

# **Molekulární biologie pro informatiky - 8**

## **Molekulární mechanismy signalizace**

# Signalizace

## Proces signalizace:

1. Syntéza a uvolnění signální molekuly signalizační buňkou.
2. Transport sign. molekuly do cílové buňky.
3. Detekce signálu specifickým receptorovým proteinem.
4. Spuštění jedné nebo více signálních drah (transdukce signálu).
5. Specifický účinek na buněčný metabolismus, vývoj, diferenciaci atd.
6. Odstranění/ukončení signálu

**Signální molekula** (signál) zprostředkovává a předává informaci.

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

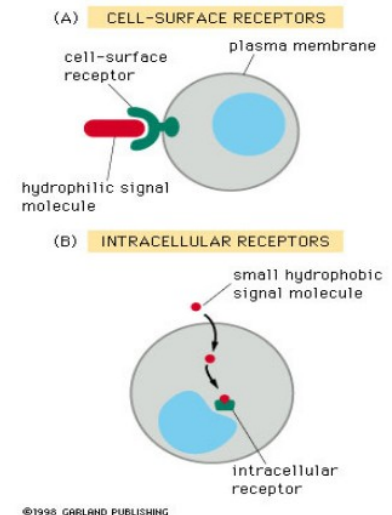
Signály **lipofilní**: vazba na intracelulární receptory, dlouhodobá odpověď.

## Signalizace:

- **extracelulární** - přenos signálu na cílovou molekulu mimo buňku,
- **intracelulární** - přenos signálu na cílovou molekulu uvnitř buňky.

**Receptory:** vazba ligandu → konformační změna → převod signálu

- **extracelulární**
- **intracelulární**



# Signální molekuly (ligandy)

---

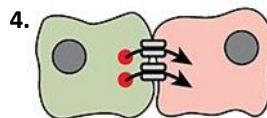
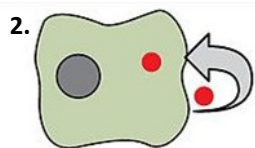
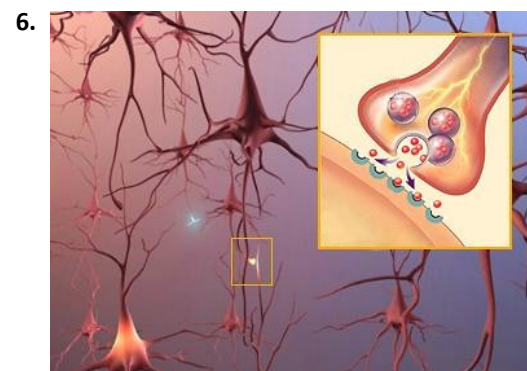
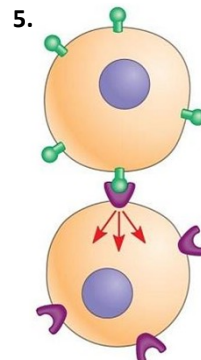
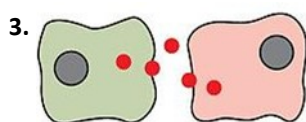
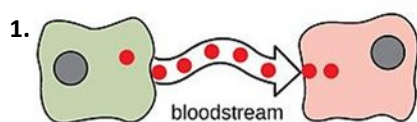
## Typy signálních molekul:

- proteiny, peptidy, aminokyseliny a jejich deriváty - **hydrofilní**, nukleotidy, lipidy, steroidy, mastné kyseliny, plyny (např. NO, CO<sub>2</sub>)
- hormony - odvozené od aminokyselin (adrenalin, thyroxin - **lipofilní**)
  - peptidy a proteiny (inzulín, glukagon, oxytocin)
  - steroidní (testosteron, estrogen, kortizol) - **lipofilní**
  - vitamin D, kyselina retinová
- cytokiny - interleukiny, interferony
  - nádorové nekrotické faktory (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TNF- $\gamma$ )
  - růstové faktory (EGF, PDGF, IGF-1, GM-CSF, GHF, NGF)
- nervové mediátory (acetylcholin, GABA)
- lokální mediátory (histamin, oxid dusnatý)

# Extracelulární signalizace

Přenos signálu ze zdrojové buňky na receptor buňky cílové **na různou vzdálenost**:

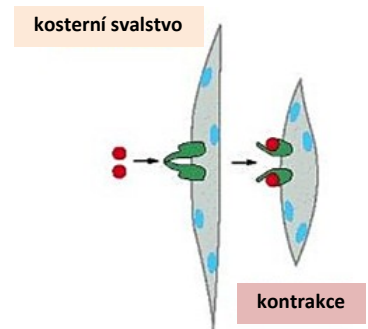
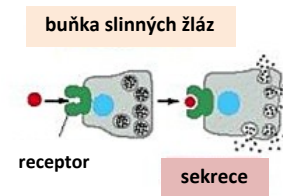
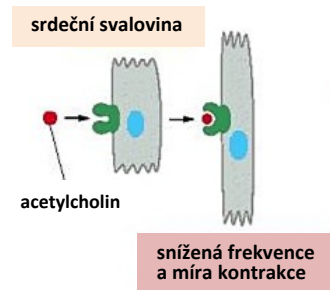
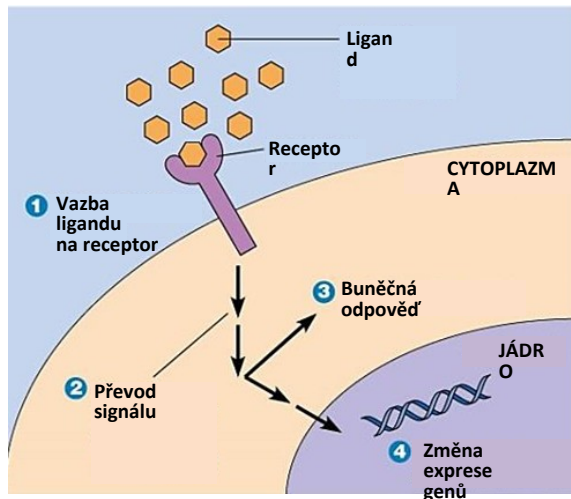
1. **endokrinní** - buňky vzdáleny, přenos signálu krví (např. hormony)
2. **autokrinní** - stejná buňka
3. **parakrinní** - produkce signálu do tělních tekutin, lokální účinek (např. histamin, NO)
4. **dutý spoj** - buňky v těsném kontaktu, tubulární struktura (např.  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP)
5. **přímý kontakt** - ligand i receptor na povrchu buněk v přímého kontaktu (např. FasL)
6. **synapse** - nervová soustava, permeabilita membrán (např. acetylcholin)



# Signalizace - účinek

## 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

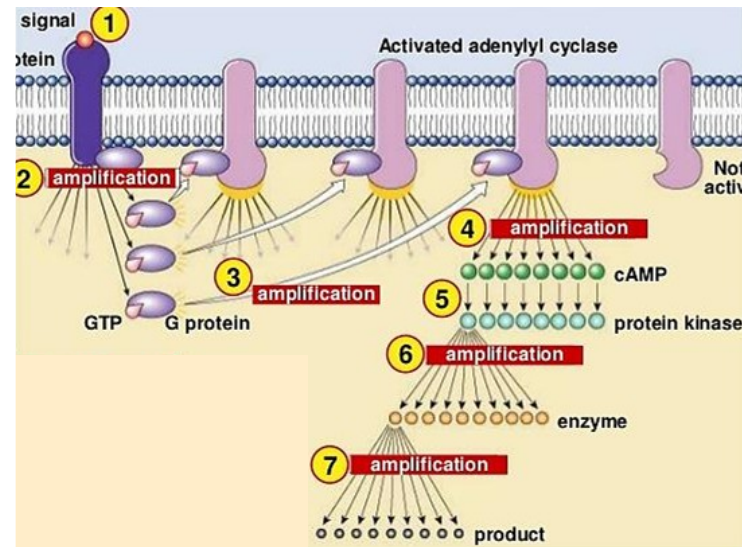
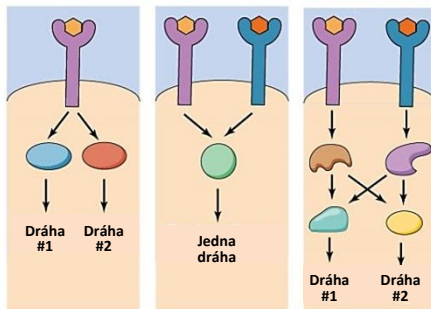
**Druhé (sekundární) přenašeče signálu:** malé molekuly produkované uvnitř buňky po vazbě ligandu na receptor

Patří sem: cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), inositol-1,4,5-tris-fosfát, 1,2-diacylglycerol, calcium, NO, kyslíkové radikály.

**Intracelulární signalizace zahrnuje**

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

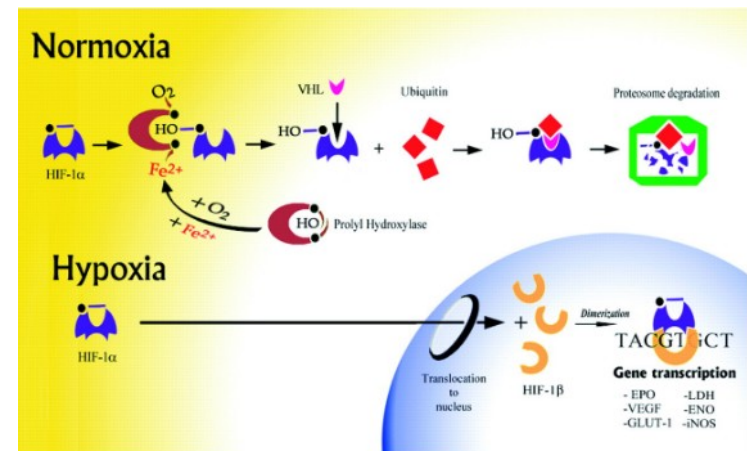
Po přijetí signálu se rovnováha signálních molekul velmi rychle obnovuje.



# Intracelulární signalizace

Do buněčného jádra může prostupovat skrze jadernou membránu: ligand, receptor, transkripční faktor (TF), jiná signální molekula (druhý přenašeč signálu - posel).

- receptory steroidních a tyroidních hormonů, vitamínu D, kyseliny retinové, oxidu dusnatého
- difuze **ligandu** pro jaderný receptor (např. receptor pro vitamin D, kyseliny retinové, thyroxin) cytoplazmatickou membránou → vazba na receptor → změna konformace receptoru → regulace transkripce cílových genů
- difuze jaderného **receptoru** (např. receptor pro glukokortikoidy, estrogen)
- difuze **TF** (cytoplazmatický receptor aktivuje transkripční faktor, který translokuje do jádra) např. JAK/STAT → tvorba cytokinů
- jiná signální molekula - např. normoxie/hypoxie pomocí Hypoxia-inducible factor (HIF)



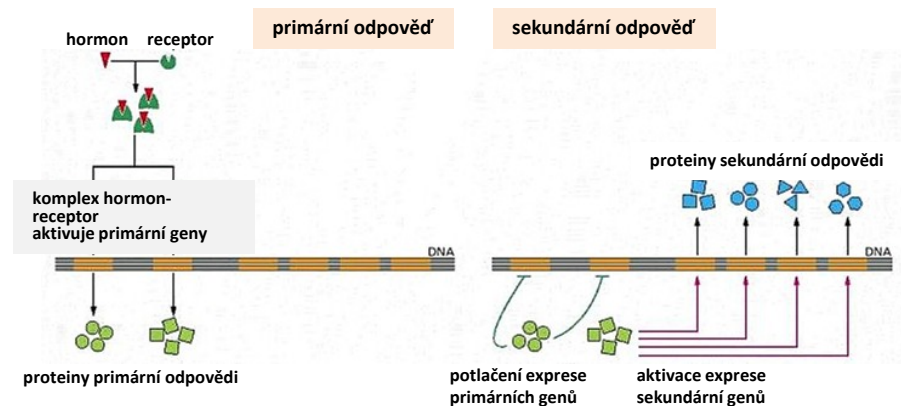
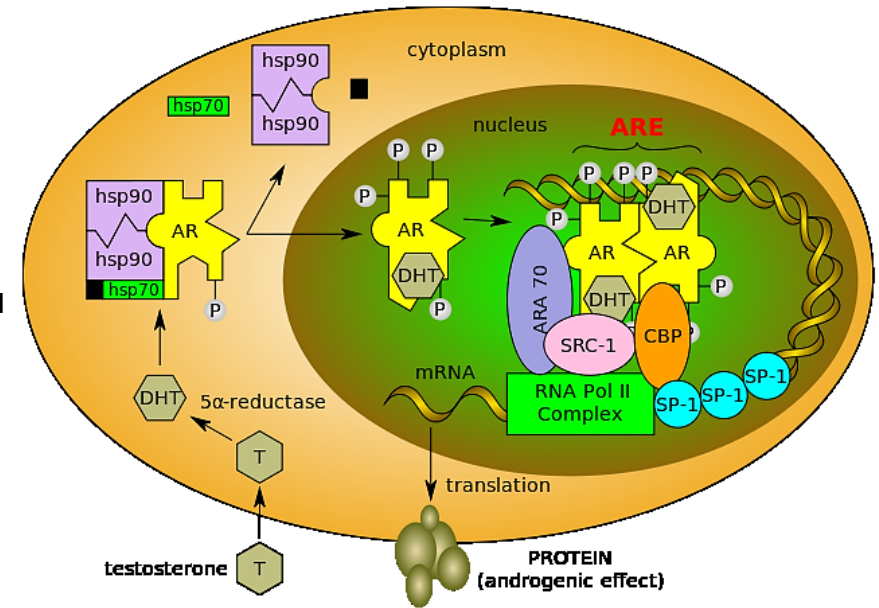
# Intracelulární receptory

## Funkční domény receptorů

- doména pro vazbu ligandu
- doména pro dimerizaci
- aktivační doména - vazba k TFIID, TFIIB
- DNA vazebná doména - motiv dvou zinkových prstů

## 1. Cytoplazmatické receptory

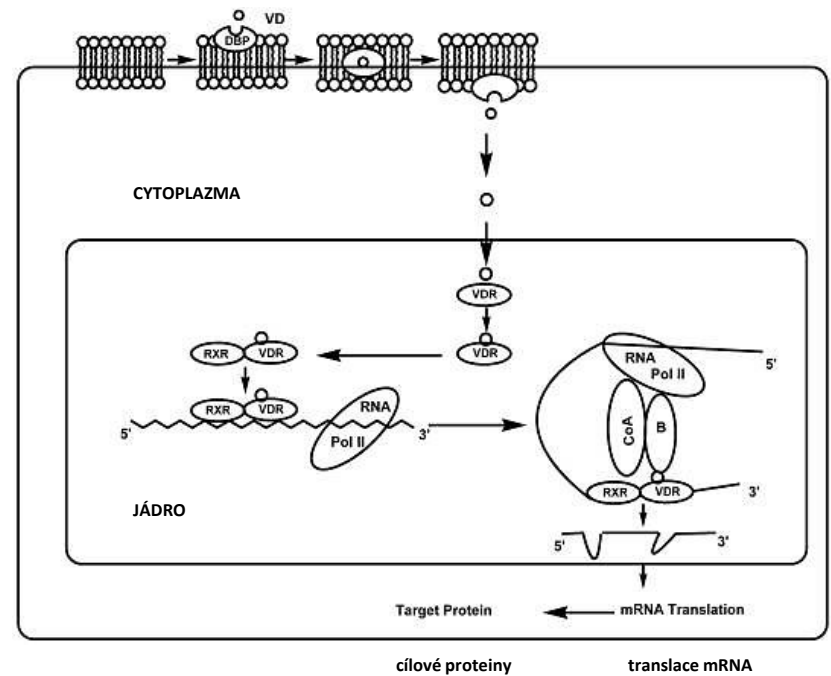
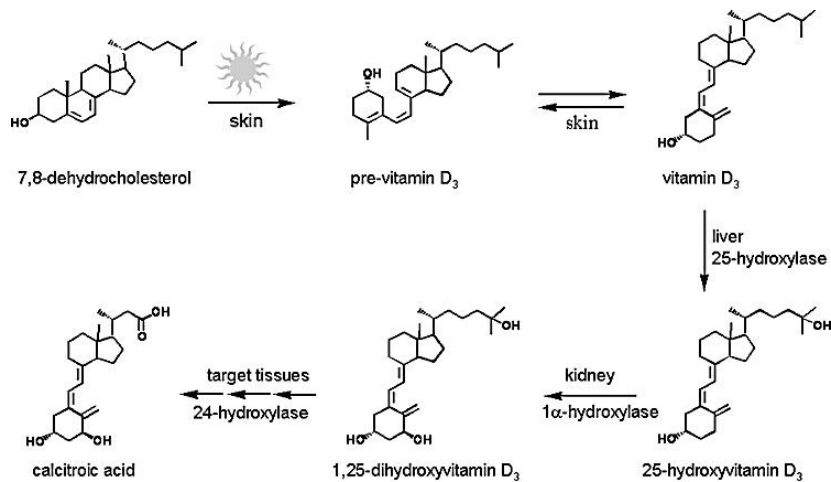
- steroidní hormony, glukokortikoidy, testosteron
- vazba HSP90
- tvorba homodimeru, přechod do jádra, aktivace příslušných genů
- př. androgenní receptor
- dvoustupňová reakce na steroidní hormony



# Intracelulární receptory

## 2. jaderné receptory

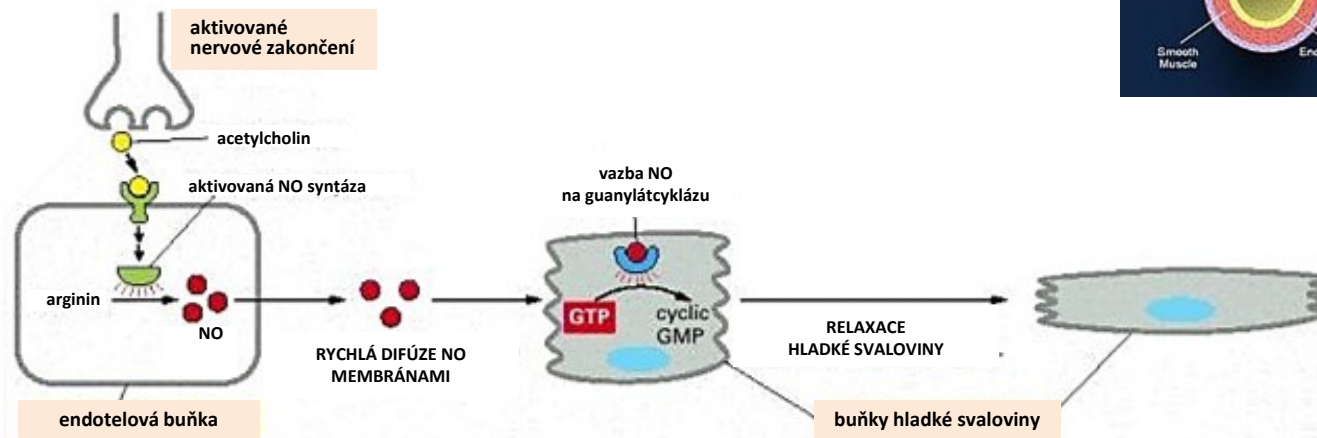
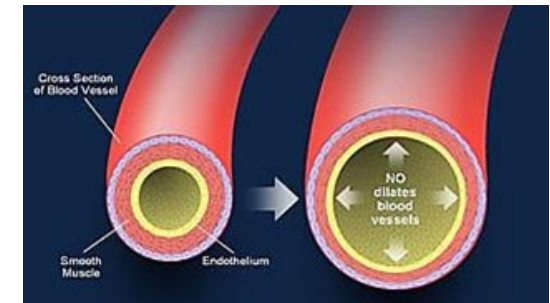
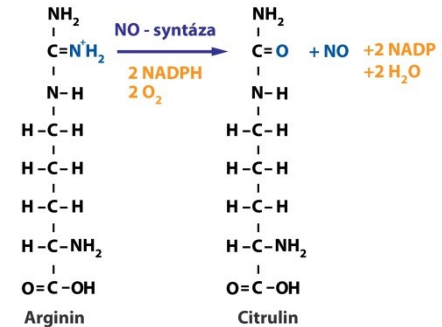
- tyroidní hormony, vit D, kyselina retinová
- tvoří heterodimery (RXR)
- př. vitamín D - v krvi vázán na DBP protein  
- jaderný receptor VDR



# Intracelulární receptory

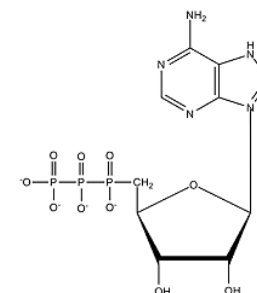
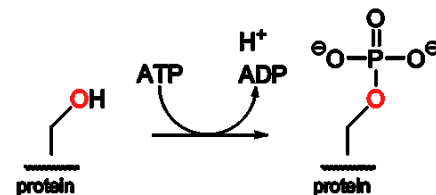
## Oxid dusnatý (NO)

- parakrinní signál, volný průnik přes membrány buněk
- NO syntáza - deaminace argininu
- rychlý, lokální účinek
- 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

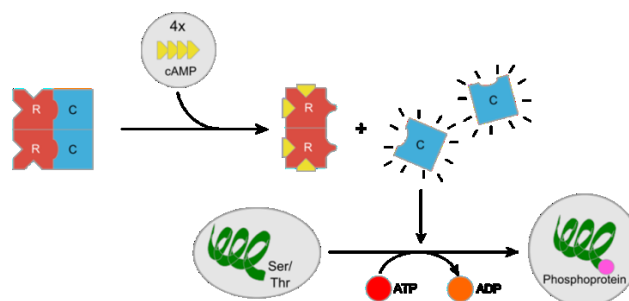
- **fosforylace** - vazba fosfátové skupiny na AK
- jako donor fosfátové skupiny slouží ATP, vznik ADP
- tyrosinkinázy - vazba fosfátu na fenolickou skupinu Tyr
- serin/treoninkinázy - vazba fosfátu na hydroxylovou skupinu Ser či Thr



## SERIN / TREONIN KINÁZY

### 1. proteinkináza A, PKA

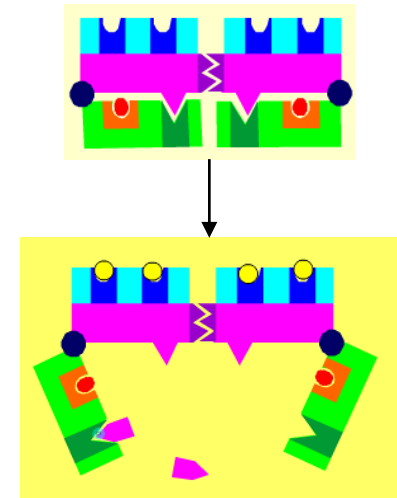
- cAMP dependentní proteinkináza
- homodimer, regulační (R) a katalytická (C) doména
- po vazbě cAMP na R jsou C uvolněny a mohou fosforylovat cílové proteiny
- př. rozklad glykogenu ve svalových vláknech, syntéza somatostatinu v D-buňkách



# Přehled proteinkináz

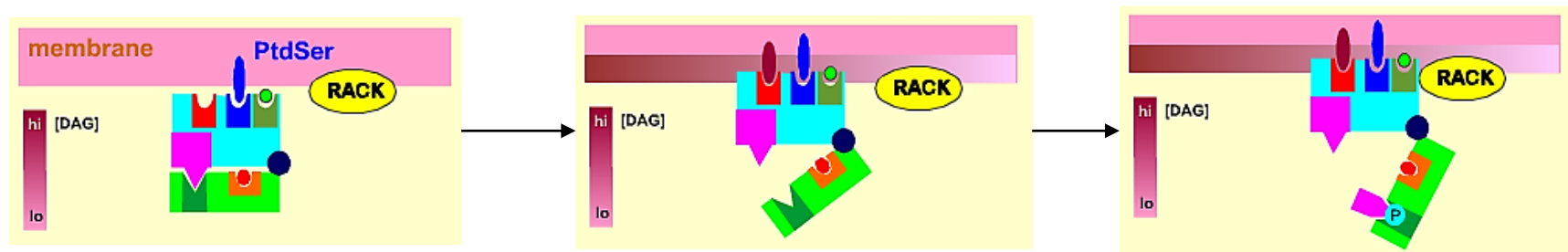
## 2. proteinkináza G, PKG

- cGMP dependentní proteinkináza, homodimer
- regulační doména: dimerizace, vazba cGMP, blok aktivního místa
- katalytická doména: fosforylace
- PKG-I - hladká svalovina, trombocyty, endotely, kardiomyocyty
- PKG-II - buňky ledvin, střevní mukóza, pankreas



## 3. proteinkináza C, PKC

- monomer v blízkosti plazmalemy, aktivace účinkem DAG, PtdSer a  $\text{Ca}^{2+}$
- regulační doména - vazba DAG, PtdSer a  $\text{Ca}^{2+}$ , blok aktivního místa
- katalytická doména - fosforylace



# Přehled proteinkináz

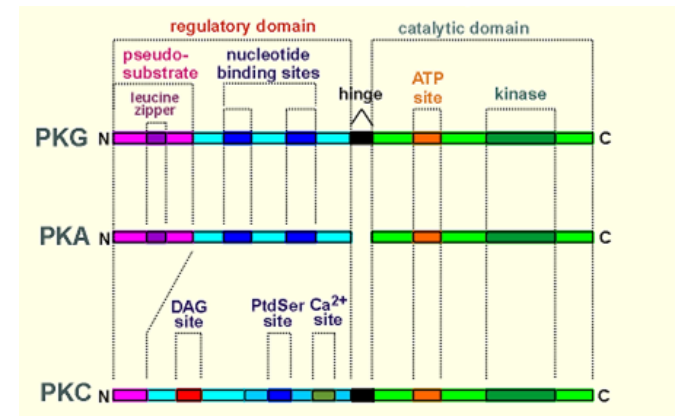
Struktura PKA, PKC a PKG je vysoce příbuzná

## Regulační doména

- pseudosubstrát blokující aktivní místo
- leucinový zip pro dimerizaci
- vazebná místa pro ligandy

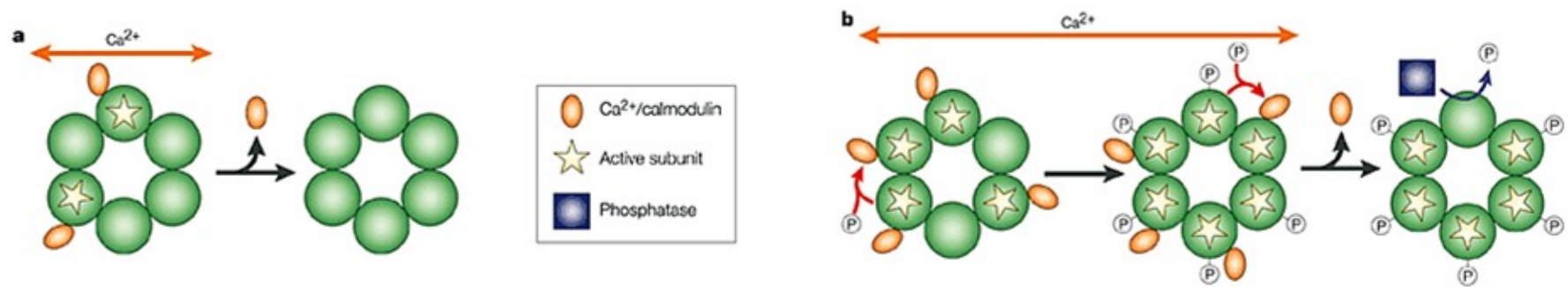
## Katalytická doména

- aktivní místo enzymu s kinázovou aktivitou
- vazba ATP



## 4. Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin dependentní proteinkináza II (CaMKII)

- regulována komplexem Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin, autofosforylace
- katalytická doména - fosforylace
- regulační doména - pseudosubstrát, vazba monomerů do multimerů
- specializované CaMKII - př. kináza lehkého řetězce myosinu



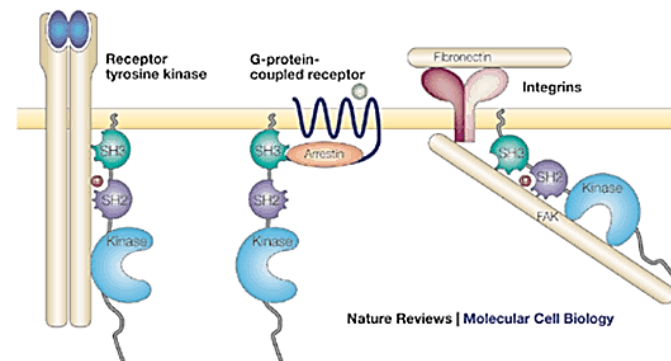
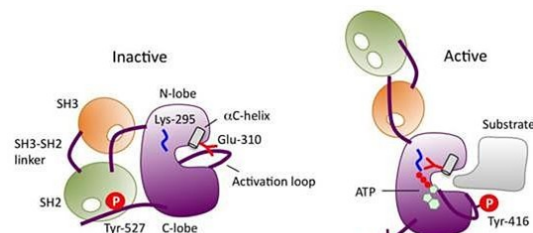
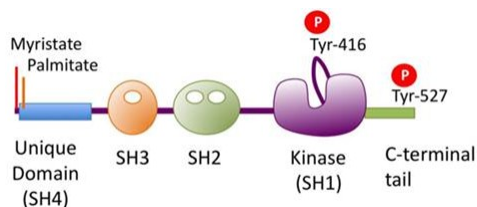
# Přehled proteinkináz

## TYROSIN KINÁZY

- kinázová doména SH1
- receptorové - vázané na plazmatickou membránu, součást receptorů
- nerekceptorové - asociují s receptory, děleny do rodin:

### 1. proteinkinázy Src-rodiny

- SH1; regulační domény SH2, SH3; ukotvení k membráně 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

### 1. MAP-kinázakinázakinázy (MAPKKK)

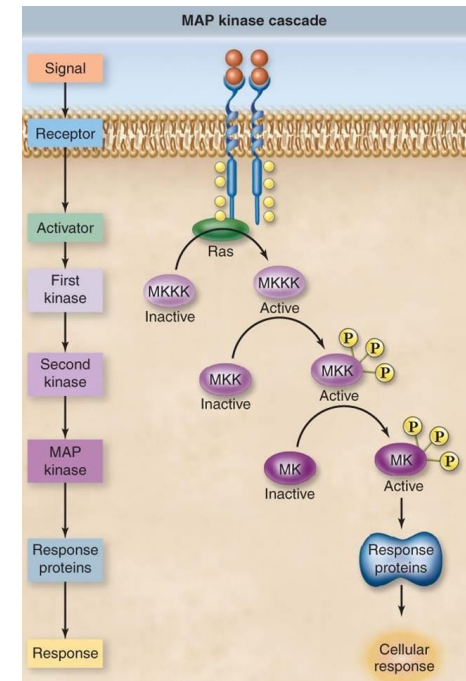
- aktivace MAPKK přes Ser či Thr
- př. Raf-proteinkináza přímo aktivovaná Ras proteinem

### 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)
- $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin d. proteinkináza II (CaMKII)

## NERECEPTOROVÉ TYROSIN KINÁZY

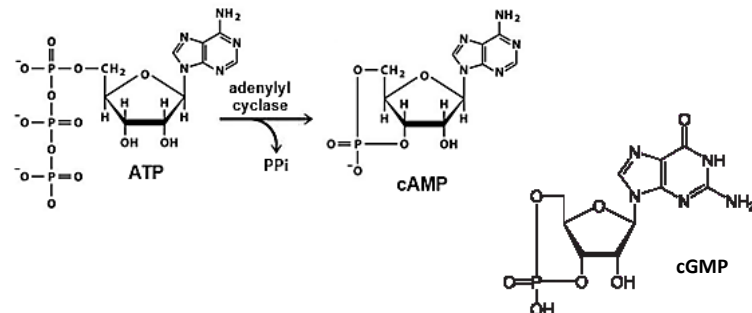
- proteinkinázy Src-rodiny
- proteinkinázy Jak-rodiny
- proteinkinázy Syk-rodiny

# Další enzymy signálních drah

Kde se bere fosfát pro fosforylaci?

## Adenylátcykláza

- $\text{ATP} \rightarrow \text{bisfosfát} + \text{cyklický adenosinmonofosfátu (cAMP)}$



## Guanylátcykláza

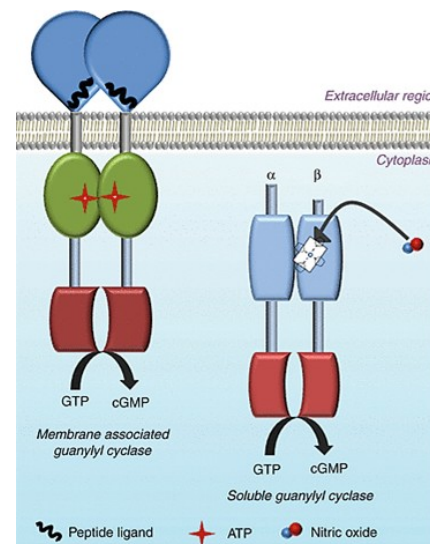
- $\text{GTP} \rightarrow \text{bisfosfát} + \text{cyklický guanosinmonofosfát (cGMP)}$

**Typ 1** - homodimer, receptor pro různé ligandy

- domény: extracelulární, transmembránová, kinázová, cyklázová
- př. ANF: vyloučení  $\text{Na}^+$  a vody z ledvin

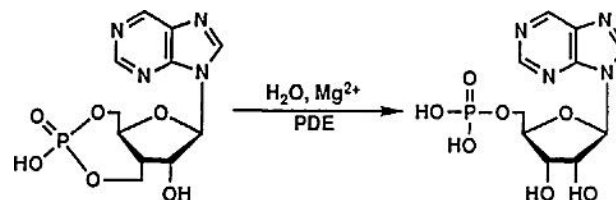
**Typ 2** - rozpustný heterodimer ( $\alpha$ ,  $\beta$ )

- aktivace vazbou NO
- domény: vazebná (hem), cyklázová

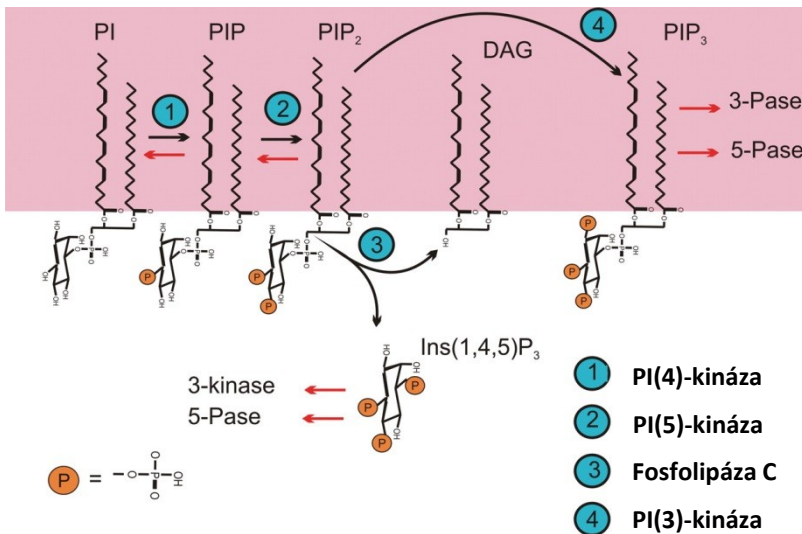


## cAMP-fosfodiesteráza, cGMP-fosfodiesteráza

- hydrolýza cAMP / cGMP na AMP / GMP



# Další enzymy signálních drah



PI      fosfatidylinositol  
 PIP      fosfatidylinositol-4-fosfát  
 PIP<sub>2</sub>      fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát  
 PIP<sub>3</sub>      fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát

DAG      diacylglycerol  
 Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>      inositol-1,4,5-trisfosfát

**Fosfolipáza C (PLC)** hydrolyzuje PIP<sub>2</sub> na DAG a Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>

# Povrchové (extracelulární) 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

- průchodnost kanálů dle přítomnosti ligandu
- změna permeability membrány
- rychlá signalizace na synapsích

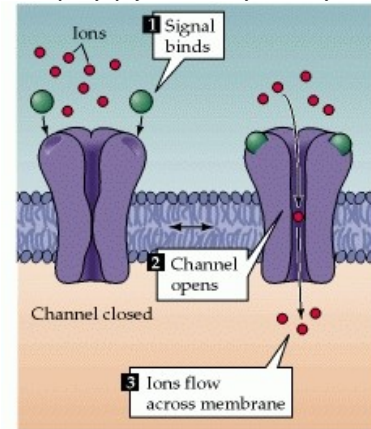
### 2. Katalytické receptory

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

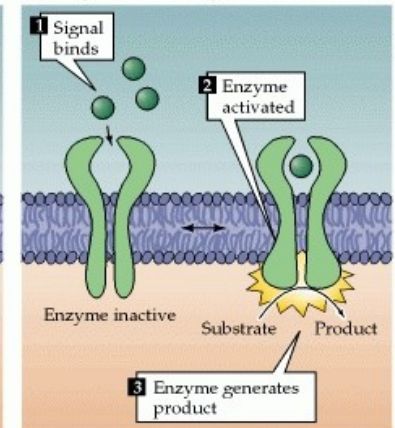
### 3. Receptory vázané na G protein

- přes G-protein ovlivňují aktivitu enzymů nebo průchodnost kanálů

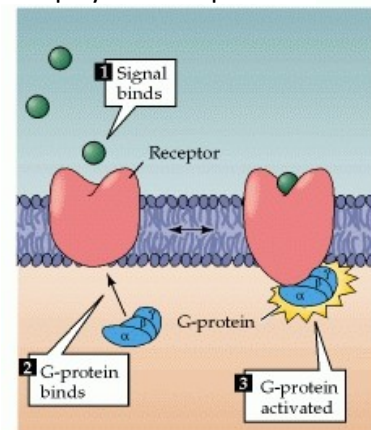
Receptory spojené s iontovými kanály



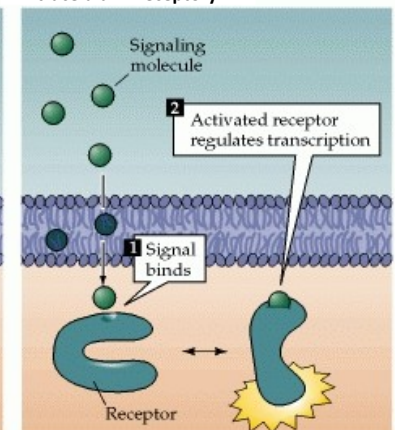
Katalytické receptory



Receptory vázané na G-protein



Intracelulární receptory

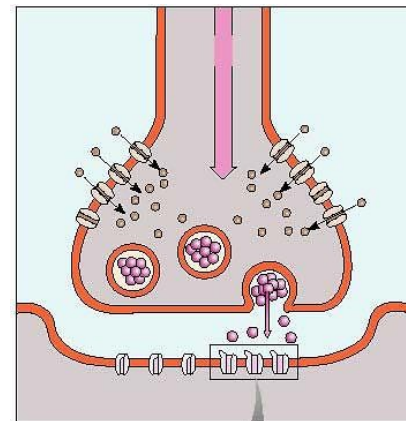
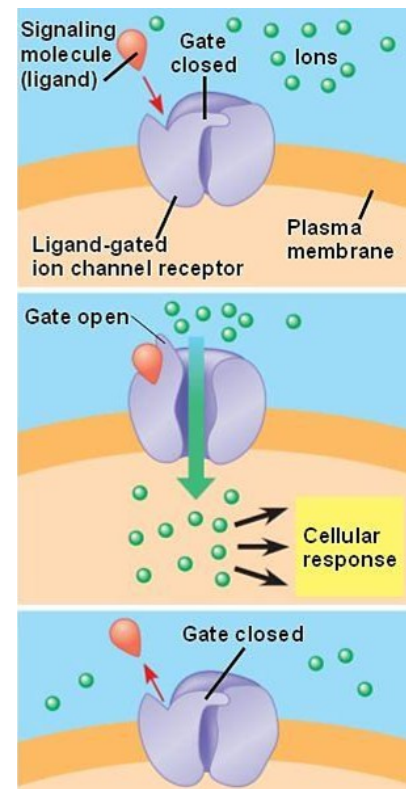


# Receptory spojené s iontovým kanálem

- iontový kanál v plazmatické membráně
- vazba ligandu → konformační změna receptoru → otevření kanálu → pohyb iontů → disociace ligandu a receptoru → uzavření kanálu
- ligandy - neurotransmitery, peptidové hormony
- molekuly procházející kanálem - ionty  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$

## Signalizace na synapsích

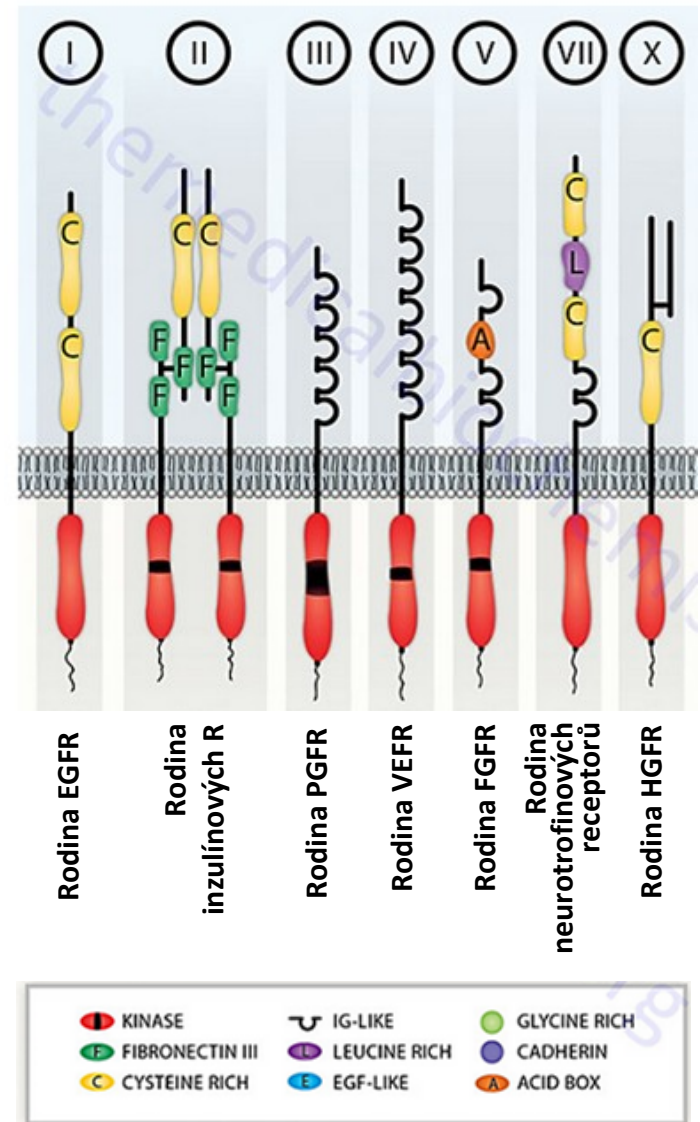
- převod chemických signálů na elektrické
- excitovaný presynaptický neuron vypouští neurotransmiter, který se váže na receptor spojený s iontovým kanálem
- otevřeným kanálem proudí ionty, které vyvolají excitaci postsynaptického neuronu
- př. receptor pro serotonin  
receptor pro GABA ( $\gamma$ -aminomáslená kyselina)



# Katalytické receptory

## TYROSINPROTEINKINÁZOVÉ RECEPTORY

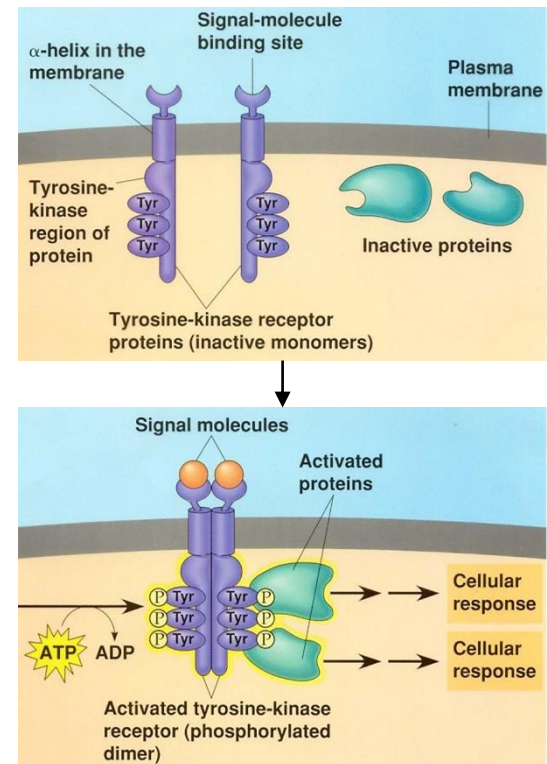
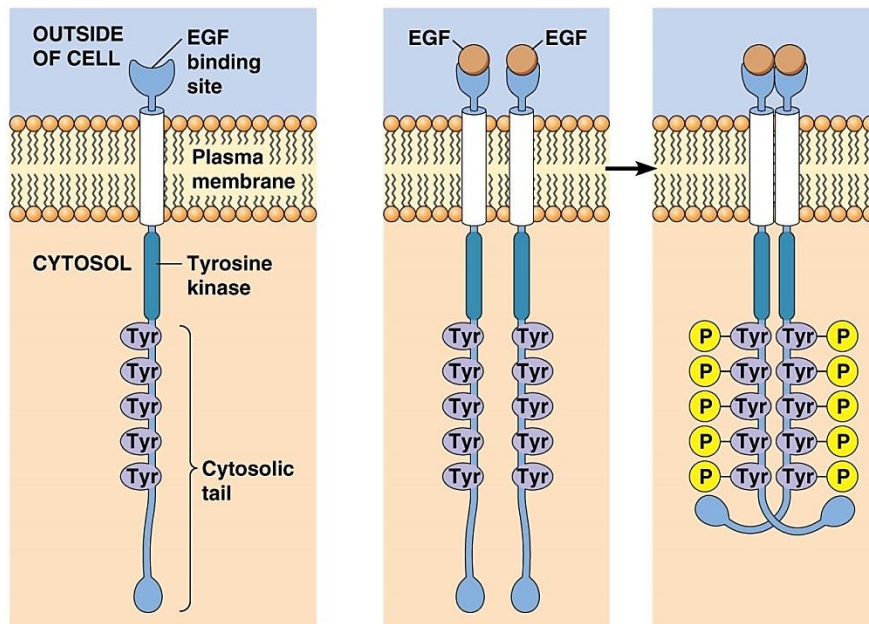
- tyrosinproteinkinázová aktivita regulovaná ligandy
- společné strukturní rysy
- **extracelulární doména**
  - N-konec, glykosylována
  - vazba ligandu
  - určuje typ signálu, na který bude buňka citlivá
- **transmembránová doména**
  - krátká, hydrofobní,  $\alpha$ -šroubovice
- **cytoplazmatická doména**
  - 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

## Aktivace tyrosinproteinkinázových receptorů

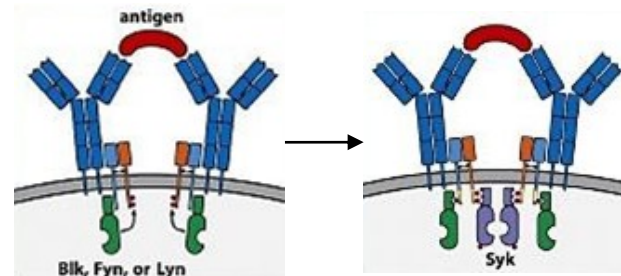
- vazba ligandu v extracelulární doméně
- změna konformace a dimerizace receptoru
- stimulace tyrosinproteinkinázové aktivity, autofosforylace
- P-Tyr jsou vazebnými místy pro intracelulární proteiny, které předávají signál dál



# Katalytické receptory

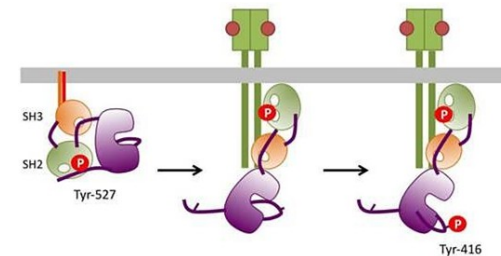
## RECEPTORY S PŘIDRUŽENOU TYROSINPROTEINKINÁZOVOU AKTIVITOU

- 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



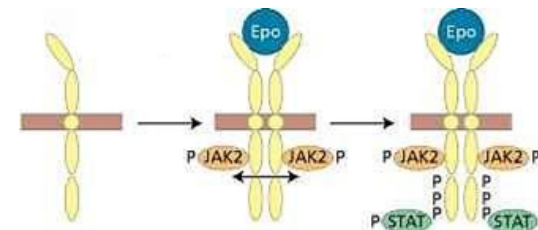
## Receptory asociované s proteinkinázami Src-rodiny

- po dimerizaci receptoru aktivována Src-kináza
- vazba adaptorových molekul na P-Tyr-416



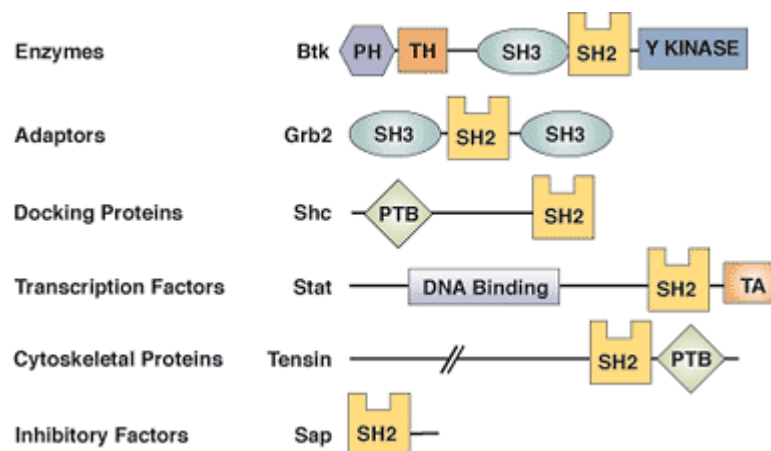
## Receptory asociované s proteinkinázami Jak-rodiny

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



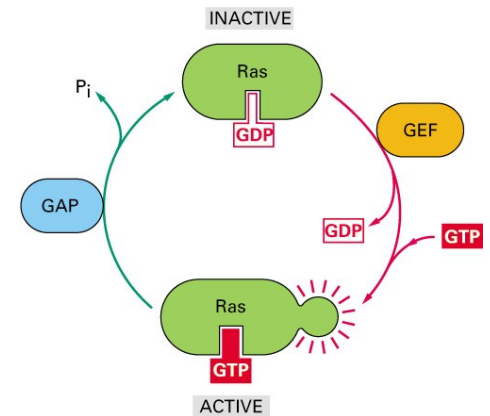
# SH2 doména

- **S**rc **H**omology 2
- strukturní doména (cca 100 AK) u většiny eukaryotických organismů
- vazba na P-Tyr mění konformaci a aktivitu proteinu s SH2
- **podíl na interakcích signálních molekul**
  - spojuje katalytické receptory s dalšími molekulami signálních drah
  - 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



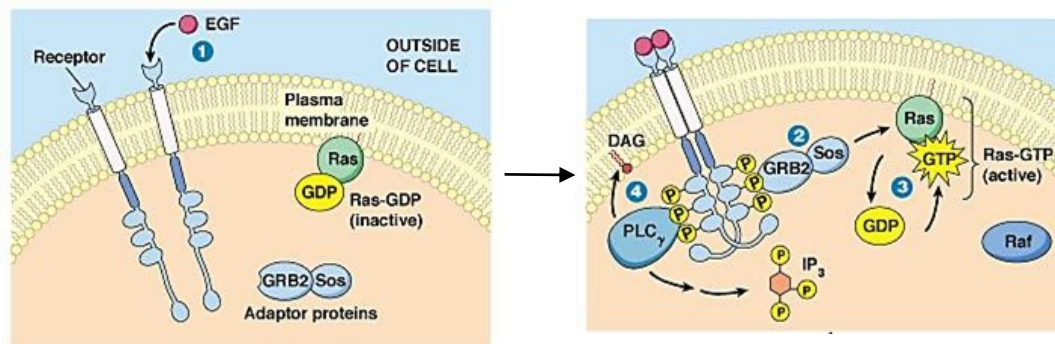
# Rodina proteinů Ras

- monomerní GTPázy, vazba GDP/GTP
- vazba k plazmatické membráně
- aktivace - **GEF faktor**, uvolnění GDP
- Ras váže GTP a přenáší signál na své efekty
- inaktivaci - **GAP protein**, hydrolýza 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

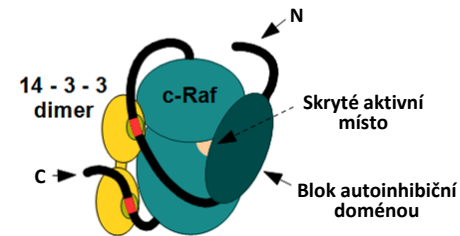
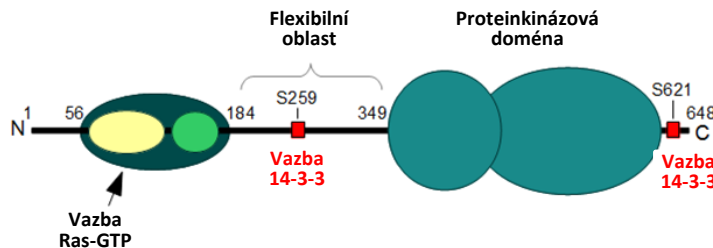
- Grb2 - SH2: aktivovaný tyrosinproteinkinázový receptor
  - SH3: vazba k Sos
- Sos funguje jako GEF a zajišťuje aktivaci Ras



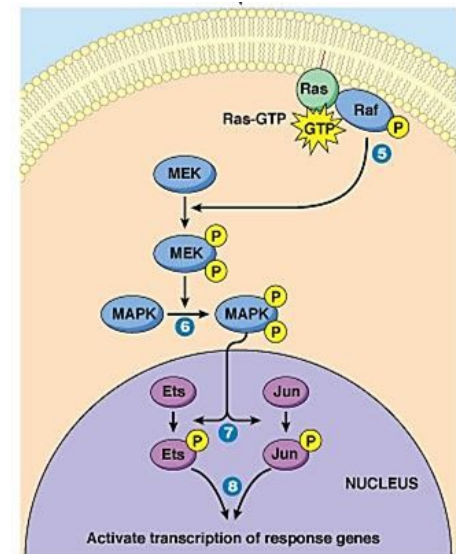
# Rodina proteinů Ras

## 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

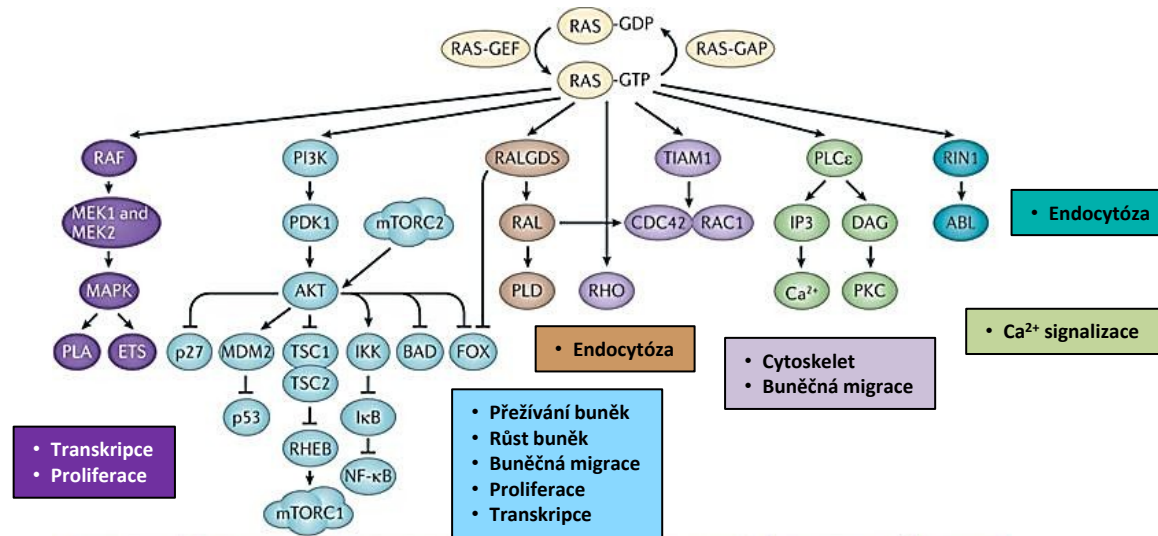


- MAPKK - MEK
- MAPK - ERK, transport do jádra, aktivace transkripčních faktorů
- transkripční faktory indukují transkripci specifických genů
- přenos signálů od mitogenů
- dominantní při signalizaci určující růst, vývoj a diferenciaci buněk



# Rodina proteinů Ras

## Efektory proteinů Ras



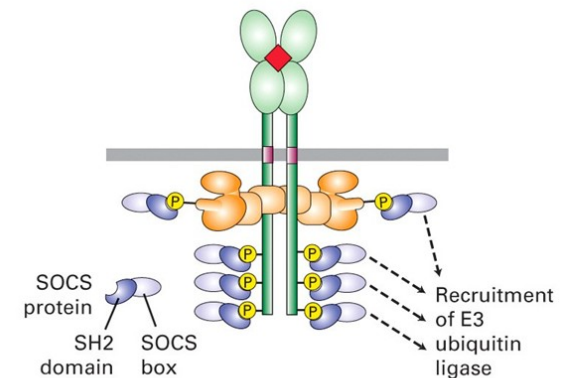
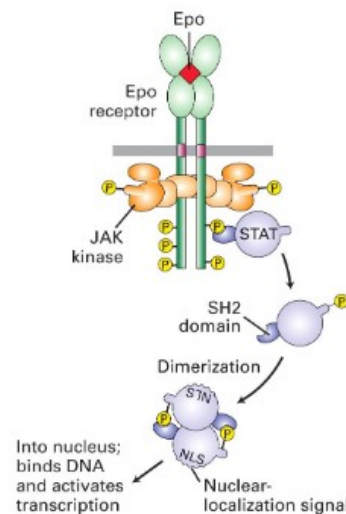
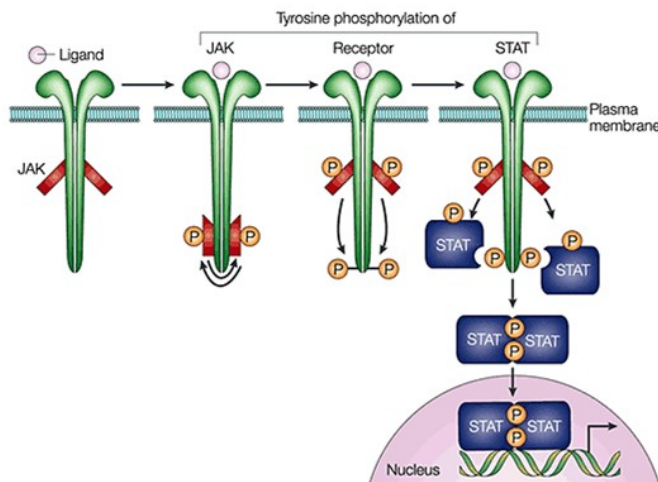
## Nádorová onemocnění

- **stále aktivní Ras-GTP, nemůže se vypnout (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

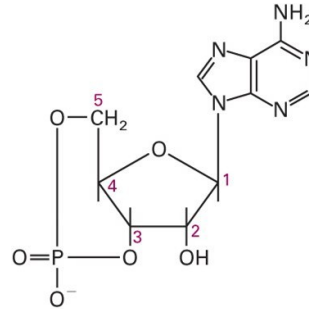
## Signální dráha Jak/STAT

- JAK (Just Another Kinase) - asociuje s receptorem
- STAT (Signal Transducer & Activator of Transcription) - transkripční faktory (SH2), 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

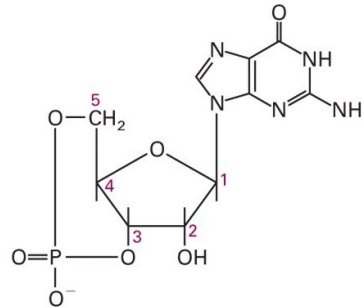


# Sekundární přenašeče signálu (poslové)

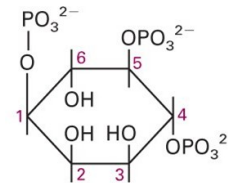
- nízká molekulová hmotnost
- dobře rozpustné
- krátký poločas rozpadu
- intracelulární signály
- **Funkce: přenos, amplifikace a rozdělení signálu z receptorů**
- po přijetí signálu aktivovány enzymy zodpovědné za jejich tvorbu
- jejich koncentrace v buňce stoupá a klesá v závislosti na přítomnosti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



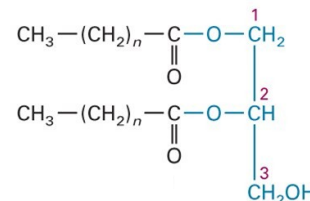
**3', 5'-cyklický  
adenosinmonofosfát (cAMP)  
Aktivuje proteinkinázu A (PKA)**



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



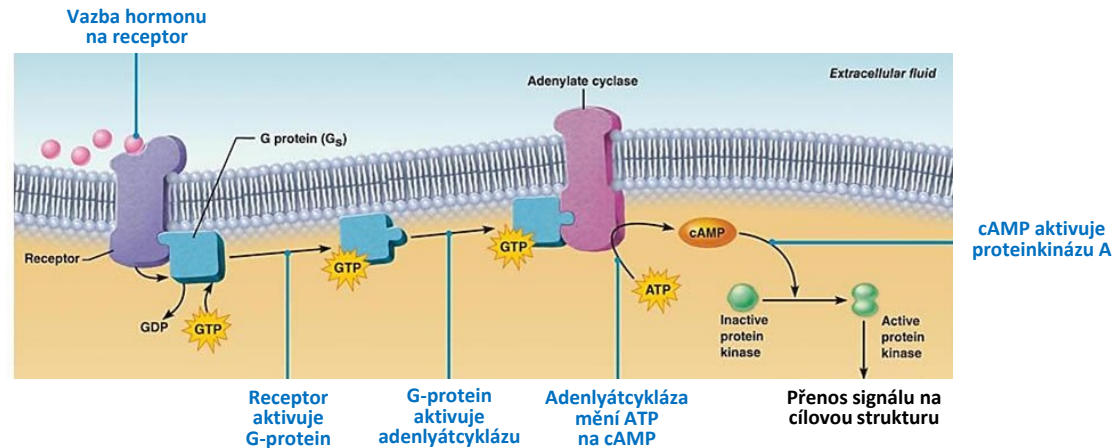
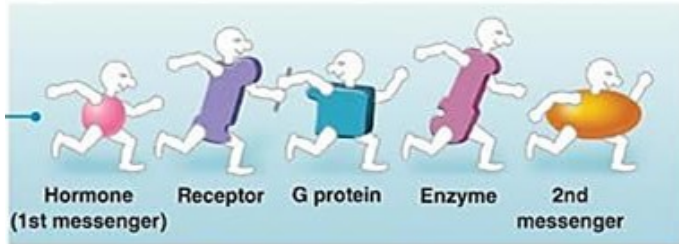
**Inositol-1,4,5-trisfosfát  
(Ins(1,4,5)P3)  
Otevírá Ca<sup>2+</sup> kanály ER**



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

# Receptory vázané na G-protein

## G-proteiny (trimerní)



Podjednotka  $\alpha$  - vazba GDP/GTP, GTPáza

Podjednotky  $\beta\gamma$  - ukotvení v plazmatické membráně

## Základní stav

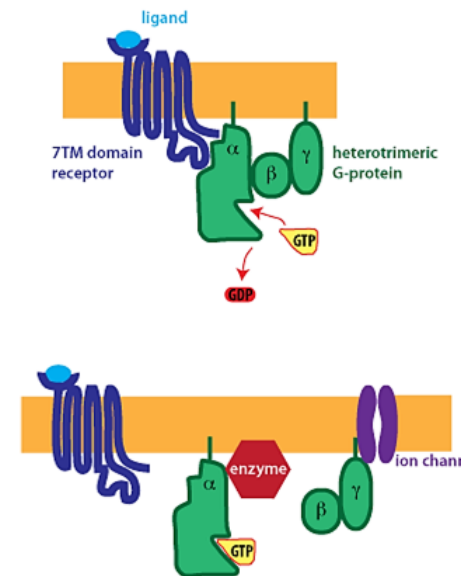
- asociace  $\alpha\beta\gamma$  podjednotek, GDP na  $\alpha$

## Aktivace

- vazba ligandu na receptor vede k výměně GDP za GTP
- disociace  $\alpha$  od  $\beta\gamma$
- $\alpha$  a  $\beta\gamma$  regulují aktivitu specifických cílových proteinů

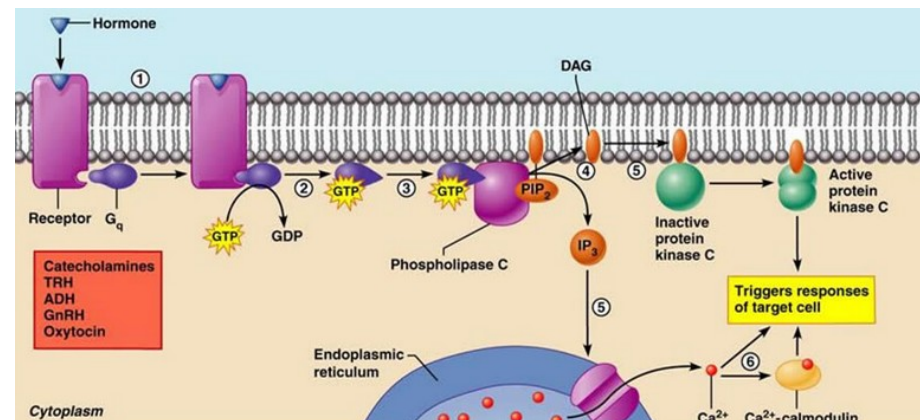
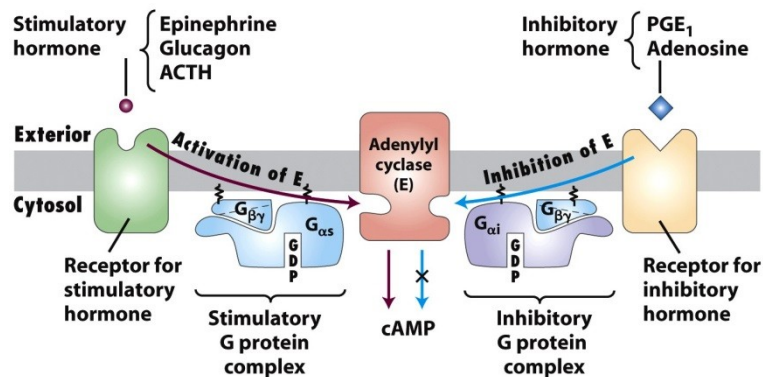
## Inaktivace

- po hydrolýze GTP na GDP, návrat do trimerního stavu



# Receptory vázané na G-protein

|                        |               |                                                                           |
|------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>G<sub>as</sub></b>  | $\alpha$      | aktivace adenylátcyklázy, Ca <sup>2+</sup> kanálů                         |
| <b>G<sub>ai</sub></b>  | $\alpha$      | inaktivace adenylátcyklázy, aktivace fosfolipázy C a cGMP fosfodiesterázy |
|                        | $\beta\gamma$ | aktivace K <sup>+</sup> kanálů a fosfolipázy C                            |
| <b>G<sub>aq</sub></b>  | $\alpha$      | aktivace fosfolipázy C                                                    |
| <b>G<sub>α12</sub></b> | $\alpha$      | aktivace Rho                                                              |



## Efektory

- adenylátcykláza - nárůst cAMP - aktivace PKA, regulace iontových kanálů
- fosfolipáza C - vznik DAG, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> - aktivace PKC, otevření Ca<sup>2+</sup> kanálů
- Ca<sup>2+</sup> kanál

# Receptory vázané na G-protein

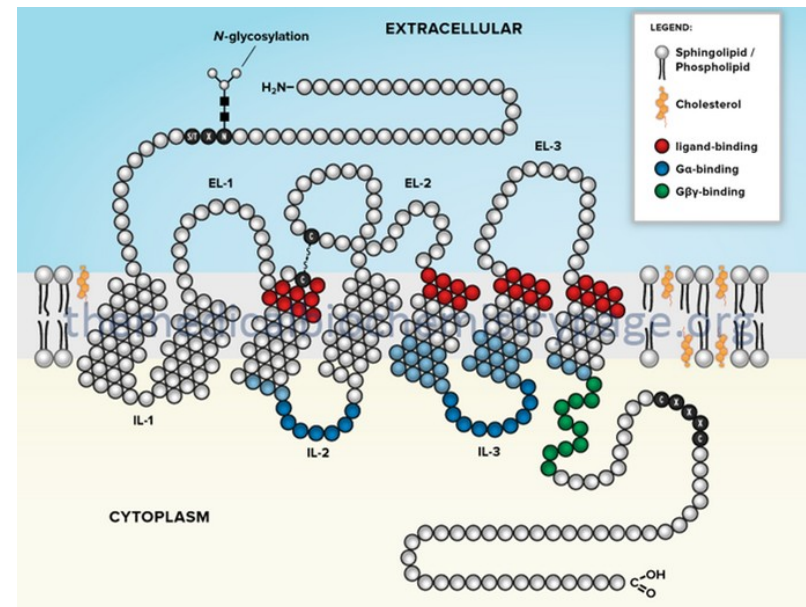
Robert J. Lefkowitz, Brian K. Kobilka  
2012 NC za chemii



- sedm  $\alpha$  helixů (22-24 ÅK) v plazmatické membráně
- $\alpha$  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

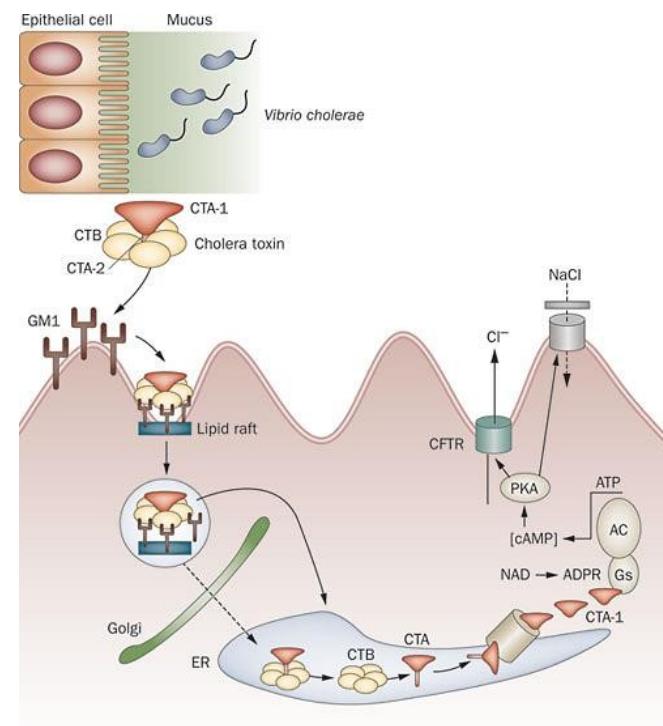
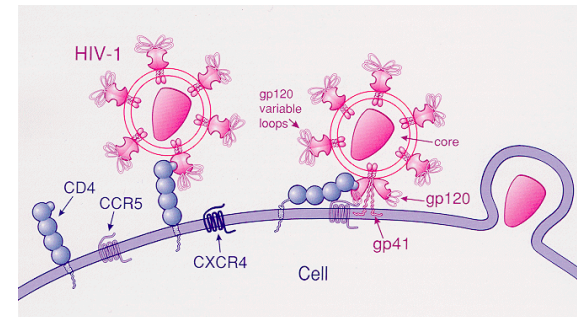
- růst a diferenciace buněk, chemotaxe
- přenos signálů z chuťových, pachových a světelným vjemů
- nervová signalizace
- regulace krevního tlaku, funkce endokrinních žláz
- embryogeneze a vývoj organismu

Z toho vyplývá, že jeden extracelulární podnět indukuje různou odpověď v závislosti od cílové buňky.

## Nemoci spjaté s G-proteiny

- nádorová onemocnění (1/5 nádorů)
- infekce virem HIV (CXCR4 a CCR5)
- cholera (*Vibrio cholerae*)
  - choleratoxin z podjednotek A a B
  - podjednotka B: vazba na povrch buněk (GM1)
  - podjednotka A: ADP-ribosylace G $\alpha$ s, ne hydrolýza GTP
  - hyperaktivace adenylátcyklázy → vysoká koncentrace cAMP

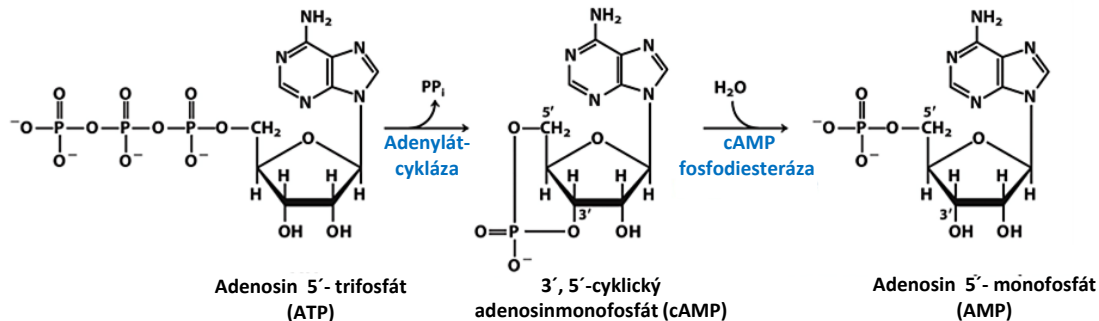
v epitelu střeva → propustnost iontových kanálů → únik vody a iontů do lumen střeva → prudké průjmy



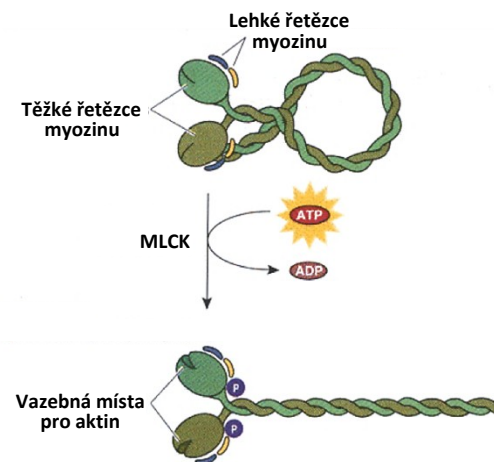
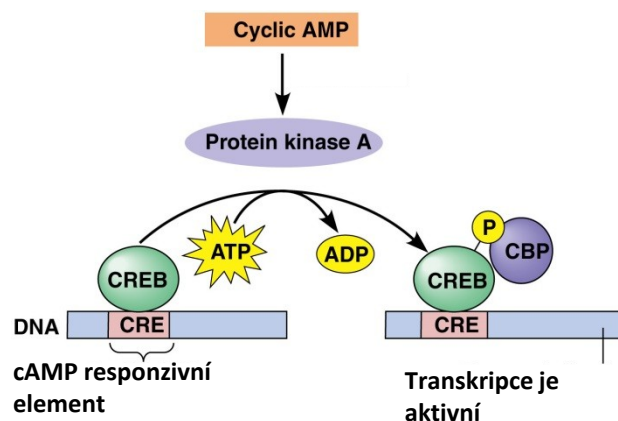
# Nitrobuněčné signální dráhy

## Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)

- koncentrace závislá na aktivitě:  
adenylátcyklázy  
cAMP fosfodiesterázy



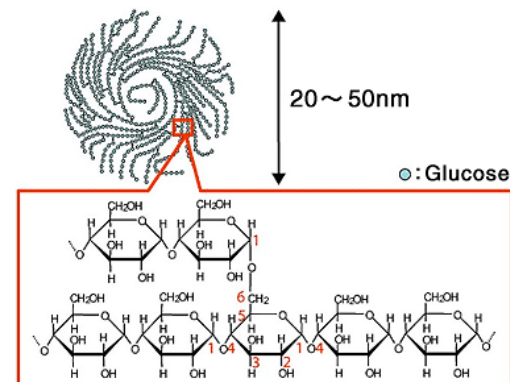
- aktivace PKA → fosforylace cílových substrátů
  - i) transkripční faktor CREB: vazba k sekvencím CRE, aktivace příslušných genů
  - ii) receptory steroidních hormonů
  - iii) kináza lehkého řetězce myosinu (MLCK) v buňkách hladké svaloviny



# Nitrobuněčné signální dráhy

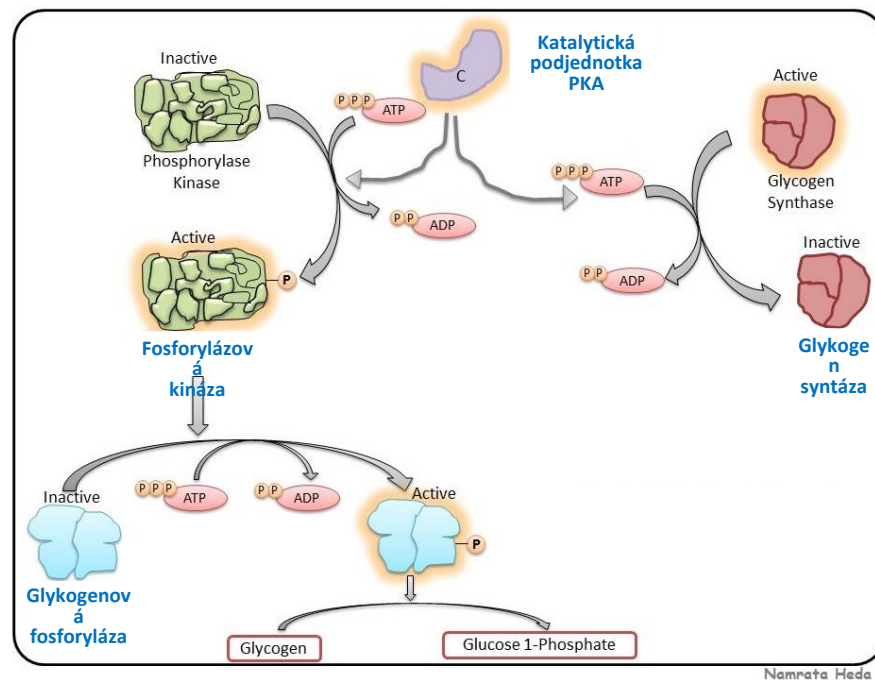
## Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)

- objeven při studiu metabolismu glykogenu
- glykogen - zásobárna glukózy
- při stresu se do krve produkuje adrenalin, který stimuluje svalové a jaterní buňky k uvolnění a štěpení glykogenu



## Mechanismus

- vazba adrenalinu na  $\beta$ -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

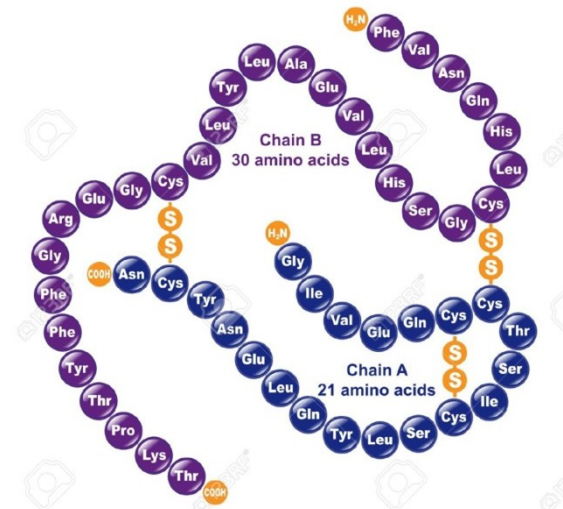
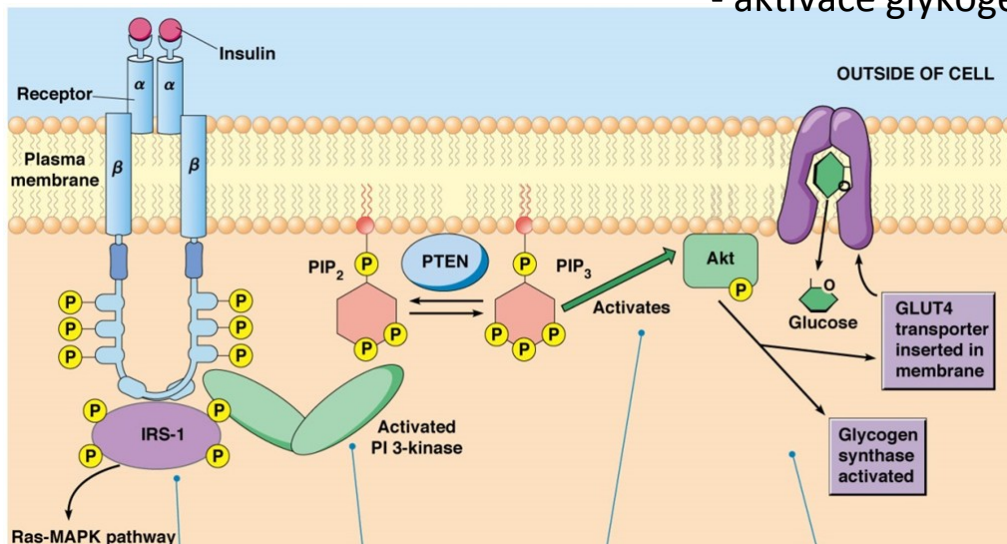
**Inzulín** - heterodimer, B buňky Langerhansových ostrůvků slinivky břišní  
- snižuje hladinu glukózy v krvi, podporuje její využití buňkami a přeměnu na glykogen

**Inzulínový receptor** - IR, tyrosinproteinkinázový receptor, heterotetramer

## Signální dráha

- vazba inzulinu → 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

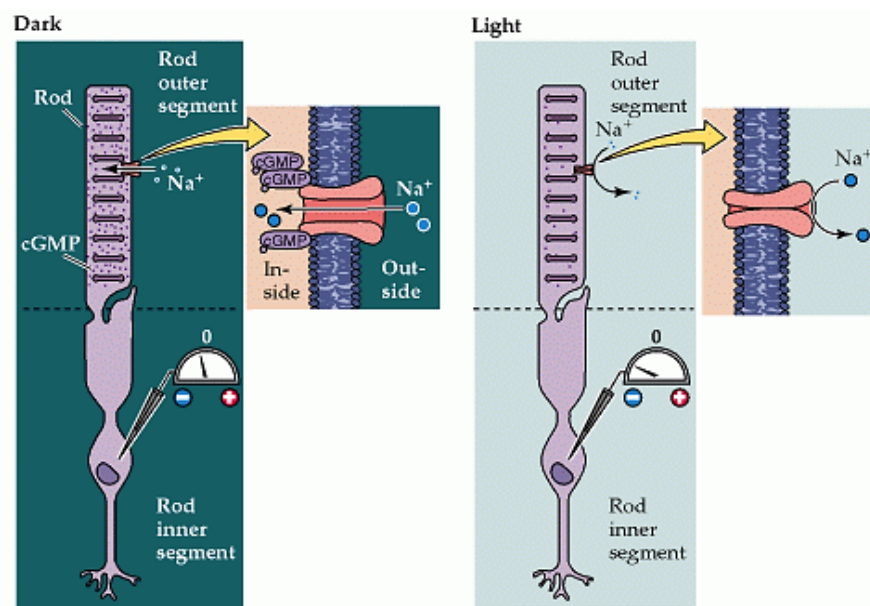
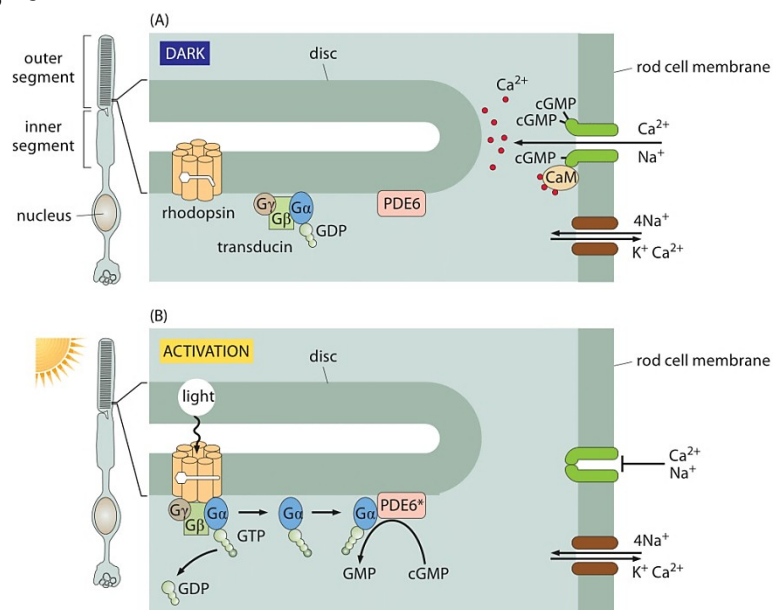
- aktivace glykogen syntetasy



# Nitrobuněčné signální dráhy

## Cyklický guanosinmonofosfát (cGMP)

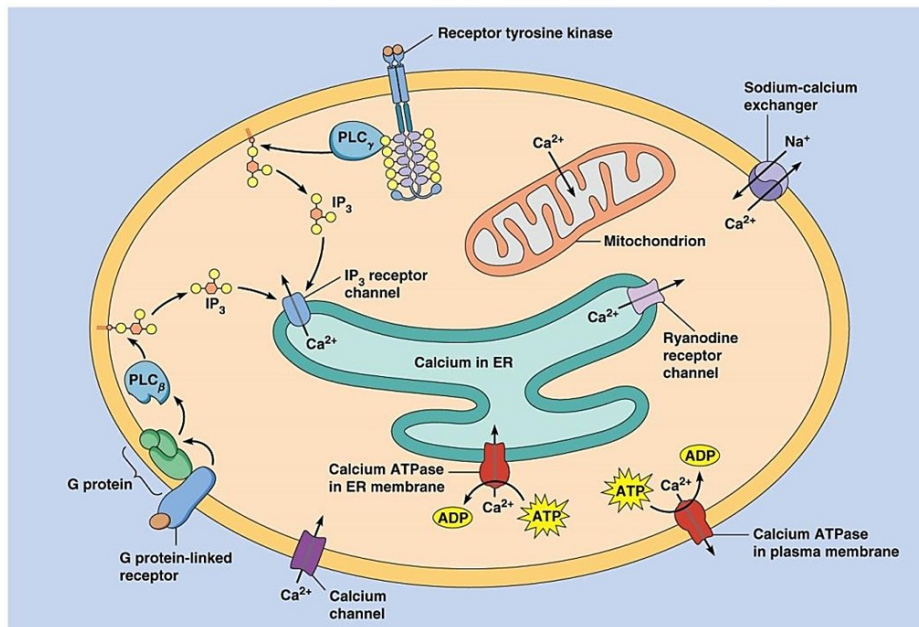
- koncentrace závislá na aktivitě guanylátcyklázy a cGMP fosfodiesterázy
- aktivuje PKG - stimulace iontových kanálů ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ )
  - uvolnění hladké svaloviny, dilatace tepen, sekrece  $\text{Na}^+$  a vody v trávicí soustavě
- mění propustnost iontových kanálů v tyčinkách oční sítnice
  - tma: guanylátcykláza tvoří cGMP, iontové kanály otevřené
  - 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



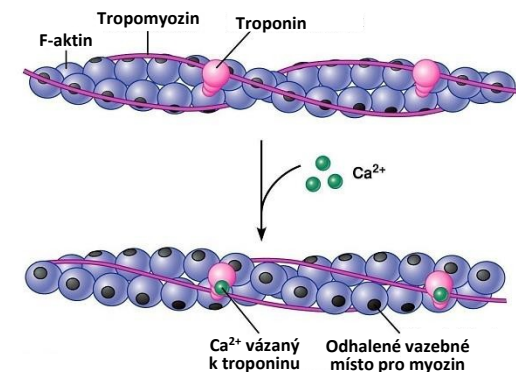
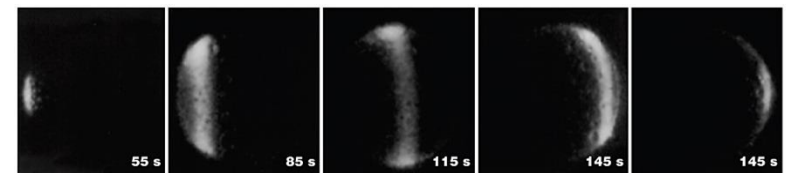
# Nitrobuněčné signální dráhy

## Dráha $\text{Ca}^{2+}$

- 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
  1. depolarizace membrán akčním potenciálem
  2. fosfolipáza C štěpí  $\text{PIP}_2$ , vzniklý  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  otvírá  $\text{Ca}^{2+}$  kanál endoplazmatického retikula
- cílové proteiny - troponin C v buňkách kosterního svalstva (svalová kontrakce), kalmodulin



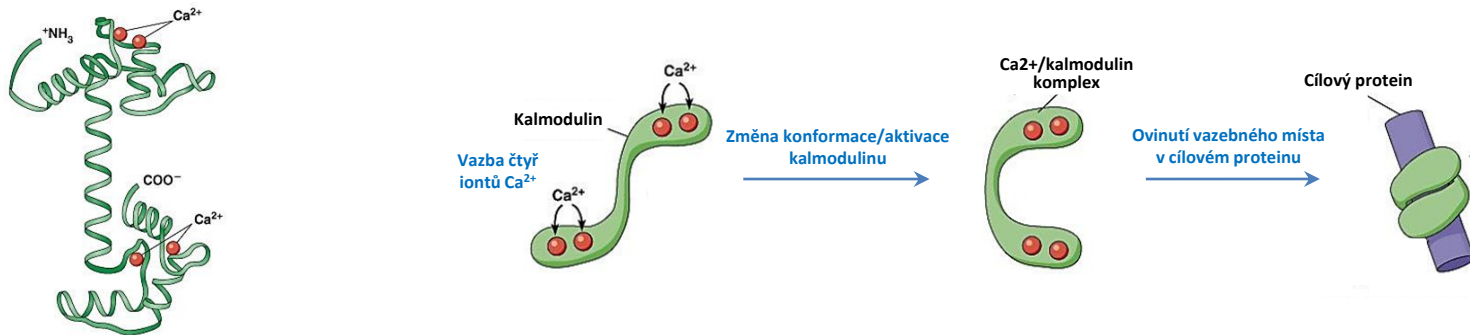
$\text{Ca}^{2+}$  signální vlna v oplozeném vajíčku



# Nitrobuněčné signální dráhy

## Kalmodulin

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

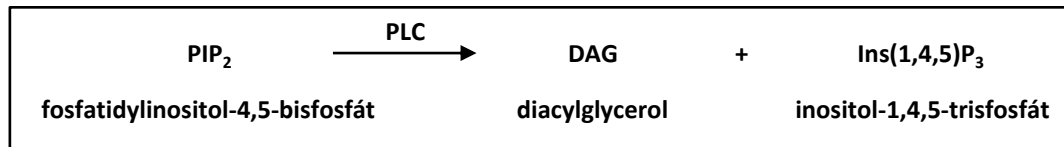


## Interakce cAMP a $\text{Ca}^{2+}$ drah

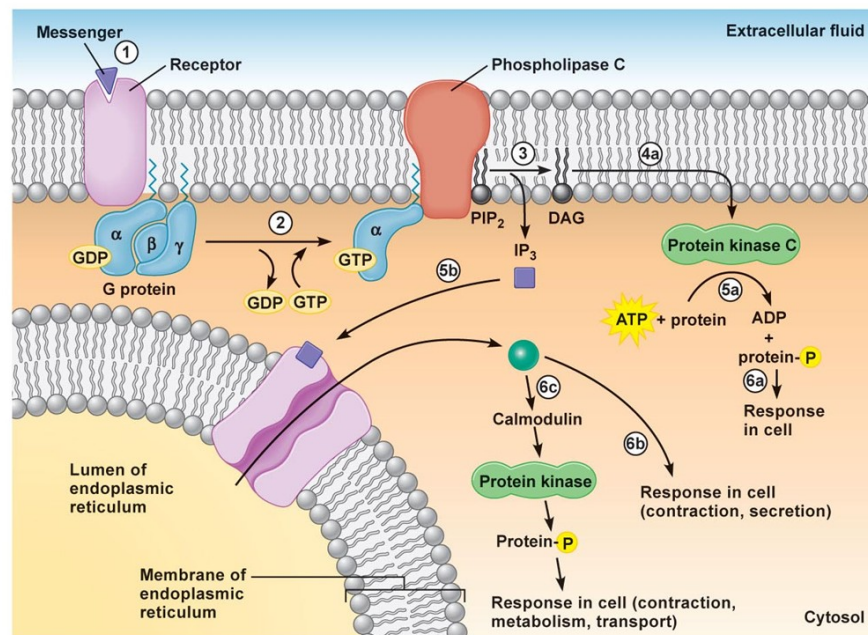
- komplex  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin může vázat a regulovat aktivitu adenylátcyklázy a fosfodiesterázy
- PKA může fosforylovat některé kanály určující obsah  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu
- CaMKII může být fosforylována PKA
- PKA a CaMKII často fosforylují aminokyseliny stejného proteinu (např. CREB)

# Nitrobuněčné signální dráhy

## Dráha inositolových fosfolipidů



- PLC $\beta$  aktivována G-proteinem z rodiny G $\alpha_q$
- PLC $\gamma$  aktivována po vazbě na tyrosinproteinkinázový receptor (SH2 doména)
- Ins(1,4,5)P $_3$  uvolňuje Ca $^{2+}$  z buněčných zásob
- DAG aktivuje PKC, PI3K



# Oxid dusnatý při vazodilataci - mechanismus účinku

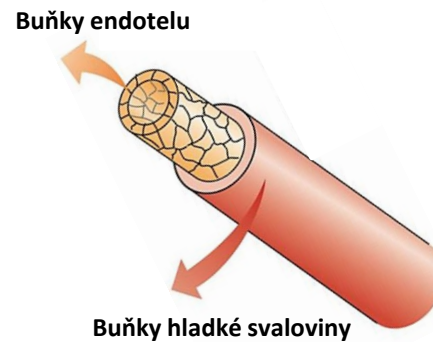
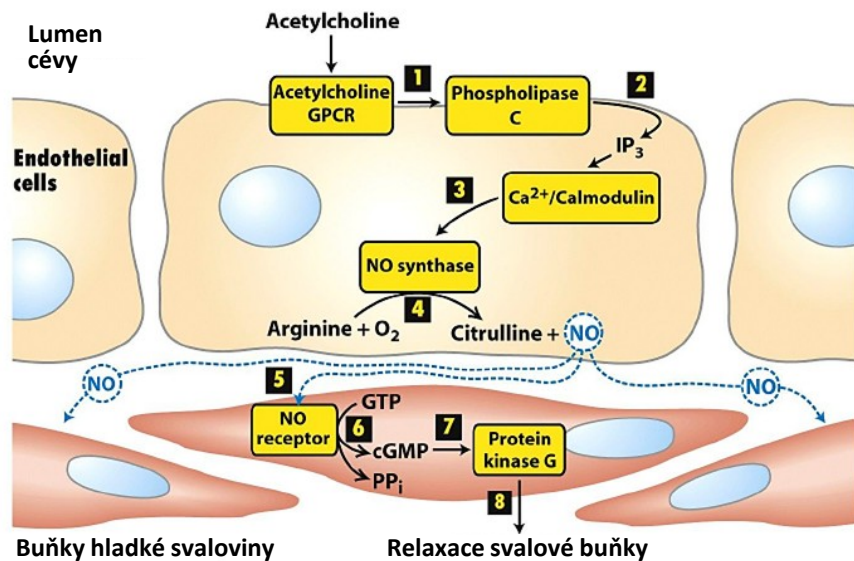
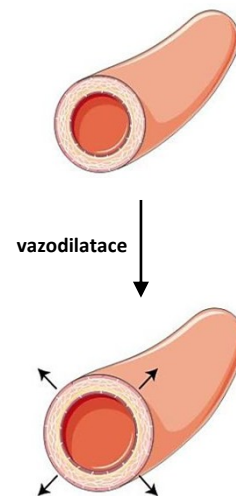
Nervová zakončení signalizující uvolnění hladké svaloviny uvolňují acetylcholin

## 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

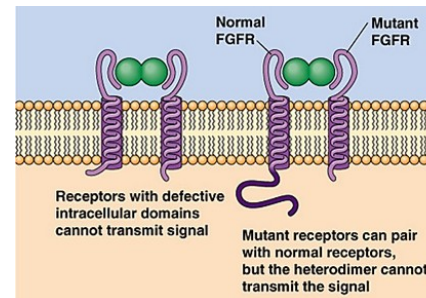
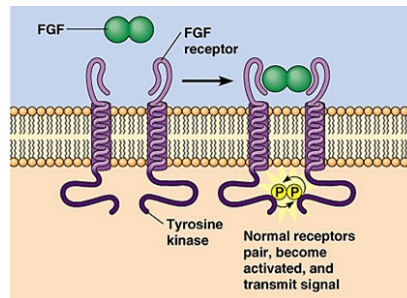
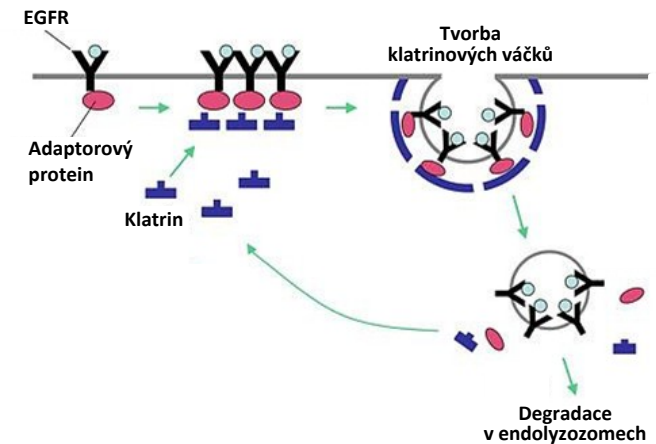
## Buňky hladké svaloviny

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



# Utlumení signálních drah

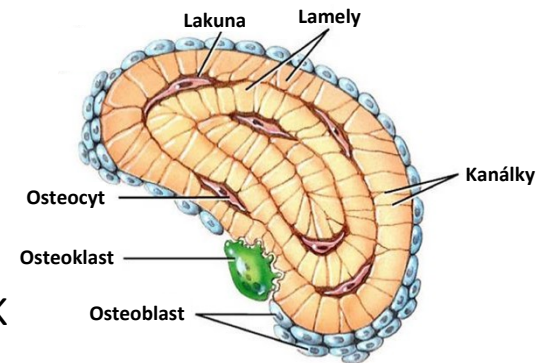
- snížení hladiny hormonů, defosforylace složek signálních drah, degradace sekundárních přenašečů
- nitrobuněčné negativní regulátory (SOCS)
- odstranění receptorů z povrchu buňky endocytózou
  - př. pohlcení EGFR do klatrinových váčků, degradace v lysozomu
- přítomnost mutantních složek signálních drah
  - př. dominantně negativní mutace receptoru pro FGF



- sekrece proteinů, které vychytávají hormony
  - př. kontrola resorpce kostí

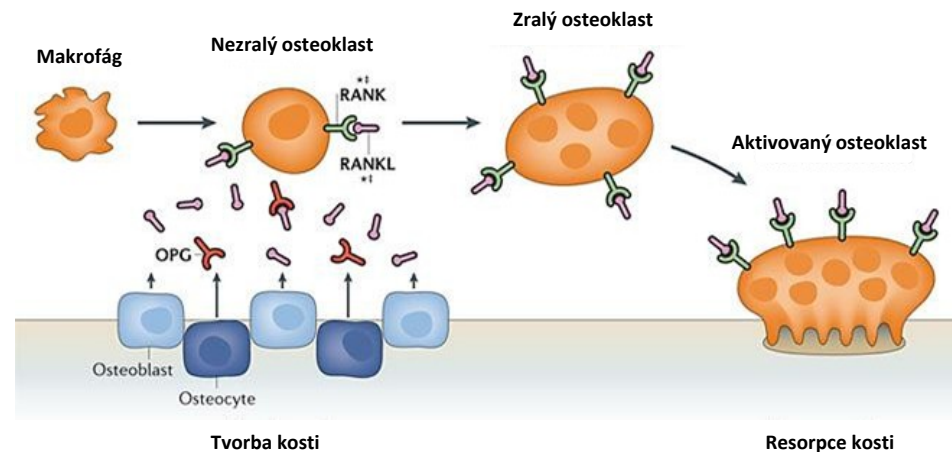
# Tvorba kostí u savců

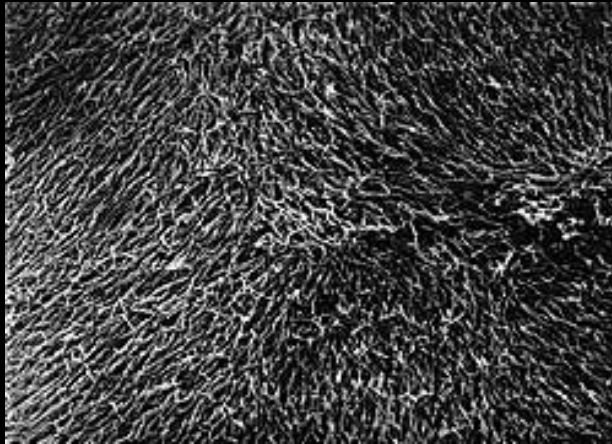
- osteoklasty: odbourávání kostní hmoty, receptor RANK
- osteoblasty: tvorba mezibuněčné hmoty  
produkce ligandu RANKL a osteoprotegerinu (OPG)
- osteocyty: klidová forma osteoblastu
- vazba RANKL na RANK aktivuje diferenciaci osteoklastů, resorpci kostí
- útlum resorpce kosti přes sekreci OPG, který 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



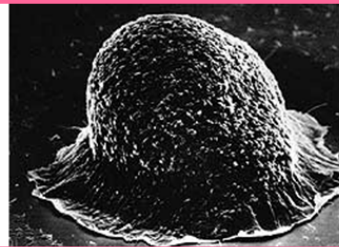
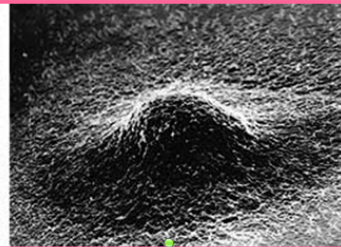
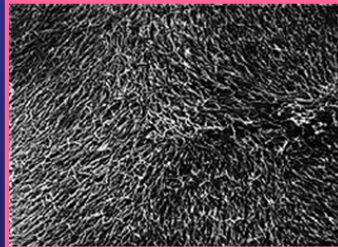
Normální stav

Osteoporóza





Individual cells    Aggregation in progress    Spore forming



Myxobacteria (*Myxococcus xanthus*, slime bacteria) use chemical signaling to share information about nutrient availability. When food is limited, starving cells secrete a molecule that enters neighboring cells and stimulate them to aggregate. The cells form a structure that produces thick-walled spores capable of surviving until the environment improves.