

Molekulární biologie pro informatiky - 8

Molekulární mechanismy signalizace

Signální molekuly

Signál

- faktor, kterým se zprostředkovává a předává nějaká informace
- extracelulární - zdroj mimo buňku, ligand reagující s buňkou pomocí receptoru
- intracelulární - zdroj uvnitř buňky

Extracelulární signály

- proteiny, peptidy, aminokyseliny, nukleotidy, lipidy, steroidy, mastné kyseliny, plyny
- hormony - odvozené od aminokyselin (adrenalin, thyroxin)
 - peptidy a proteiny (inzulín, glukagon, oxytocin)
 - steroidní (testosteron, estrogen, kortizol)
 - vitamín D, kyselina retinová
- cytokiny - interleukiny, interferony
 - nádorové nekrotické faktory (TNF- α , TNF- β , TNF- γ)
 - růstové faktory (EGF, PDGF, IGF-1, GM-CSF, GHF, NGF)
- nervové mediátory (acetylcholin, GABA)
- lokální mediátory (histamin, oxid dusnatý)

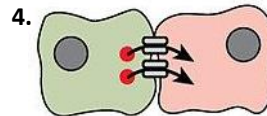
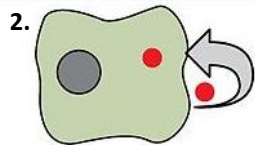
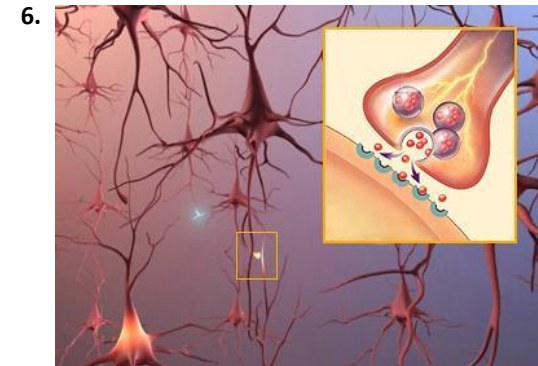
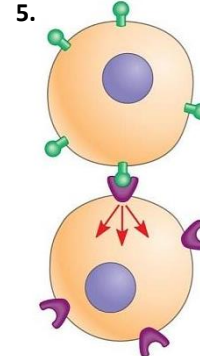
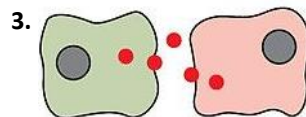
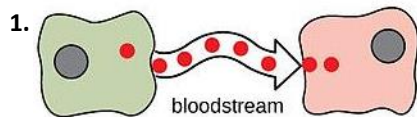
Signály **hydrofilní** povahy: vazba na membránové receptory, krátkodobá odpověď

Signály **lipofilní** povahy: vazba na intracelulární receptory, dlouhodobá odpověď

Extracelulární signalizace

Přenos signálu ze zdrojové buňky na receptor buňky cílové

1. **endokrinní** - zdrojová a cílová buňka vzdáleny, přenos signálu krví (př. hormony)
2. **autokrinní** - stejná buňka je zdrojová i cílová
3. **parakrinní** - produkce signálu do tělních tekutin, lokální účinek (př. histamin, NO)
4. **dutý spoj** - mezi oběma buňkami v těsném kontaktu vytvořena tubulární struktura (př. Ca^{2+} , cAMP)
5. **přímý kontakt** - ligand i receptor na povrchu buněk v přímého kontaktu (př. FasL)
6. **synapse** - nervová soustava, vliv na permeabilitu membrán (př. acetylcholin)



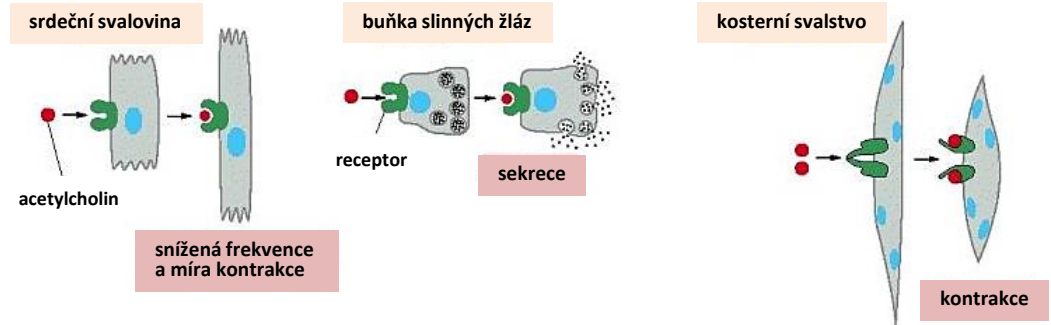
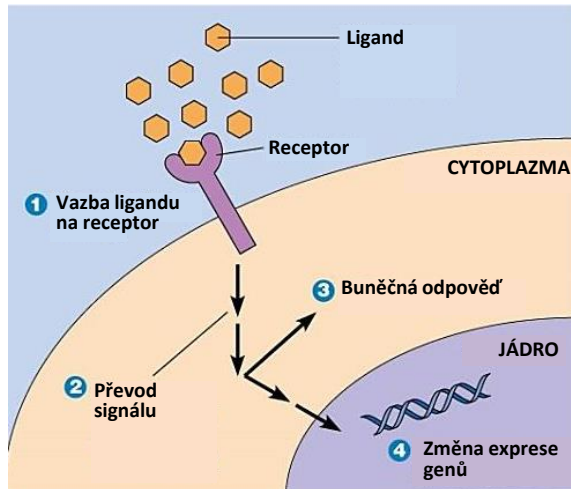
Signalizace

Intracelulární signalizace

- přenos signálu uvnitř buňky
- vazba signálu na receptor → enzymatická aktivita v buňce → převod signálu na cílovou molekulu

Odpověď buňky

- genová exprese, aktivita metabolických enzymů, konfigurace cytoskeletu, permeabilita membrány, syntéza DNA, indukce apoptózy
- přítomnost receptorů a výbava buňky rozhoduje o tom, na který signál bude buňka reagovat
- stejný signál může mít různé účinky u různých buněk (např. acetylcholin)
- rychlost reakce - změna funkce proteinů (s - min), změna v expresi genů (min - hod)



Signální dráhy

První přenašeč signálu: prvotní signál zachycený buňkou

Druhé přenašeče signálu: malé molekuly produkované uvnitř buňky po vazbě ligandu na receptor

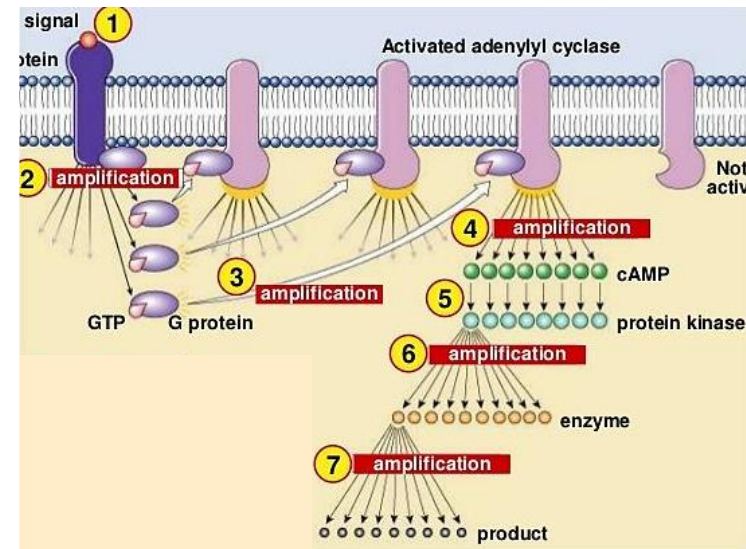
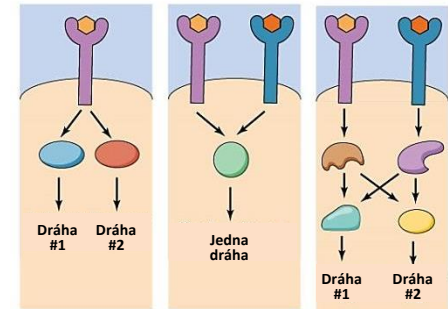
Intracelulární signalizace zahrnuje

- přenos signálu a jeho převod do srozumitelné podoby
- zesílení původního signálu, případné rozdělení signálu
- propojení signálních drah

Po přijetí signálu se rovnováha signálních molekul velmi rychle obnovuje. Odpověď buňky zastavena po rozložení nebo inaktivaci signální molekuly.

Ztráta senzitivity buněk

- dlouhodobé vystavení buněk působení ligandu
- změny na úrovni receptoru
 - (i) odstranění receptoru z povrchu buňky
 - (ii) změny receptoru, které snižují jeho afinitu k ligandu či schopnost převodu signálu do nitra buňky



Intracelulární receptory

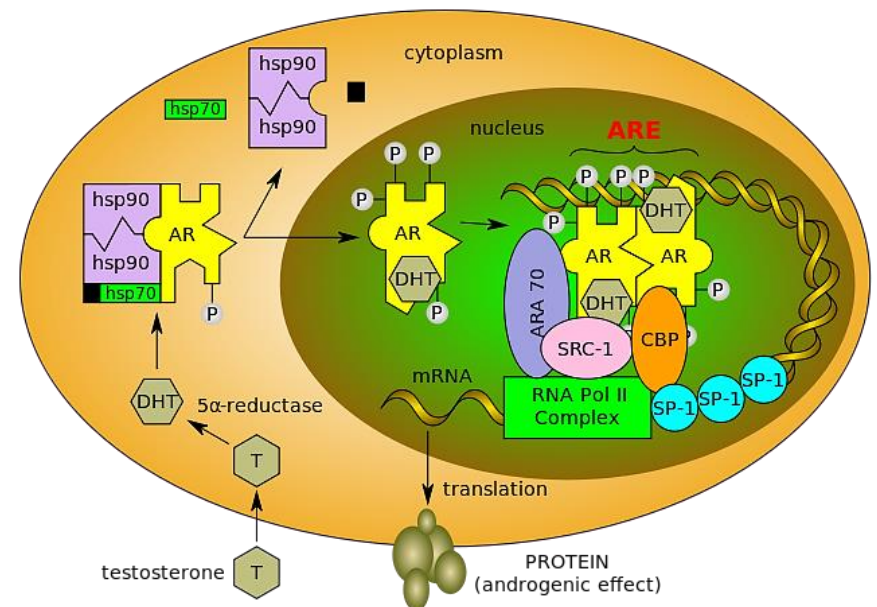
- receptory steroidních a tyroidních hormonů, vitamínu D, kyseliny retinové, oxidu dusnatého
- difuze ligandu cytoplazmatickou membránou → vazba na receptor → změna konformace receptoru → regulace transkripce cílových genů

Funkční domény receptorů

- doména pro vazbu ligandu - v nepřítomnosti ligandu může být vázán inhibitor
- doména pro dimerizaci - nutná pro plnou aktivaci receptoru
- aktivační doména - vazba k TFIID, TFIIB
- DNA vazebná doména - vazba k regulačním oblastem DNA, motiv dvou zinkových prstů

1. Cytoplazmatické receptory

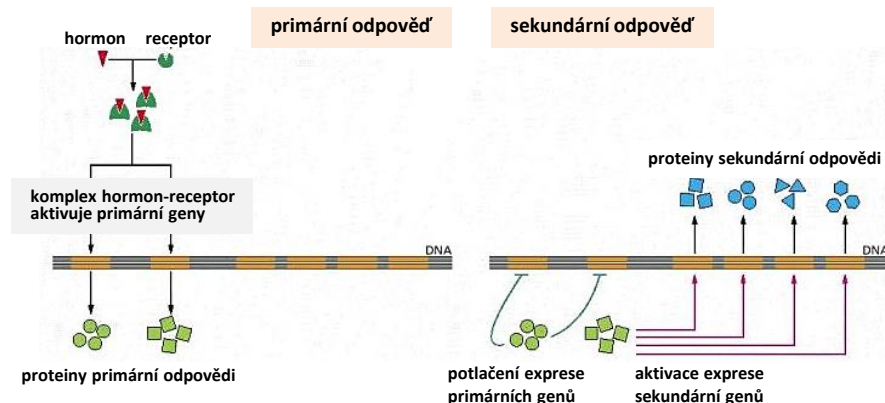
- steroidní hormony, glukokortikoidy, testosteron, ekdyzon, mineralkortikoidy
- vazba HSP proteinů (HSP70, 90), které se uvolní po vazbě ligandu
- tvorba homodimeru, přechod do jádra, aktivace příslušných genů
- př. androgenní receptor



Intracelulární receptory

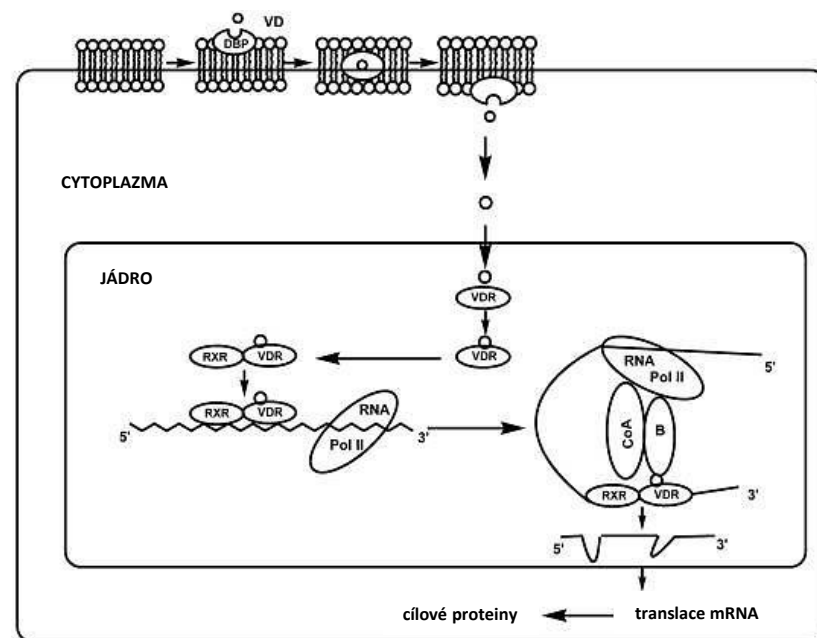
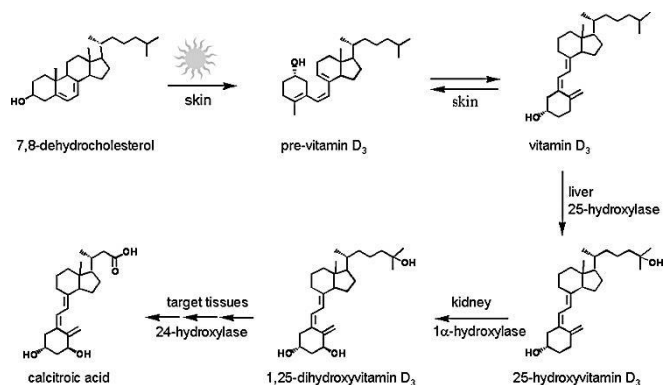
1. Cytoplazmatické receptory

- dvoustupňová reakce na steroidní hormony



2. jaderné receptory

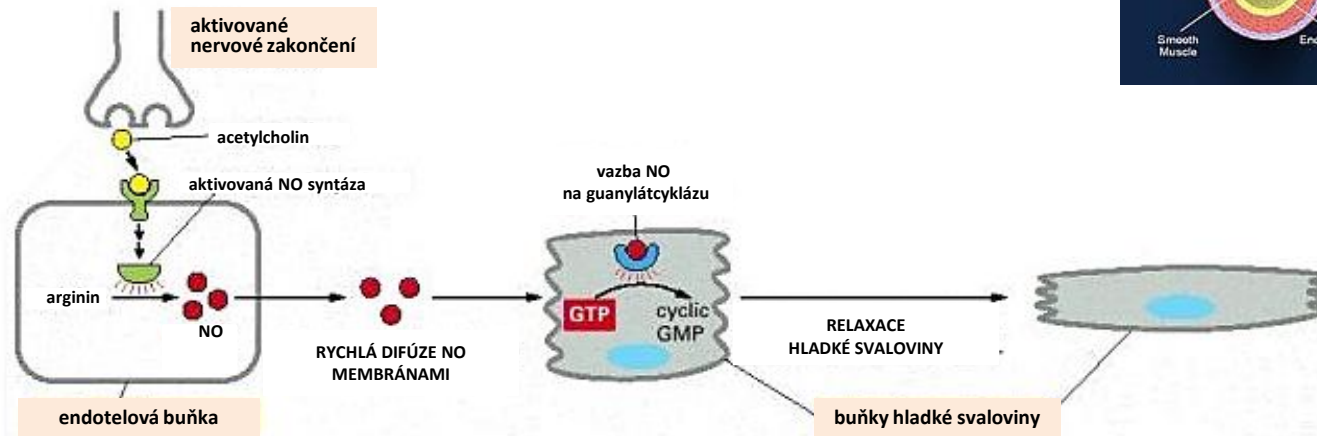
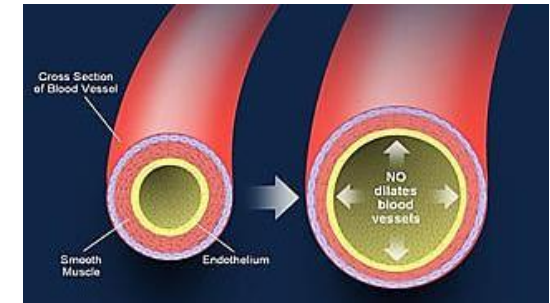
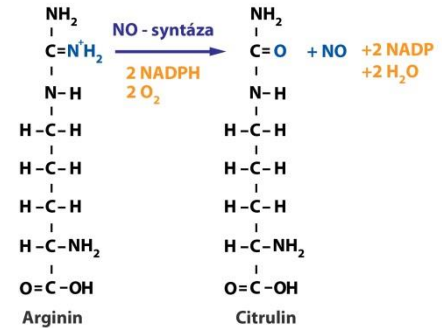
- tyroidní hormony, vit D, kyselina retinová
- tvoří heterodimery (RXR)
- př. vitamín D - v krvi vázán na DBP protein - jaderný receptor VDR



Intracelulární receptory

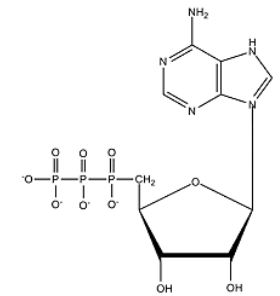
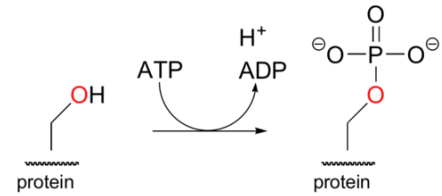
Oxid dusnatý (NO)

- toxický nestabilní plyn, volný průnik přes membrány buněk
- parakrinní signál kardiovaskulárního systému
- NO syntáza - deaminace argininu
- velmi rychlý, lokální účinek, rozklad na dusitany a dusičnany
- vazodilatátor - aplikace nitroglycerinu při angíně pectoris
- prodloužení účinku NO po aplikaci viagry
- acetylcholin → vznik a uvolnění NO z endotelových buněk → difuze k buňkám hladké svaloviny → aktivace guanylátcyklázy → relaxace svalové buňky



Přehled proteinkináz

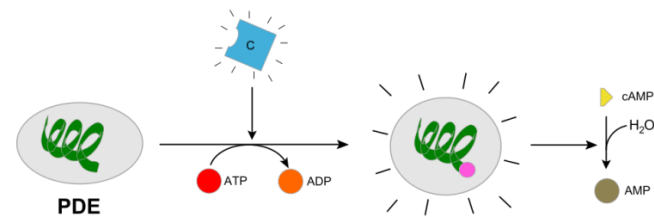
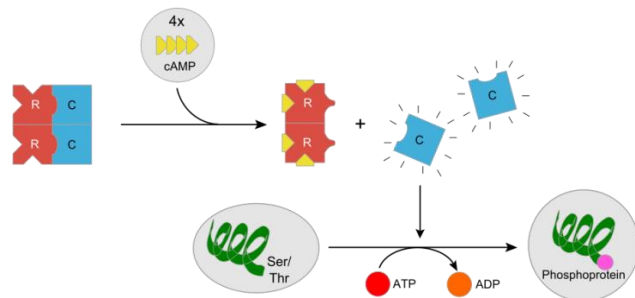
- fosforylace - vazba fosfátové skupiny na AK zbytky v proteinech
- změna biochemických vlastností proteinu
- jako donor fosfátové skupiny slouží ATP, vznik ADP
- tyrosinkinázy - vazba fosfátu na fenolickou skupinu Tyr
- serin/treoninkinázy - vazba fosfátu na hydroxylovou skupinu Ser či Thr



SERIN / TREONIN KINÁZY

1. proteinkináza A, PKA

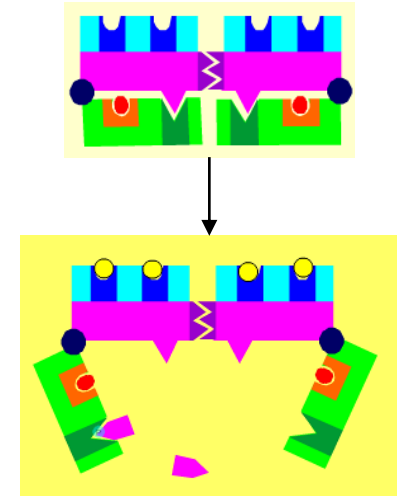
- cAMP dependentní protein kináza
- homodimer, regulační (R) a katalytická (C) doména
- R blokují C a váží PKA na určité místo v buňce
- po vazbě cAMP na R jsou C uvolněny a mohou fosforylovat cílové proteiny
- př. rozklad glykogenu v svalových vláknech, syntéza somatostatinu v D-buňkách



Přehled proteinkináz

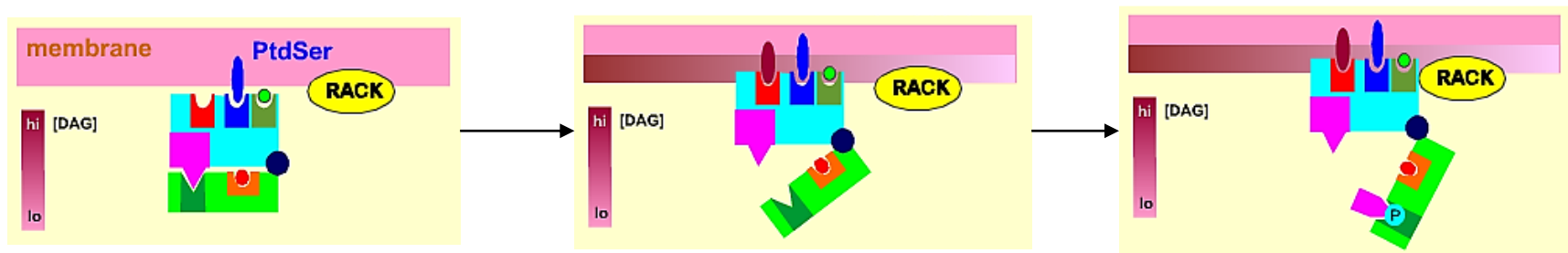
2. proteinkináza G, PKG

- cGMP dependentní protein kináza, homodimer
- regulační doména: dimerizace, vazba cGMP, blok aktivního místa
- katalytická doména: fosforylace, uvolněna po vazbě cGMP
- PKG-I v cytoplasmě hladké svaloviny, trombocytů, endotelu, kardiomyocytů
- PKG-II vázána k membráně v buňkách ledvin, střevní mukózy, pankreatu



3. proteinkináza C, PKC

- monomer v blízkosti plazmalemy, aktivace účinkem DAG, PtdSer a Ca^{2+}
- regulační doména - vazba DAG, PtdSer a Ca^{2+} , blok aktivního místa
- katalytická doména - fosforylace, uvolněna po vazbě ligandů k regulační doméně
- fosforylace různých proteinů v závislosti na typu buňky a buněčném kompartmentu



Přehled proteinkináz

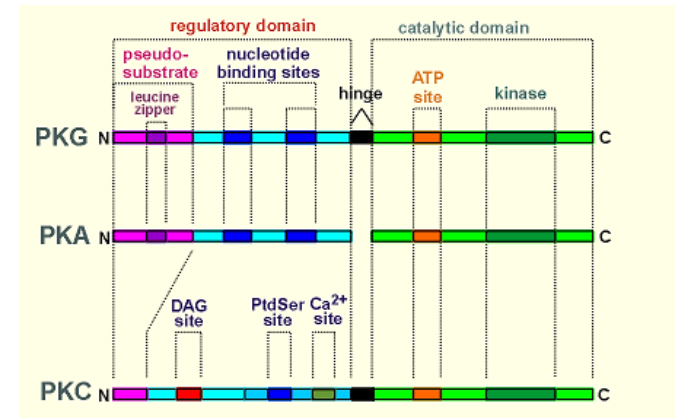
Struktura PKA, PKC a PKG je vysoce příbuzná

Regulační doména

- pseudosubstrát blokuje aktivní místo
- leucinový zip pro dimerizaci (ne u PKC)
- vazebná místa pro ligandy

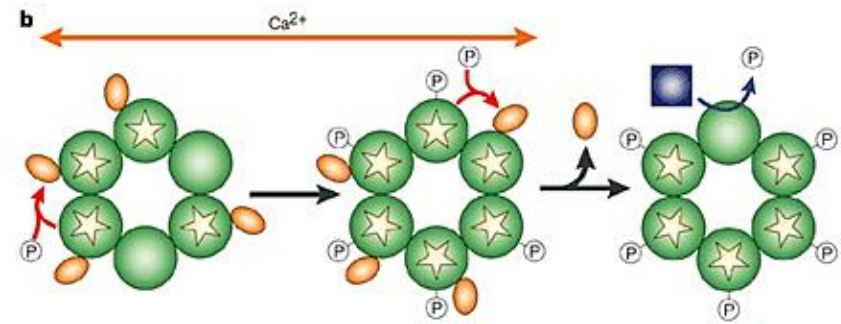
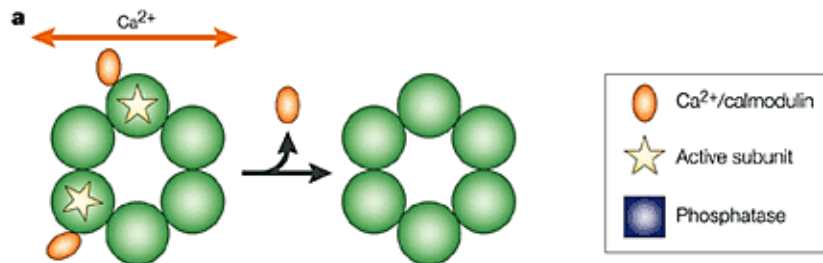
Katalytická doména

- aktivní místo enzymu s kinázovou aktivitou
- vazba ATP



4. Ca²⁺/kalmodulin dependentní proteinkináza II (CaMKII)

- regulována komplexem Ca²⁺/kalmodulin, autofosforylace na Thr286
- katalytická doména - fosforylace, vazebná místa pro ATP
- regulační doména - pseudosubstrát, vazba monomerů do multimerů
- specializované CaMKII - př. kináza lehkého řetězce myozinu



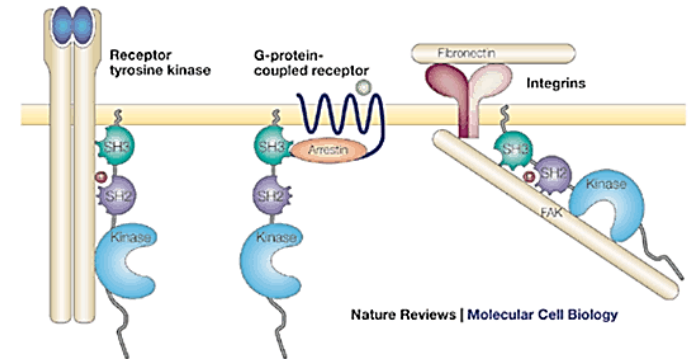
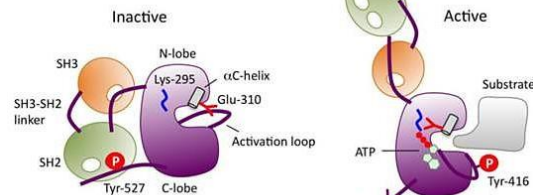
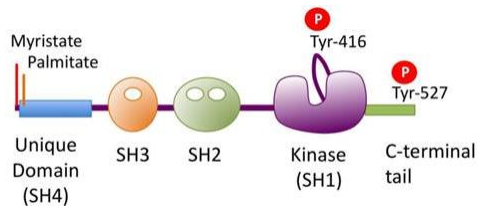
Přehled proteinkináz

TYROSIN KINÁZY

- kinázová doména SH1
- receptorové - vázané na plazmatickou membránu, součást receptorů
- nereceptorové - nejsou součástí receptorů, pouze s nimi asociují, děleny do rodin:

1. proteinkinázy Src-rodiny

- SH1; regulační domény SH2, SH3; ukotvení k membráně myristilovou kyselinou přes SH4
- c-Src - inaktivní: fosforylace Tyr-527, vazba SH2, blok SH1
 - aktivace: defosforylací či vyvázáním fosfátu na Tyr-527, fosforylace Tyr-416
- asociace s receptory - receptorové tyrosinkinázy, receptory vázané s G-proteiny, adhezní receptory



2. proteinkinázy Jak-rodiny

- přímá aktivace receptory pro interferon, Jak/STAT signální dráha

3. proteinkinázy Syk-rodiny

Přehled proteinkináz

MAP-PROTEINKINÁZY

- proteinkinázy aktivované mitogeny
- fosforylace na Ser či Thr nebo současně na Thr a Tyr

1. MAP-kinázakinázakinázy (MAPKKK)

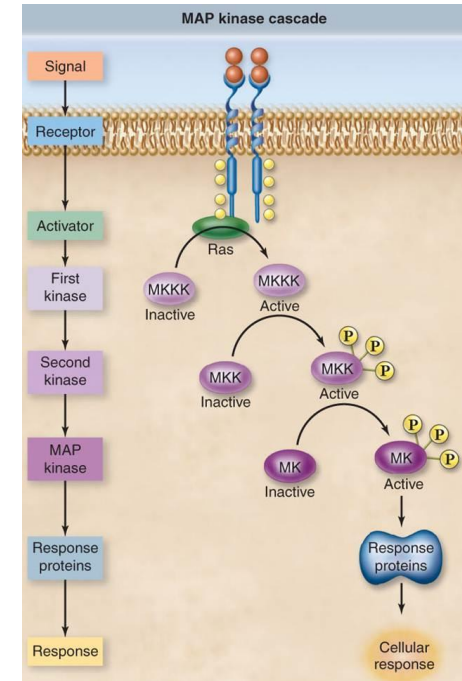
- aktivace MAPKK přes Ser či Thr
- př. Raf-proteinkináza přímo aktivovaná Ras proteinem

2. MAP-kinázakinázy (MAPKK)

- aktivace MAPK fosforylací Thr a Tyr (Thr-X-Tyr)
- př. MAP/ERK-proteinkináza (MEK-proteinkináza)

3. MAP-kinázy (MAPK)

- po své aktivaci migrují k cílovým molekulám



SERIN / TREONIN KINÁZY

- proteinkináza A (PAK)
- proteinkináza G (PKG)
- proteinkináza C (PKC)
- Ca²⁺/kalmodulin d. proteinkináza II (CaMKII)

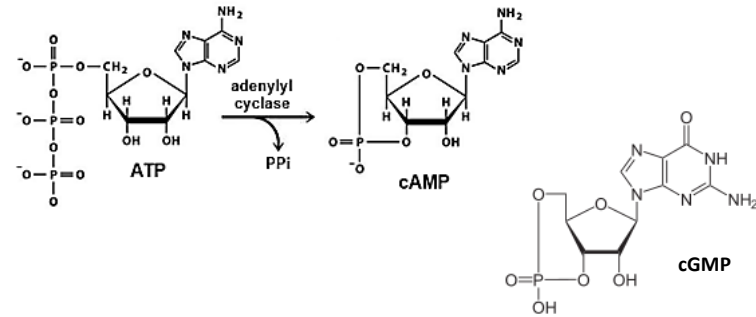
NERECEPTOROVÉ TYROSIN KINÁZY

- proteinkinázy Src-rodiny
- proteinkinázy Jak-rodiny
- proteinkinázy Syk-rodiny

Další enzymy signálních drah

Adenylátcykláza

- ATP → bisfosfát + cyklický adenosinmonofosfátu (cAMP)



Guanylátcykláza

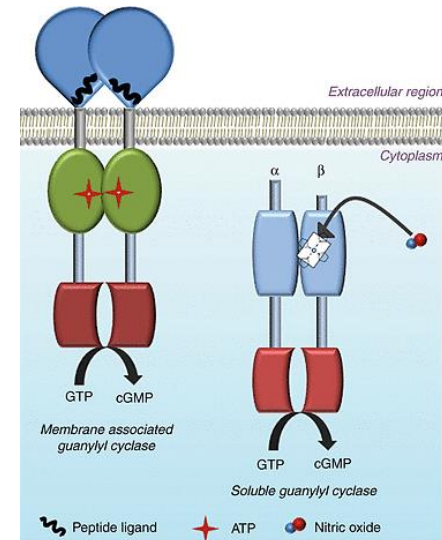
- GTP → bisfosfát + cyklický guanosinmonofosfát (cGMP)

Typ 1 - homodimer, receptor pro různé ligandy

- extracelulární, transmembránová, kinázová, cyklázová doména
- př. ANF: atriální natriuretický faktor
vyloučení Na⁺ a vody z ledvin

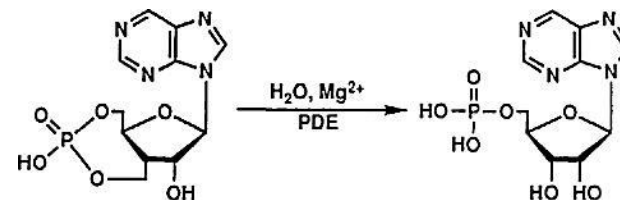
Typ 2 - rozpustný heterodimer, alfa a beta řetězec

- aktivace vazbou NO
- vazebná (hem), cyklázová doména

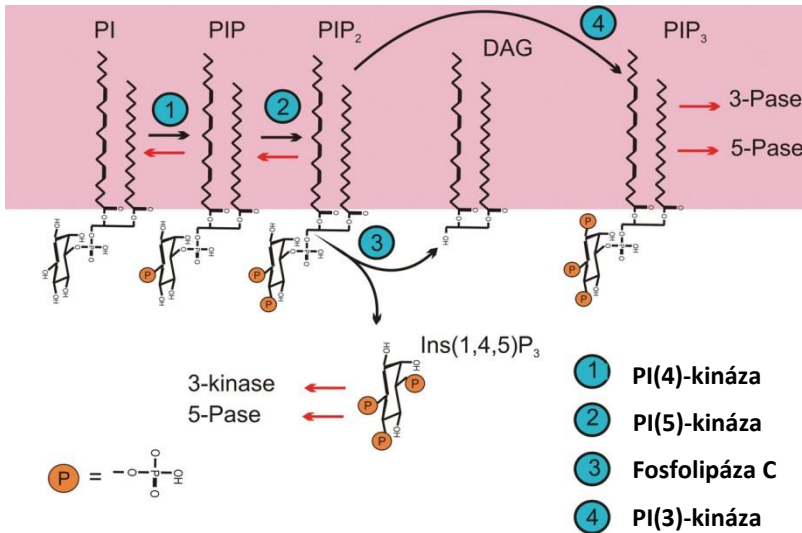


cAMP-fosfodiesteráza, cGMP-fosfodiesteráza

- hydrolýza cAMP / cGMP na AMP / GMP



Další enzymy signálních drah



PI fosfatidylinositol
PIP fosfatidylinositol-4-fosfát
PIP₂ fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP₃ fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát

DAG diacylglycerol
Ins(1,4,5)P₃ inositol-1,4,5-trisfosfát

Fosfolipáza C (PLC)

- hydrolyzuje PIP₂ na DAG a Ins(1,4,5)P₃

Fosfatidylinositol-3-fosfatáza

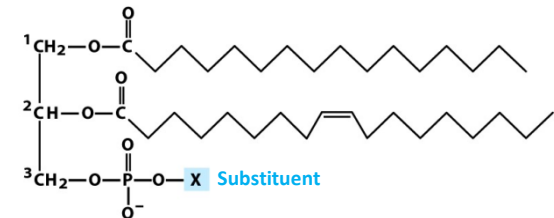
- katalyzuje hydrolýzu 3-fosfátu z PtdIns(3)P / PtdIns(3,4)P₂ / PtdIns(3,4,5)P₃

1-fosfatidylinositol-3-kináza, PI(3)K

- katalyzuje fosforylaci opačnou k fosfatidylinositol-3-fosfatáze

Fosfolipáza D

- hydrolyzuje glycerofosfolipidy (nejčastěji fosfatidylcholin) za vzniku kyseliny fosfatidové a příslušného substituentu (cholinu)



Povrchové receptory

Signalizace zprostředkovaná povrchovými receptory

1. mimobuněčný signál (ligand)
2. povrchový receptor
3. sekundární přenašeč
4. cílová molekula (efektor)

Typy povrchových receptorů

1. Receptory spojené s iontovými kanály

- vazba ligandu ovlivňuje průchodnost kanálů
- změna permeability membrány
- rychlá signalizace na synapsích

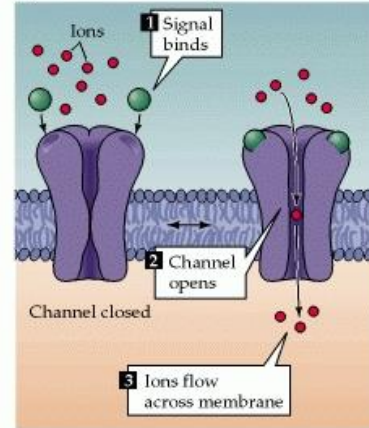
2. Katalytické receptory

- získání katalytické schopnosti po vazbě ligandu
- transmembránové proteiny s proteinkinázovou aktivitou

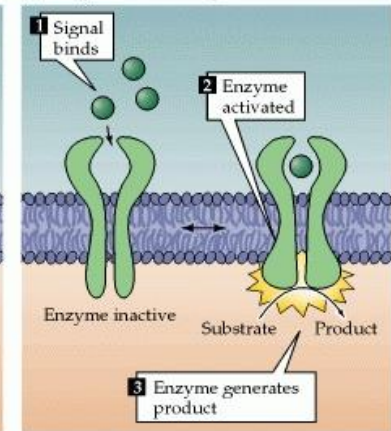
3. Receptory vázané na G protein

- přes G-protein ovlivňují aktivitu enzymů nebo průchodnost kanálů

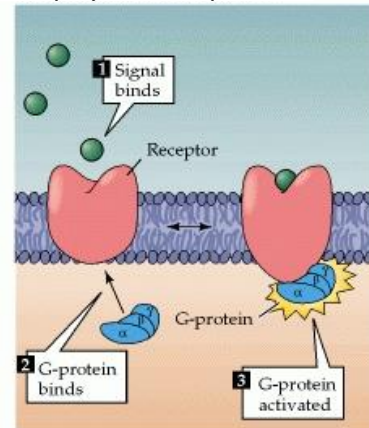
Receptory spojené s iontovými kanály



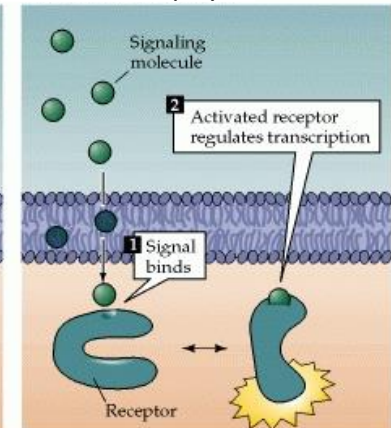
Katalytické receptory



Receptory vázané na G-protein



Intracelulární receptory

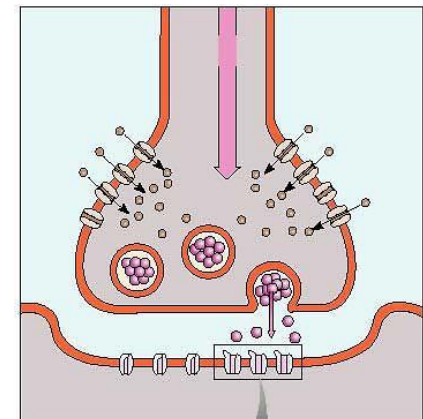
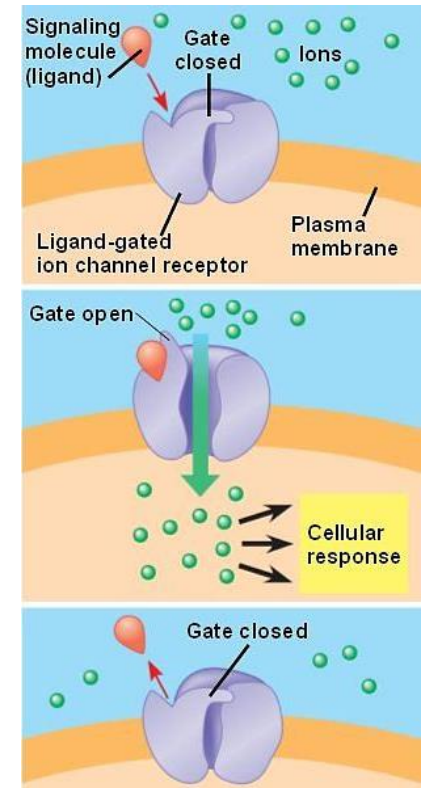


Receptory spojené s iontovým kanálem

- oligomerní proteiny tvoří v plazmatické membráně iontový kanál
- vazba ligandu → konformační změna receptoru → otevření kanálu → pohybu iontů mezi buňkou a okolím → disociace ligandu z receptoru → uzavření kanálu
- ligandy - neurotransmitery, peptidové hormony
- molekuly procházející kanálem - ionty Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-

Signalizace na synapsích

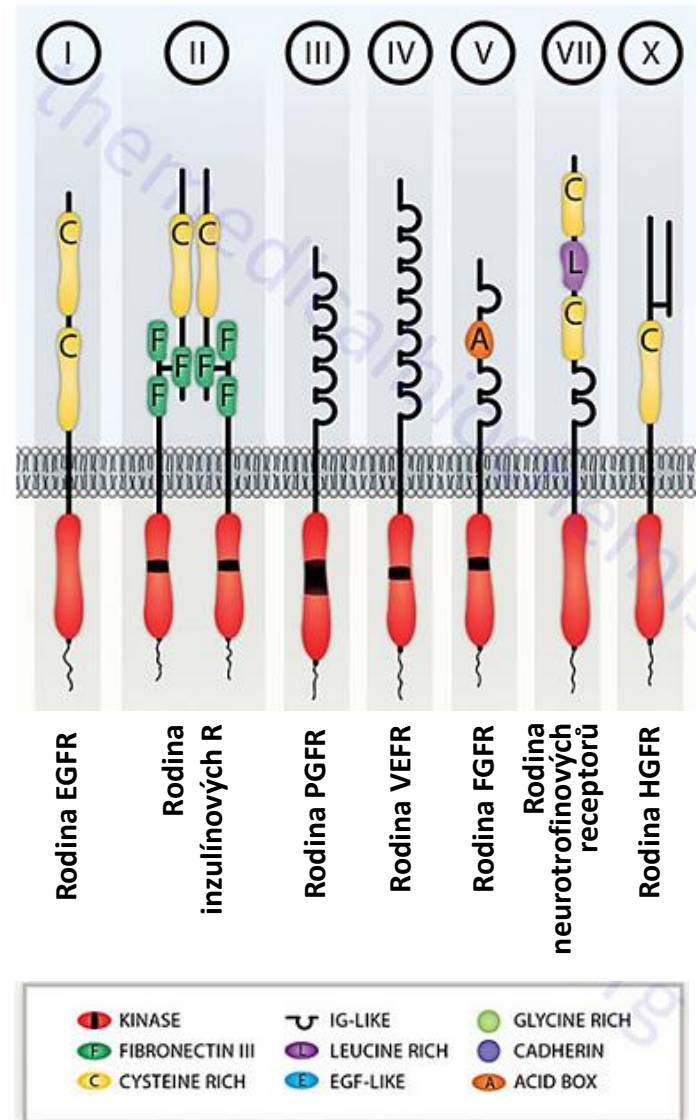
- převod chemických signálů na elektrické
- excitovaný presynaptický neuron vypouští neurotransmitter, který se váže na receptor spojený s iontovým kanálem
- otevřeným kanálem proudí ionty, které vyvolají excitaci postsynaptického neuronu
- př. receptor pro serotonin
 - cíl antidepresiv a antipsychotik
- př. receptor pro GABA (γ -aminomáslená kyselina)
 - hlavní inhibiční neurotransmitter CNS
 - ovlivňuje chování drogově závislých jedinců



Katalytické receptory

TYROSINPROTEINKINÁZOVÉ RECEPTORY

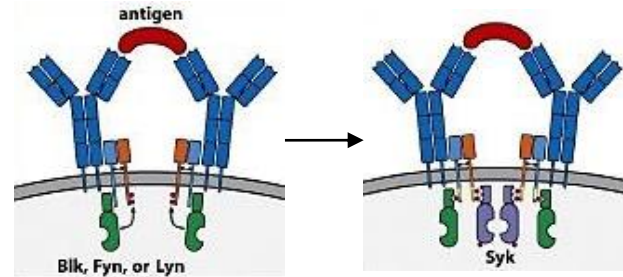
- tyrosinproteinkinázová aktivita regulovaná ligandy
- společné strukturní rysy
- **extracelulární doména**
 - N-konec, glykosylována
 - vazba ligandu
 - určuje typ signálu, na který bude buňka citlivá
- **transmembránová doména**
 - krátká, hydrofobní, α -šroubovice
- **cytoplazmatická doména**
 - C-konec, tyrosinproteinkinázová aktivita
 - určuje typ signální dráhy a tím i buněčnou odpověď
- kolem 50 receptorů
- 14 rodin podle motivu v extracelulárních doménách



Katalytické receptory

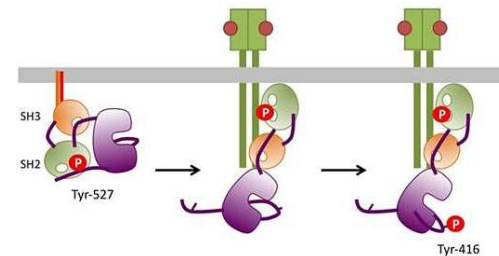
RECEPTORY S PŘIDRUŽENOU TYROSINPROTEINKINÁZOVOU AKTIVITOU

- nemají kinázovou doménu, po vazbě ligandu dimerizují, aktivují nereceptorové tyrosinproteinkinázy
- imunoglobulinové receptory
 - BCR, TCR, vazba antigenů
 - asociace s kinázami Src- a Syk-rodin
- receptory pro cytokiny
 - př. Epo, GM-CSF, HGF, IL2-10, interferony



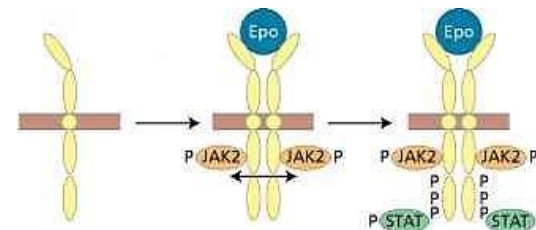
Receptory asociované s proteinkinázami Src-rodiny

- po dimerizaci receptoru aktivována Src-kináza
- na její P-Tyr-416 se váží adaptorové molekuly, které přenášejí signál dál



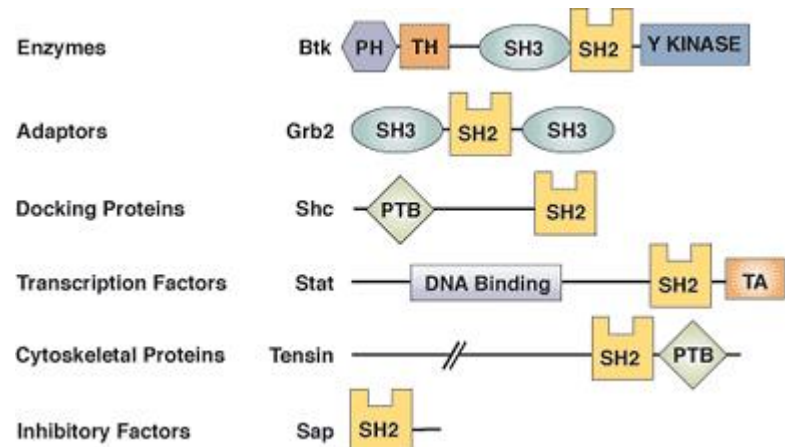
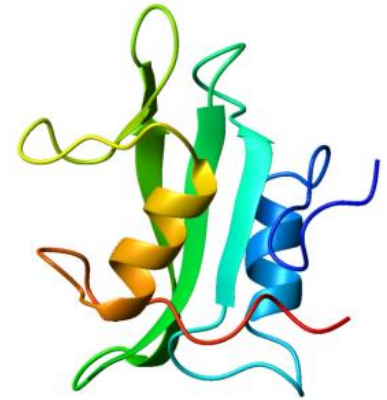
Receptory asociované s proteinkinázami Jak-rodiny

- po dimerizaci receptoru aktivována Jak-kináza
- fosforylace receptoru
- vazba a fosforylace STAT



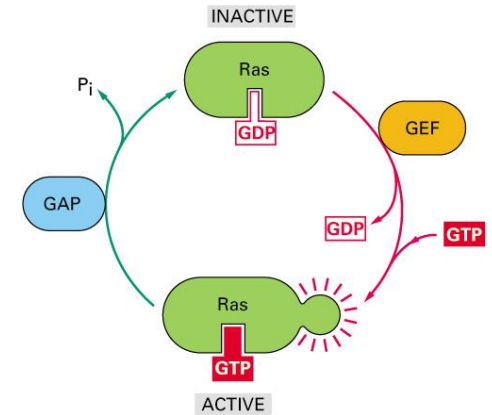
SH2 doména

- **Src Homology 2**
 - strukturní doména (cca 100 AK) u většiny eukaryotických organismů
 - vazba na fosforylovaný tyrosin v sekvenci 3-6 aminokyselin
 - po spojení s P-Tyr se mění konformace a aktivita proteinu s SH2
-
- **podíl na interakcích signálních molekul**
 - různé SH2, které se liší rozeznávanými sekvencemi
 - spojuje katalytické receptory s např. FLC, G proteiny, transkripčními faktory
 - součástí enzymů (Src, Jak, Lck, Fyn, Syk, PLCG, PI3K)
 - adaptorových molekul (Grb2)
 - transkripčních faktorů (STAT)
 - regulátorů signalizace (SOCS)
 - signální dráha přes proteiny Ras = příklad zapojení SH2 domény do signalizací



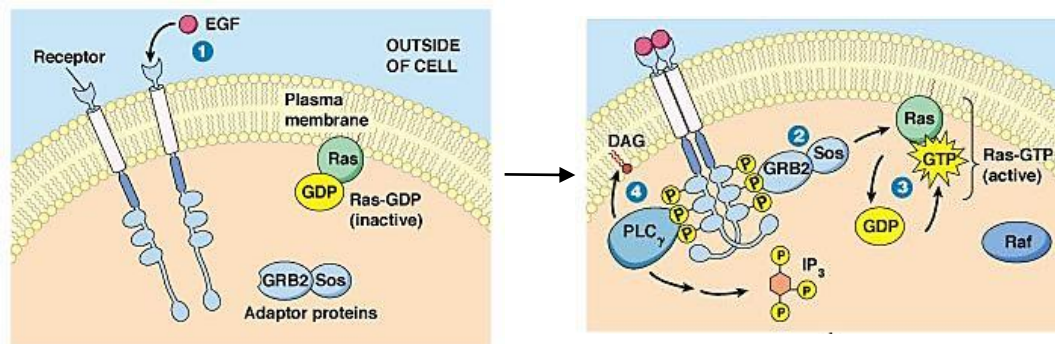
Rodina proteinů Ras

- monomerní GTPázy se schopnost vázat GDP/GTP
- po prenylaci CAAX boxu vazba k plazmatické membráně
- aktivace **GEF faktorem**, který uvolňuje GDP
- Ras váže GTP, aktivuje se a přenáší signál na své efekty
- inaktivaci zajišťuje **GAP protein**, který podporuje hydrolýzu GTP
- nadrodina proteinů Ras - rodiny Ras (růst a diferenciace buněk)
Rho (morfologie a pohyb buněk)
Rab a Arf (transport měchýřků)
Ran (jaderný transport)



Signalizace přes Grb2-Sos

- Grb2 se přes SH2 doménu spojuje s aktivovanými tyrosinproteinkinázovými receptory
SH3 doménu konstitutivně váže k proteinu Sos
- Sos funguje jako GEF a zajišťuje aktivaci Ras

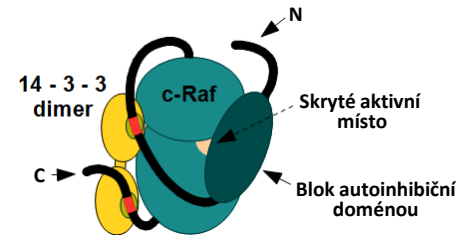
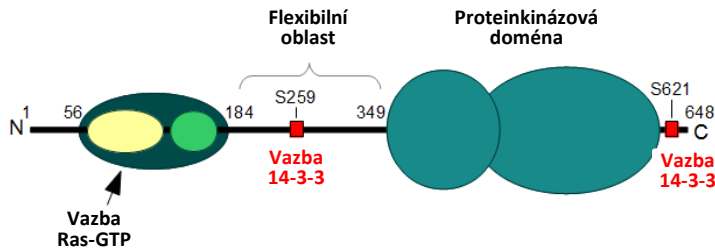


Rodina proteinů Ras

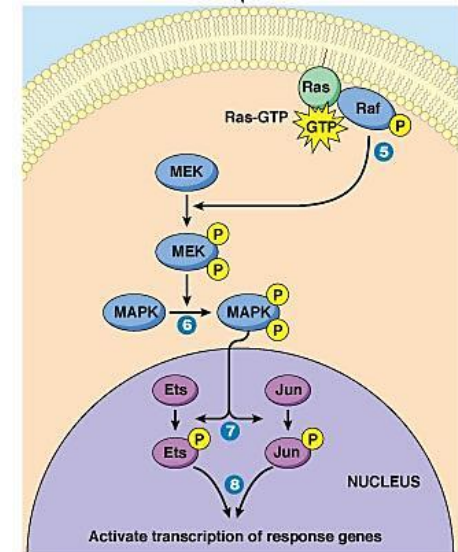
Aktivovaný Ras-GTP váže a aktivuje své efektory, hlavním efektem proteinů Ras je kináza Raf

MAPK dráha zahájená aktivací Raf

- Raf - Ser/Thr MAPKKK
 - v inaktivním stavu udržuje faktor 14-3-3 konformaci blokující katalytické místo
 - vazba Ras-GTP indukuje disociaci 14-3-3



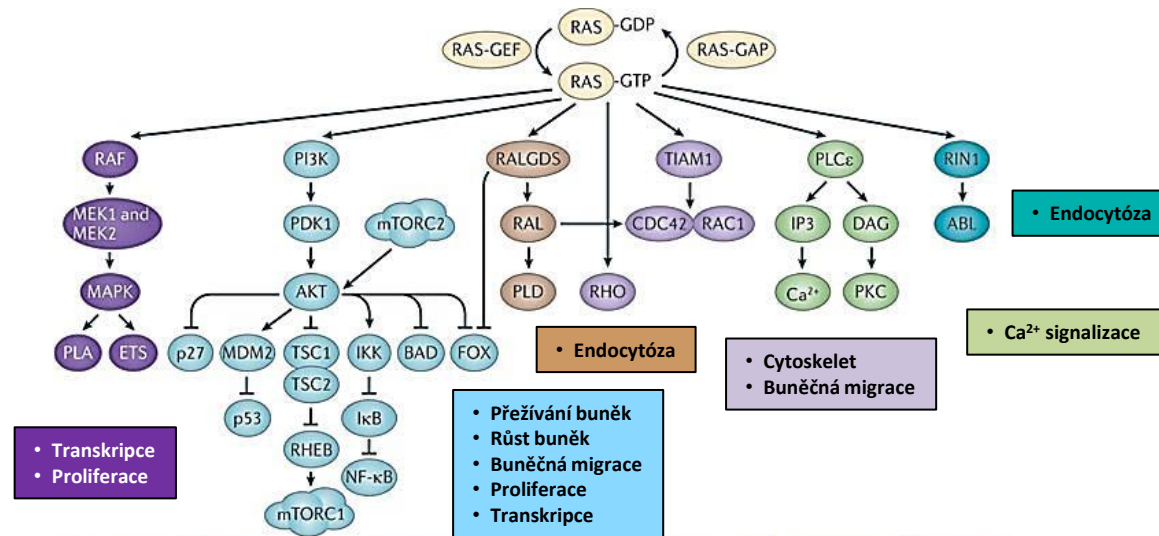
- MAPKK - MEK
- MAPK - ERK, transport do jádra, aktivace transkripčních faktorů
- transkripční faktory se váží na SRE (serum response elements) a indukují transkripci specifických genů (SRF, serum response factor)
- přenos signálů od mitogenů
- dominantní při signalizaci určující růst, vývoj a diferenciaci buněk



Rodina proteinů Ras

- GEF faktory aktivující Ras proteiny - Sos: signál od proteinkinázových receptorů přes Grb2
- Ras-GRP: signál od fosfolipázy C přes DAG
 - Ras-GRF: signál od Ca^{2+} iontového kanálu přes kalmodulin

Efektory proteinů Ras



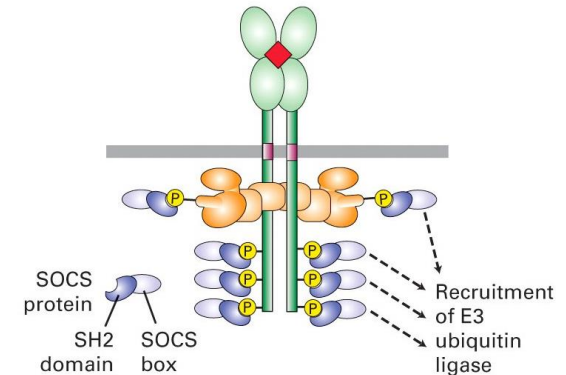
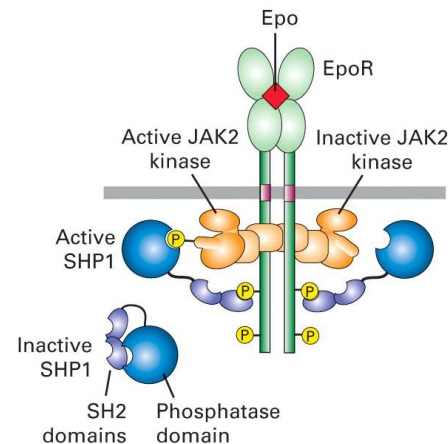
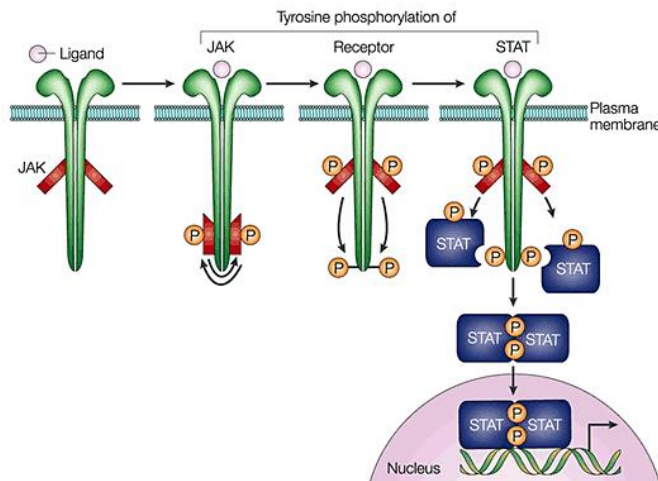
Nádorová onemocnění

- stále aktivní Ras-GTP (blok hydrolýzy GTP, mutace GAP proteinů)
- H-Ras, K-Ras a N-Ras nejčastější onkogeny nádorových onemocnění (u 20 - 30 % nádorů)
- inhibitory Ras proteinů předmětem protinádorové léčby

Přímá aktivace transkripčních faktorů

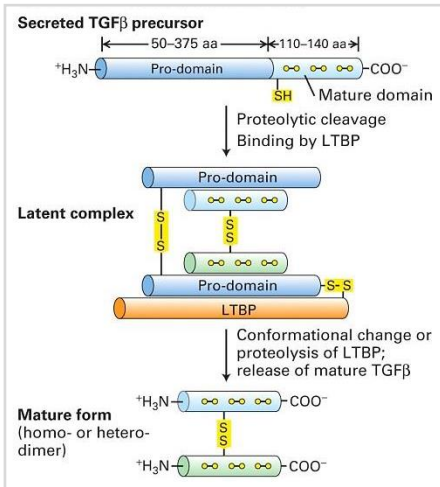
Signální dráha Jak/STAT

- Jak konstitutivně asociuje s receptorem
- STAT jsou transkripční faktory s SH2 doménou, translokace cytoplazma → jádro
- vazba cytokinu → dimerizace receptoru → fosforylace Jak, fosforylace receptoru → vazba a aktivace STAT → dimerizuje STAT → translokace do jádra → aktivace cílových genů
- negativní regulace dráhy
 - fosfatáza SHP1: vazba na P-Tyr receptoru (SH2), defosforylace Jak
 - proteiny SOCS: vazba na P-Tyr receptoru (SH2), blok struktury vazba ubikvitin ligázy, degradace Jak v proteazomu



Přímá aktivace transkripčních faktorů

Signalizace TGFβ (Transforming Growth Factor β)



- tři izoformy TGFβ1-3
- prekurzor sekretovaný do extracelulárního prostoru
- odštěpení pro-domény, vazba na LTBP protein → latentní komplex
- po aktivaci uvolněn zralý dimer TGFβ

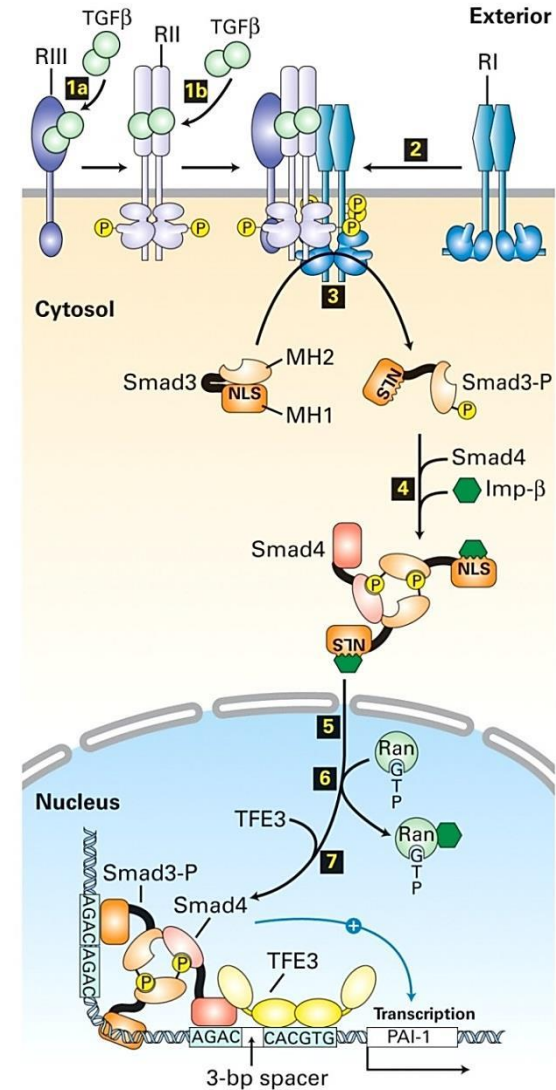
• tři typy receptorů

R1 a R2 - transmembránové dimery

- Ser/Thr kinázovou aktivita v cytosolické doméně

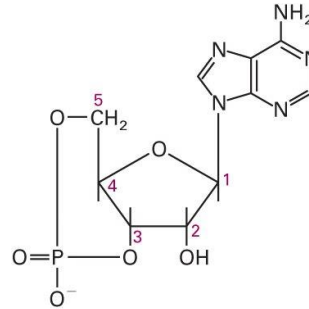
R3 - vazba a koncentrace TGFβ blízko povrchu buněk

- vazba TGFβ na R2 → přitažení a aktivace R1 → fosforylace Smad3 → dimerizace Smad3 a tvorba komplexu se Smad4 a Importinem β → translokace do jádra → uvolnění Importinem β → Smad3/Smad4 váže transkripční faktor TFE3 a reguluje transkripci genů

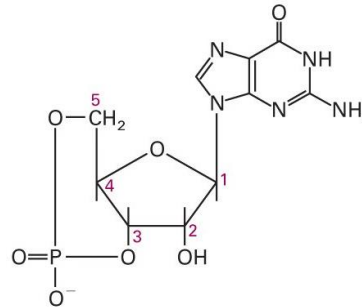


Sekundární přenašeče

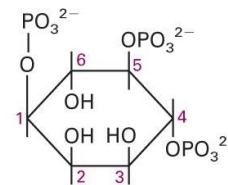
- nízká molekulová hmotnost
- dobře rozpustné
- krátký poločas rozpadu
- intracelulární signály
- přenos, amplifikace a rozdělení signálu z receptorů
- po přijetí signálu aktivovány enzymy zodpovědné za jejich tvorbu
- jejich koncentrace v buňce stoupá a klesá v závislosti na přítomnosti mimobuněčného signálu
- vyvolávají rychlou změnu aktivity enzymů nebo jiných proteinů



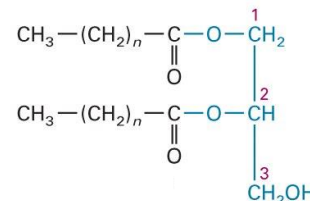
3', 5'-cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)
Aktivuje proteinkinázu A (PKA)



3', 5'-cyklický guanosinmonofosfát (cGMP)
Aktivuje proteinkinázu G (PKG)



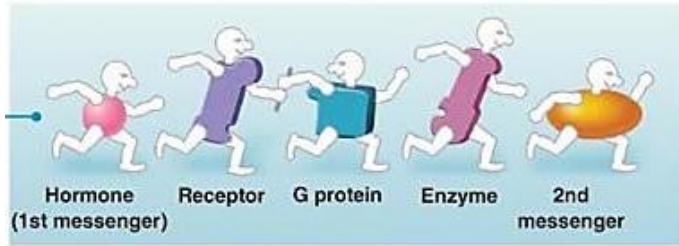
Inositol-1,4,5-trisfosfát (Ins(1,4,5)P₃)
Otevírá Ca²⁺ kanály ER



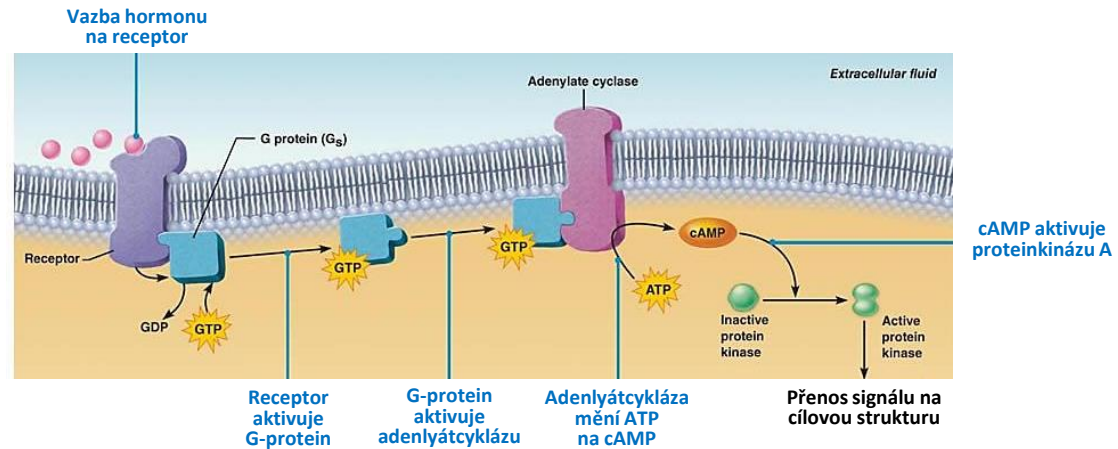
1,2-diacylglycerol (DAG)
Aktivuje proteinkinázu C (PKC)

Receptory vázané na G-protein

G-proteiny (trimerní)



Přenos signálu z receptoru na producenta sekundárních přenašečů



Podjednotka α - vazebné místo pro GDP/GTP, GTPázová aktivita
Podjednotky $\beta\gamma$ - ukotvení G-proteinu v plazmatické membráně

Základní stav

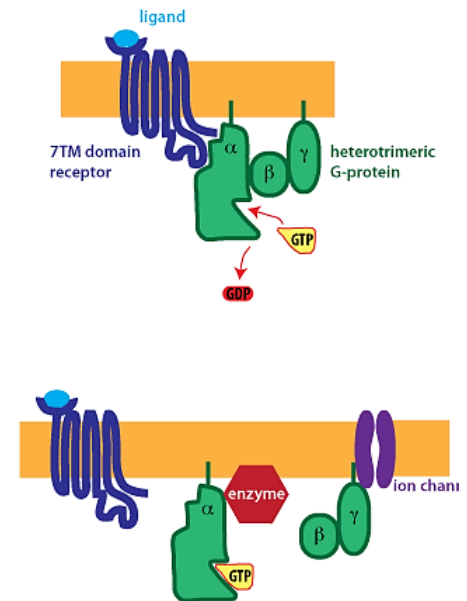
- asociace $\alpha\beta\gamma$ podjednotek, GDP na podjednotce α

Aktivace

- vazba ligandu na receptor vede k výměně GDP za GTP (GEF faktor)
- disociace α od $\beta\gamma$
- α a $\beta\gamma$ regulují aktivitu specifických cílových proteinů

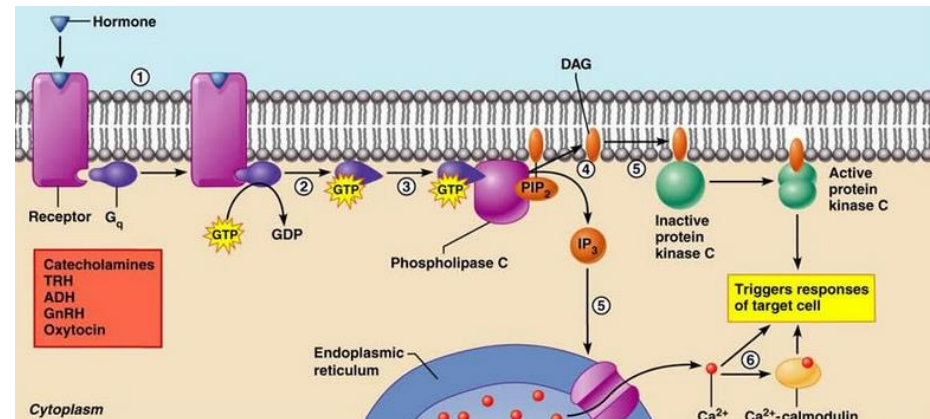
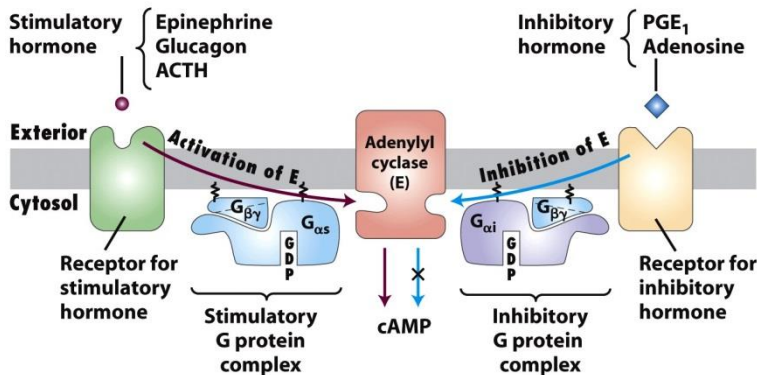
Inaktivace

- po hydrolýze GTP na GDP (GAP protein) návrat do trimerního stavu



Receptory vázané na G-protein

Gαs	α	aktivace adenylátcyklázy, Ca ²⁺ kanálů
Gαi	α	inaktivace adenylátcyklázy, aktivace fosfolipázy C a cGMP fosfodiesterázy
	$\beta\gamma$	aktivace K ⁺ kanálů a fosfolipázy C
Gαq	α	aktivace fosfolipázy C
Gα12	α	aktivace Rho



Efektory

- adenylátcykláza - nárůst cAMP - aktivace PKA, regulace iontových kanálů
- fosfolipáza C - vznik DAG, Ins(1,4,5)P3 - aktivace PKC, otevření Ca²⁺ kanálů
- GTPáza Rho - aktivace ROCK kinázy
- Ca²⁺ kanál - vazba na kalmodulin - aktivace CaMKII

Receptory vázané na G-protein

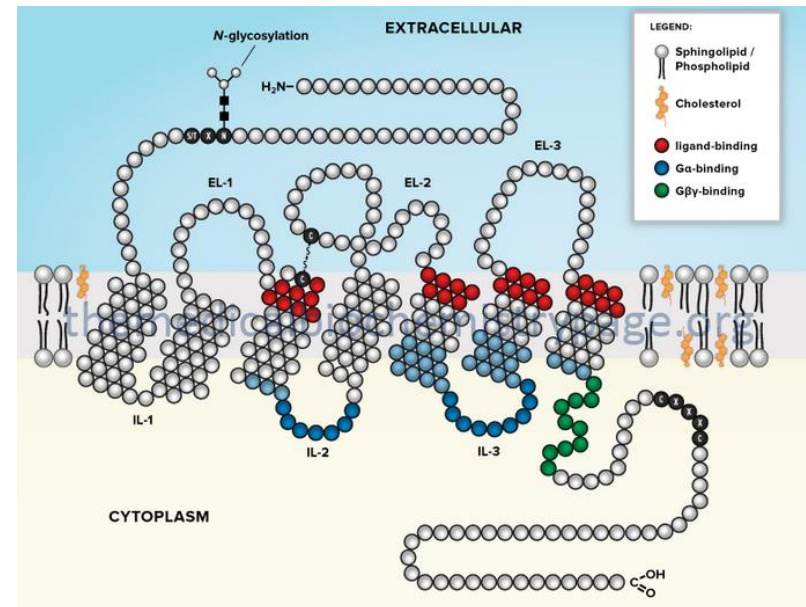
Robert J. Lefkowitz, Brian K. Kobilka
2012 NC za chemii, za studium receptorů
vázaných na G-proteiny



- největší rodina buněčných povrchových receptorů
- sedm α helixů (22-24 AK) v plazmatické membráně
- α helixy spojeny variabilními smyčkami
 - extracelulární: vazba ligandu
 - intracelulární: vazba G-proteinu
- vazba ligandu mění konformaci intracelulární části receptoru, na kterou se váže a aktivuje G proteinu

Ligandy

- neurotransmitery, neuropeptidy
- odoranty, lipidy
- hormony - př. serotonin, epinefrin, glukagon, tyrotropin, kalcitonin, ACTH, prostaglandiny
- ztráta citlivosti vlivem přetrvávající přítomnosti ligandu



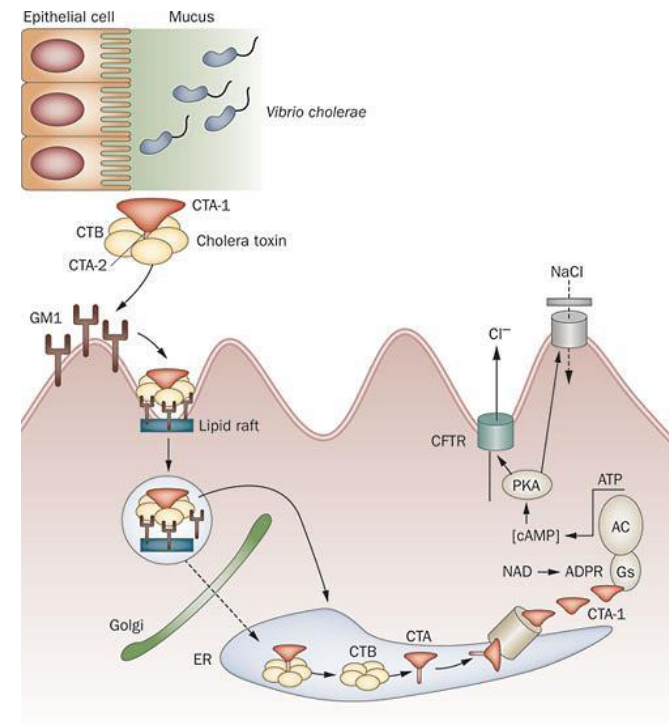
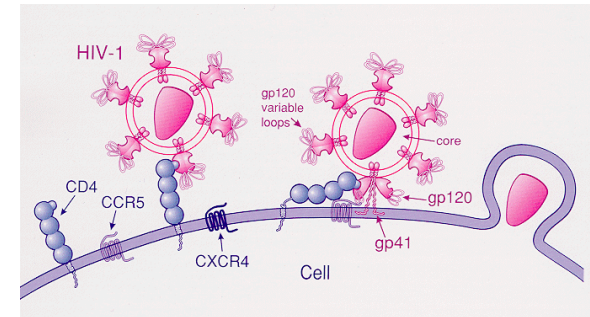
Receptory vázané na G-protein

Biologické účinky

- růst a diferenciace buněk, chemotaxe
- přenos signálů z chuťových, pachových a světelným vjemů
- nervová signalizace
- regulace krevního tlaku, funkce endokrinních žláz
- embryogeneze a vývoj organismu

Nemoci spjaté s G-proteiny

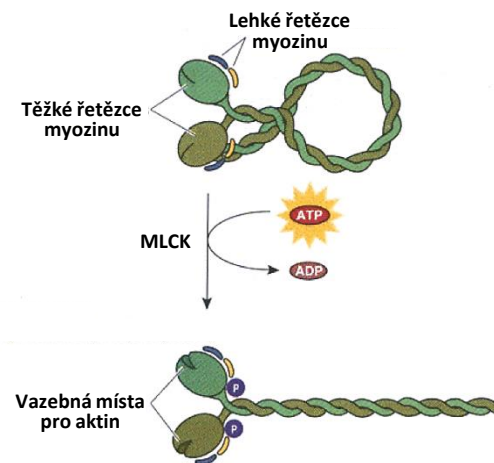
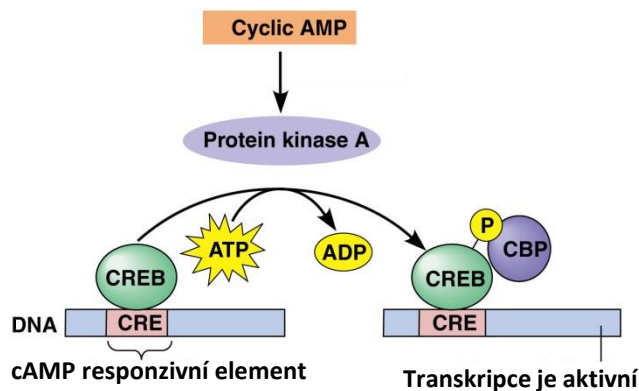
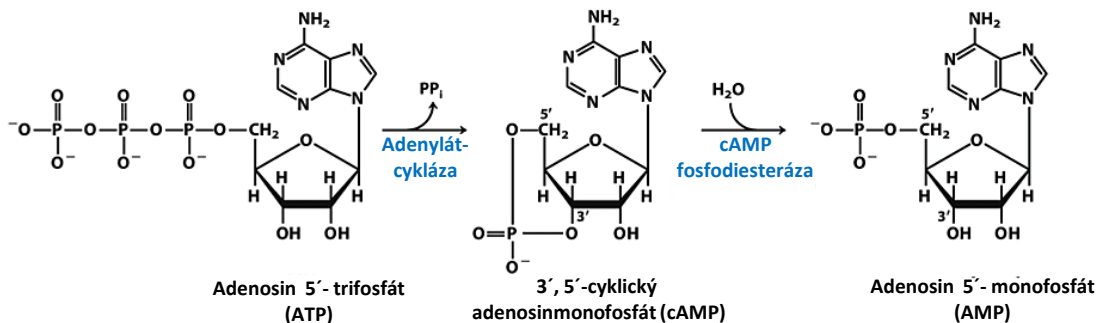
- nádorová onemocnění
 - mutace receptorů u 1/5 nádorů
- infekce virem HIV
 - vstup viru do buněk přes receptory CXCR4 a CCR5
- cholera (*Vibrio cholerae*)
 - cholera toxin z podjednotek A a B
 - podjednotka B zajišťuje vazbu na povrch buněk (GM1)
 - podjednotka A podporuje ADP-ribosylaci G α s, která pak není schopna hydrolýzy GTP
 - hyperaktivace adenylátcyklázy → vysoká koncentrace cAMP v epitelu střeva → propustnost iontových kanálů → únik vody a iontů do lumen střeva → prudké průjmy



Nitrobuněčné signální dráhy

Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)

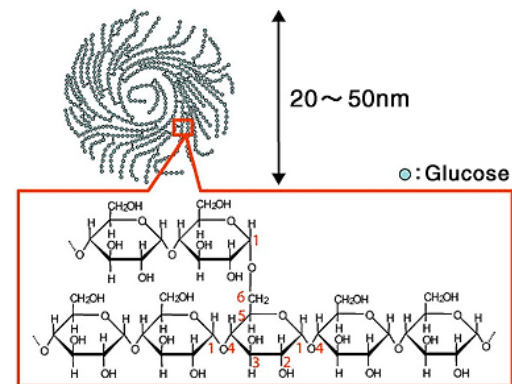
- koncentrace závislá na aktivitě:
adenylátcyklázy
cAMP fosfodiesterázy
- přenos signálu z membrány k proteinům cytosolu nebo jádra
- vazba na regulační doménu PKA → uvolnění katalytické domény → fosforylace cílových substrátů
 - i) transkripční faktor CREB: aktivace příslušných genů po vazbě k sekvencím CRE
 - ii) receptory steroidních hormonů
 - iii) kináza lehkého řetězce myozinu (MLCK) v buňkách hladké svaloviny



Nitrobuněčné signální dráhy

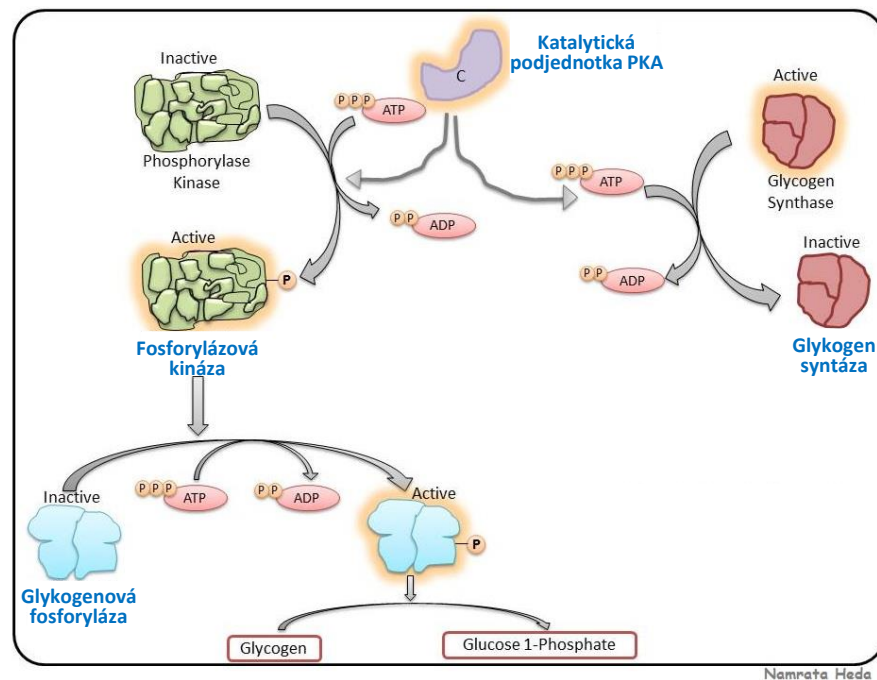
Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)

- objeven při studiu metabolismu glykogenu (Sutherland, 1958)
- glykogen je zásobárnou glukózy v lidském těle
- při stresu se do krve produkuje adrenalin, který stimuluje svalové a jaterní buňky k uvolnění a štěpení glykogenu



Mechanismus

- vazba adrenalinu na β -adrenergní receptory svalových buněk
- aktivace G-proteinu \rightarrow aktivace adenylátcyklázy \rightarrow zvýšení hladiny cAMP \rightarrow aktivace PKA
- fosforylace/aktivace fosforylázové kinázy
- fosforylace/aktivace glykogenové fosforylázy
- štěpení glykogenu na glukóza-1-fosfát, která je po defosforylaci uvolněna do krve
- PKA zároveň fosforyluje/inaktivuje glykogen syntázu



Signalizace přes inzulínový receptor

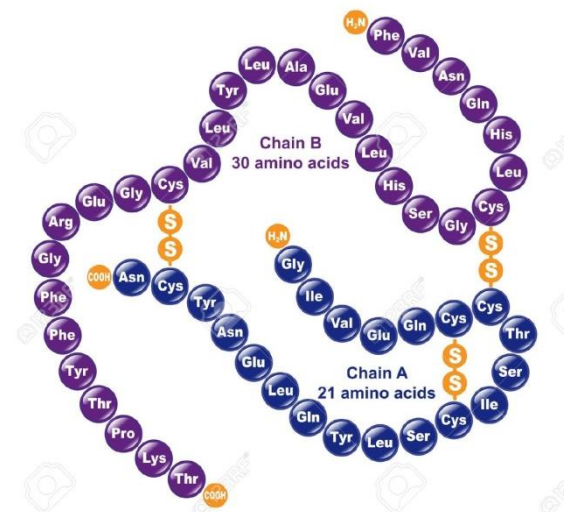
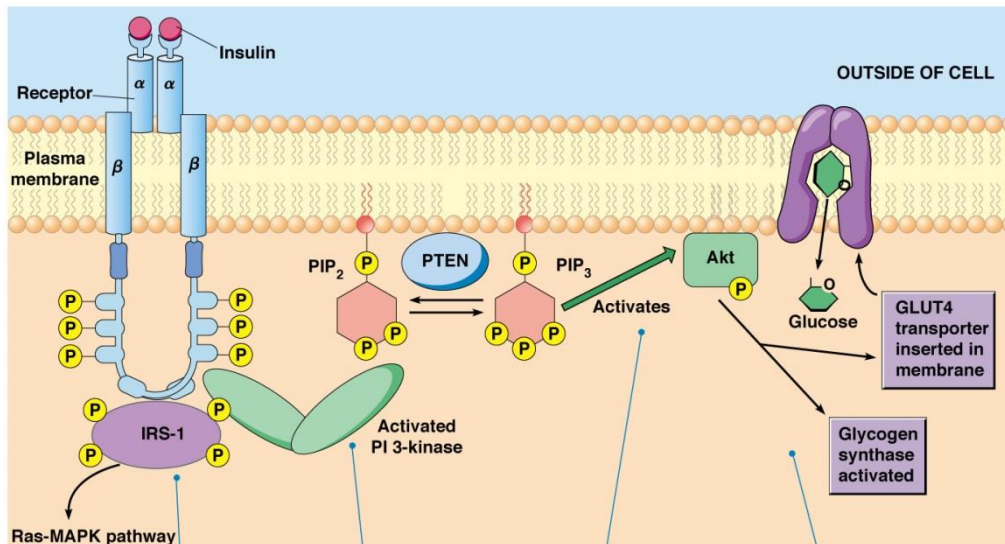
Inzulín - heterodimer, B buňky Langerhansových ostrůvků slinivky břišní

- snižuje hladinu glukózy v krvi, podporuje její využití buňkami a přeměnu na glykogen

Inzulínový receptor - IR, tyrosinproteinkinázový receptor rodiny 2, heterotetramer

Signální dráha

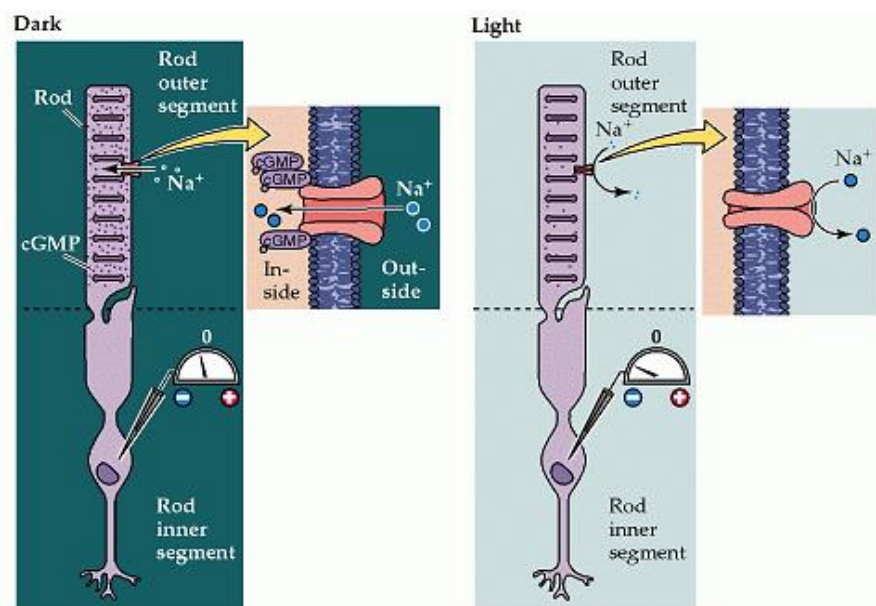
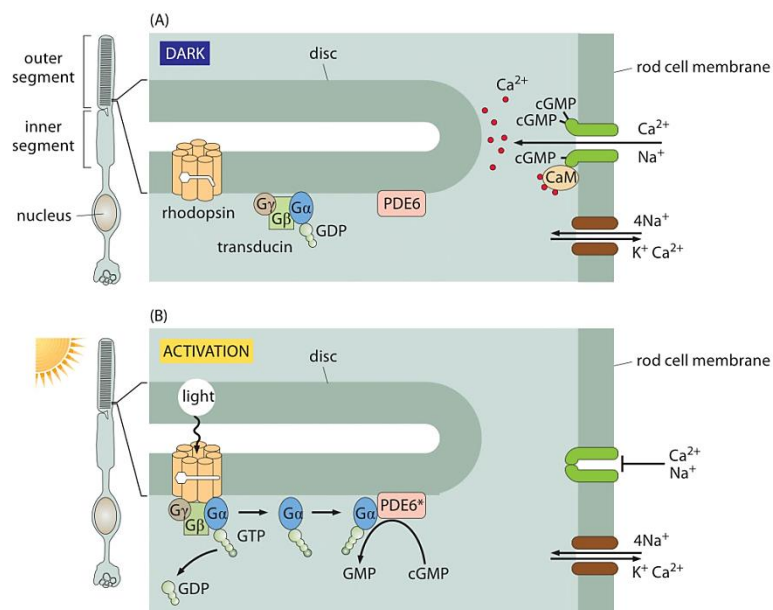
- vazba inzulínu → autofosforylace/aktivace IR → fosforylace/aktivace IRS-1
- na IRS-1 se přes SH2 domény váží
 - i) Grb2-Sos → Ras-Raf-MAPK dráha
 - ii) PI(3)K → tvorba PIP3 → aktivace Akt - translokace glukózového transportéru GLUT4 k membráně - aktivace glykogen syntázy



Nitrobuněčné signální dráhy

Cyklický guanosinmonofosfát (cGMP)

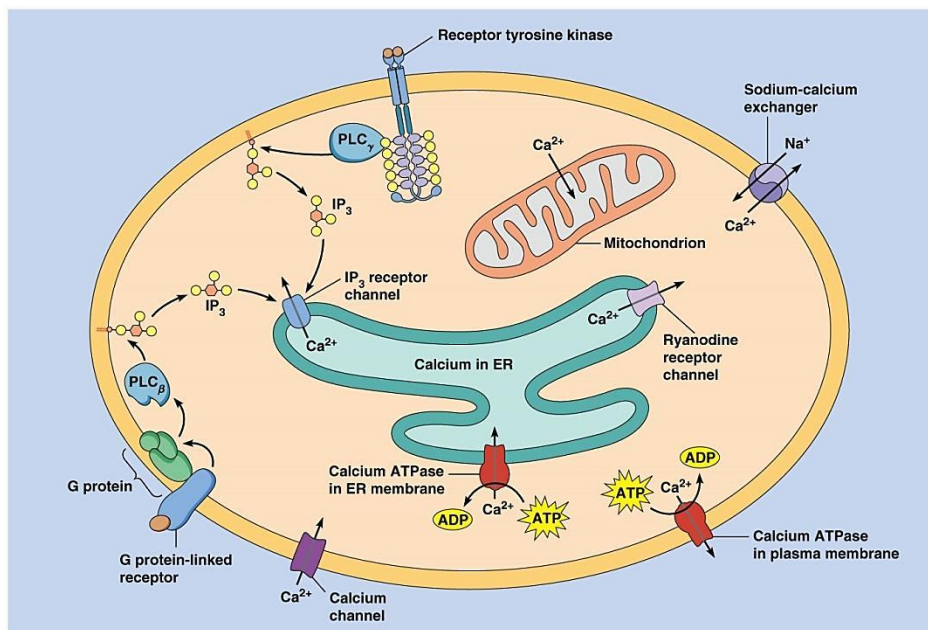
- koncentrace závislá na aktivitě guanylátcyklázy a cGMP fosfodiesterázy
- aktivuje PKG - stimulace iontových kanálů (Ca^{2+} , Na^+)
 - uvolnění hladké svaloviny, dilatace tepen, sekrece Na^+ a vody v trávicí soustavě
- mění propustnost iontových kanálů v tyčinkách oční sítnice
 - tma: guanylátcykláza tvoří cGMP, iontové kanály otevřeny
 - světlo: absorpce fotonu \rightarrow aktivace rodopsinu \rightarrow aktivace G-proteinu \rightarrow aktivace fosfodiesterázy \rightarrow hydrolýza cGMP \rightarrow zavření iontových kanálů \rightarrow hyperpolarizace membrány \rightarrow vizuální signál



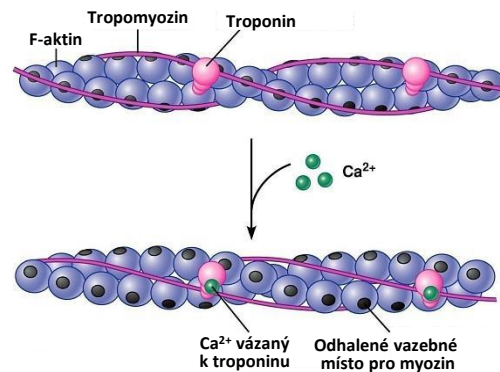
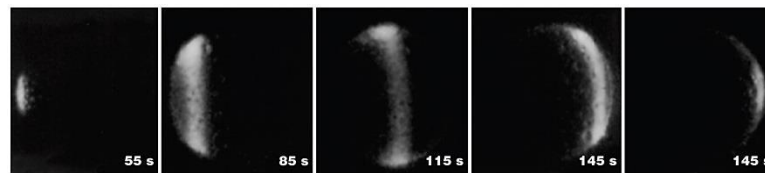
Nitrobuněčné signální dráhy

Dráha Ca^{2+}

- rozdílná koncentrace v cytoplasmě (10^{-7} M) a mimobuněčné tekutině (10^{-3} M)
- buňka jej nepřijímá, aktivně vyčerpává, váže do organel
- zvýšení koncentrace v cytoplasmě aktivuje nitrobuněčný signální mechanismus
 1. depolarizace membrán akčním potenciálem
 2. fosfolipáza C štěpí PIP_2 , vzniklý $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ otvírá Ca^{2+} kanál endoplazmatického retikula
- cílové proteiny - troponin C v buňkách kosterního svalstva (svalová kontrakce)
 - kalmodulin



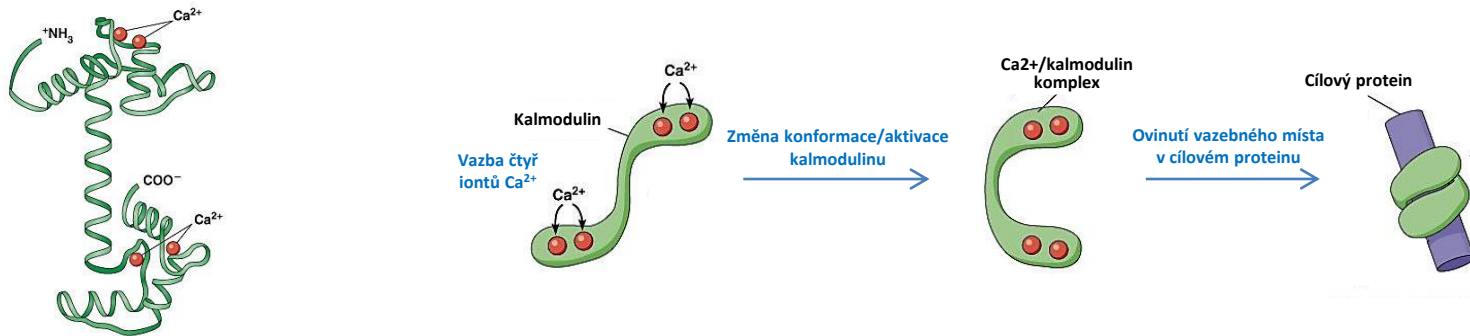
Ca^{2+} signální vlna v oplozeném vajíčku



Nitrobuněčné signální dráhy

Kalmodulin

- dvě globulární domény (vazba Ca^{2+}) spojené flexibilní oblastí (vazba k různým substrátům)
- vazba čtyř iontů Ca^{2+} mění jeho konformaci, vyšší afinita k proteinům, které mění svoji aktivitu
- důležitou cílovou molekulou je CaMKII
- úloha v metabolismu (aktivace fosforylázové kinázy), kontrakci hladké svaloviny (aktivace MLCK), expresi genů (CREB), sekreci neurotransmiterů, zánětu, pohybu buněk, apoptóze



Interakce cAMP a Ca^{2+} drah

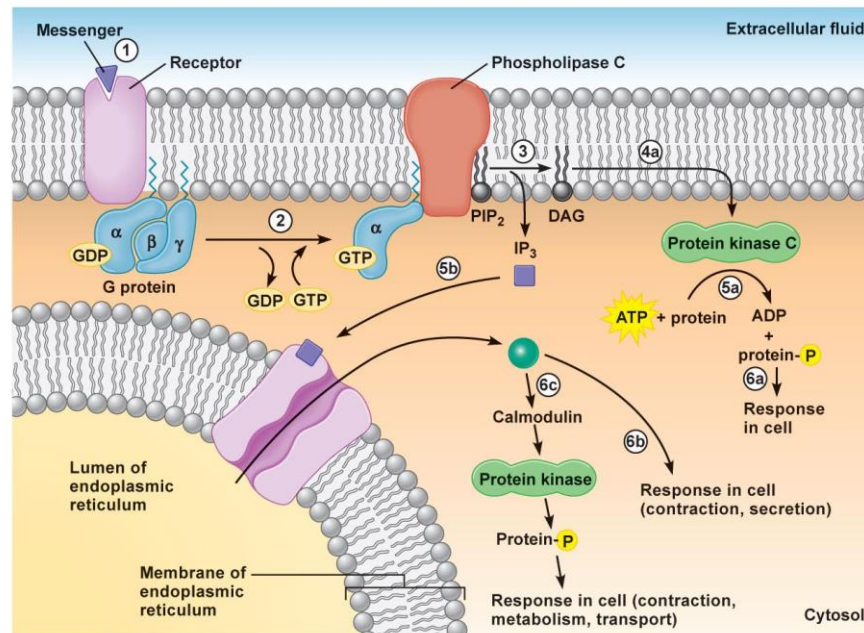
- komplex Ca^{2+} /kalmodulin může vázat a regulovat aktivitu adenylátcyklázy a fosfodiesterázy
- PKA může fosforylovat některé kanály určující obsah Ca^{2+} v cytosolu
- CaMKII může být fosforylována PKA
- PKA a CaMKII často fosforylují aminokyseliny stejného proteinu (např. CREB)

Nitrobuněčné signální dráhy

Dráha inositolových fosfolipidů



- PLC β aktivována G-proteinem z rodiny G α_q
- PLC γ aktivována po vazbě na tyrosinproteinkinázový receptor (SH2 doména)
- Ins(1,4,5)P₃ uvolňuje Ca²⁺ z buněčných zásob
- DAG aktivuje PKC, PI3K



Oxid dusnatý při vazodilataci - mechanismus účinku

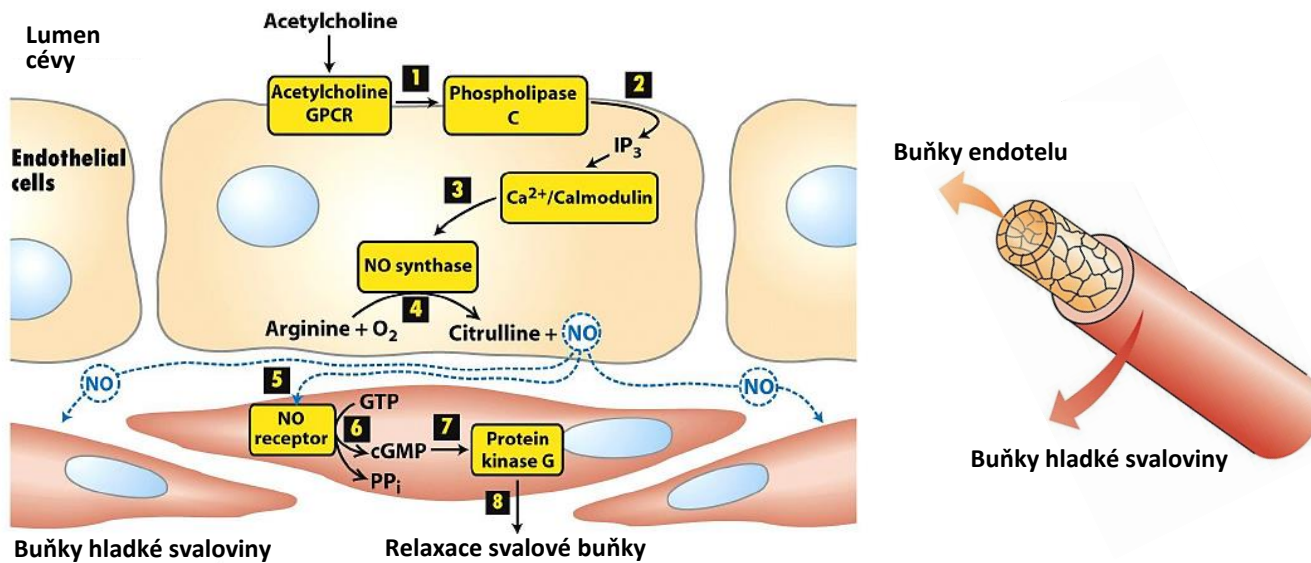
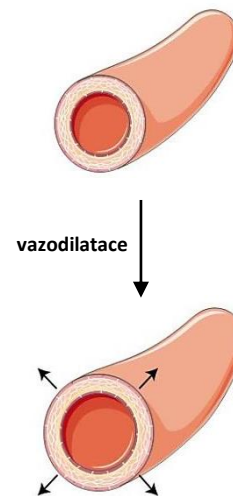
Nervová zakončení signalizující uvolnění hladké svaloviny uvolňují acetylcholin

Buňky endotelu

- vazba acetylcholinu na receptor vázaný na G-protein, aktivace $G\alpha_q$
- aktivace $PLC\beta$, produkce $Ins(1,4,5)P_3$
- uvolnění Ca^{2+} z endoplazmatického retikula, tvorba komplexu Ca^{2+} /kalmodulin
- aktivace NO syntázy, produkce NO, který difunduje k buňkám hladké svaloviny

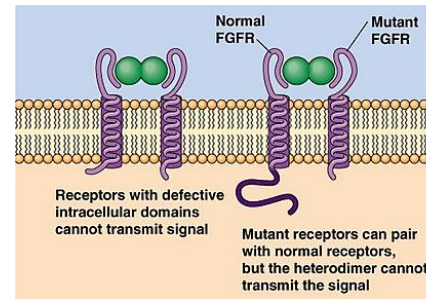
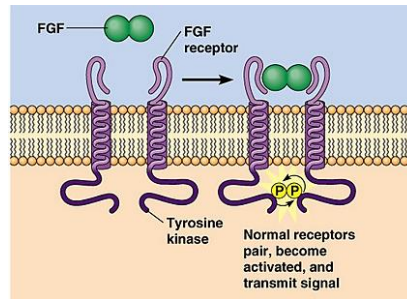
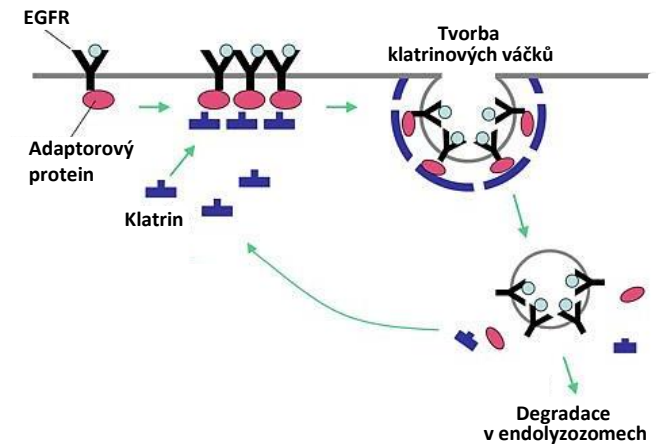
Buňky hladké svaloviny

- vstup NO membránou, aktivace rozpustné guanylátcyklázy, produkce cGMP
- aktivace PKG, fosforylace řady svalových proteinů, relaxace svalové buňky



Utlumení signálních drah

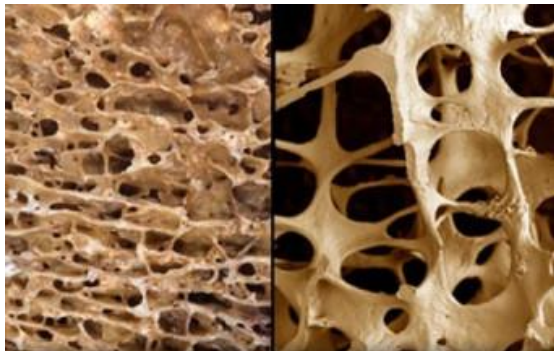
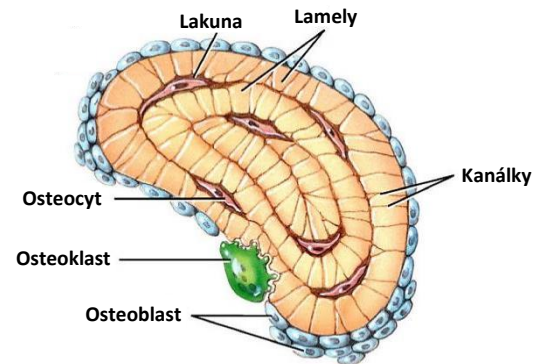
- snížení hladiny hormonů, defosforylace složek signálních drah, degradace sekundárních přenašečů
- nitrobuněčné negativní regulátory (SOCS)
- odstranění receptorů z povrchu buňky endocytózou
 - př. receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) je po vazbě EGF pohlčen do klatrinových váčků, transportován do lysozomů a degradován
- přítomnost mutantních složek signálních drah
 - př. dominantně negativní mutace receptoru pro fibroblastový růstový faktor (FGF)



- sekrece proteinů, které vychytávají hormony
 - tyto proteiny dokáží vázat hormon, ale nejsou schopny aktivovat nitrobuněčnou signalizaci
 - př. kontrola resorpce kostí

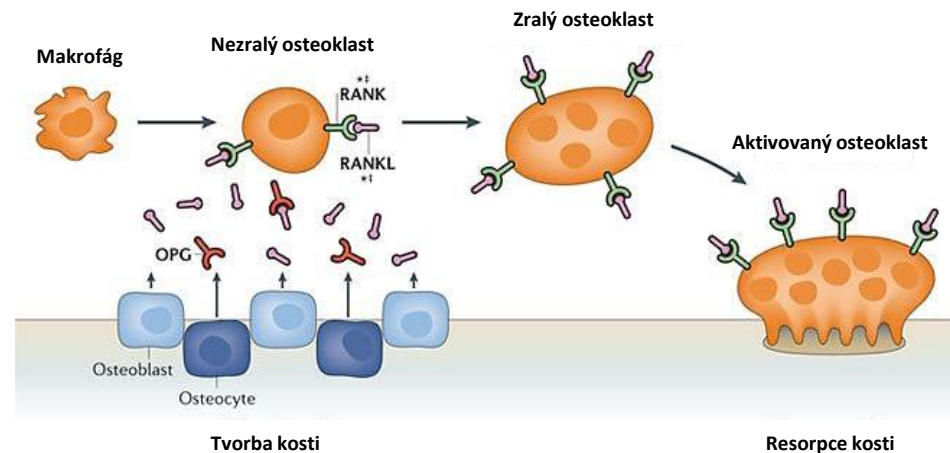
Tvorba kostí u savců

- osteoklasty: odbourávání kostní hmoty, receptor RANK
- osteoblasty: tvorba mezibuněčné hmoty
produkce ligandu RANKL a osteoprotegerinu (OPG)
- osteocyty: klidová forma osteoblastu
- vazba RANKL na RANK aktivuje diferenciaci osteoklastů, resorpci kostí
- útlum resorpce kosti přes sekreci OPG, který brání vazbě RANKL na RANK
- poruchy tvorby kostí u člověka
 - i) osteoporóza: přílišná resorpce kosti, nedostatečná denzita kostní tkáně, zvýšená křehkost kostí
 - ii) osteopetróza: abnormálně nízká resorpce kosti, zvýšená denzita kostní tkáně
lámání kostí, poškození kostní dřeně



Normální stav

Osteoporóza



Zvídavé otázky

Buňka dokáže rychle odpovědět na extracelulární signál pokud:

- A. buňka nevyžaduje receptor pro signální molekulu
- B. odpověď nevyžaduje, aby se změnily proteiny v cílové buňce
- C. odpověď nevyžaduje, aby se spustila exprese genů či syntéza proteinů

Co potřebuje cílová buňka, aby mohla odpovědět na extracelulární signální molekulu?

- A. přístup k signální molekule
- B. přítomnost odpovídajícího receptoru
- C. odpovídající intracelulární signální dráhu
- D. vše z uvedeného

Po vazbě ligandu se tyrosinproteinkinázové receptory aktivují dimerizací, což umožňuje:

- A. každý polypeptidový řetězec dimeru fosforyluje sám sebe na tyrosinu cytoplazmatické domény
- B. každý polypeptidový řetězec dimeru fosforyluje druhý řetězec na tyrosinu cytoplazmatické domény
- C. internalizaci receptoru, což umožní fosforylaci a aktivaci různých intracelulárních signálních proteinů

Jaká je funkce diacylglycerolu (DAG) v dráze inositolových fosfolipidů?

- A. Aktivuje fosfolipázu C (PLC)
- B. Sám o sobě váže a aktivuje proteinkinázu C (PKC)
- C. Spolu s Ca^{2+} váže PKC z cytosolu k plazmatické membráně a aktivuje ji
- D. Váže se k Ca^{2+} kanálům, otevírá je a umožňuje extracelulárními Ca^{2+} dostat se do buňky

Mutantní Ras protein, který se často vyskytuje u nádorů, nemůže hydrolyzovat GTP na GDP a proto:

- A. se nemůže zapnout
- B. se nemůže vypnout
- C. nemůže být degradován
- D. je schopný přímo aktivovat MAPK dráhu

Zvídavé otázky

Každý extracelulární signál indukuje podobnou odpověď v rozdílných cílových buňkách (ANO / NE)

Jaká je funkce inositol-1,4,5-trisfosfátu (Ins(1,4,5)P₃) v dráze inositolových fosfolipidů?

- A. vytváří díry do membrány endoplazmatického retikula (ER), čímž vypouští Ca²⁺ z ER do cytoplazmy
- B. váže se k Ca²⁺ kanálům v membráně ER, čímž je otevírá a vypouští Ca²⁺ z ER do cytoplazmy
- C. Přímo aktivuje proteinkinázu C (PKC)
- D. Aktivuje fosfolipázu C (PLC)

Když je adenylát cykláza aktivována přes receptor vázaný na G-protein, tak:

- A. mění AMP na cAMP
- B. mění ADP na cAMP
- C. mění ATP na cAMP
- D. mění cAMP na AMP

Protein Ras je aktivován Ras-aktivačním proteinem, který:

- A. způsobuje vazbu Ras ke G-proteinu
- B. fosforyluje Ras
- C. defosforyluje Ras
- D. vyvolává u Ras výměnu GDP za GTP

Paralelní intracelulární signální dráhy mohou interagovat mimojiné proto, že proteinkinázy z jedné dráhy mohou fosforylovat a regulovat proteiny z jiných drah (ANO / NE)

Která z následujících molekul není malou intracelulární signální molekulou (sekundárním přenašečem)?

- A. cAMP
- B. Fosfolipáza C
- C. Inositol-1,4,5-trisfosfát
- D. Diacylglycerol

