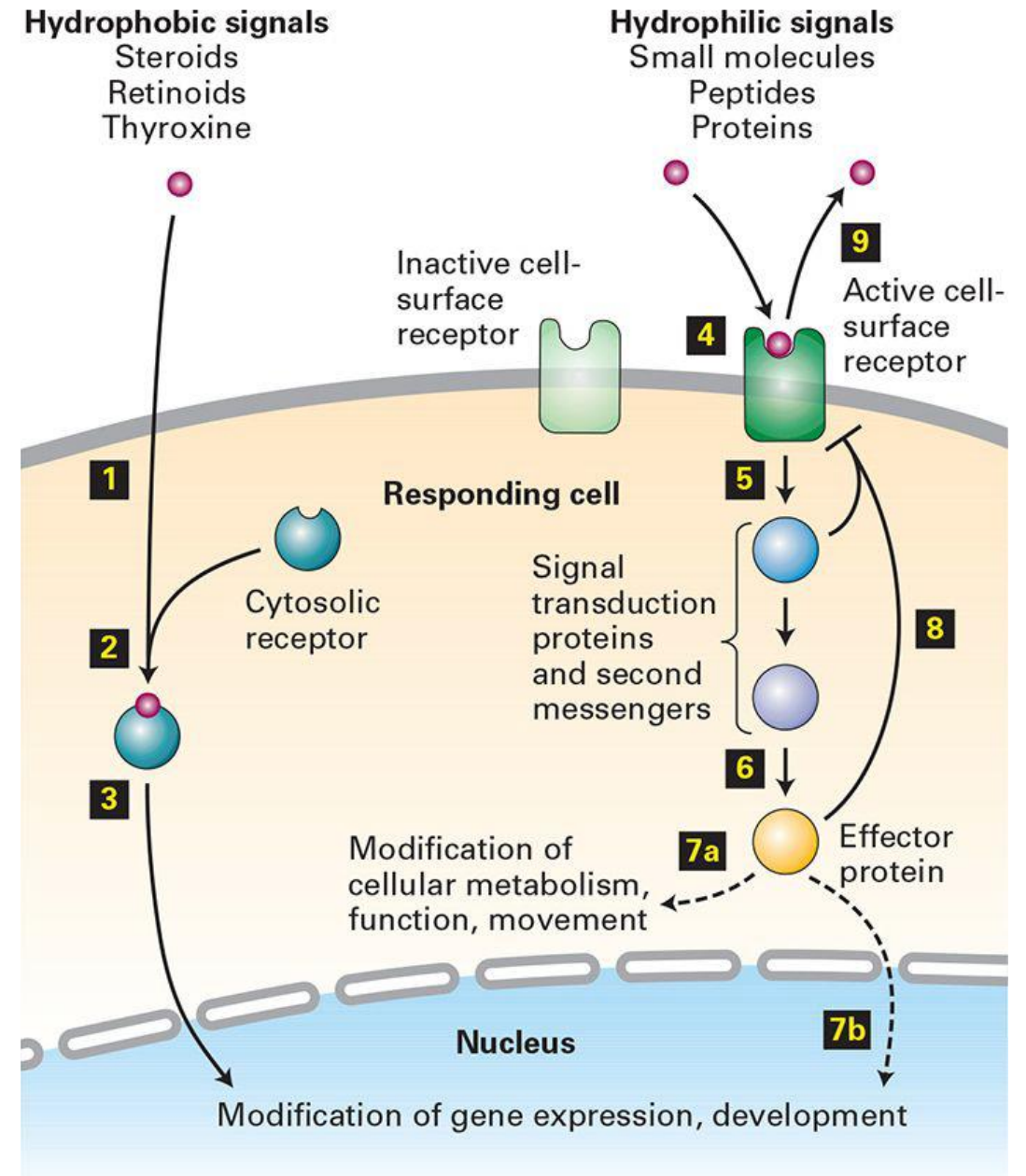
SIGNALIZACE ≈ KOMUNIKACE

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



KLÍČOVÍ HRÁČI SIGNALIZACE

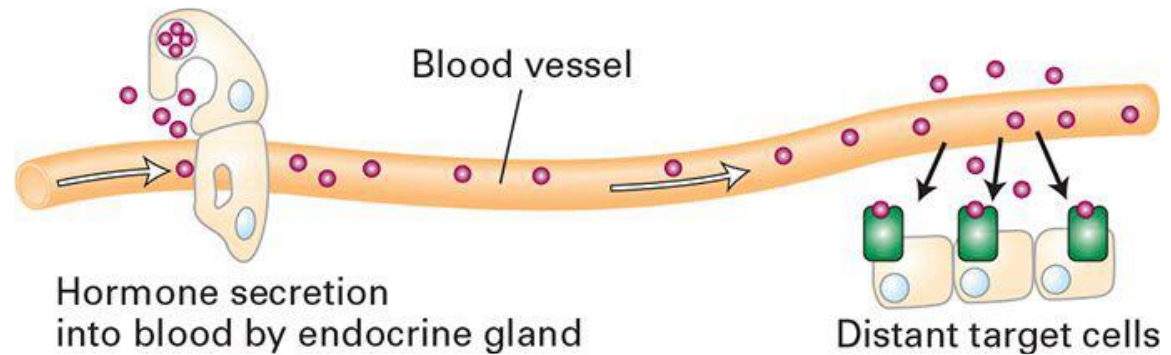
- Signální molekuly
 - hydrofobní
 - hydrofilní
- Receptory
 - membránové
 - cytosolické
- Přenašeče signalizace + druzí posli
- Efektorové proteiny
- Efekt
 - rychlý (modifikace proteinů)
 - pomalý (modifikace genové exprese)



DOSAĤ SIGNÁLŮ

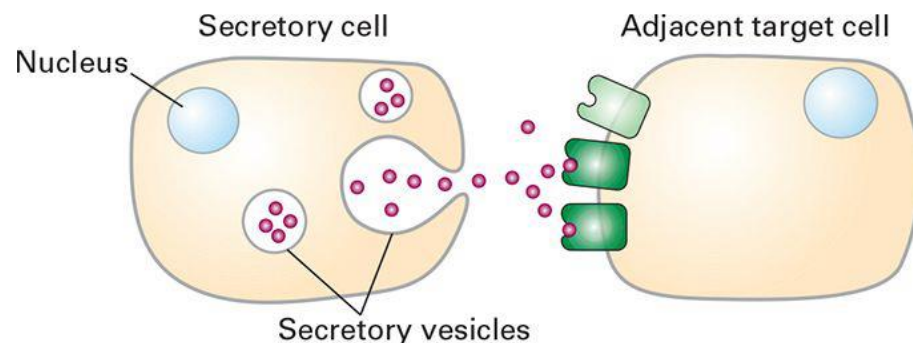
Endokrinní signalizace

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

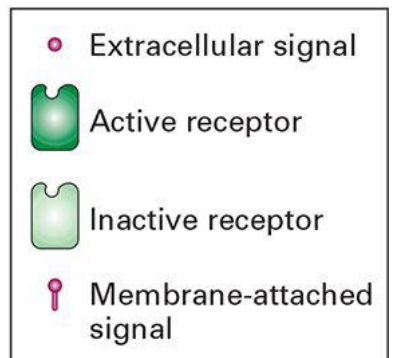


Parakrinní signalizace

- 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



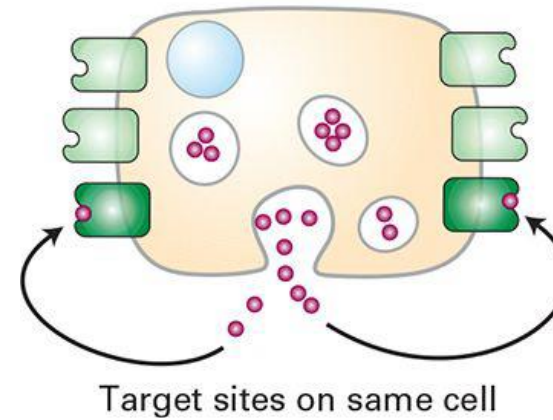
Key:



DOSAĤ SIGNÁLŮ

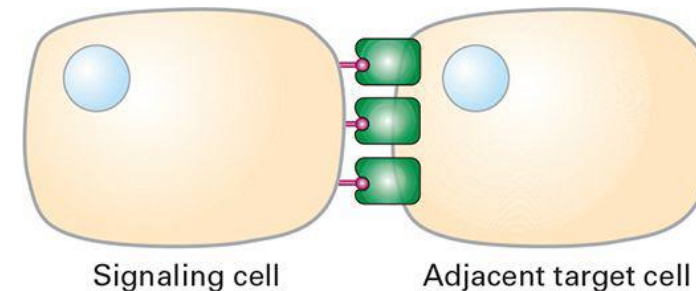
Autokrinní signalizace

- 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



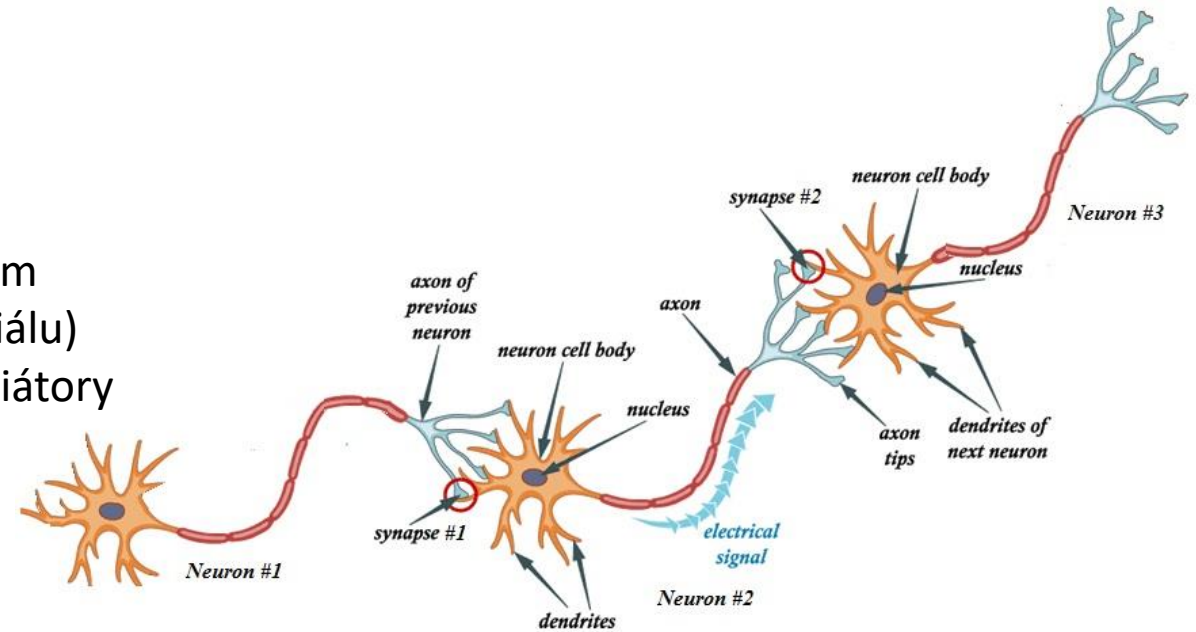
Kombinovaná signalizace

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

DOSAĤ SIGNÁLŮ

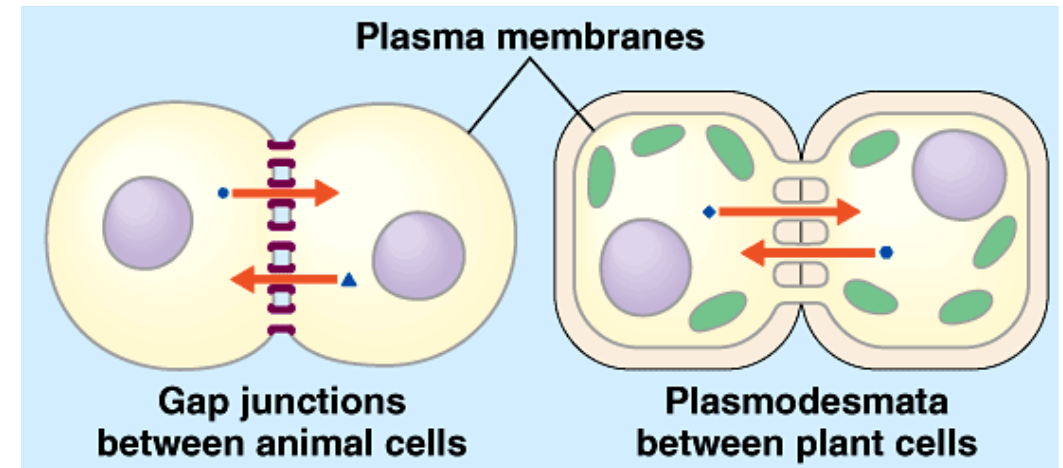
Signály nervové soustavy

- 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

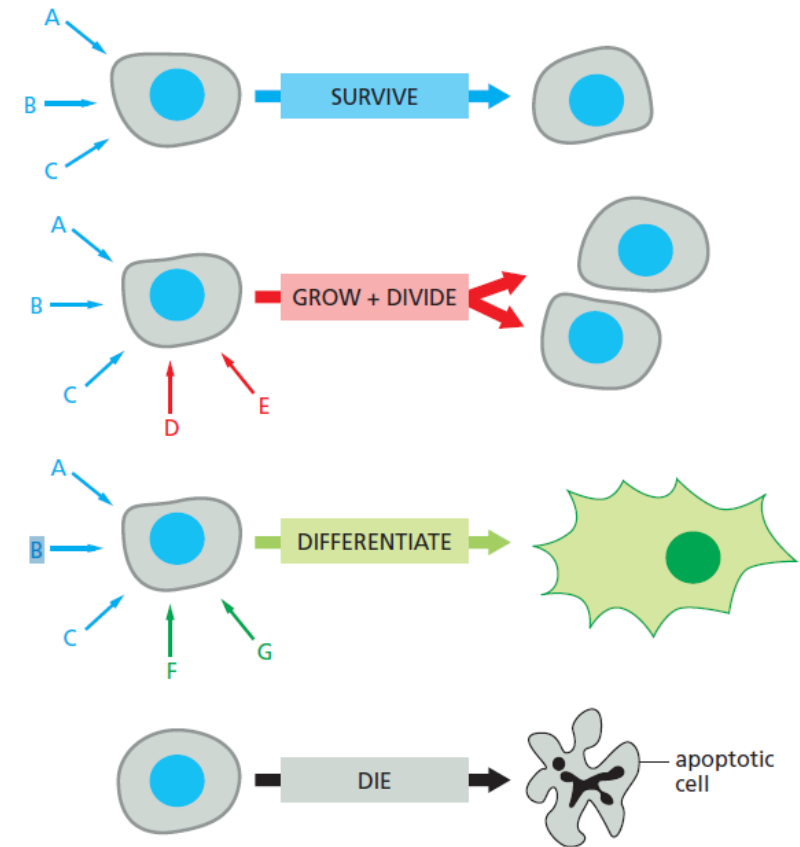


REAKCE BUŇKY NA SIGNÁL

- 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

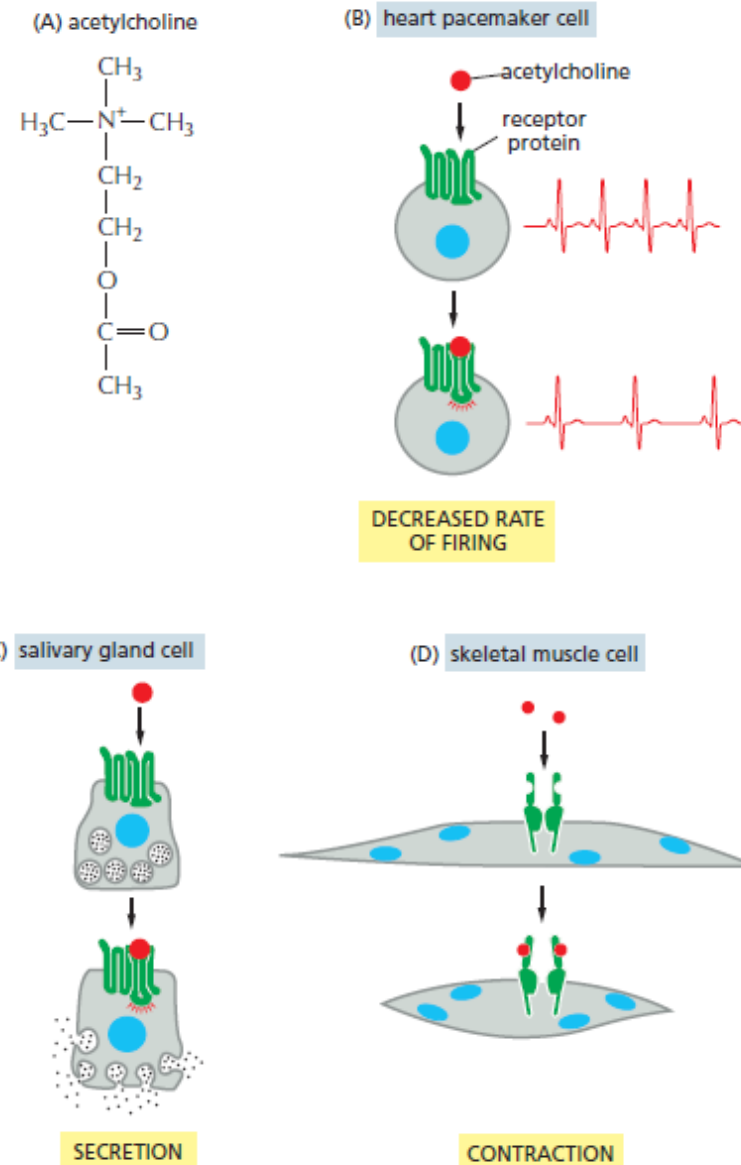
REAKCE BUŇKY NA SIGNÁL

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



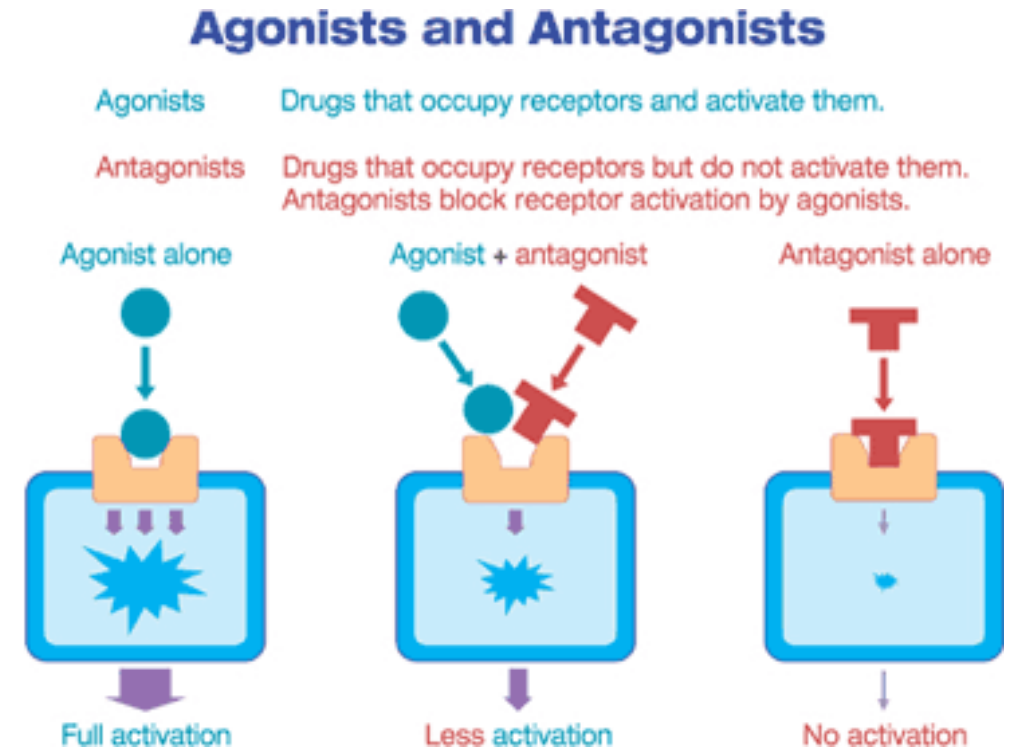
REAKCE BUŇKY NA SIGNÁL

- 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 vést k jiným odpovědím = efektorová specifita
- 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

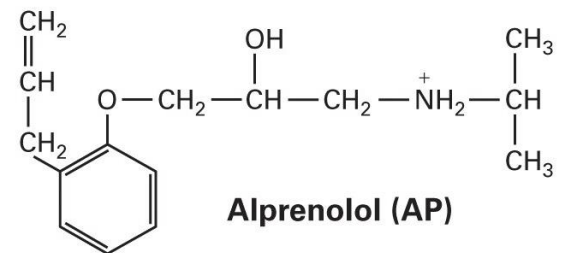
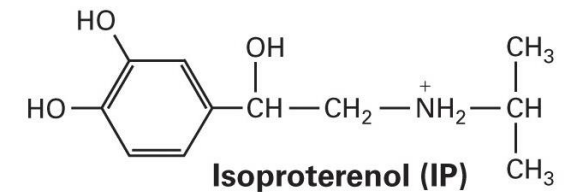
- Možnost ovlivnění různých signálních drah
- Aplikace syntetických analogů ligandů medicíně
- Agonista (působí pozitivně) – stejná funkce jako ligand, vazba na receptor -> odpověď
- Antagonista (působí negativně) - vazba na receptor, blokuje vazbu ligandu -> bez odpovědi



POUŽITÍ AGONISTŮ A ANTAGONISTŮ V MEDICÍNĚ

Příklad:

- Adrenalin (epinefrin) – produkce dřeně nadledvin
- Agonista: isoproterenol – vazba (10x silnější než adrenalin) na adrenalinové receptory buněk hladkého svalstva průdušek -> dilatace -> léčba astma
- Antagonista: alprenolol – blokátor β -adrenalinových receptorů (β -blokátor) – vazba na adrenalinové receptory buněk srdečního svalstva -> zpomalení kontrakcí -> léčba arytmií a anginy pectoris



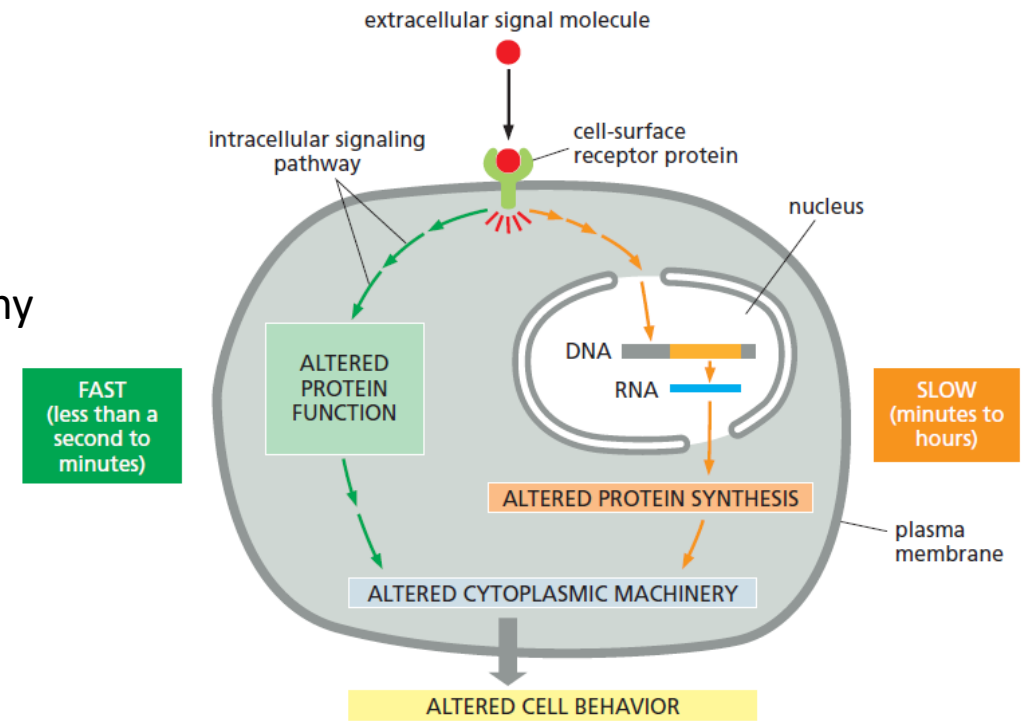
SPECIFICITA vs. ROBUSTNOST SIGNALIZACE

- Velké množství různých signálních molekul
- Nutnost předejít chybné signalizaci
- Vysoká specifita 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



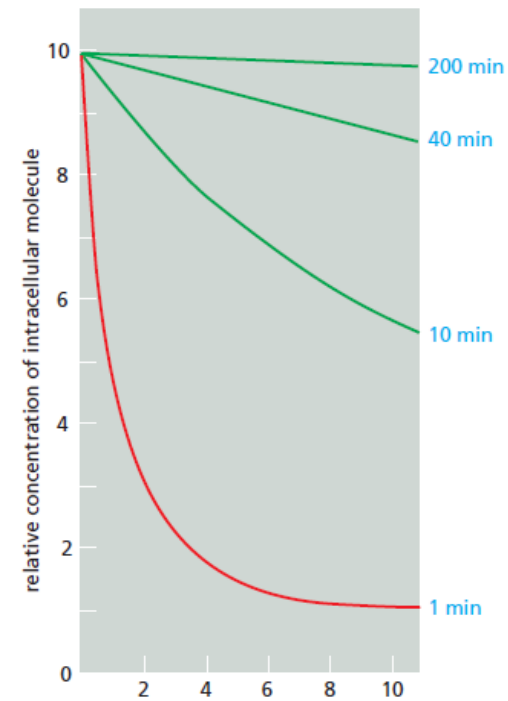
VARIABILITA VZTAHU SIGNÁL – ODPOVĚĎ

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

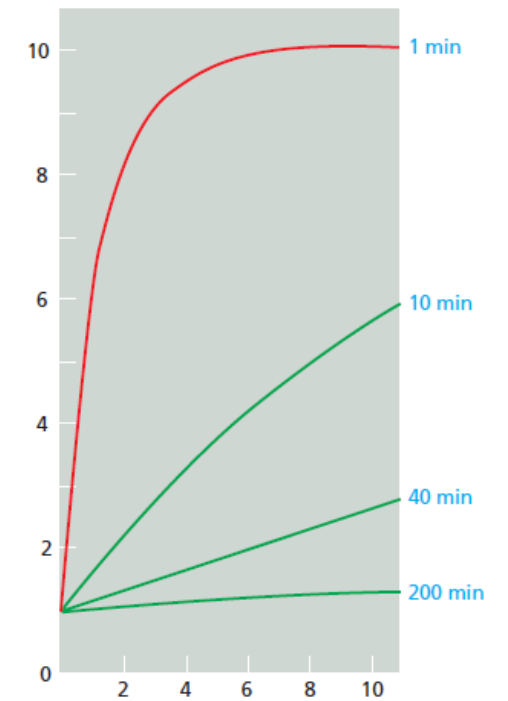
- Proteiny s rychlým obratem (červené) se rychle degradují/syntetizují po zásahu do exprese
- Proteiny s pomalým obratem (zelené) se pomalu degradují/syntetizují po zásahu do exprese
- Poločas (half-life) proteinu je doba, za kterou dosáhnou $\frac{1}{2}$ předpokládaného množství

10x snížená syntéza



(A) minutes after the synthesis rate has been decreased by a factor of 10

10x zvýšená syntéza

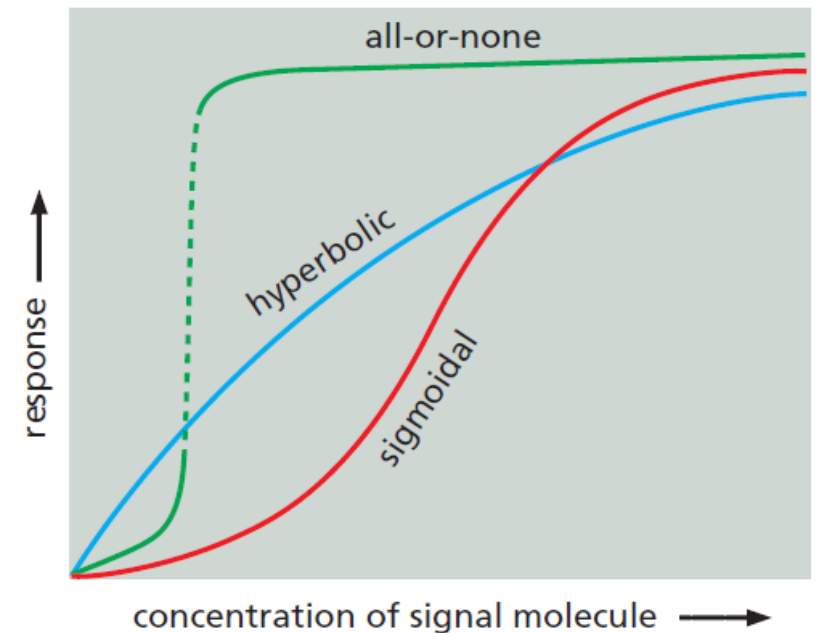


(B) minutes after the synthesis rate has been increased by a factor of 10

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:

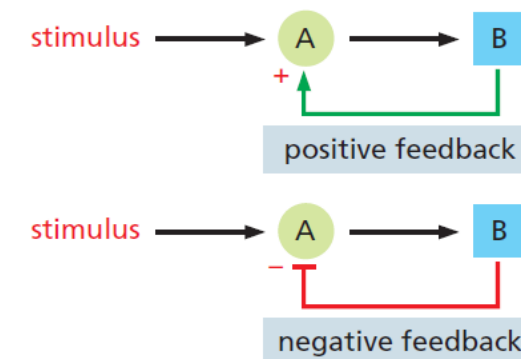
- Závisí na koncentraci ligandu (hormony: nízká koncentrace = citlivé receptory; neurotransmitery: vyšší lokální koncentrace = méně citlivé receptory)
- Vliv vnitrobuněčné amplifikace

Dynamické rozpětí signalizace:

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

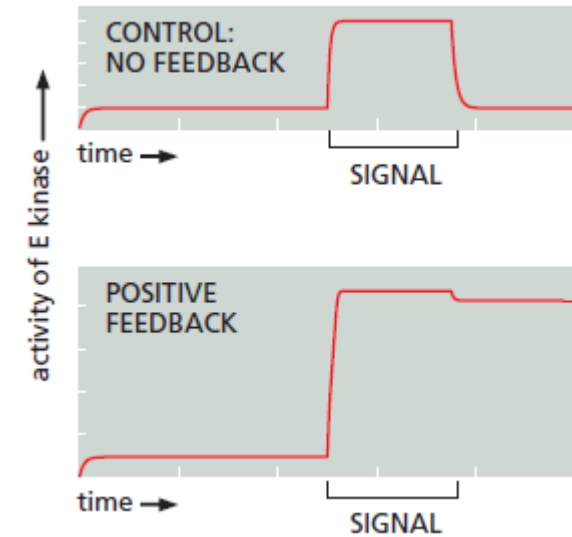
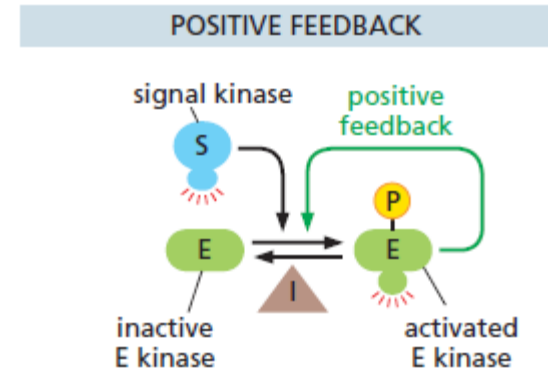
Regulace zpětnou vazbou – regulace většiny biologických procesů

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



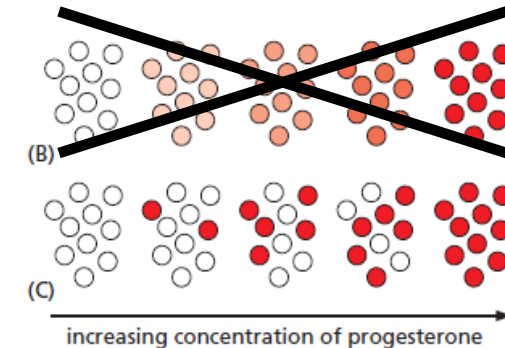
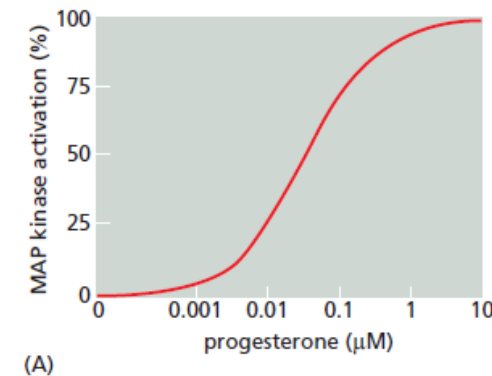
Pozitivní zpětná vazba

- 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



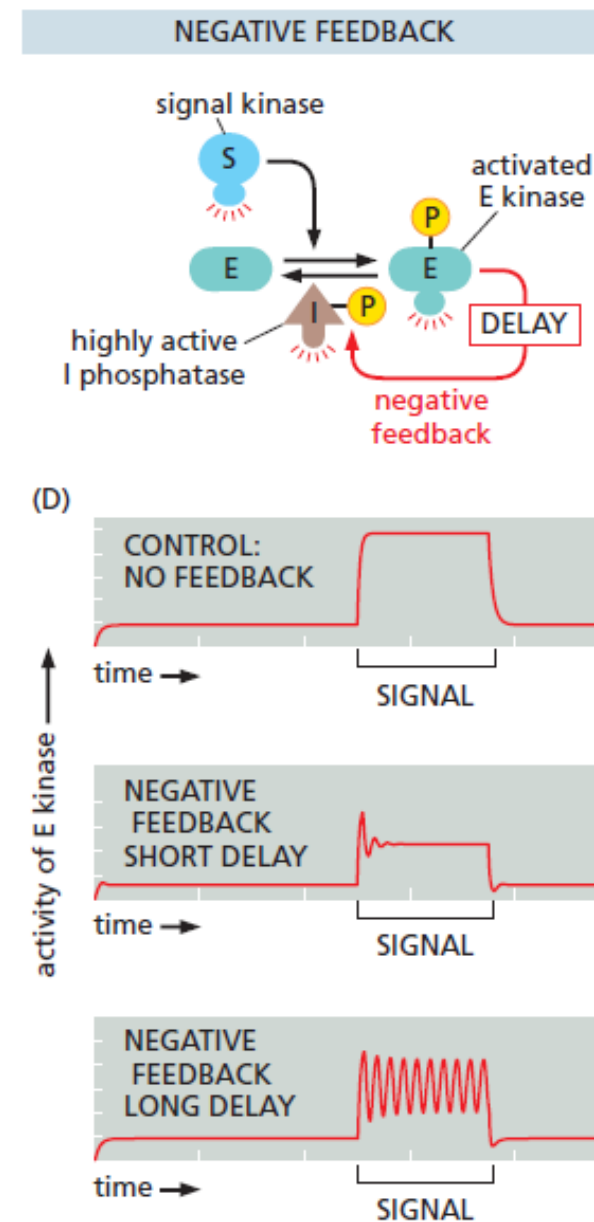
Zkreslení buněčné odpovědi vzhledem k buněčné populaci

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



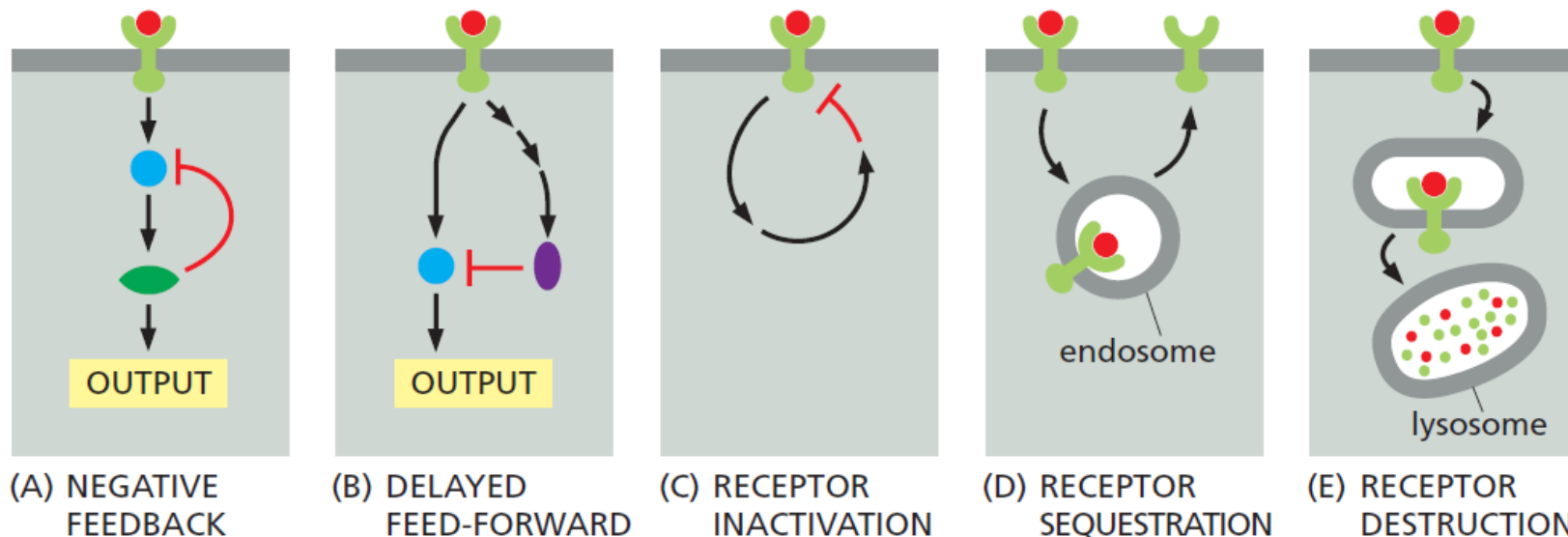
Negativní zpětná vazba

- 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 spíše 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



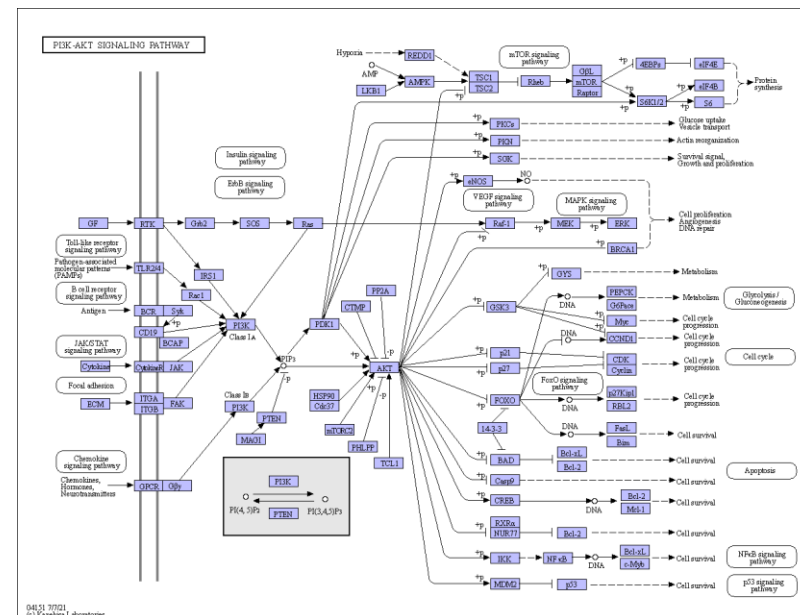
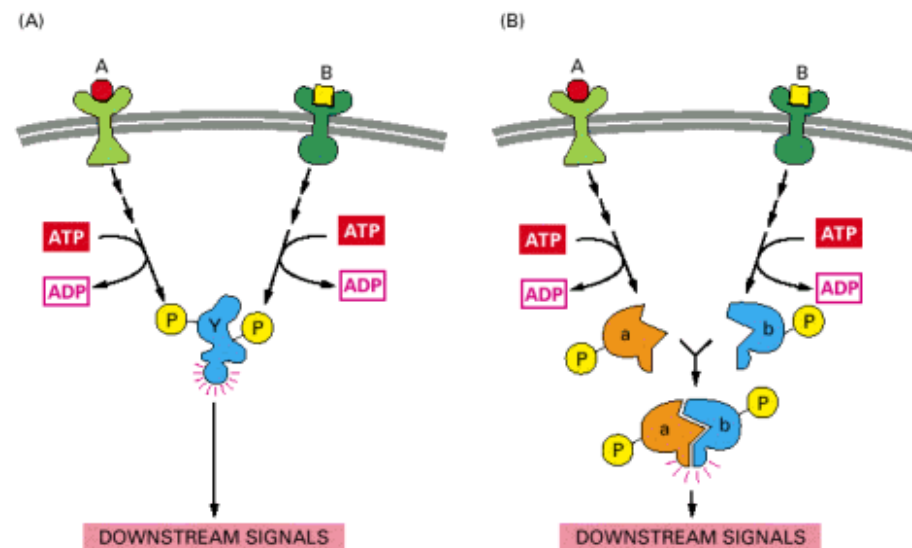
VARIABILITA VZTAHU SIGNÁL – ODPOVĚĚ

Integrace:

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

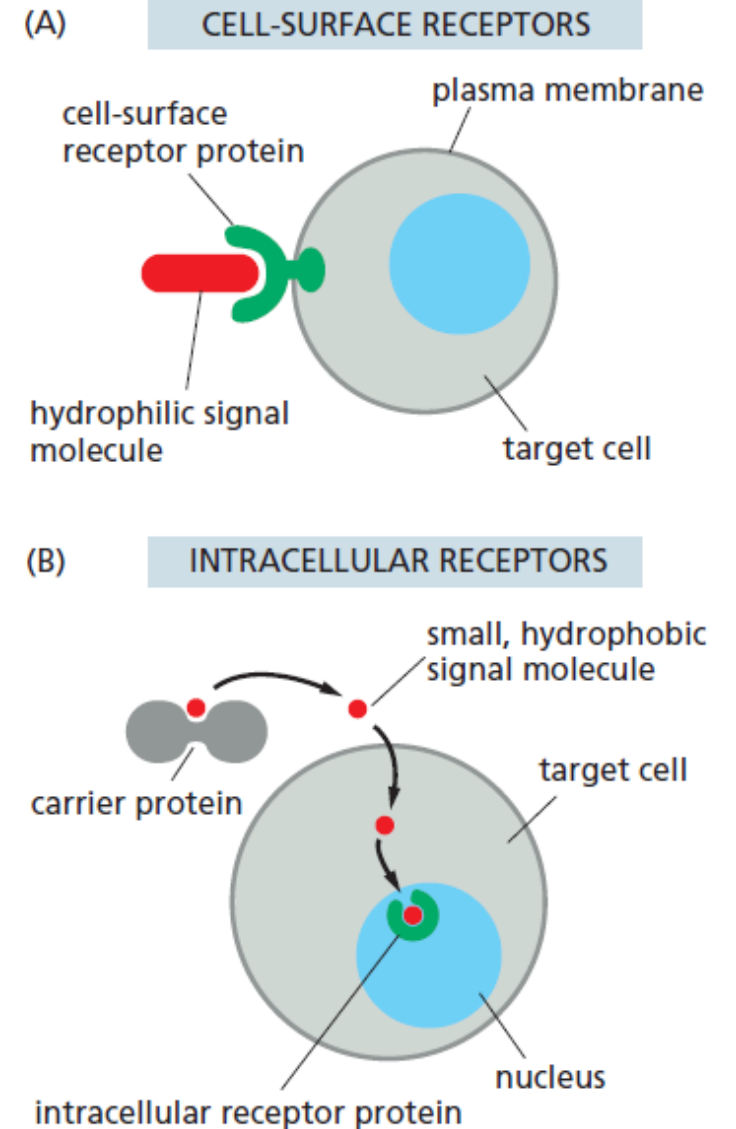
Koordinace:

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



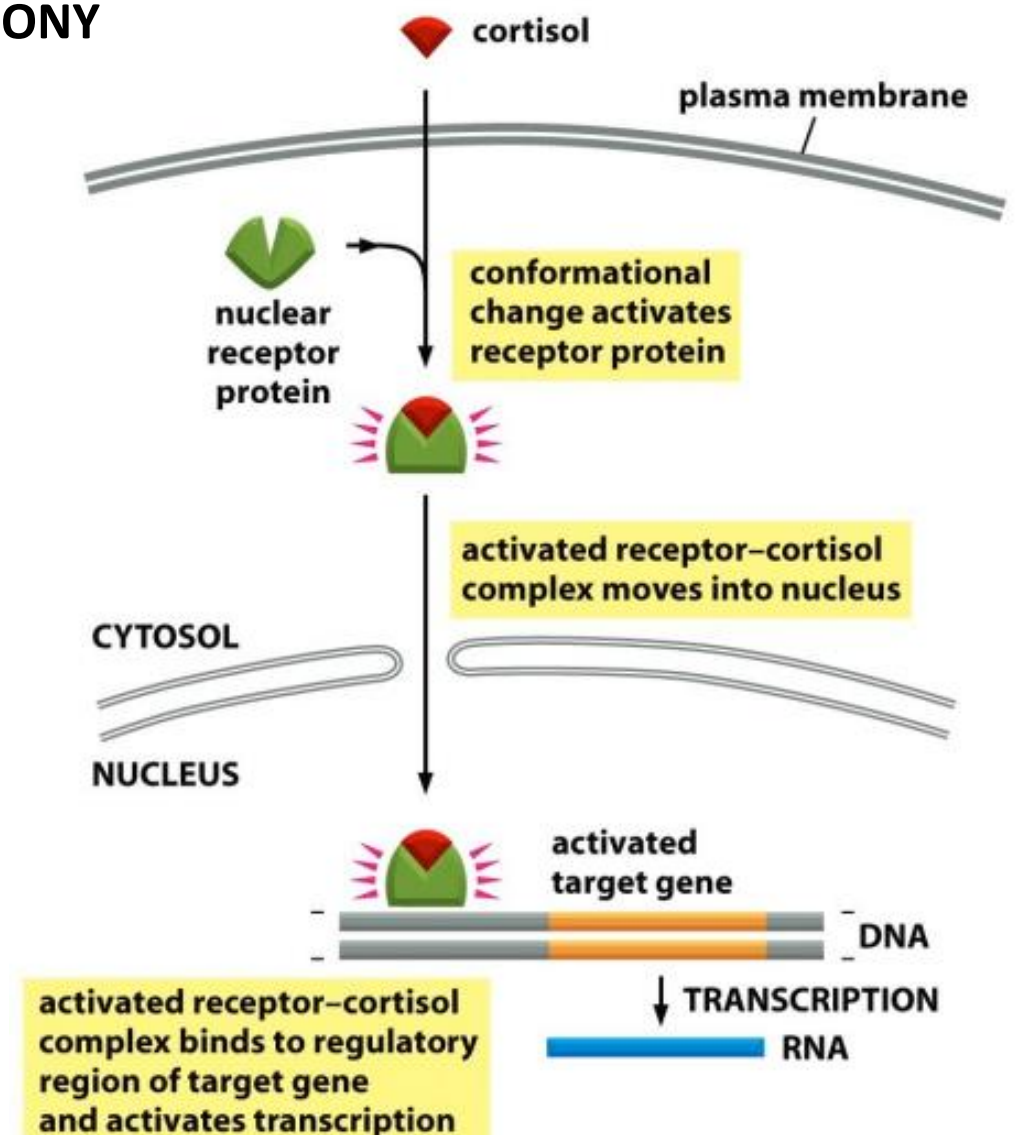
PRŮCHODNOST MEMBRÁNY PRO LIGANDY

- 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



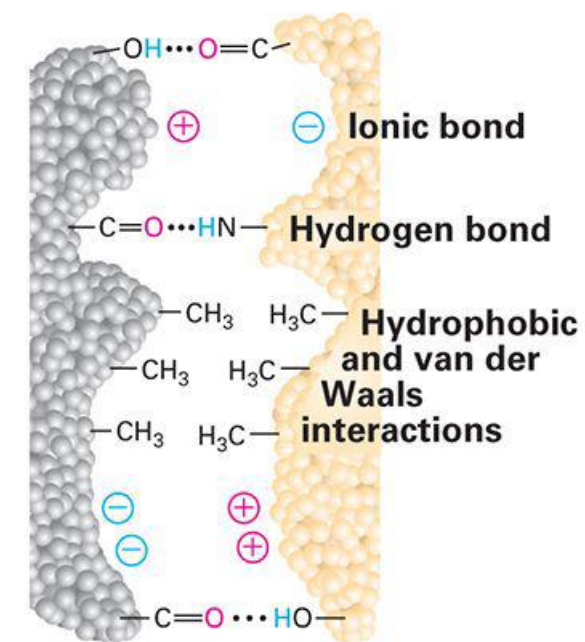
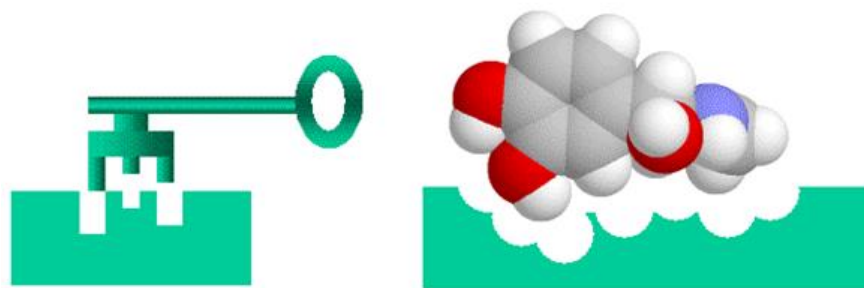
SIGNALIZACE STEROIDNÍMI A THYROIDNÍMI HORMONY

- 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

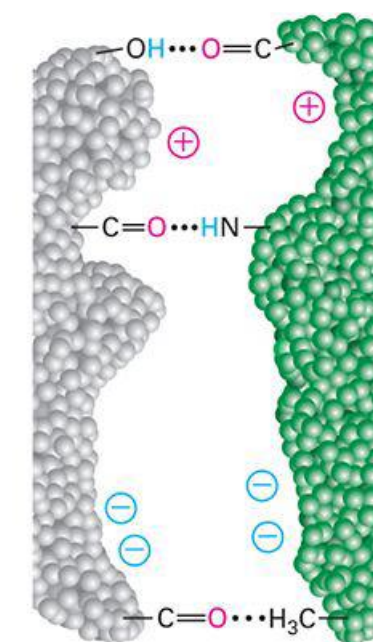


VAZBA LIGANDU NA RECEPTOR

- 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



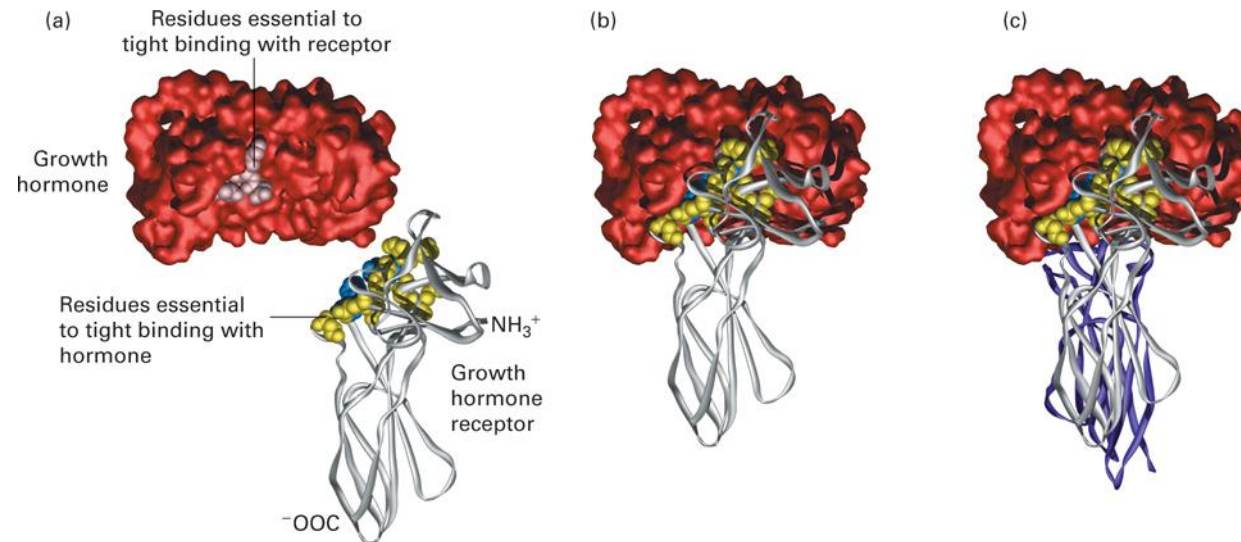
Protein A Protein B
Stable complex



Protein A Protein C
Less stable complex

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

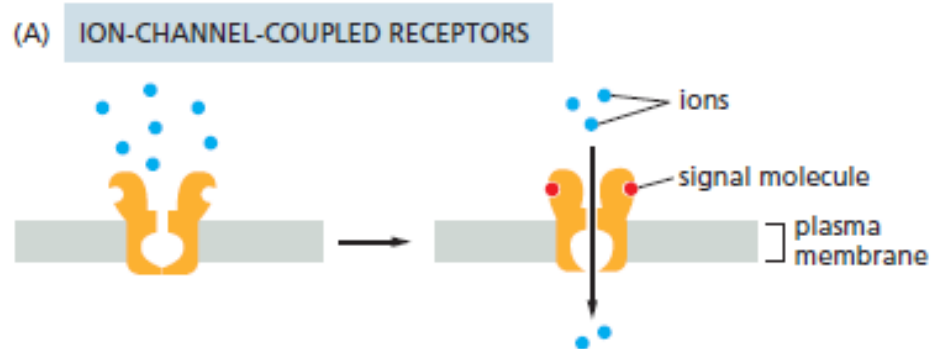


HLAVNÍ TYPY MEMBRÁNOVÝCH RECEPTORŮ

- Extracelulární signály - vazba na receptor - nepronikají do buňky
 - Receptory fungují jako přenašeče signálu (signal transducers)
 - 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)

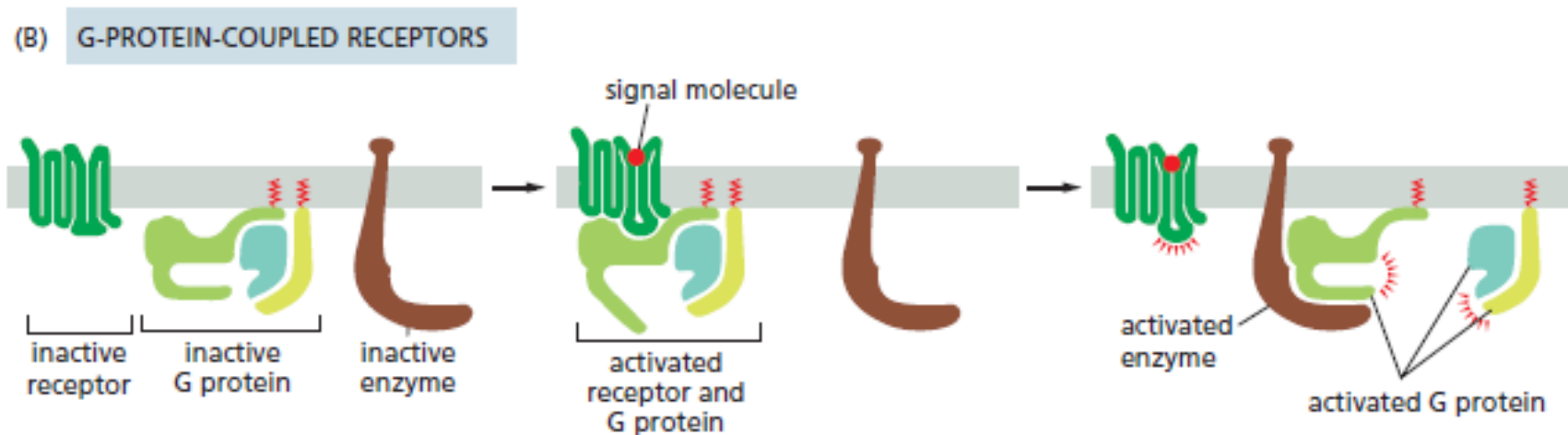
Receptory spřažené s iontovými kanály

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



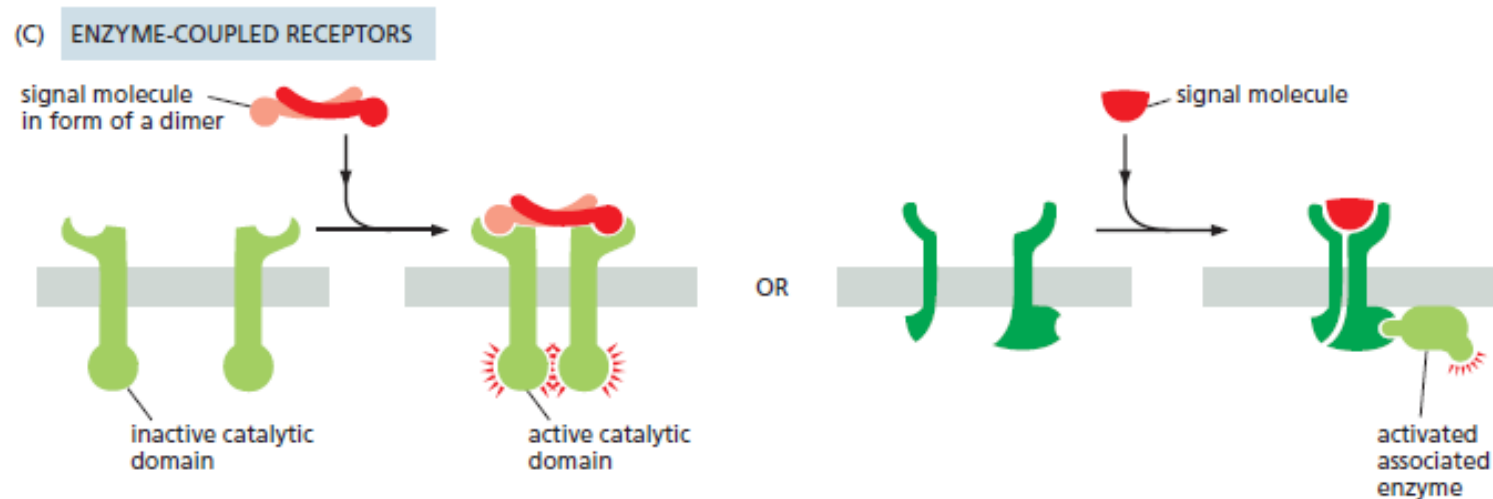
Receptory spřažené s G-proteinu

- 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

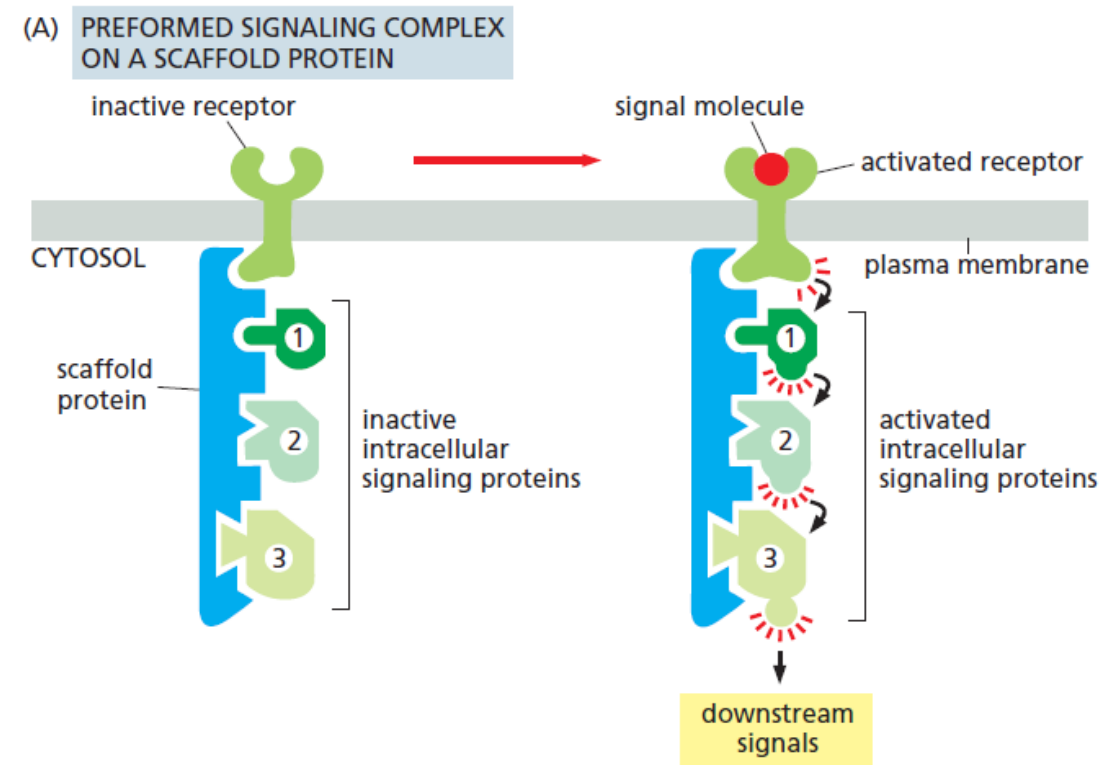


INTRACELULÁRNÍ SIGNALIZAČNÍ KOMPLEXY NAVAZUJÍCÍ NA MEMBRÁNOVÉ RECEPTORY

- Velké proteinové komplexy v blízkosti/na receptorech
- Proteiny jsou blízko sebe → zvýšení specifity 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
- Specifita signalizace

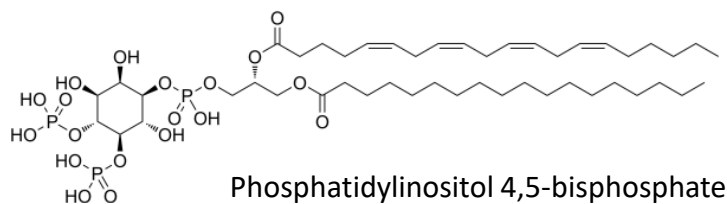


Sestavení signalizačního komplexu na receptoru

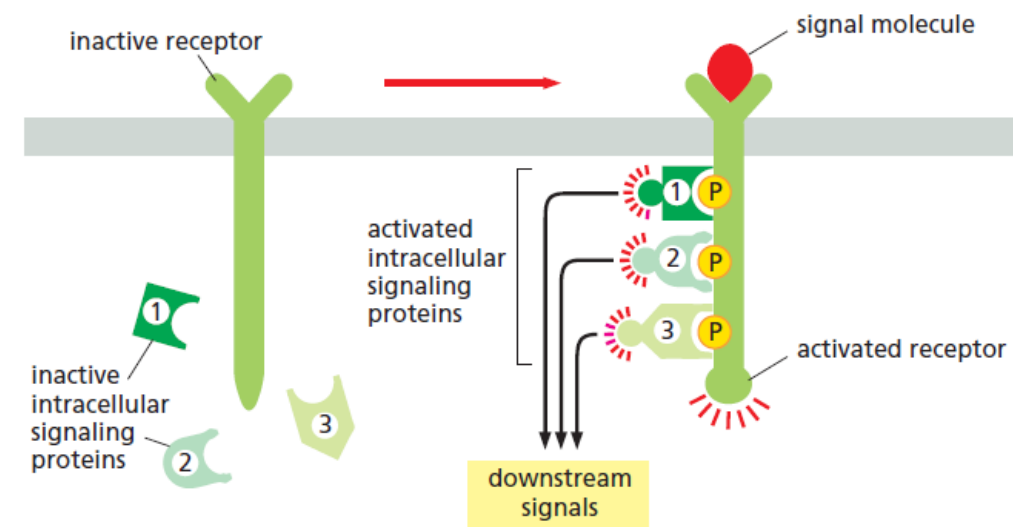
- Přechodné sestavení
- Závislé na extracelulárním signálu
- Tvorba přímo na receptoru
- Vazba proteinů na fosforylovaná rezidua receptoru
- Rozpad po odeznění signálu

Sestavení signalizačního komplexu na fosfoinositidových dokovacích místech

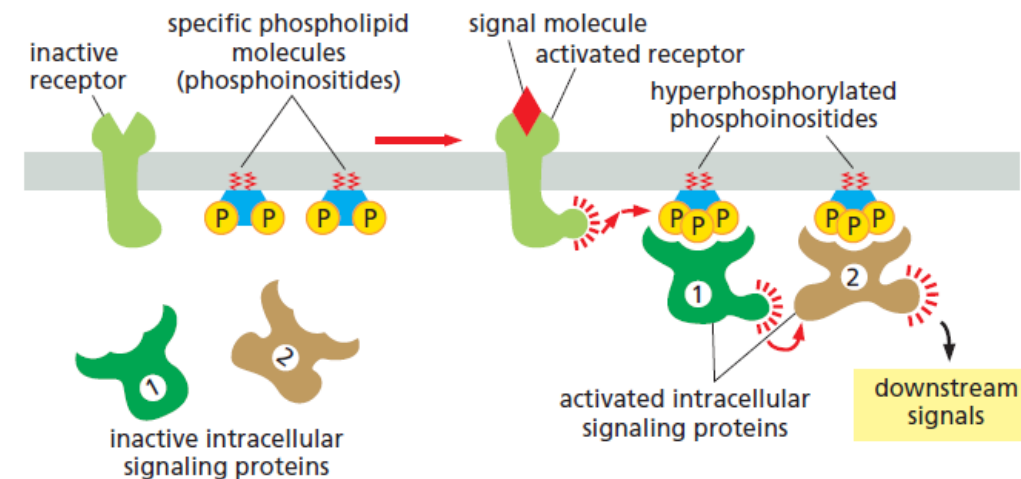
- Aktivace receptoru modifikuje membránové fosfolipidy
- Fosfoinositidy (fosfatidylinositol-mono/di/tri-fosfáty)
- Vazba a aktivace signálních molekul



(B) ASSEMBLY OF SIGNALING COMPLEX ON AN ACTIVATED RECEPTOR



(C) ASSEMBLY OF SIGNALING COMPLEX ON PHOSPHOINOSITIDE DOCKING SITES



INTERAKCE MEZI SIGNÁLNÍMI PROTEINY POMOCÍ MODULÁRNÍCH DOMÉN

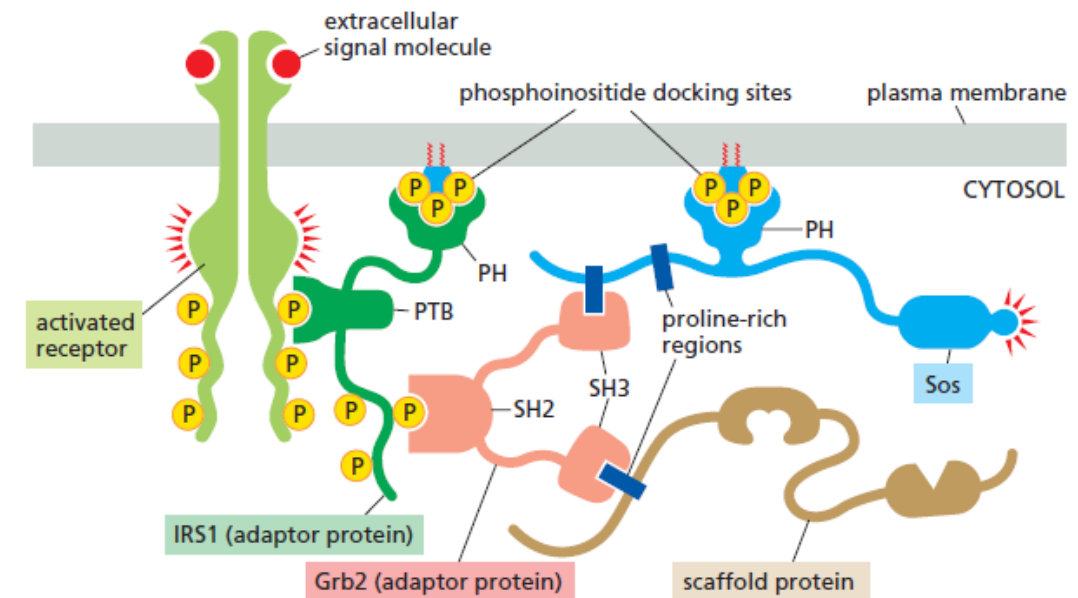
- Při tvorbě signalizačního komplexu – těsná interakce proteinů
- Sestavení komplexu závisí na malých, vysoce konzervovaných doménách = moduly
- Vazba modulu jednoho proteinu na odpovídající strukturální motiv druhého proteinu nebo lipidu
- Motiv: peptidová sekvence, kovalentní modifikace (fosforylace 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

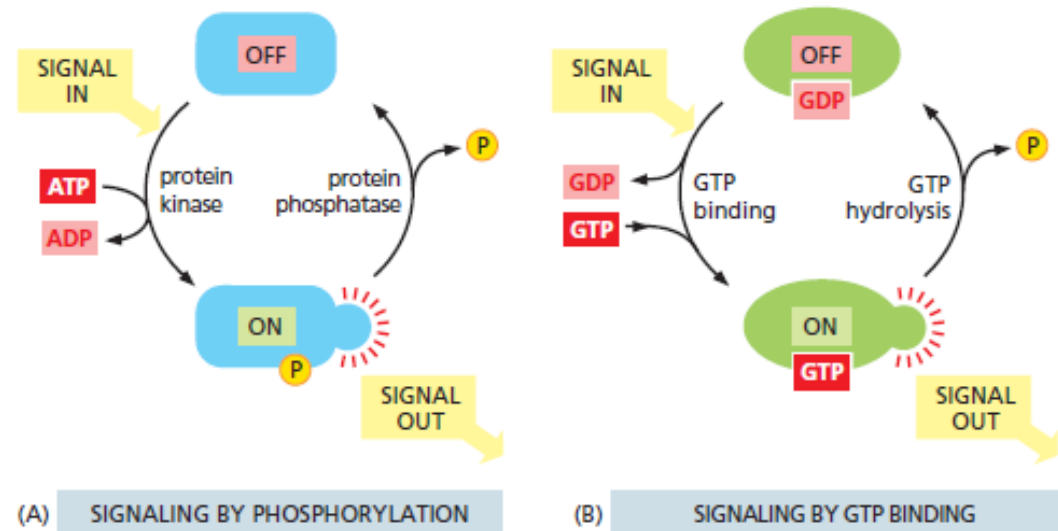
- Velké množství různých domén
- Vazba proteinů mezi sebou nebo na membránu
- Příklady domén:
 - Src homology 2 (SH2) a phosphotyrosine-binding (PTB)
 - Vazba na fosforylované tyroziny aktivovaných proteinů
 - Src homology 3 (SH3)
 - Vazba na aminokyselinové sekvence bohaté na prolin
 - Pleckstrin homology (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)

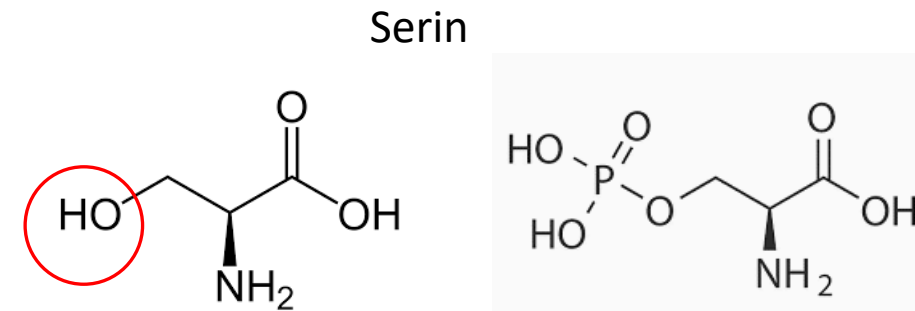
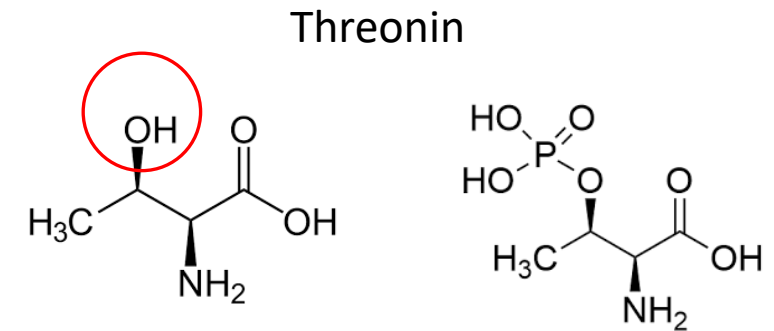
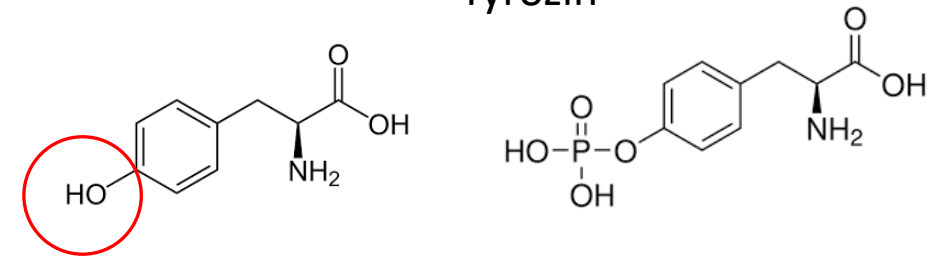
- Přenos intracelulárního signálu často skrze „přepínací“ proteiny
- Dvě pozice ON/OFF
- Signál převádí stav přenašeče z neaktivního do aktivního stavu
- proteinkinázy/fosfatázy - připojení nebo odpojení zbytku kyseliny fosforečné
- GTPázy - připojení nebo odpojení GTP/GDP



TRANSDUKCE SIGNÁLU – PROTEINKINÁZY/FOSFATÁZY

Proteinkinázy:

- Enzymy - fosforylují cílový protein
- Rozpoznání cílového rezia 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: \approx 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

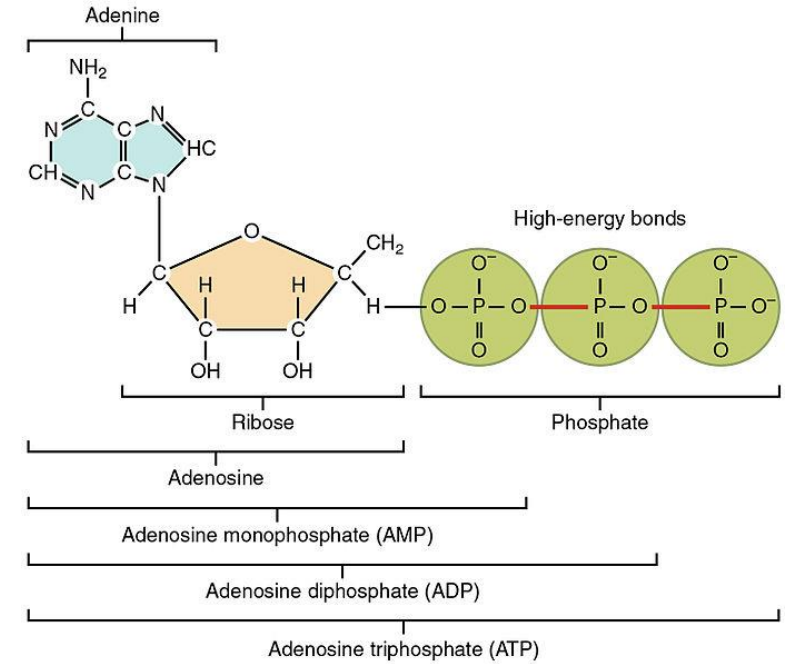
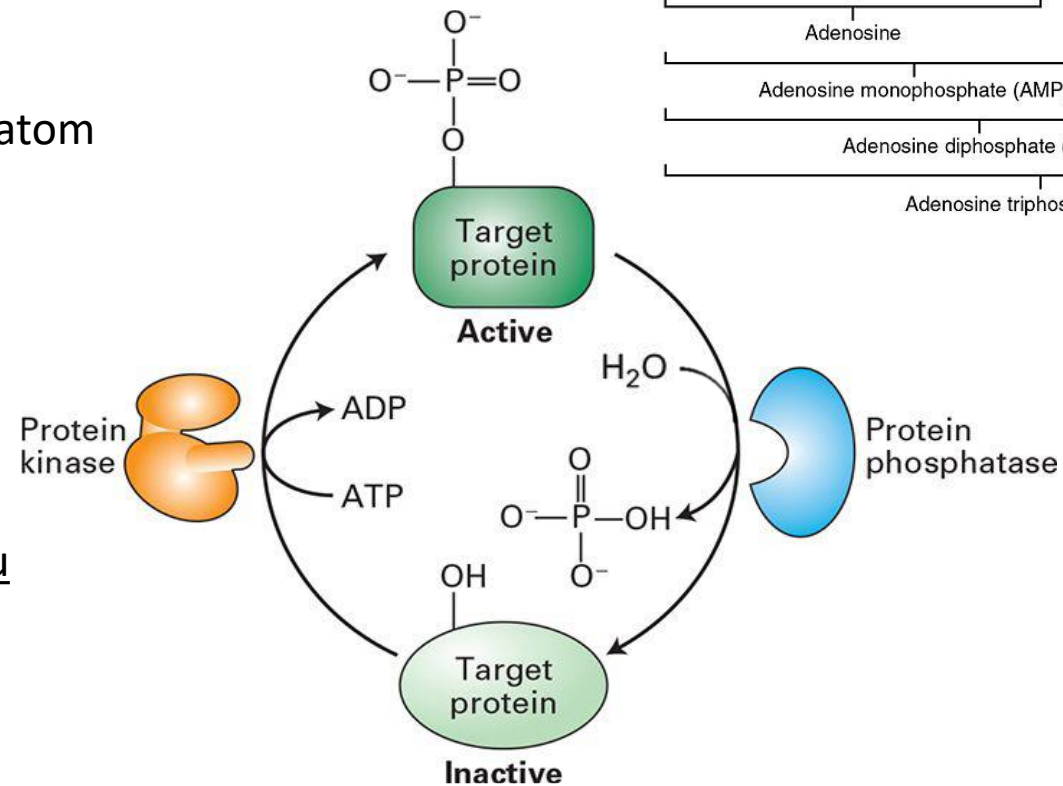
Fosfatázy:

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

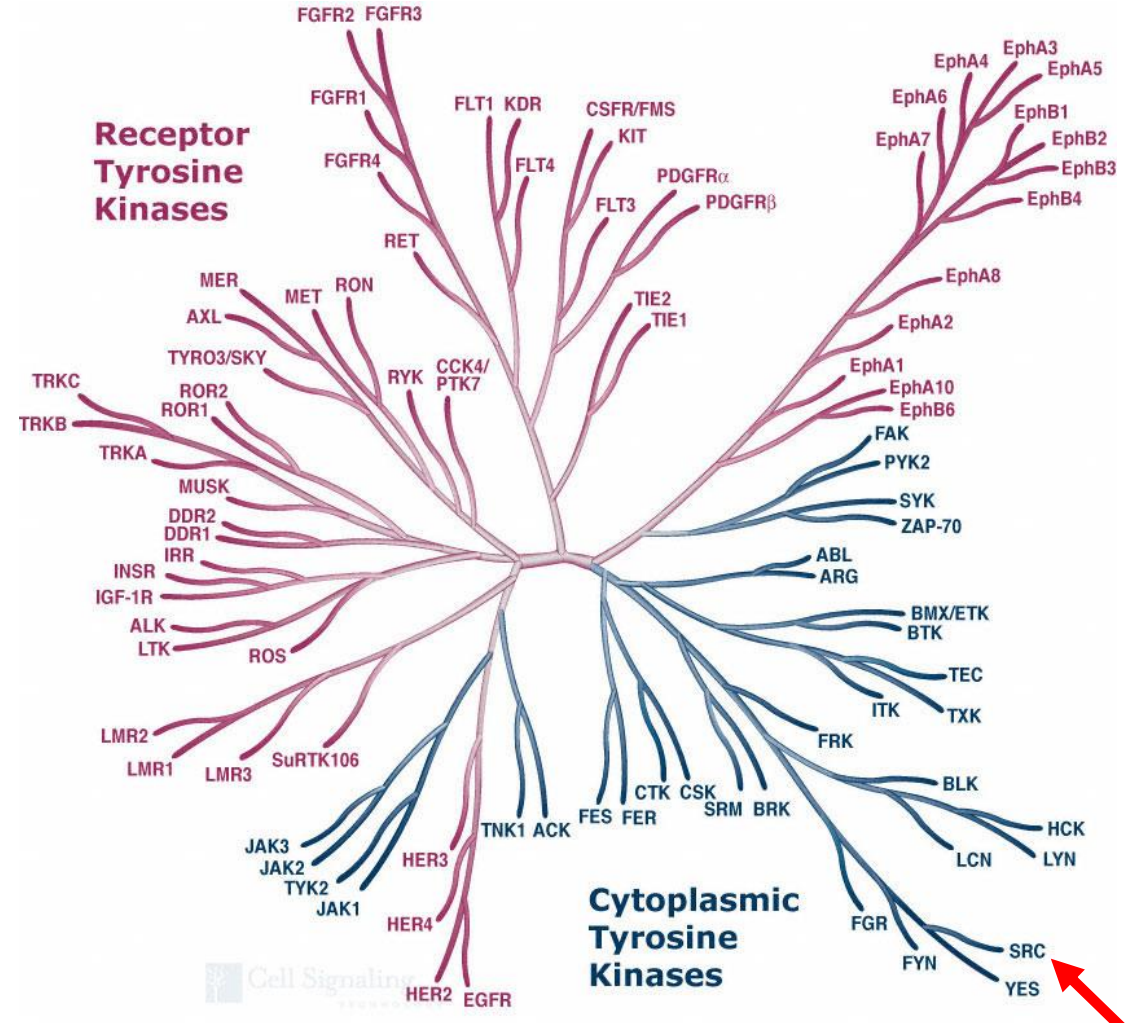
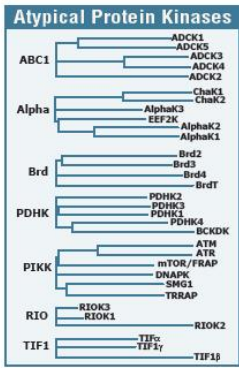
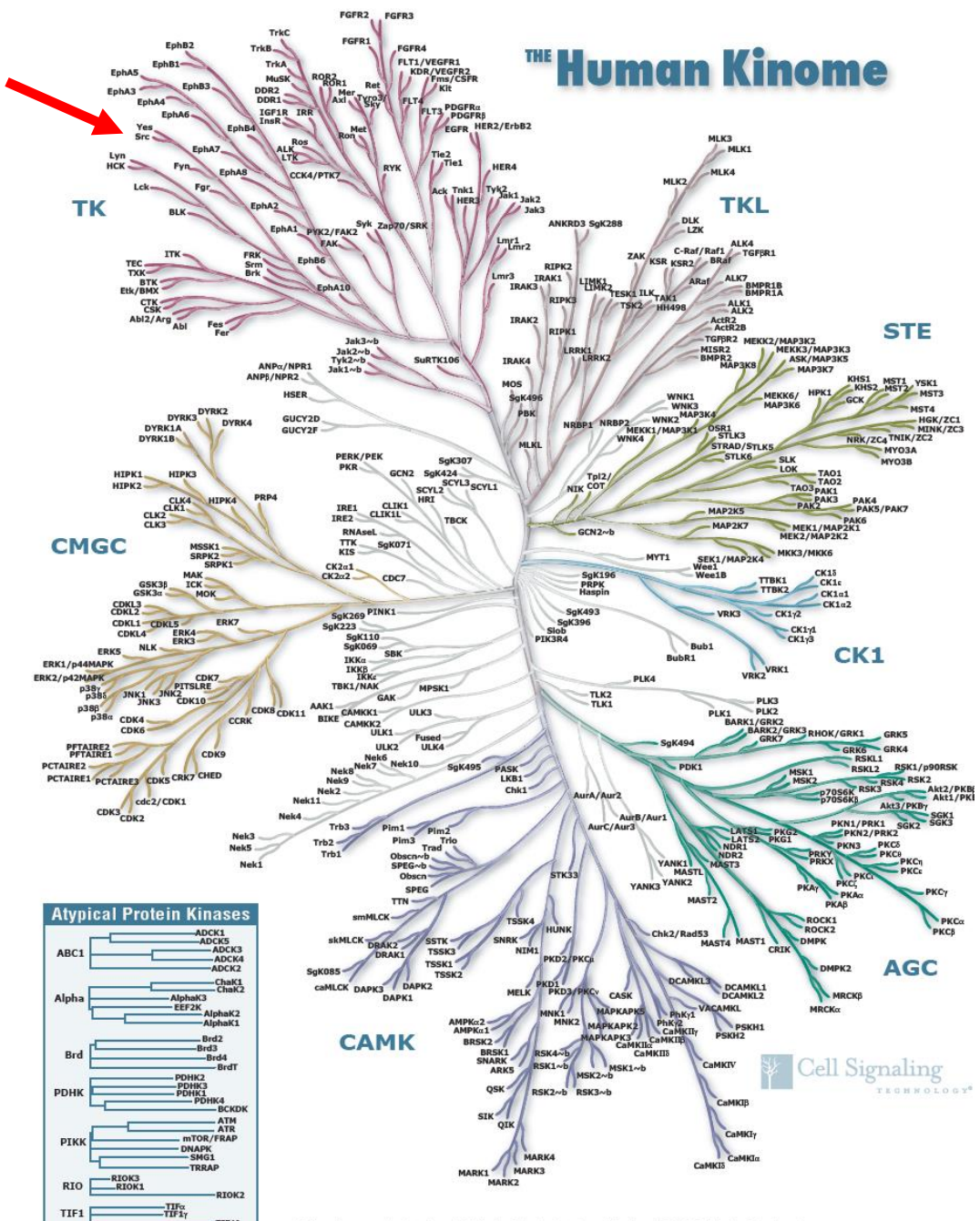
<http://phosphatome.net/3.0/>

Společně:

aktivace/deaktivace cílového proteinu



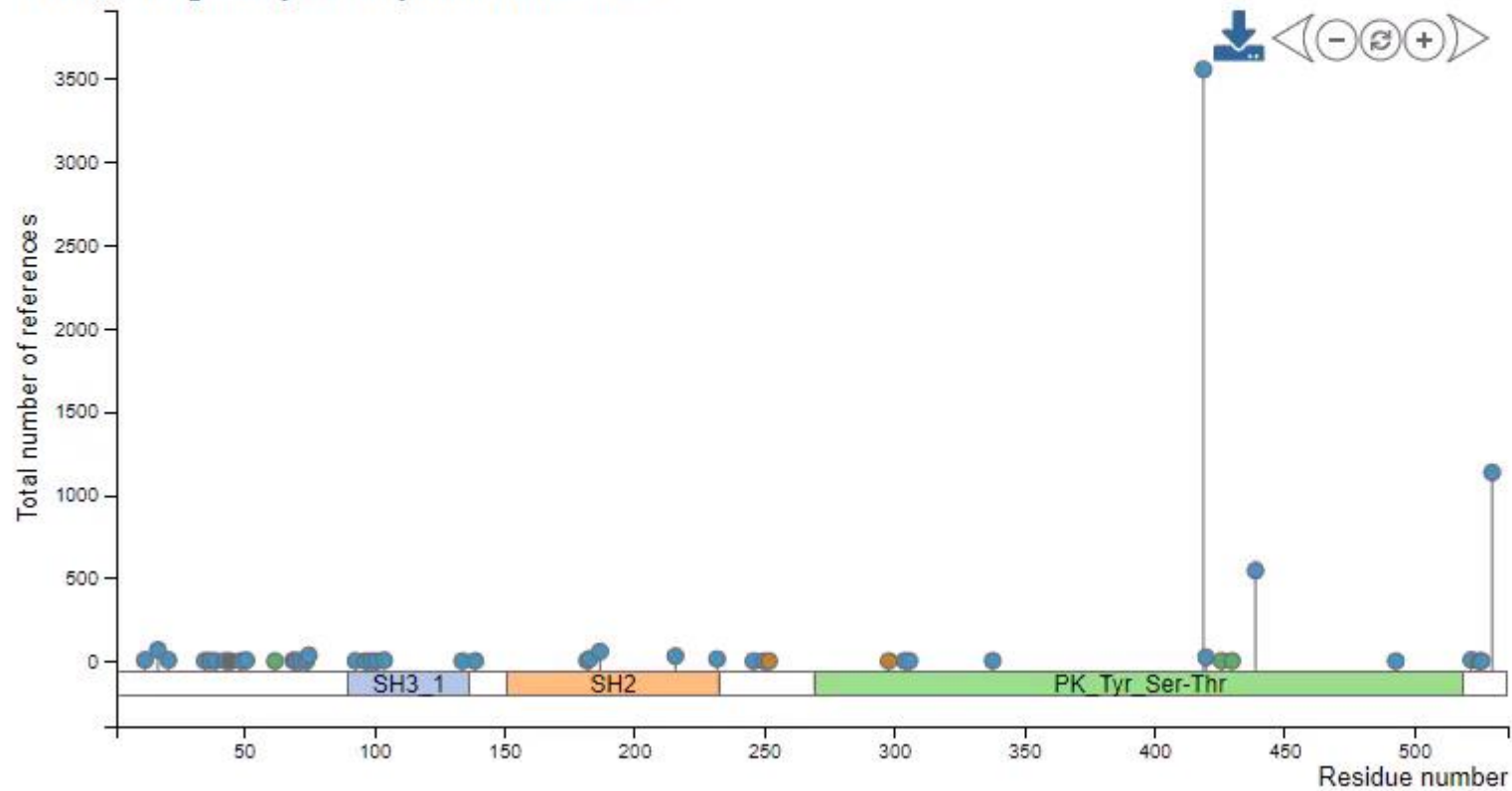
THE Human Kinome



Pathway diagram reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com). © 2007 Cell Signaling Technology, Inc.

[Home](#)[Search](#)[Browse](#)[Tools](#)[Downloads](#)[About](#)[Home](#) > [Protein](#) > [Src](#) human ▾New Protein Search: [Submit](#)

Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src



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

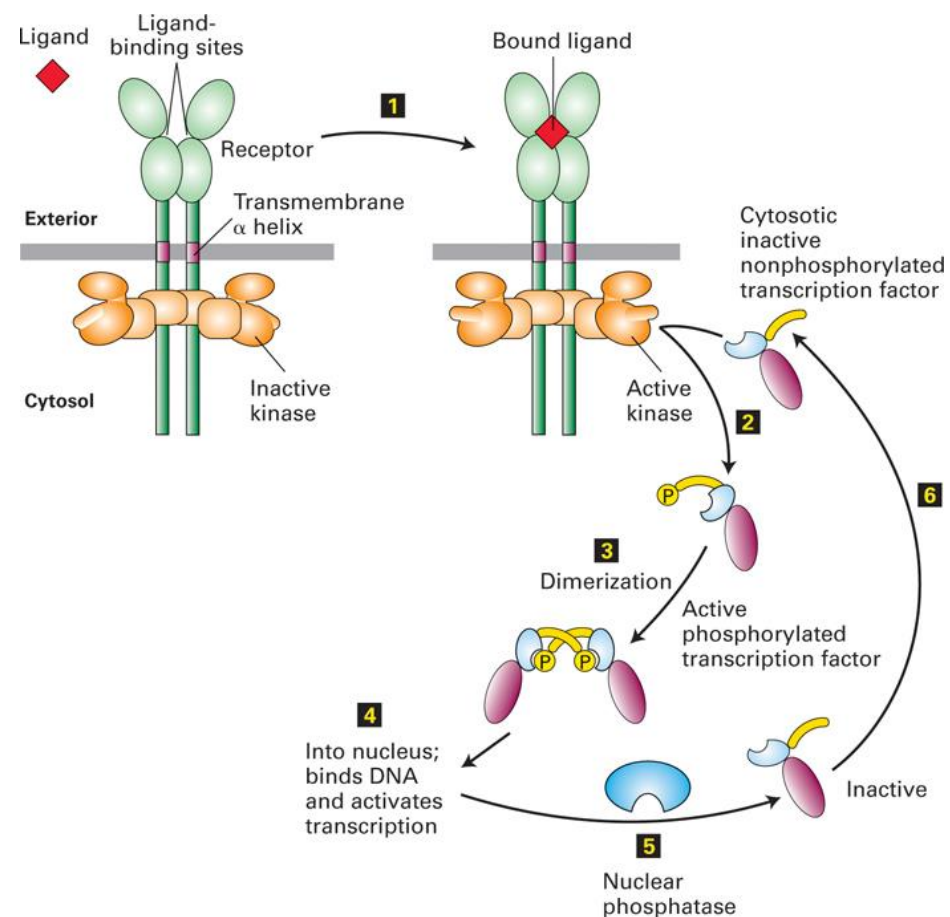
- Phosphorylation
- Acetylation
- Ubiquitylation
- Other

TRANSDUKCE SIGNÁLU ZPROSTŘEDKOVANÁ KINÁZAMI

Model:

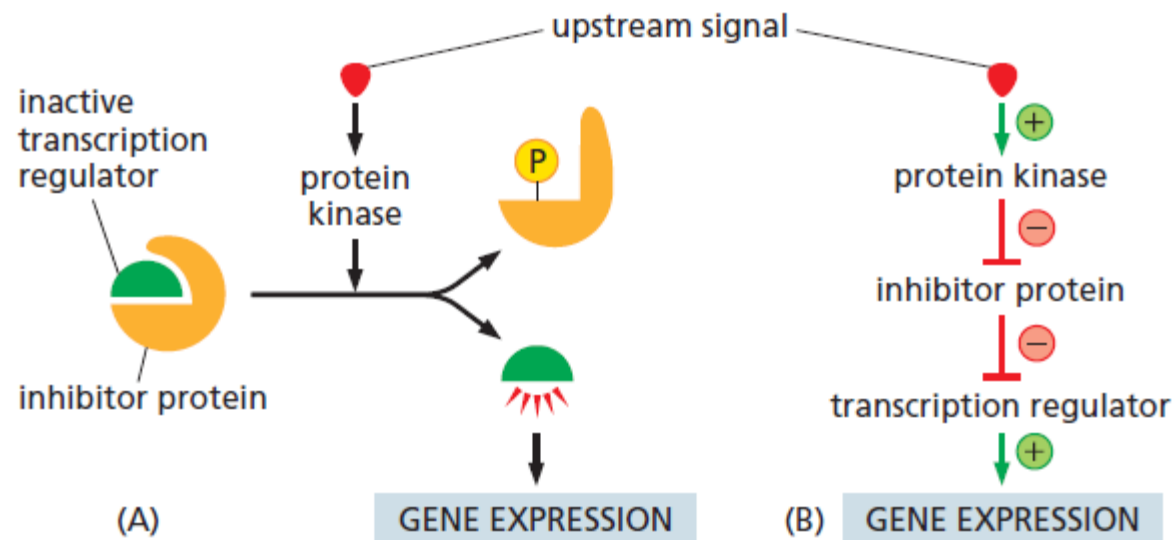
- Proteinkináza navázaná na receptor
- Cílový protein - transkripční faktor

- 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



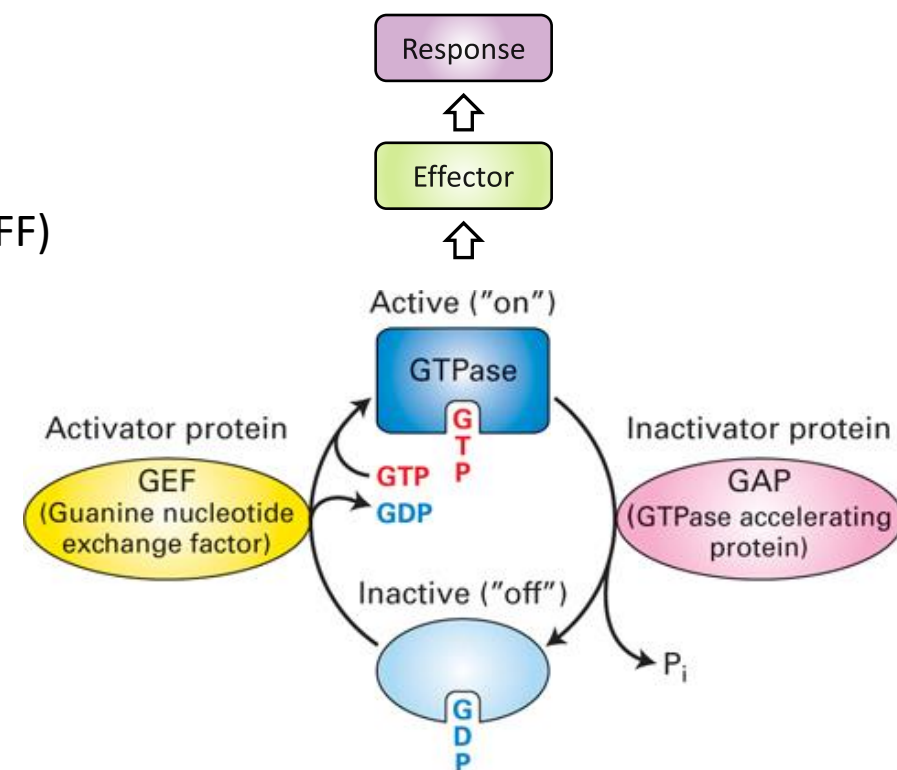
Např.: ligandem aktivovaná kináza může inhibovat protein (fosforylací), který inhibuje určitou buněčnou odpověď

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

Regulační proteiny

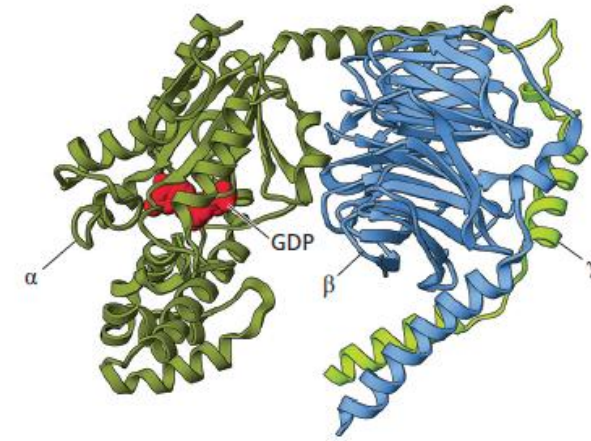
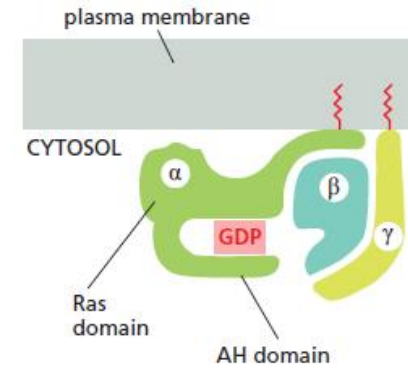
- GEF (guanine nucleotide-exchange factors) - podporují aktivitu
- GAP (GTPase-activating proteins) - podporují hydrolýzu GTP



GTPázy (GTP FOSFOHYDROLÁZY)

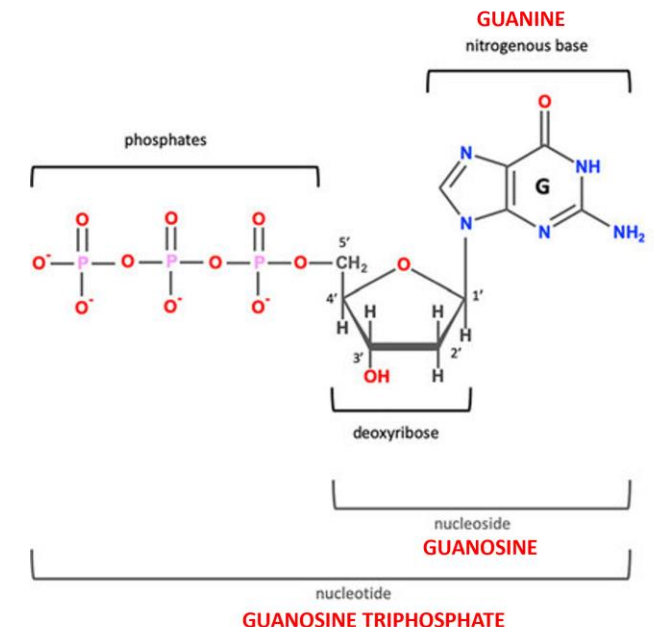
Heterotrimerické G proteiny

- 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



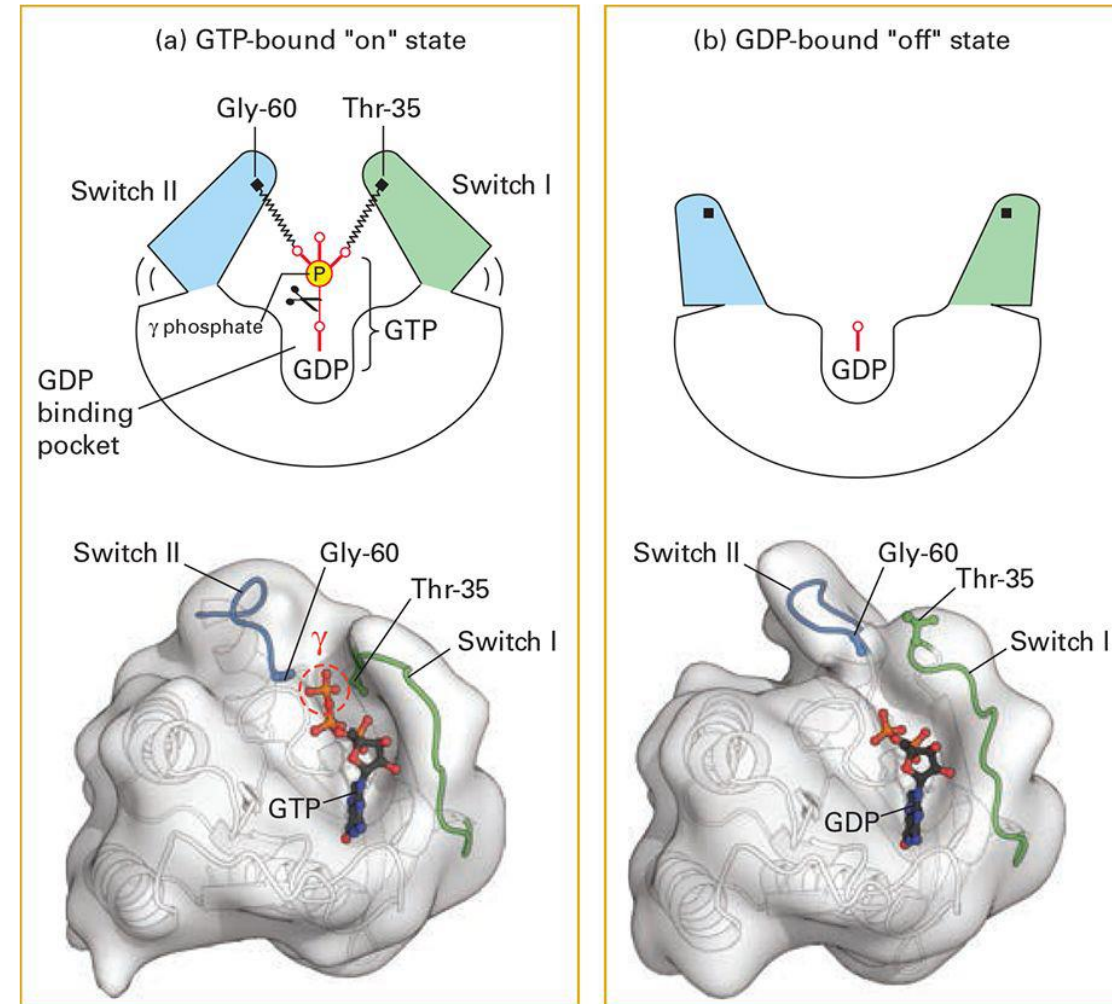
PŘEPÍNÁNÍ MONOMERNÍHO G PROTEINU (RAS)

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

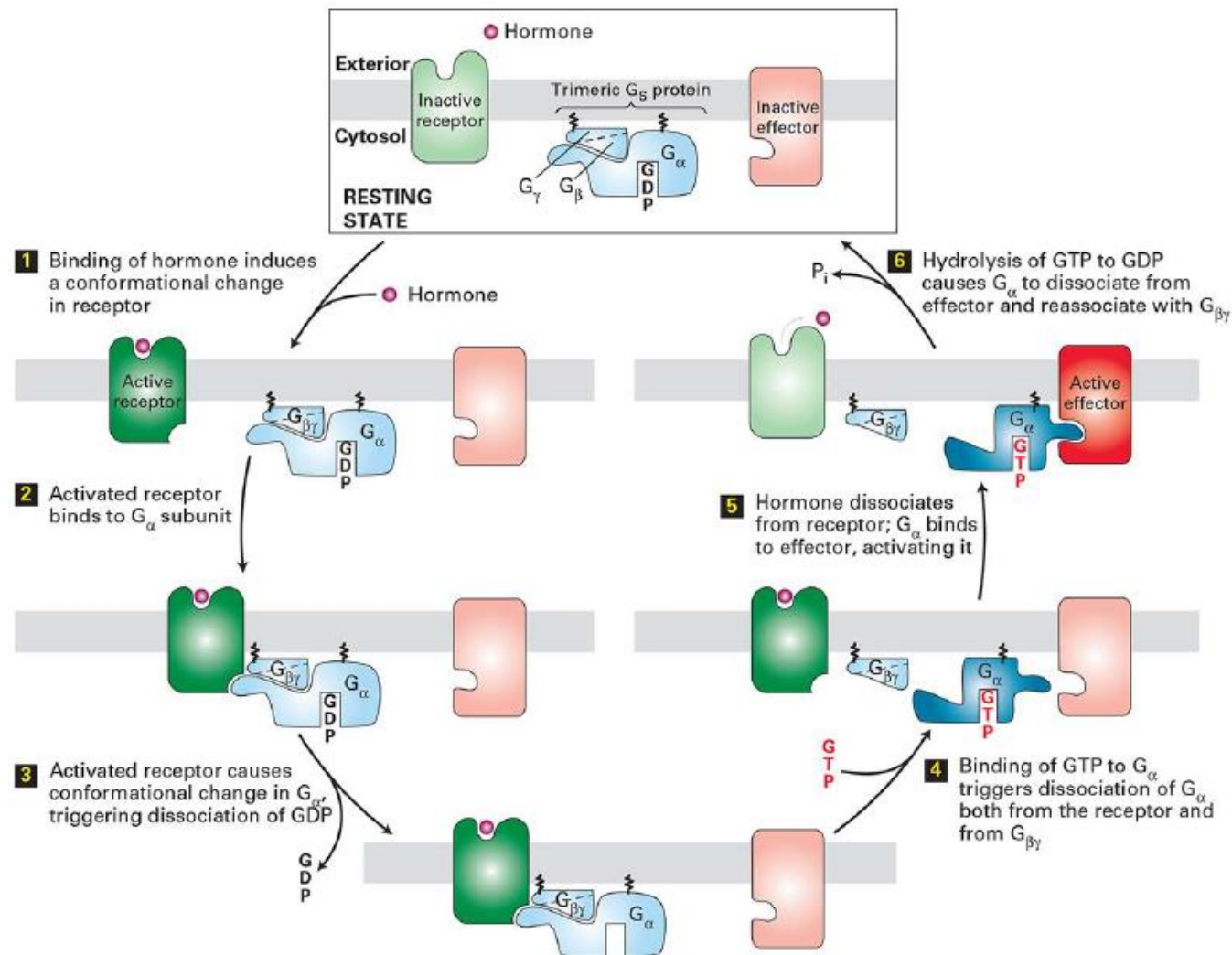
- Disociace G_{α} od dimeru $G_{\beta\gamma}$

- G_{α} aktivuje efektorový protein

- $G_{\beta\gamma}$ také může přenášet signál

- Hydrolyza GTP \rightarrow GDP uvolní G_{α} z efektoru

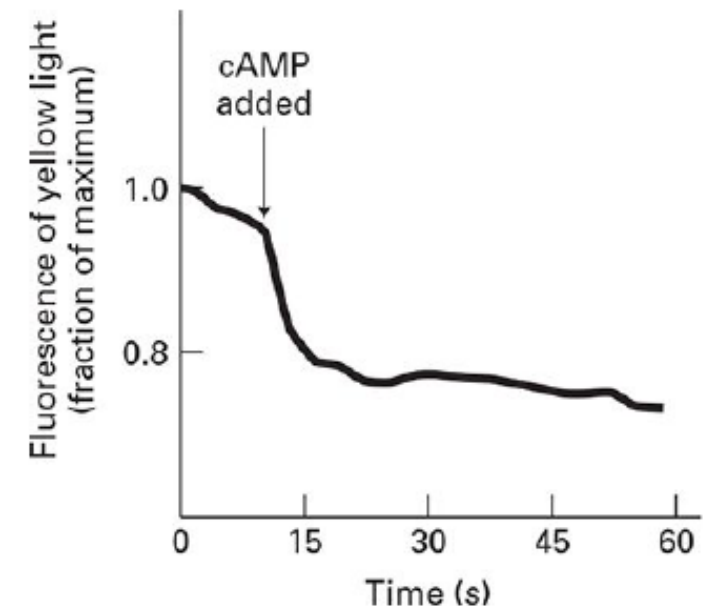
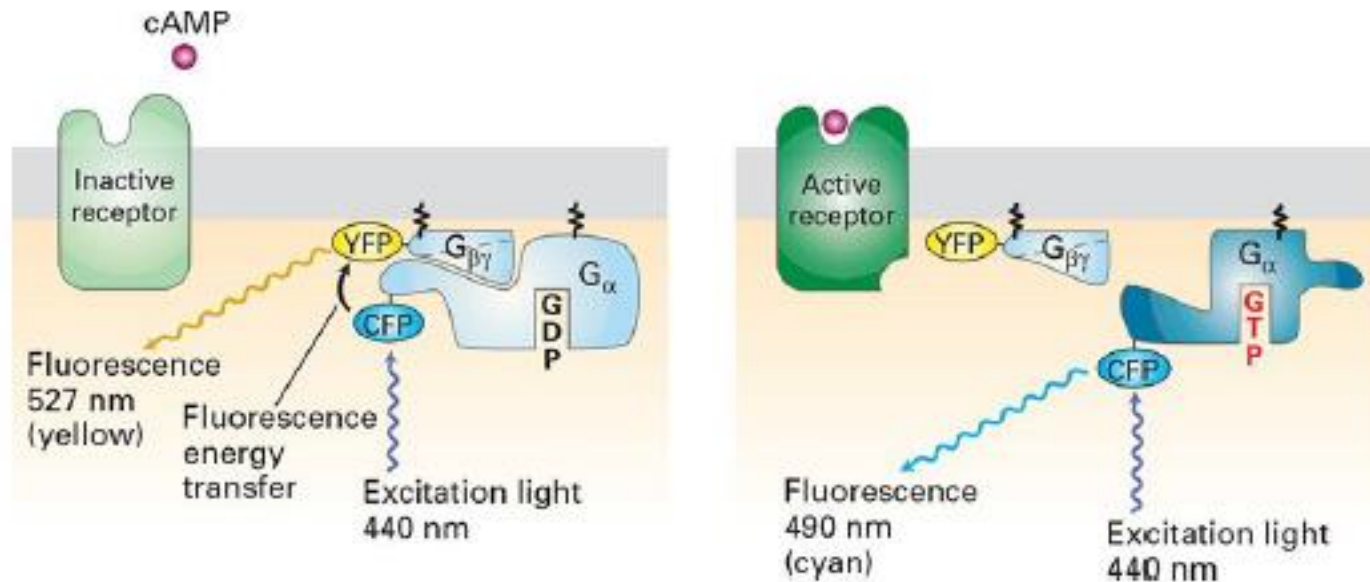
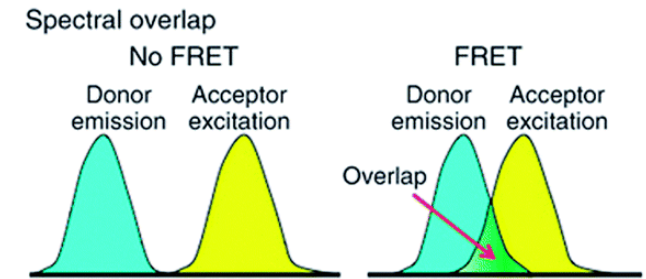
- Znovusestavení G proteinu



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



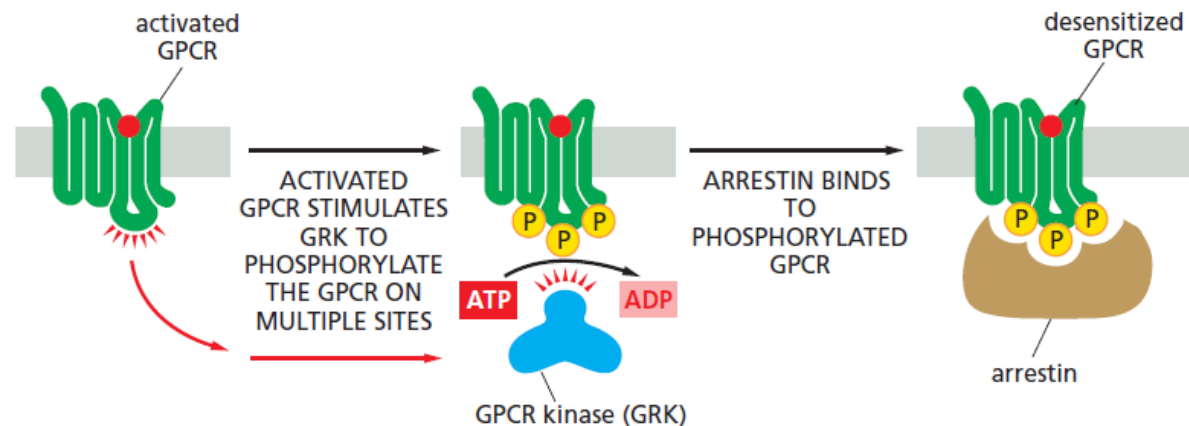
UKONČENÍ SIGNALIZACE

Desenzitizace G proteinu

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

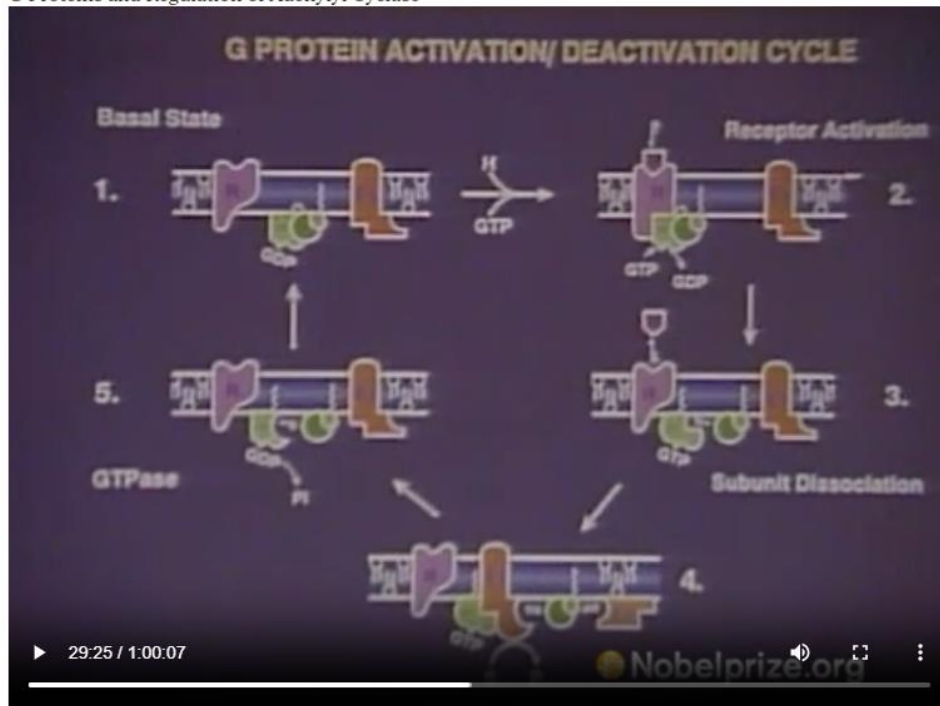
Desenzitizace receptoru

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

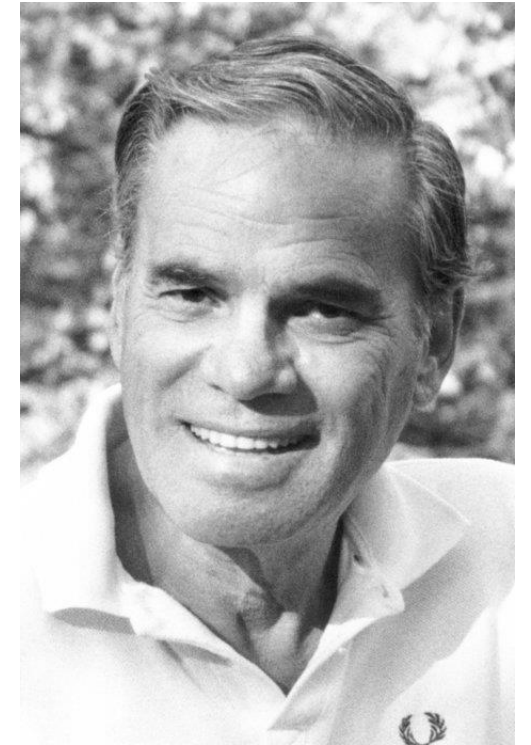


The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1994

G Proteins and Regulation of Adenylyl Cyclase



Alfred G. Gilman

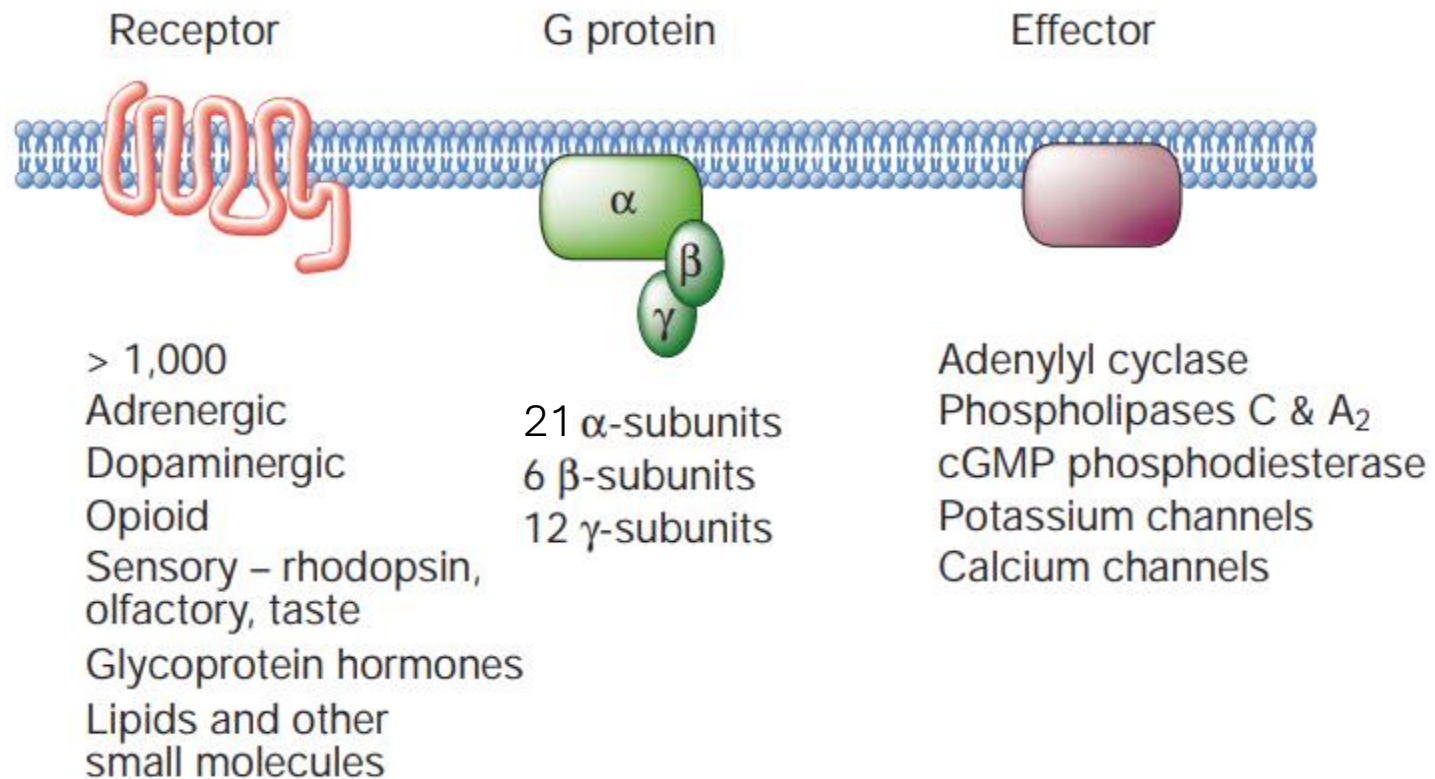


Martin Rodbell

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

EFEKTOROVÉ PROTEINY G PROTEINŮ

- iontové kanály
- membránové enzymy zodpovědné za tvorbu sekundárních přenašečů



NAPOJENÍ G PROTEINŮ NA MEMBRÁNOVÉ ENZYMY

- Transdukce signálu do cytosolu – tvorba druhých posílů
- Typ G_{α} určuje typ efektoru
- Enzymy:
 - Adenylátcykláza – cyklický adenosinmonofosfát ($\uparrow\downarrow$ cAMP)
 - Fosfolipáza C – inositoltrifosfát (\uparrow IP₃), diacylglycerol (\uparrow DAG)
 - cGMP fosfodiesteráza – cyklický guanosinmonofosfát (\downarrow cGMP)

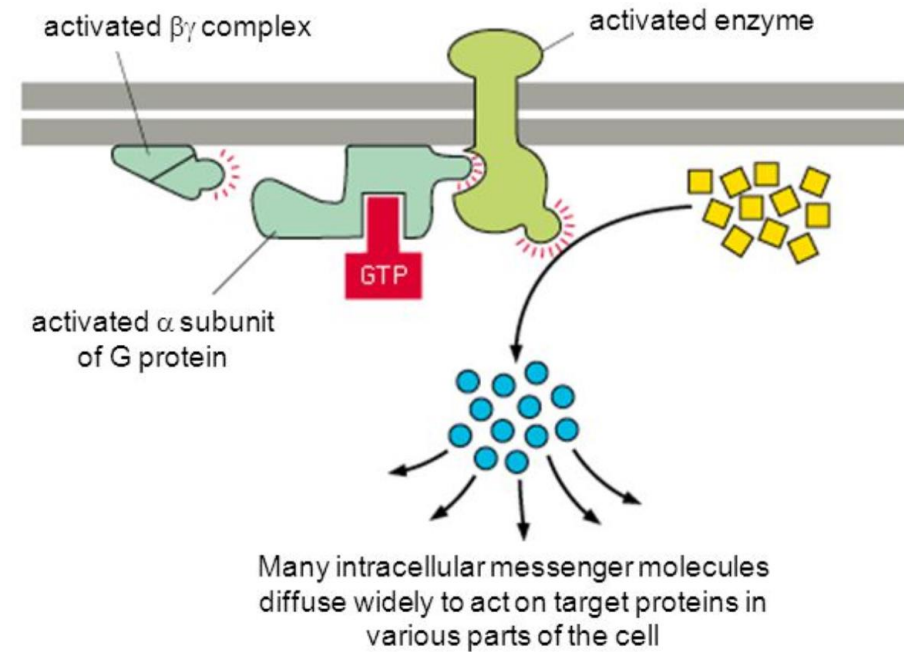


TABLE 15-1 Major Classes of Mammalian Trimeric G Proteins and Their Effectors*

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	AMP (increased)	β-Adrenergic (epinephrine) receptor; receptors for glucagon, serotonin, vasopressin
	G _{olf}	α	Activates adenylyl cyclase in olfactory sensory neurons	cAMP (increased)	Odorant receptors in nose
II	G _i	α	Inhibits adenylyl cyclase	cAMP (decreased) Change in membrane potential	α ₂ -Adrenergic receptor Muscarinic acetylcholine receptor
		βγ	Activates K ⁺ channels		
	G _o	βγ	Activates K ⁺ channels; inactivates Ca ²⁺ channels	IP ₃ , DAG (increased)	Acetylcholine receptor in endothelial cells
		α and βγ	Activates phospholipase C-β		
G _t (transducin)	α	Activates cyclic GMP phosphodiesterase in vertebrate rod photoreceptors	cGMP (decreased)	Rhodopsin (light receptor) in rod cells	
III	G _q	α	Activates phospholipase C-β	IP ₃ , DAG (increased)	α ₁ -Adrenergic receptor
IV	G _{12/13}	α	Activates Rho family monomeric GTPases (via Rho GEF) to regulate the actin cytoskeleton		

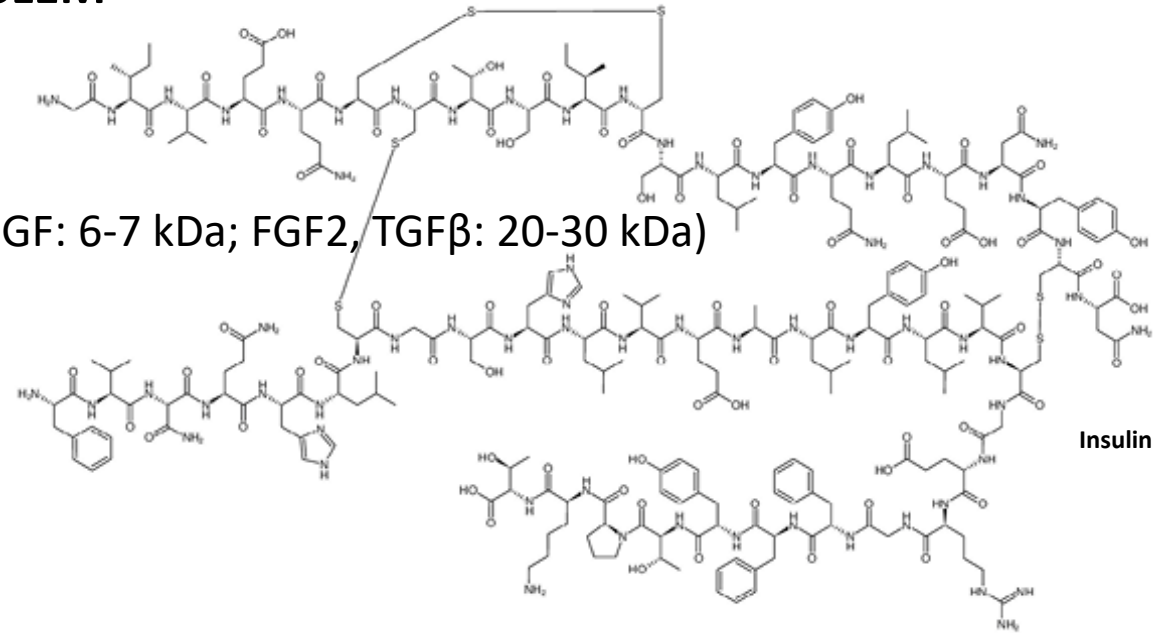
*Families are determined by amino acid sequence relatedness of the α subunits. Only selected examples are included. About 20 α subunits and at least 6 β subunits and 11 γ subunits have been described in humans.

TRANSDUKCE SIGNÁLU PRVNÍM A DRUHÝM POSLEM

První posel (1st messenger)



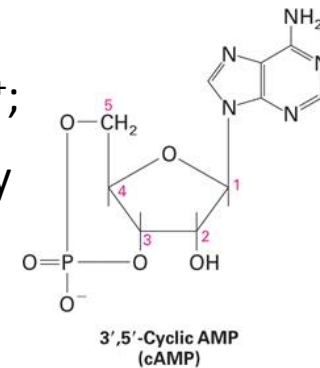
- Extracelulární ligand – relativně velký protein (INS, EGF: 6-7 kDa; FGF2, TGFβ: 20-30 kDa)
- Velký počet různých ligandů
- Vazba na membránový receptor



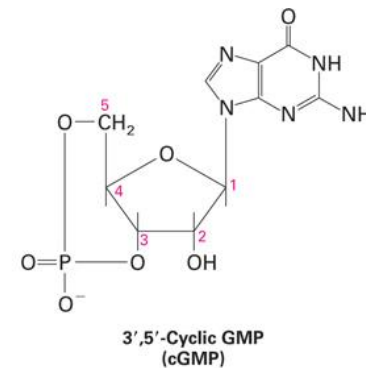
Druhý posel (2nd messenger)



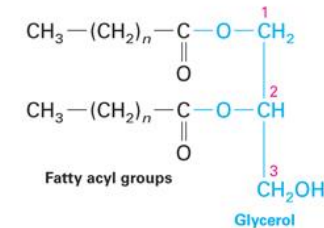
- Malé molekuly (Ca: 40 Da; fosfoinositidy: ≈1 kDa)
- Omezený počet (6 u živočichů)
- cAMP; cGMP; 1,2-diacylglycerol (DAG); Ca²⁺;
- inositol 1,4,5-trisfosfát (IP₃); fosfoinositidy
- Rychlá difuze cytoplasmou k cílům
- Usnadňuje amplifikaci signálu



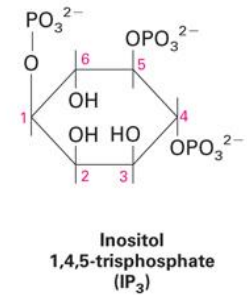
Activates protein kinase A (PKA)



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



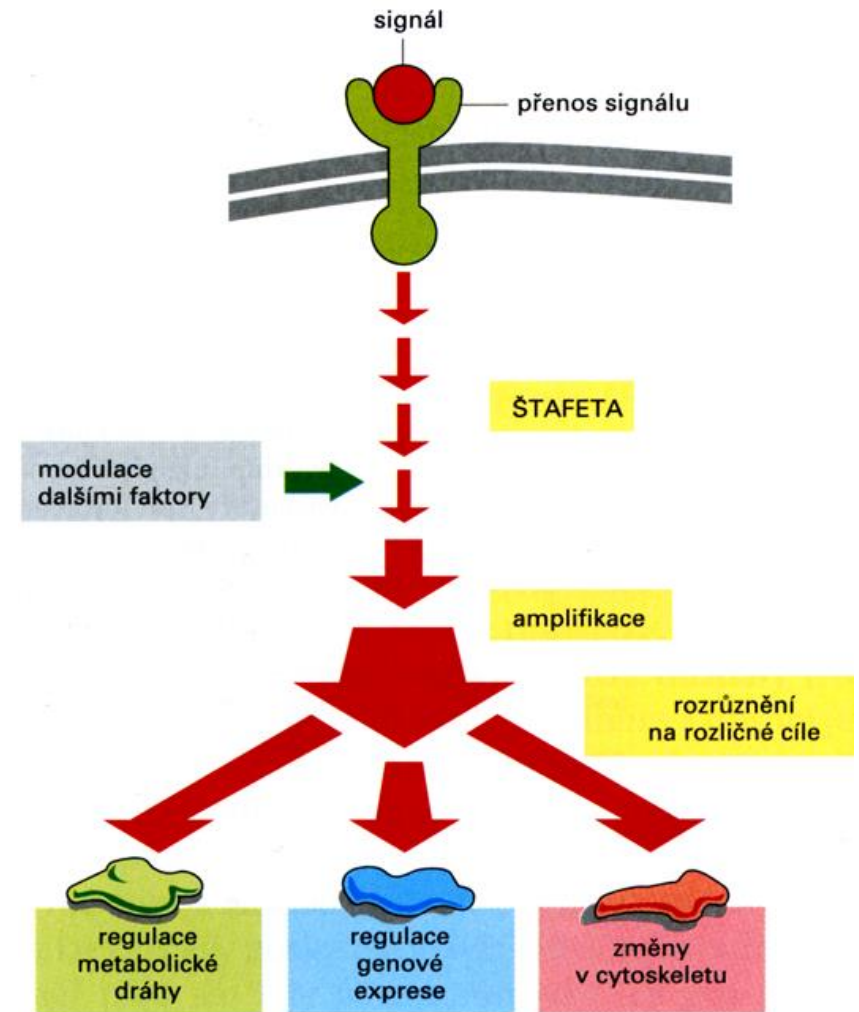
Activates protein kinase C (PKC)



Opens Ca²⁺ channels in the endoplasmic reticulum

TRANSDUKCE A AMPLIFIKACE SIGNÁLU

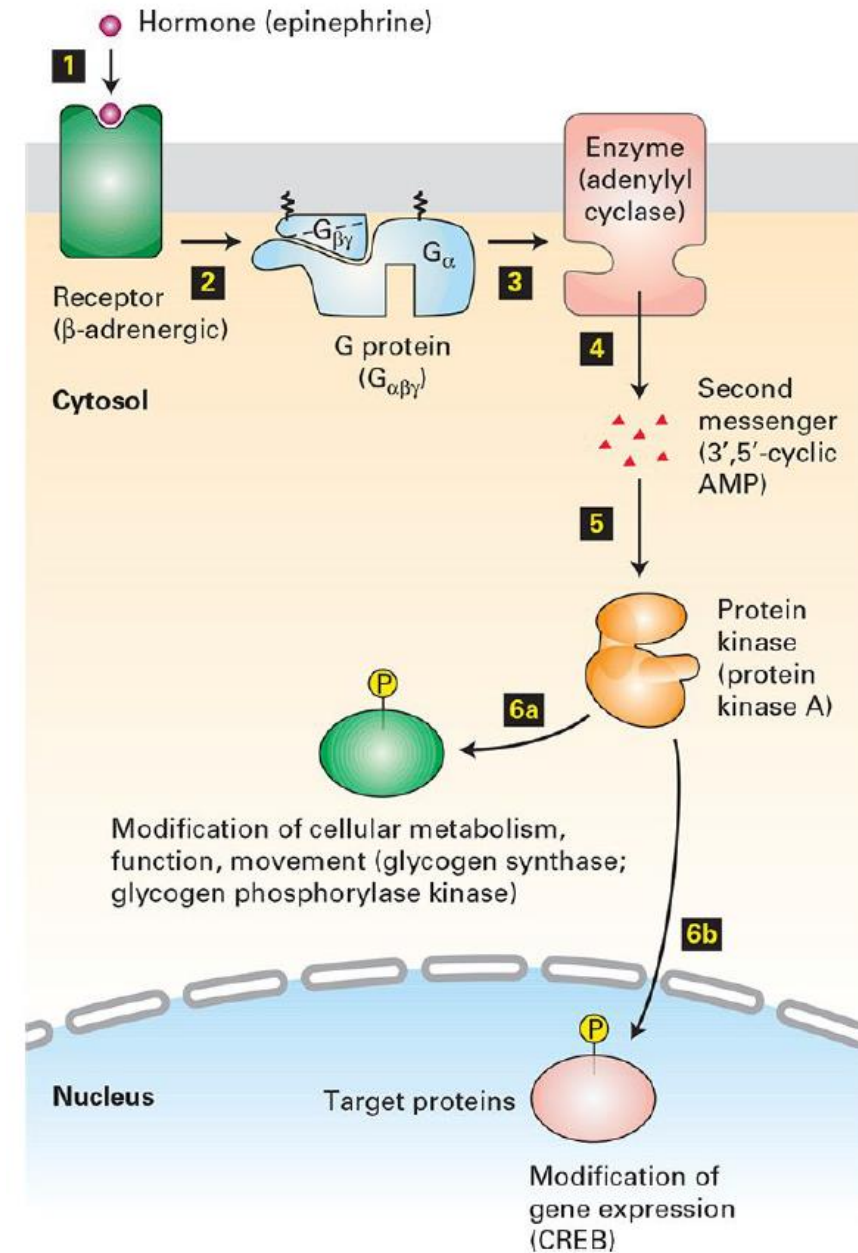
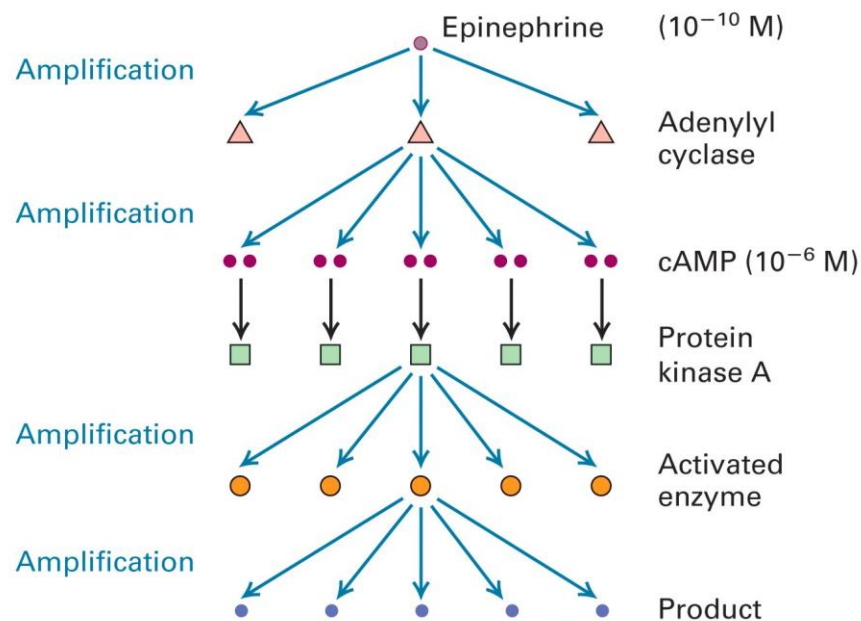
- Signální dráha – kombinace signálních proteinů
- Každý stupeň transdukce může amplifikovat signál
- Vznik amplifikační kaskády
- Aktivace/inhibice velkého množství cílového proteinu



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



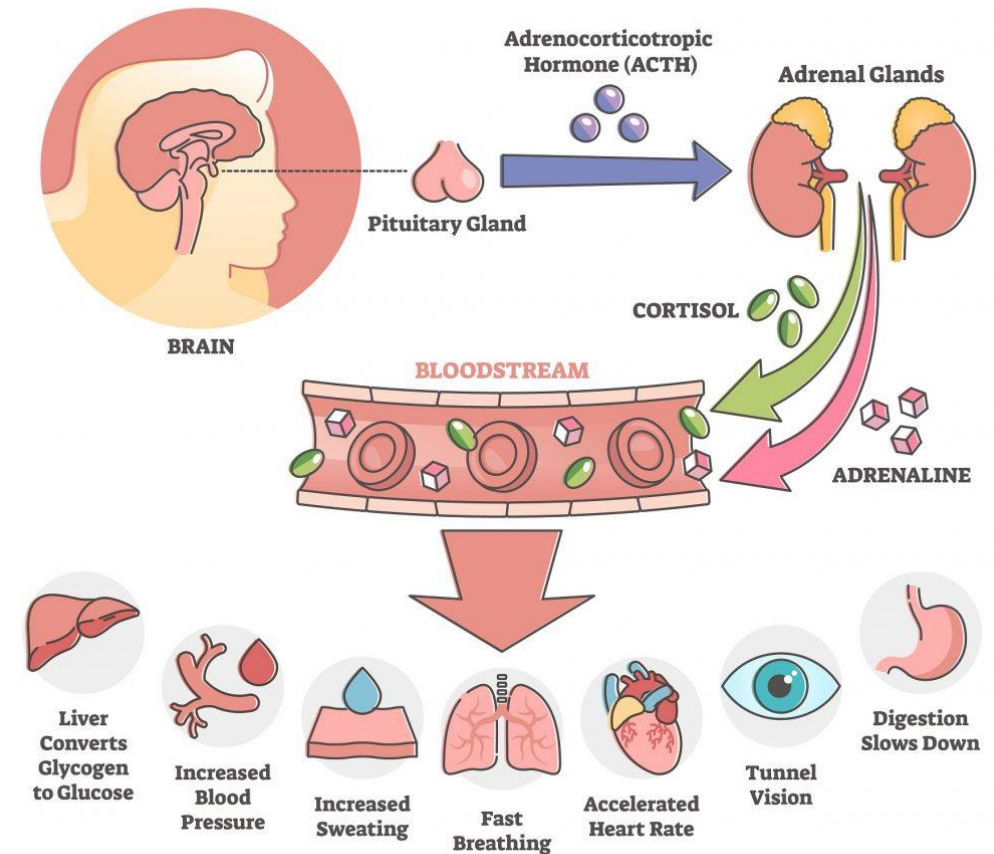
RECEPTOR A G-PROTEIN URČUJE BUNĚČNOU ODPOVĚĚ

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

- Adrenalin se váže na různé receptory různých buněk
- Aktivace β_1 -adrenergního receptoru buněk srdeční svaloviny -> G_{α_s} -> tvorba cAMP -> zvýšení kontrakce a krevního zásobení
- Aktivace α_1 -adrenergního receptoru buněk hladké svaloviny v trávící soustavě, kůži a ledvinách -> G_{α_q} -> tvorba druhých posílů DAG a IP3 -> zúžení cév, snížení průtoku krve, rozpad glykogenu
- Aktivace α_2 -adrenergního receptoru u jiných skupin somatických buněk -> G_{α_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

STRESS RESPONSE



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

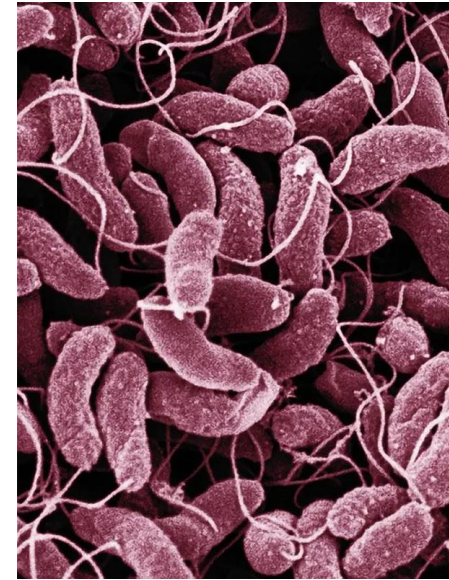
TABLE 15-1 Human G Protein–Coupled Receptors of Pharmaceutical Importance

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

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 $G_{\alpha i}$



