

SIGNALIZACE A LIPIDOVÝ METABOLISMUS

**Obecnější principy a jejich aplikace
v buněčné fyziologii;**

- **Spolupůsobení látek různé chemické povahy**
- **Buněčné signalizace obecněji s důrazem na úlohu fosfolipidů a jejich metabolitů**

Alois Kozubík

Shrnutí a doplnění probraného učiva

(obecnější východiska a modely)

Které faktory, a jak mohou modulovat dělení, diferenciaci a zánik buněk?

???

Dochází k tomu změnami

- **exprese** anebo **funkce molekul** zapojených v **přenosu** (*transdukci*) **signálů** přímo regulujících *proliferaci, diferenciaci a buněčnou smrt* včetně exprese protoonkogenů a nádorově-supresorových genů,
- **signálů**, které tyto funkce ovlivňují do určité míry nepřímo, jako jsou *posttranslační změny, inhibice mezibuněčných spojení, ovlivnění funkce enzymů* reparujících DNA, *metylace* DNA, **metabolismus** apod.

(na různých úrovních organizace
buněčných systémů)

Buněčný metabolismus

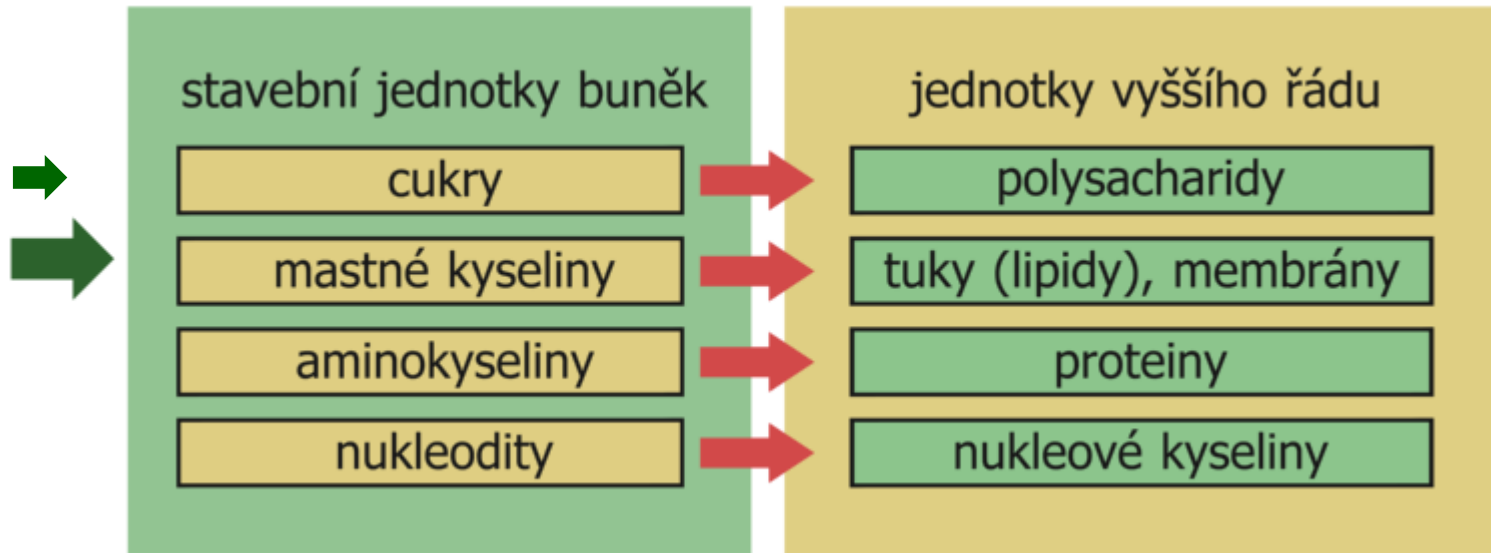
???

složitost vs. jednoduchost
speciální vs. obecnější

V buňce (buněčných signalizacích a metabolismu)

spolupůsobí látky různé chemické povahy

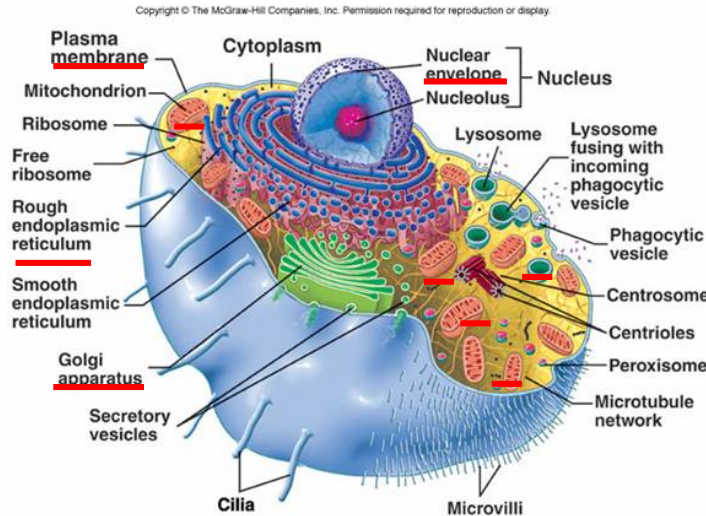
Čtyři nejdůležitější skupiny
malých organických molekul v buňkách



+ ionty atd..

Buňky prostoupeny membránovými systémy

tvořenými z velké části fosfolipidy



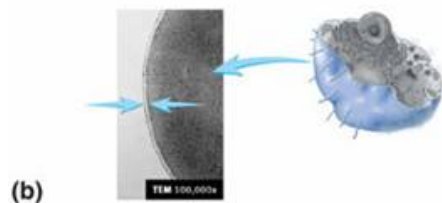
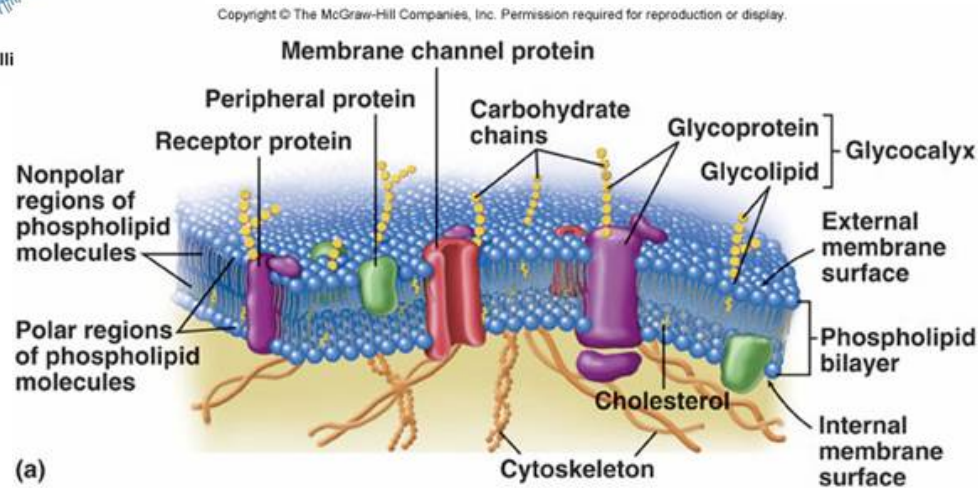
Drsné endoplazmatické retikulum: syntéza některých bílkovin, oligomerizace proteinů, rozklad poškozených bílkovin.

Hladké endoplazmatické retikulum: odstraňování toxických látek, některé části metabolismu lipidů a metabolismu hemu, regulované uvolňování Ca^{2+} iontů.

Golgiho komplex slouží k transportu, přechovávání a posttranslační modifikaci proteinů, navazování a odstraňování nebílkovinných (zejména cukerných) složek, syntéze polysacharidů a imunoglobulinů, tvorbě váčků využívaných při exocytóze.

Cytoplazmatická membrána: semipermeabilní obal ohraničující vnitřek buněk od vnějšího prostředí a kontrolující pohyb látek do buňky a ven z buňky. Je selektivně permeabilní pro ionty a organické molekuly. Chrání buňku před vnějšími vlivy. Podílí na různých buněčných procesech jako buněčná adheze, výměna iontů, buněčných signalizacích.

Skládá se z lipidové dvouvrstvy se zakotvenými proteiny, glykoproteiny, cholesterolem, sfingolipidy.





**MEMBRANOVÉ
SYSTÉMY**
a buněčné
kompartmenty

protientropické
důsledky



STRUKTURNÍ ÚLOHA
FOSFOPIDŮ v BUŇKÁCH



a **BUNĚČNÉ FUNKCE**

Kompartmenty

Funkčně nebo prostorově oddělené soubory prvků (složek).
Důsledkem je **kompartmentalizace** – vznik a existence kompartmentů.

V důsledku toho jsou prvky (složky), např. **látky, buňky** atd.,
nerovnoměrně rozmístěny.

Příklady

Všechny membránami ohraničené struktury mají své „**vnitřní prostředí**“.

Selektivně jsou v nich zadržovány určité molekuly proti koncentračnímu spádu.
Některé reakce tak proběhnout mohou, jiným může být zabráněno.

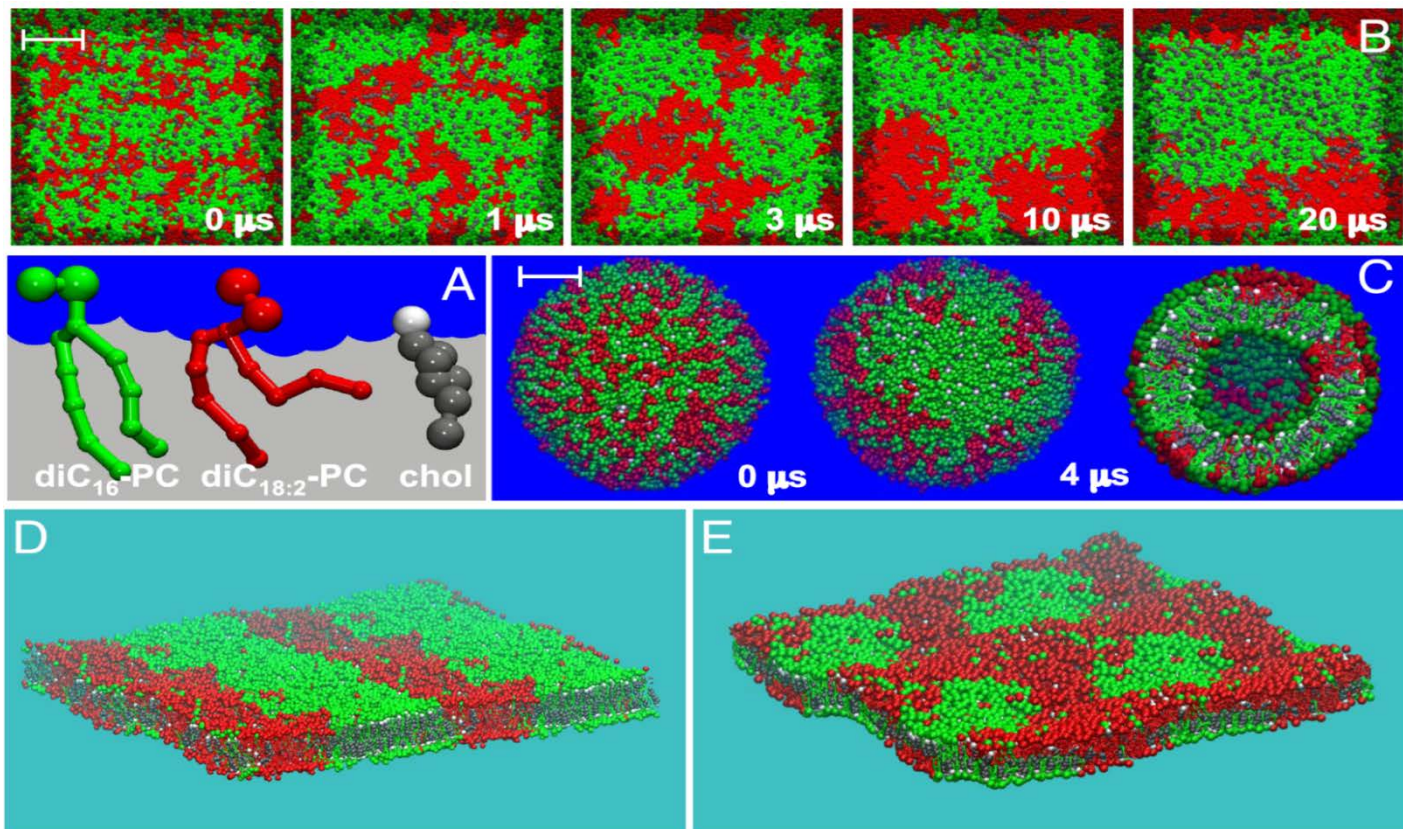
Tato **protientropická distribuce molekul a buněčných struktur**,
směřující proti neuspořádanosti, má velký význam pro buněčný metabolismus
a regulace.

Základem pro tento stav je **existence buněčných membrán**,
jeden ze základů existence biologických systémů.

Dynamický charakter biologických membrán - model

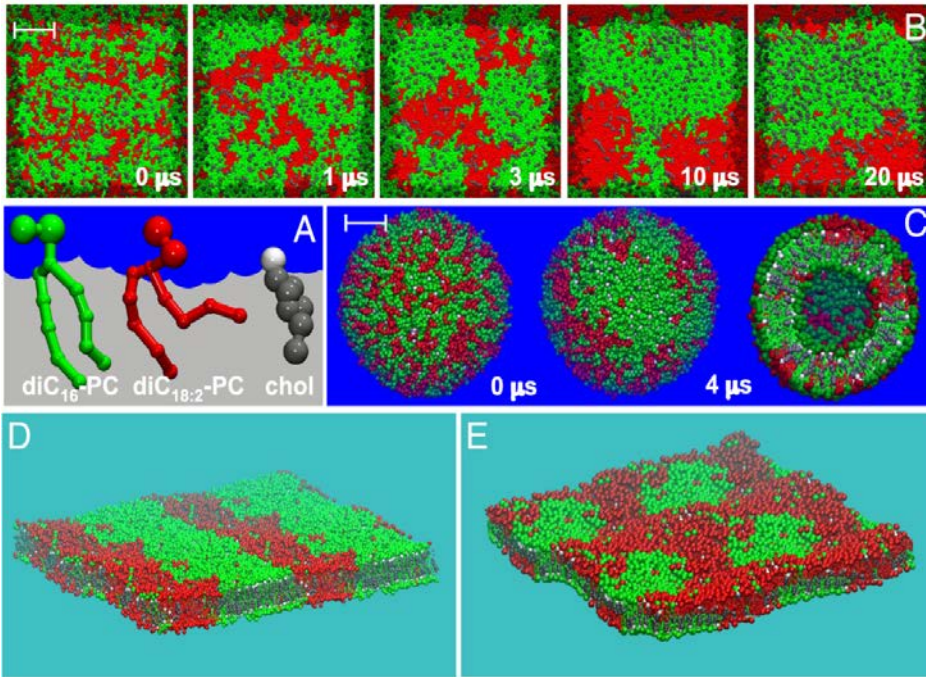
Znázorněna je dynamika „samoorganizačních schopností“ modelového systému (v μs) vytvářet membránové struktury ve vodném prostředí, jsou-li dodány prekursory:

PC - fosfatidylcholin
 diC 16 – k. palmitová
 diC 18:2 – k. linoleová
 chol - cholesterol



Dynamický charakter biologických membrán (model) a lipidové rafty

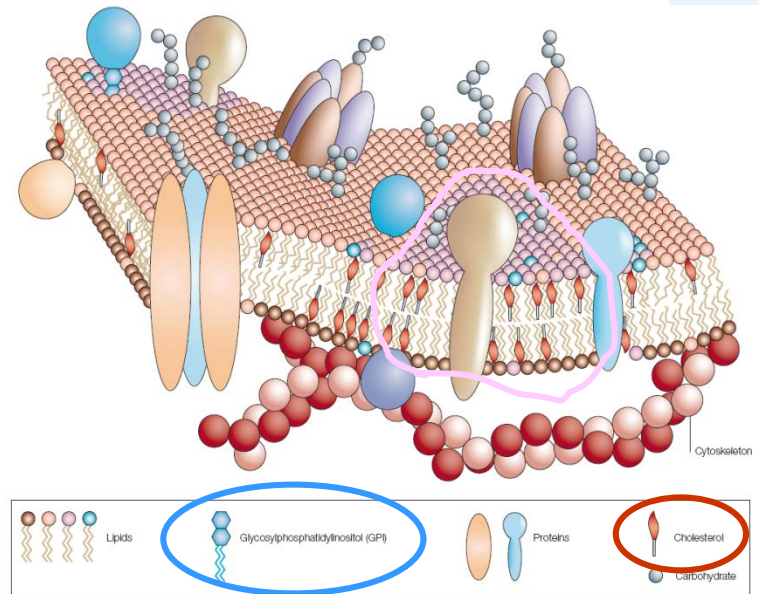
PNAS | November 11, 2008 | vol. 105 | no. 45 | 17367-17372



Prerukury:

PC - fosfatidylcholin
 diC 16 – k. palmitová
 diC 18:2 – k. linoleová
 chol - cholesterol

Červená – nenasycené lipidy
 Zelená - nasycené lipidy
 B, D, E - planární rozložení
 C - liposom



Zajištění většiny biologických funkcí se neobejde bez unikátních interakcí lipidových komponent jako jsou VNMK, fosfolipidy s dalšími biologicky významnými molekulami.



VNMK jsou součástí lipidových raftů:
 membránových mikrodomén obohacených o glykosfingolipidy + cholesterol

Jejich modulace mohou významně měnit intenzitu a také směr signálové transdukce

Struktura fosfolipidů a jejich orientace v plasmatické membráně

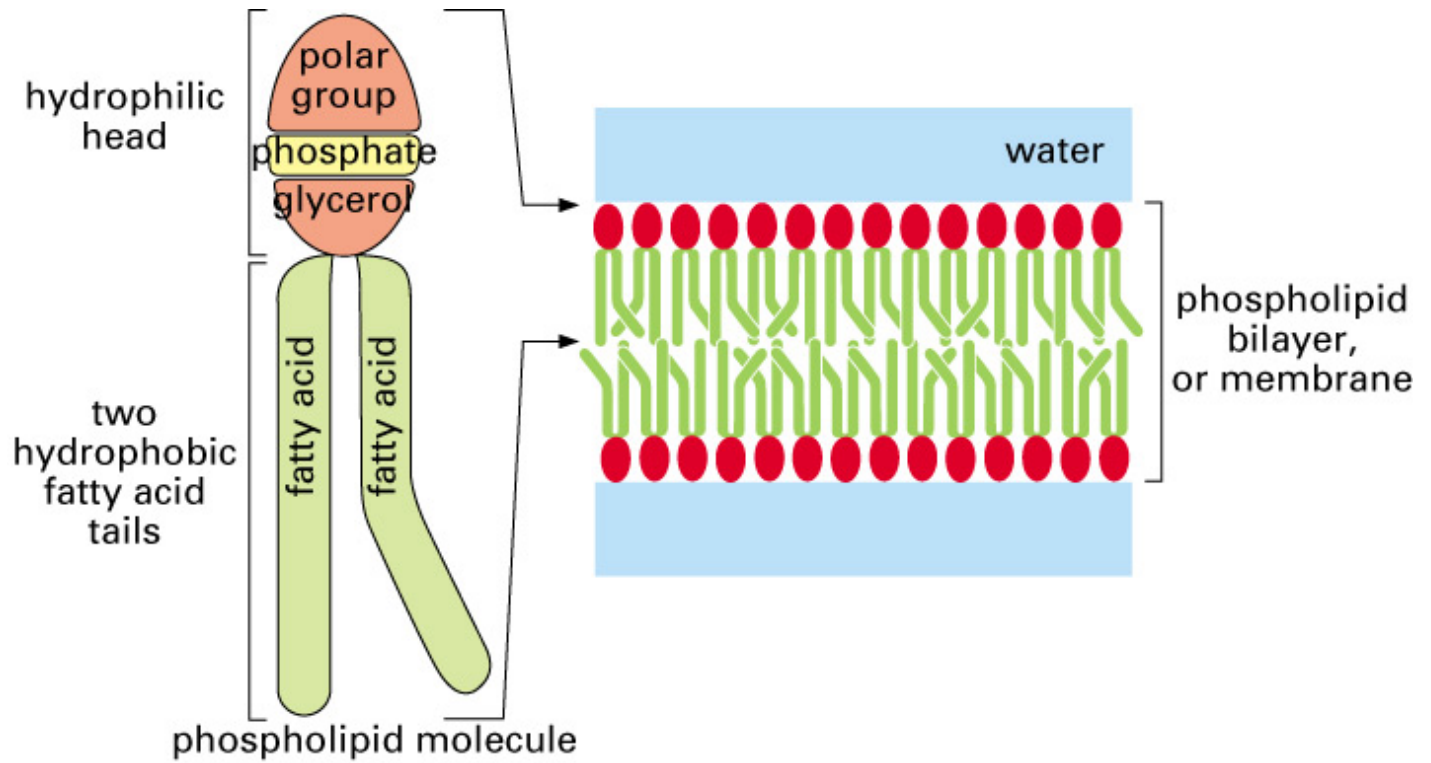
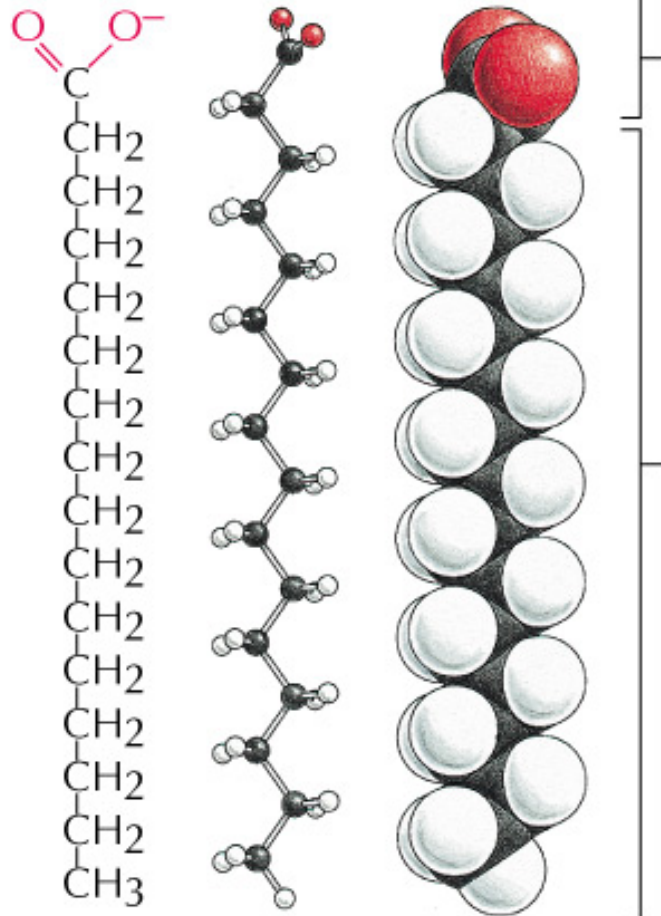


Figure 2-22. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Mastné kyseliny - struktura

hydrophilic carboxylic acid head



hydrophobic hydrocarbon tail

(A)

(B)

(C)

C-16
(k. palmitová)

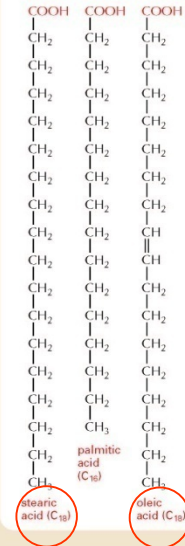
Figure 2-21. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Složení fosfolipidů a jejich štěpení fosfolipázami (PL)

PANEL 2-5 Fatty Acids and Other Lipids

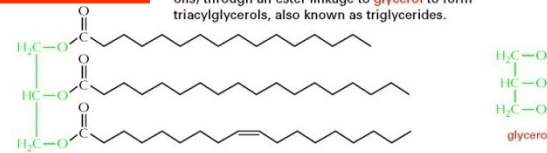
COMMON FATTY ACIDS

These are carboxylic acids with long hydrocarbon tails.

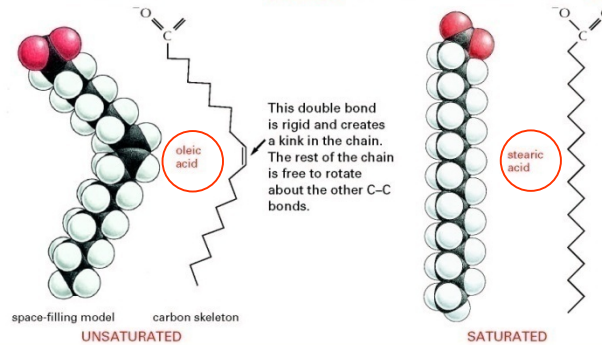


TRIACYLGLYCEROLS

Fatty acids are stored as an energy reserve (fats and oils) through an ester linkage to glycerol to form triacylglycerols, also known as triglycerides.

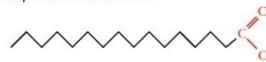


Hundreds of different kinds of fatty acids exist. Some have one or more double bonds in their hydrocarbon tail and are said to be **unsaturated**. Fatty acids with no double bonds are **saturated**.



CARBOXYL GROUP

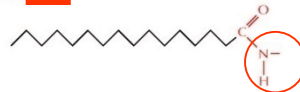
If **free**, the **carboxyl group** of a fatty acid will be **ionized**.



But **more usually**, it is linked to other groups to form either **esters**

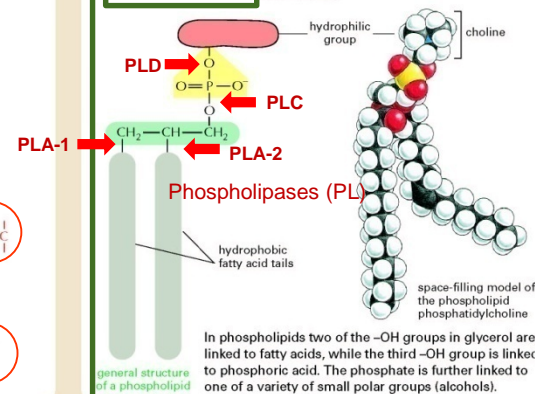


or **amides**.



PHOSPHOLIPIDS

Phospholipids are the major constituents of cell membranes.



Estery - Kyselina + alkohol (-OH skupina karboxylové kyseliny nahrazena organickým zbytkem vzniklým z alkoholu po odštěpení vodíku z OH skupiny).

Amidy - náhradou skupiny OH karboxylové skupiny za amidovou skupinu NH₂.

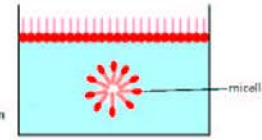
Fyzikálně-chemické vlastnosti fosfo- a glykolipidů dovolují ve vodném prostředí vzniknout strukturám membránového charakteru na samoorganizačním „self-sealing“ principu. →

Další formy lipidů →

LIPID AGGREGATES

Fatty acids have a hydrophilic head and a hydrophobic tail.

In water they can form a surface film or form small micelles.



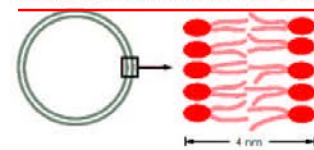
Their derivatives can form larger aggregates held together by hydrophobic forces:

Triglycerides can form large spherical fat droplets in the cell cytoplasm.



200 nm or more

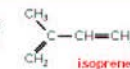
Phospholipids and glycolipids form self-sealing lipid bilayers that are the basis for all cell membranes.



4 nm

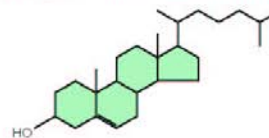
OTHER LIPIDS

Lipids are defined as the water-insoluble molecules in cells that are soluble in organic solvents. Two other common types of lipids are steroids and polyisoprenoids. Both are made from isoprene units.

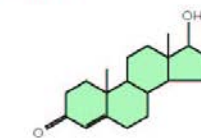


STEROIDS

Steroids have a common multiple-ring structure.



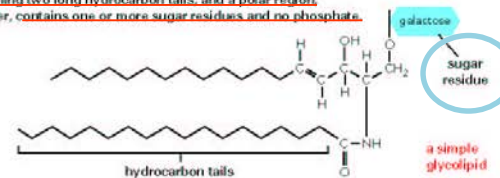
cholesterol—found in many membranes



testosterone—male steroid hormone

GLYCOLIPIDS

Like phospholipids, these compounds are composed of a hydrophobic region, containing two long hydrocarbon tails, and a polar region, which, however, contains one or more sugar residues and no phosphate.



No phosphate

galactose
sugar residue

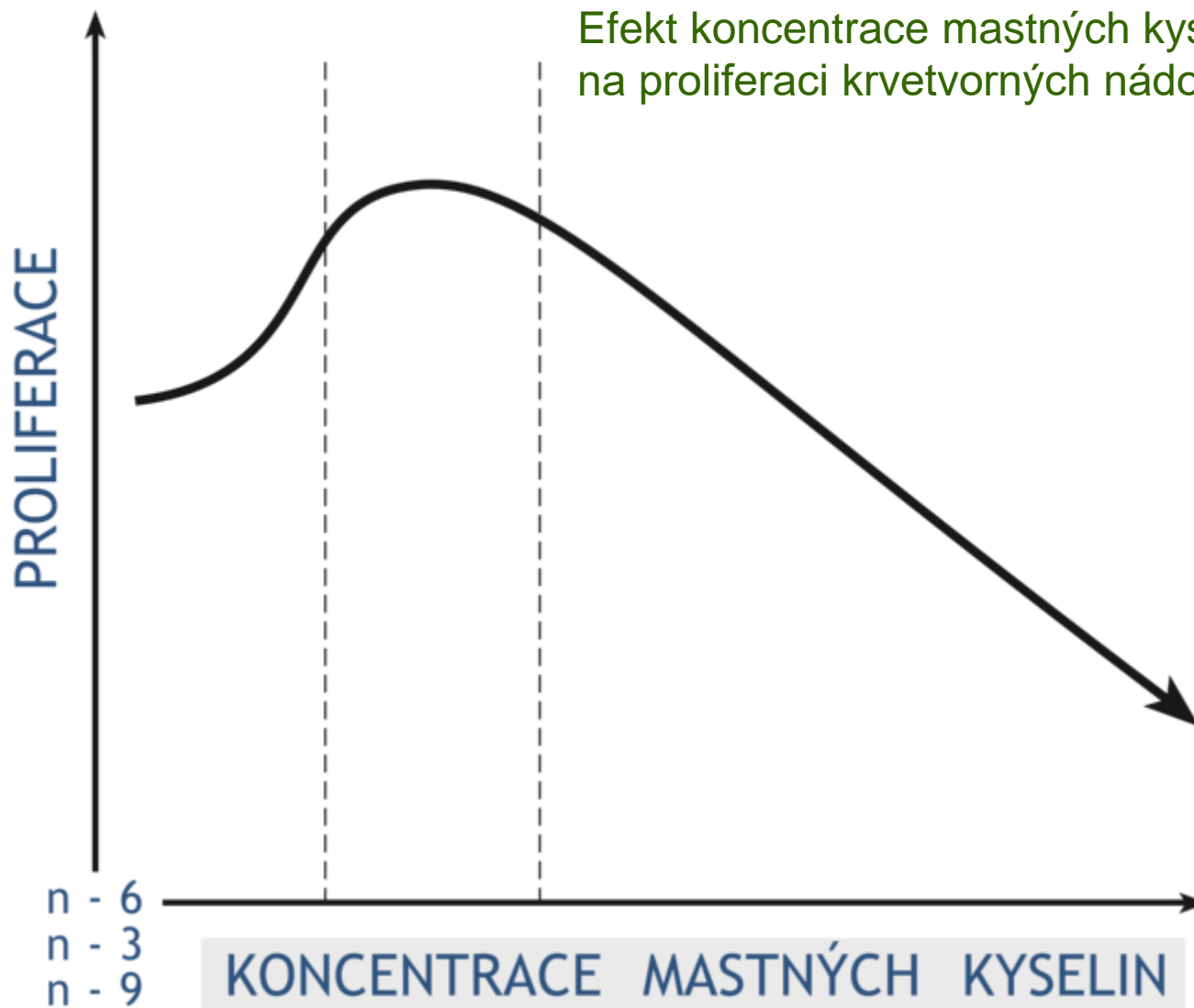
a simple glycolipid

POLYISOPRENOIDS

long chain polymers of isoprene

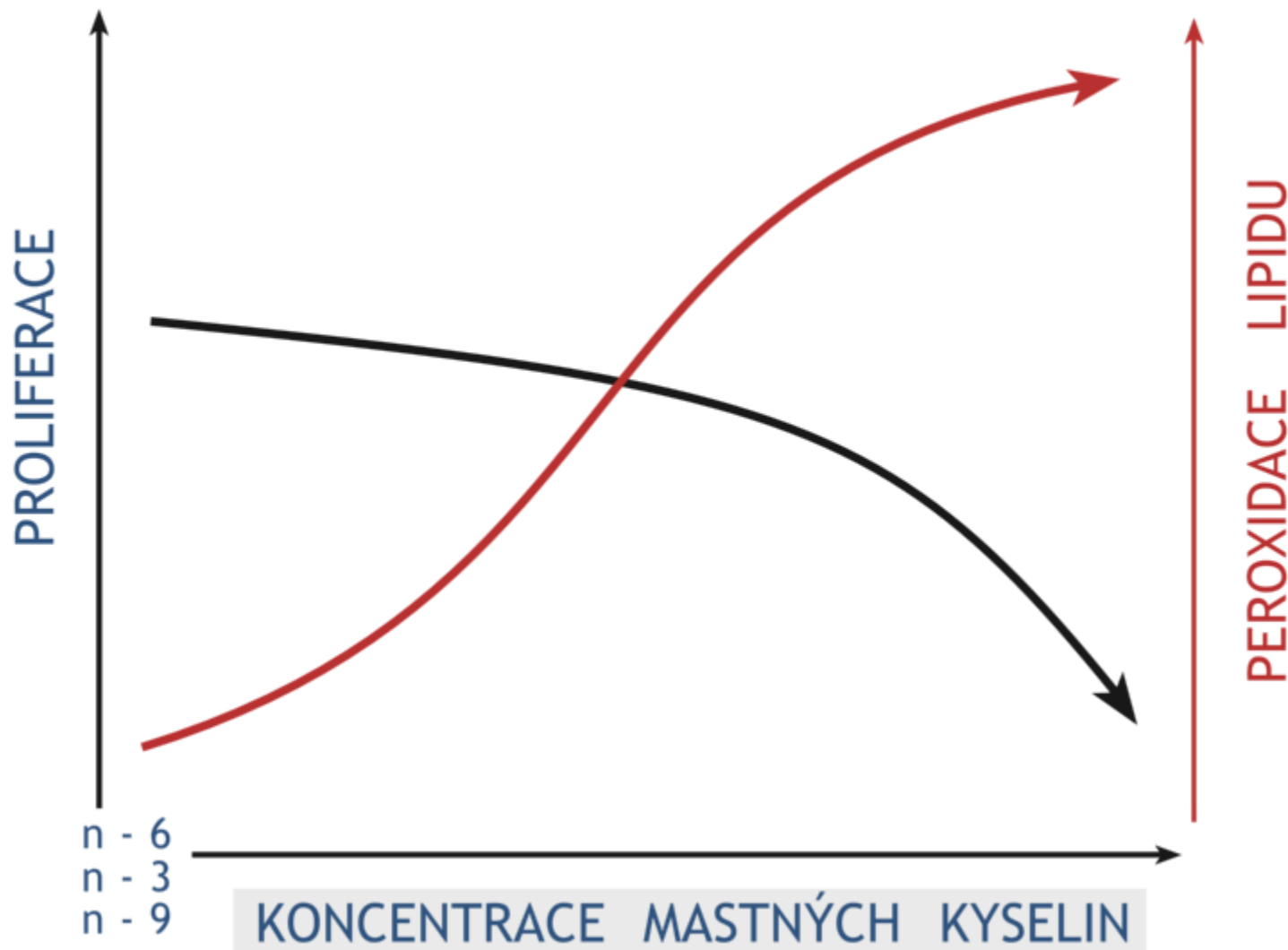


dolichol phosphate—used to carry activated sugars in the membrane-associated synthesis of glycoproteins and some polysaccharides.



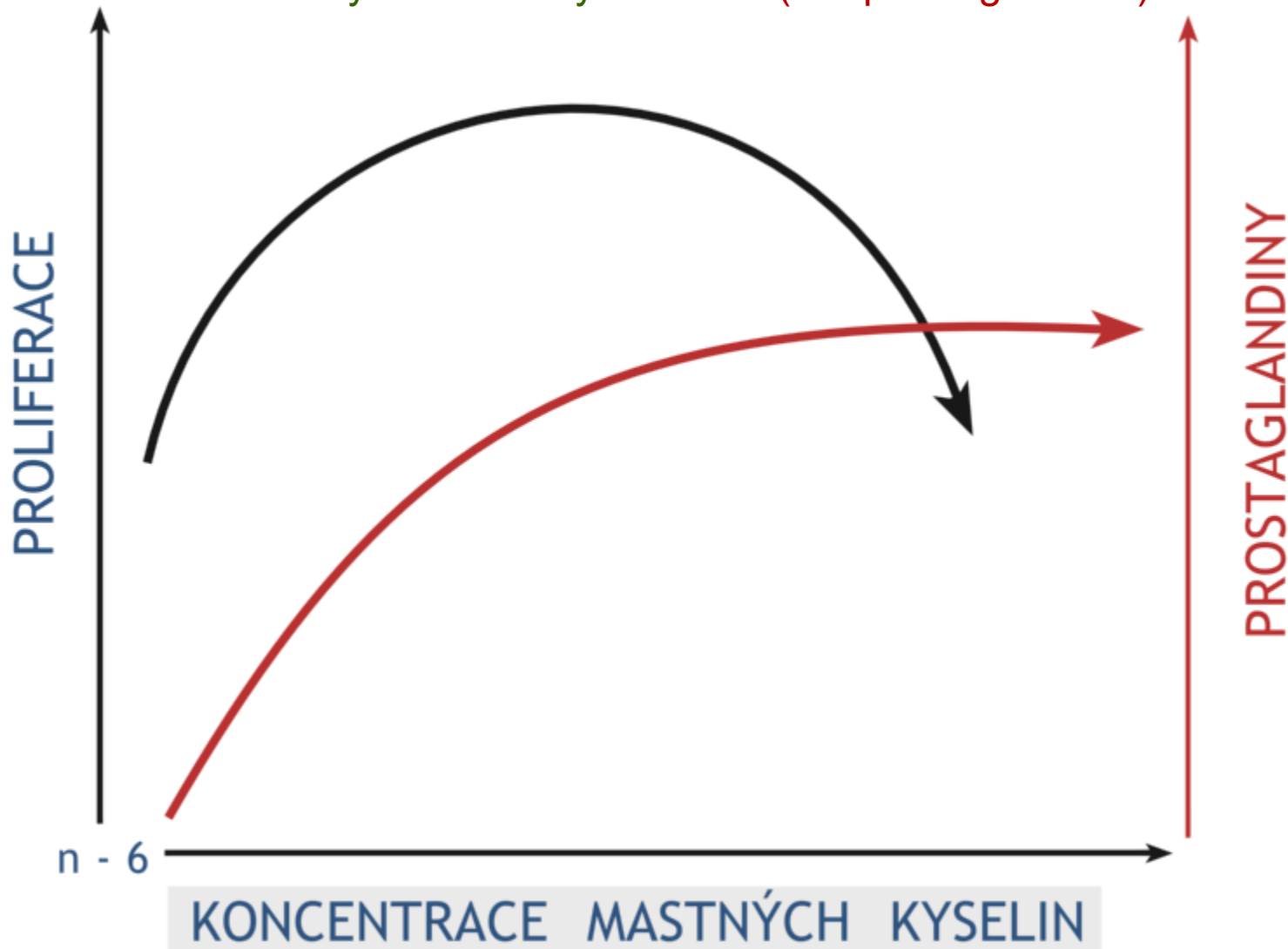
D.G.Cornwell and N.Morisaki, Free Radicals in Biology. Vol.6, 1984

Efekty koncentrace mastných kyselin na proliferaci krvevorných nádorových buněk (vliv peroxidace lipidů)



D.G.Cornwell and N.Morisaki, Free Radicals in Biology. Vol.6, 1984

Efekty koncentrace mastných kyselin na proliferaci krvevorných nádorových buněk (vliv prostaglandinů)

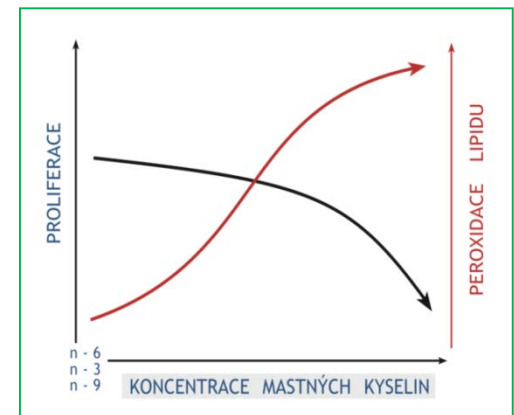
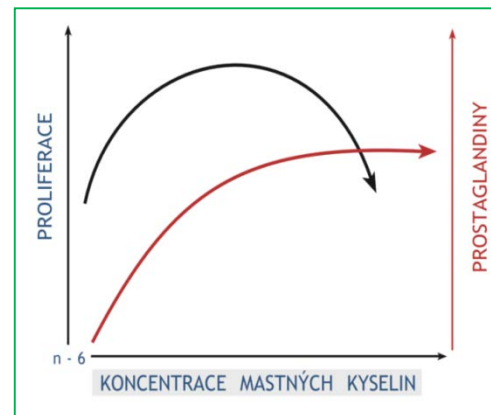
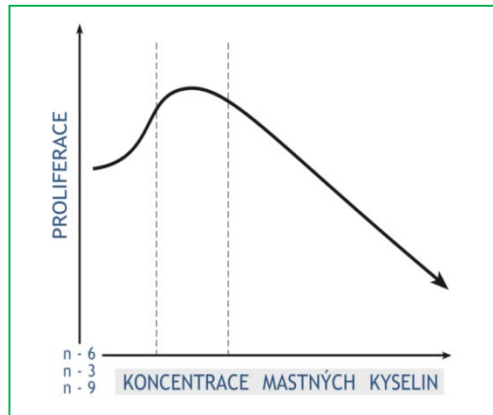


D.G.Cornwell and N.Morisaki, Free Radicals in Biology. Vol.6, 1984

Efekty závisí na koncentraci

VLIV KONCENTRACE NENASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN (VNMK) NA PROLIFERACI NÁDOROVÝCH BUNĚK – shrnutí (do r. 1985)

(„FATTY ACID PARADOXES“)

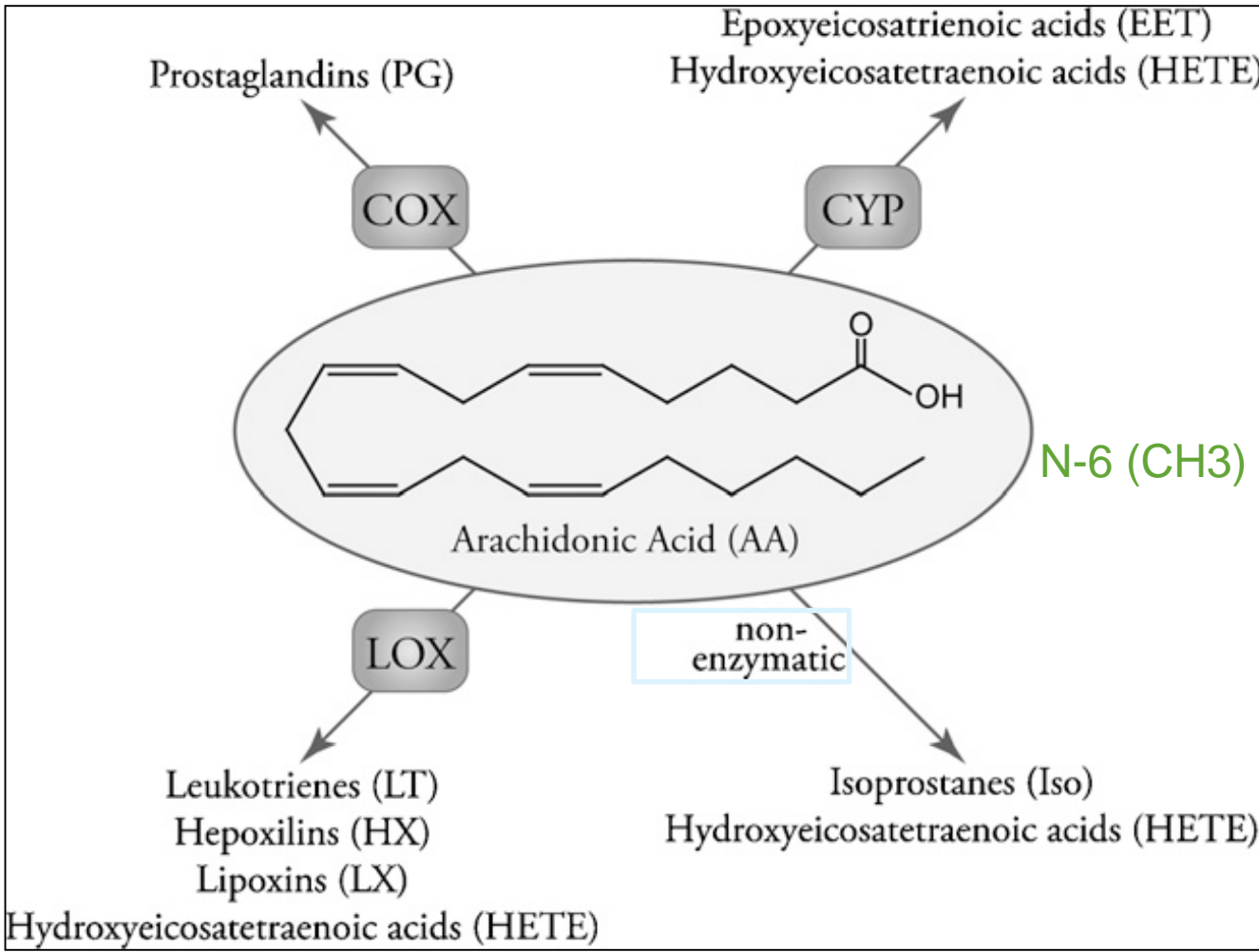


U modelových krvetvorných (nádorových) populací mohou VNMK generovat jak \oplus tak \ominus signál na proliferaci

D.G.Cornwell and N.Morisaki, Free Radicals in Biology. Vol.6, 1984

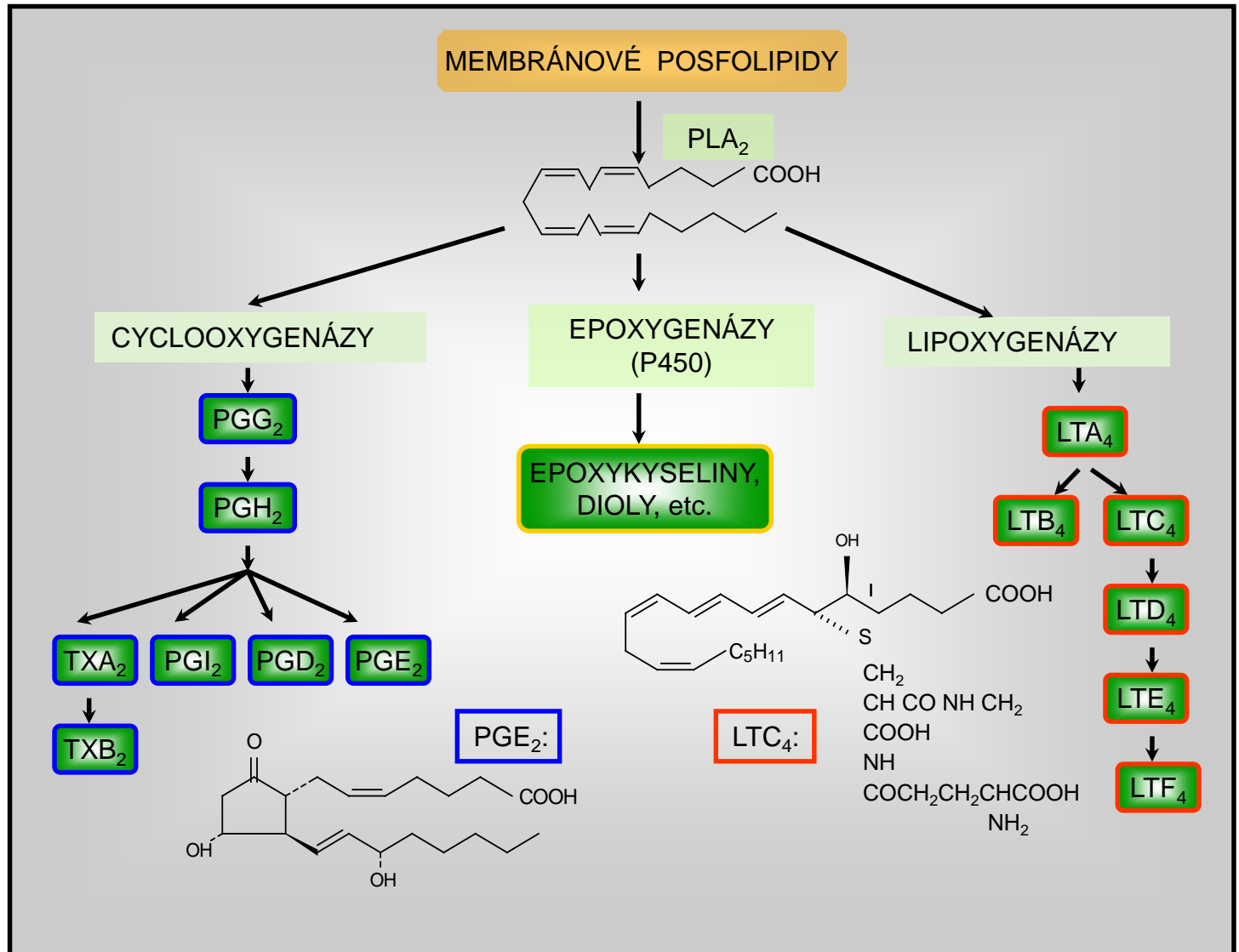
Spektrum eikosanoisů

Čtyři cesty přeměny AA na své metabolity **eikosanoidy**

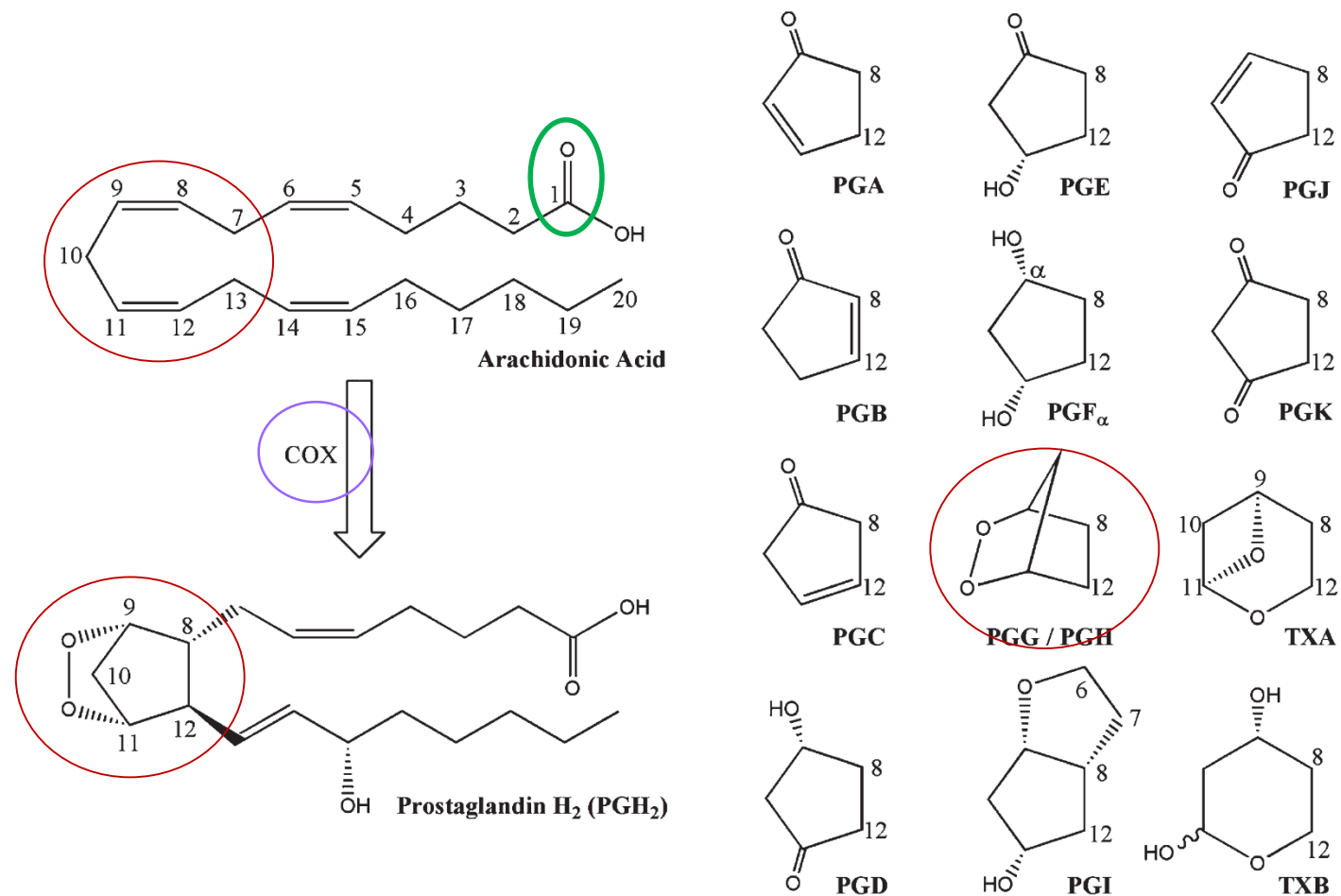


From: J. Lipid Res. 2009 June; 50 (6): 1015-1038.

METABOLISMUS KYSELINY ARACHIDONOVÉ



STRUKTURY METABOLITŮ KYSELINY ARACHIDONOVÉ (AA)



From: J. Lipid Res. 2009 June; 50 (6): 1015-1038.

Struktury metabolitů AA, jejichž vznik je katalyzován cytochromy P450

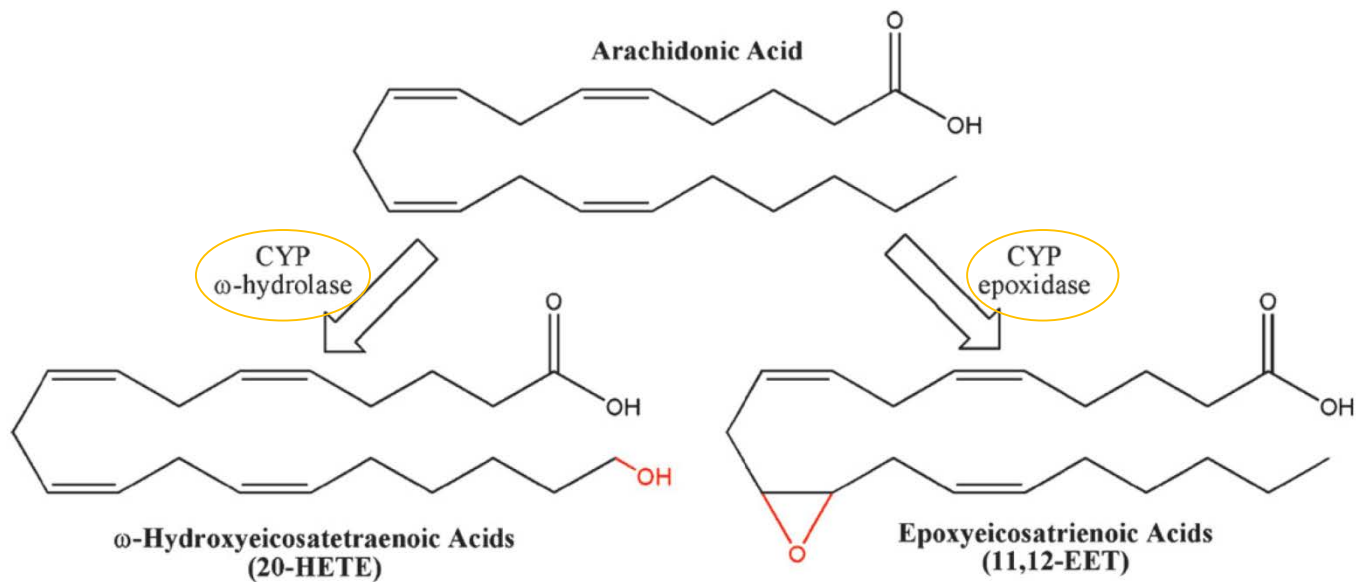
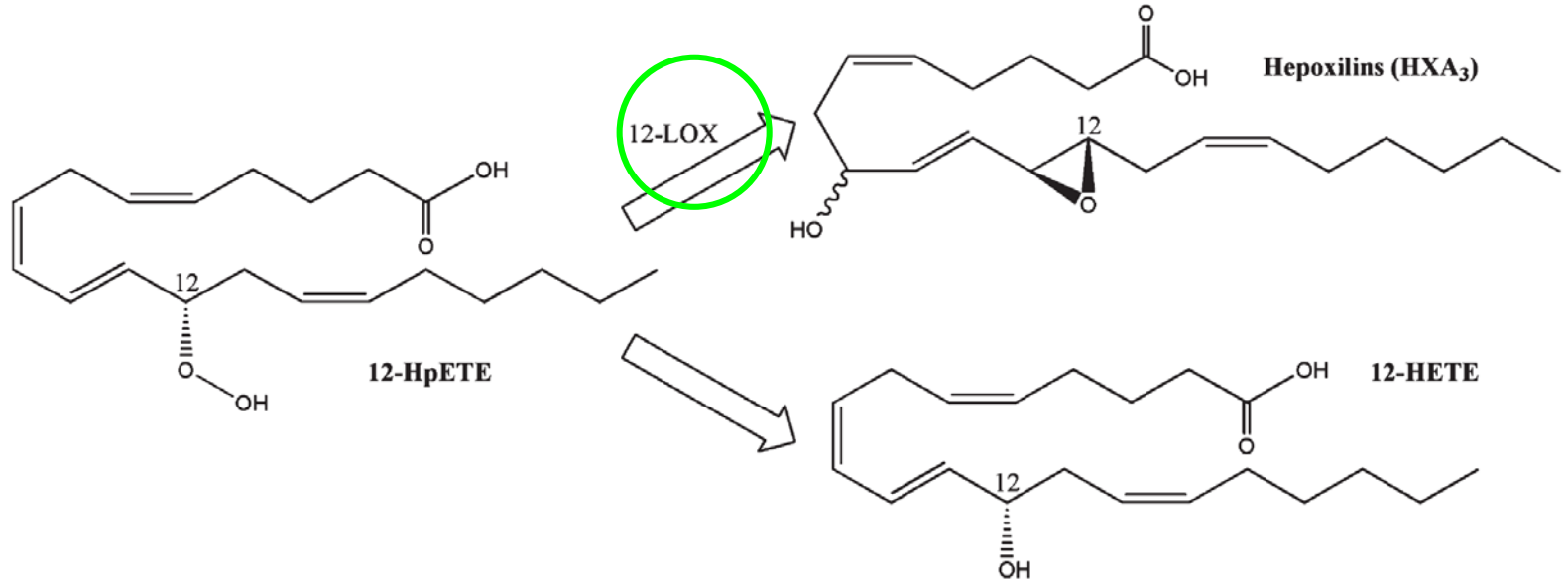


Fig. 7. Structures of cytochrome P450 metabolites. Cytochrome P450 enzymes can catalyze ω-oxidation (example: 20-HETE) and epoxidation (11,12-EET) reactions.

From: J. Lipid Res. 2009 June; 50 (6): 1015-1038.

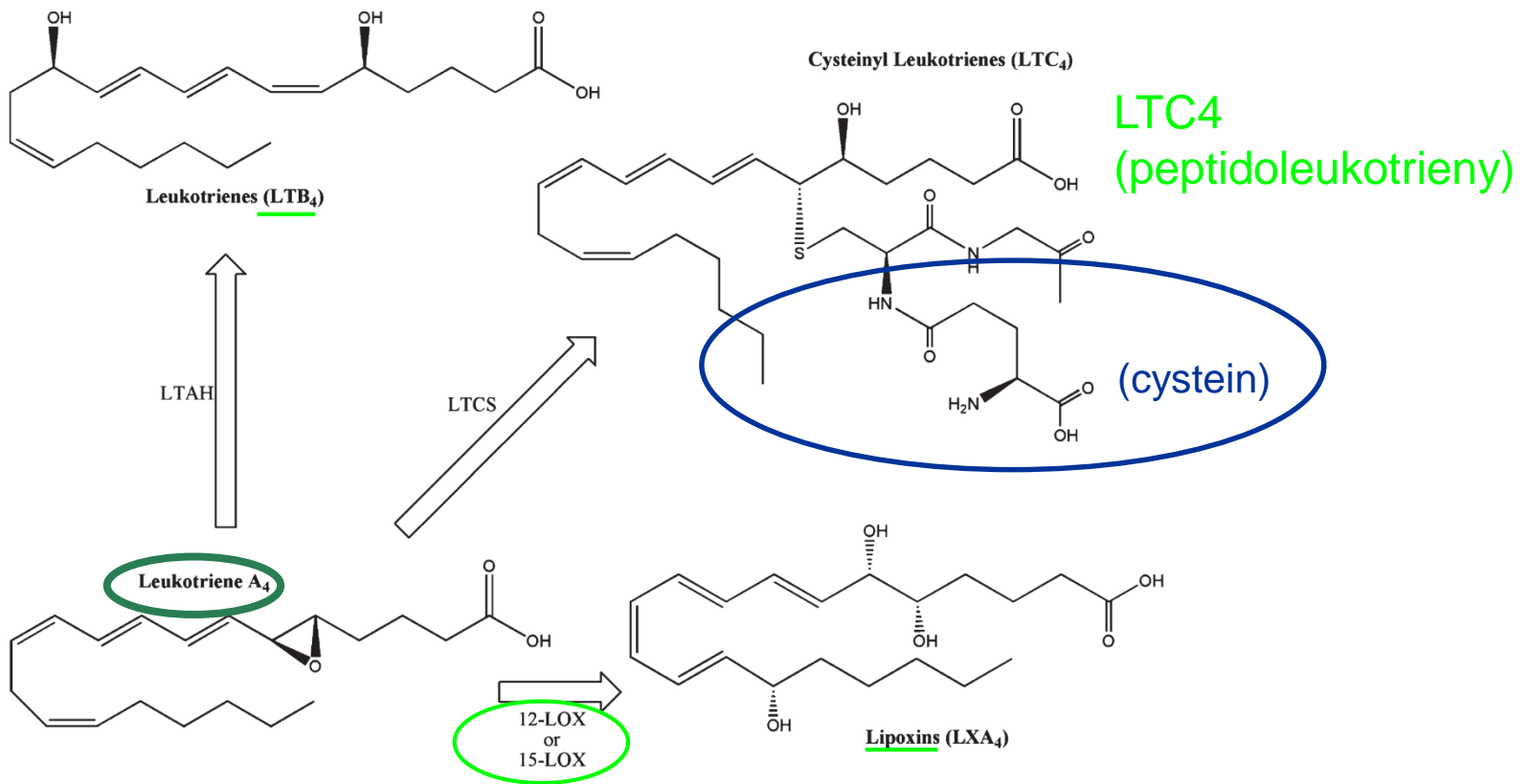
Struktury metabolitů AA, jejichž vznik je katalyzován 12-lipoxygenázou



Structures of 12-lipoxygenase metabolites. 12-Lipoxygenase creates 12-HpETE, which can further isomerize to form HXA₃.

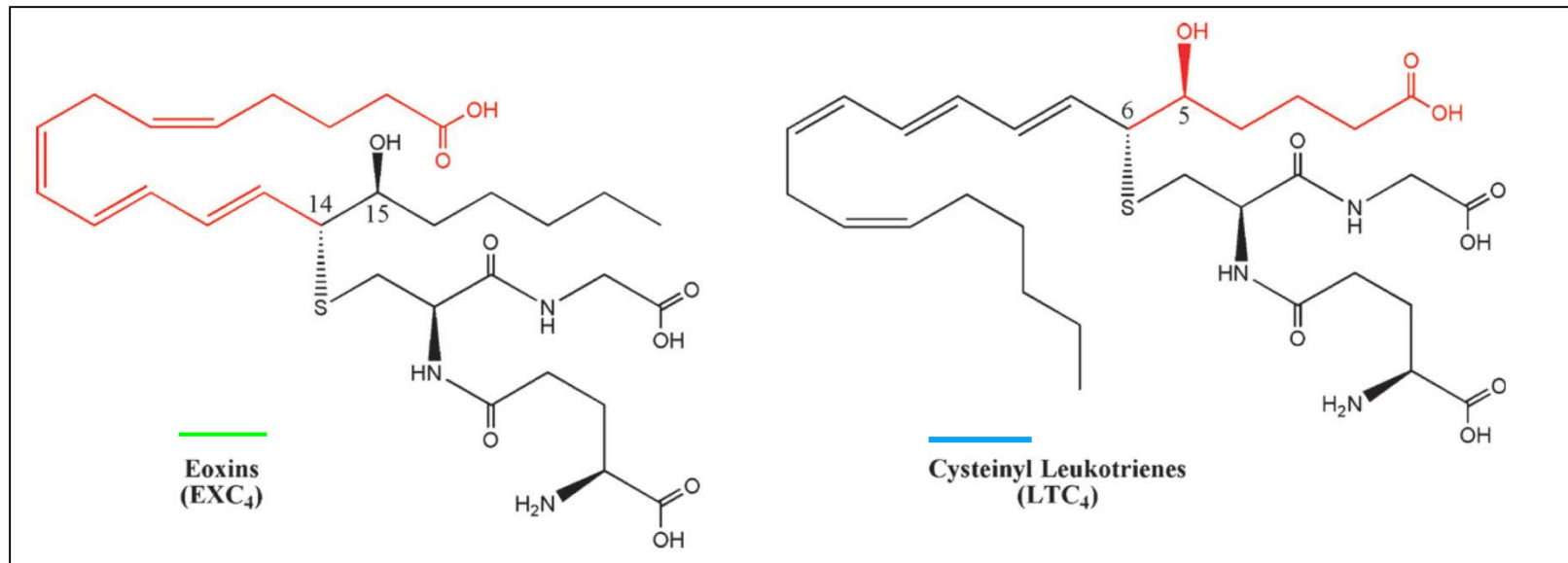
From: J. Lipid Res. 2009 June; 50 (6): 1015-1038.

Struktura metabolitů AA (peptidoleukotrien C4 a Lipoxin (LXA4))

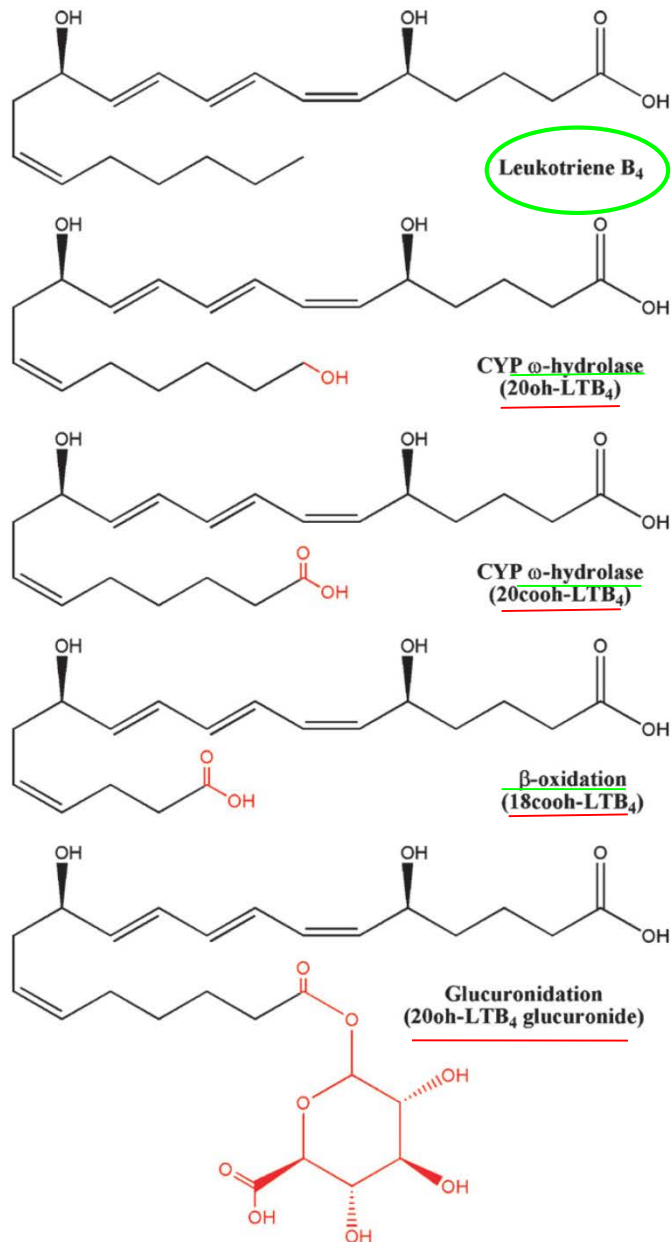


From: J. Lipid Res. 2009 June; 50 (6): 1015-1038.

Struktura metabolitů AA (peptidoleukotrien C4 a Eoxinoin (EXC4)



From: J. Lipid Res. 2009 June; 50 (6): 1015-1038.



Příklad metabolismu LTB₄

CYP ω – hydrolasa

CYP ω – hydrolasa

β - oxidace

glucuronidace

Fig. 8. Examples of LTB₄ metabolism by β -oxidation, CYP ω -hydrolases, and glucuronidation.

From: J. Lipid Res. 2009 June; 50 (6): 1015-1038.

Glukuronidace - konjugace s kyselinou glukuronovou (glukosiduronovou).

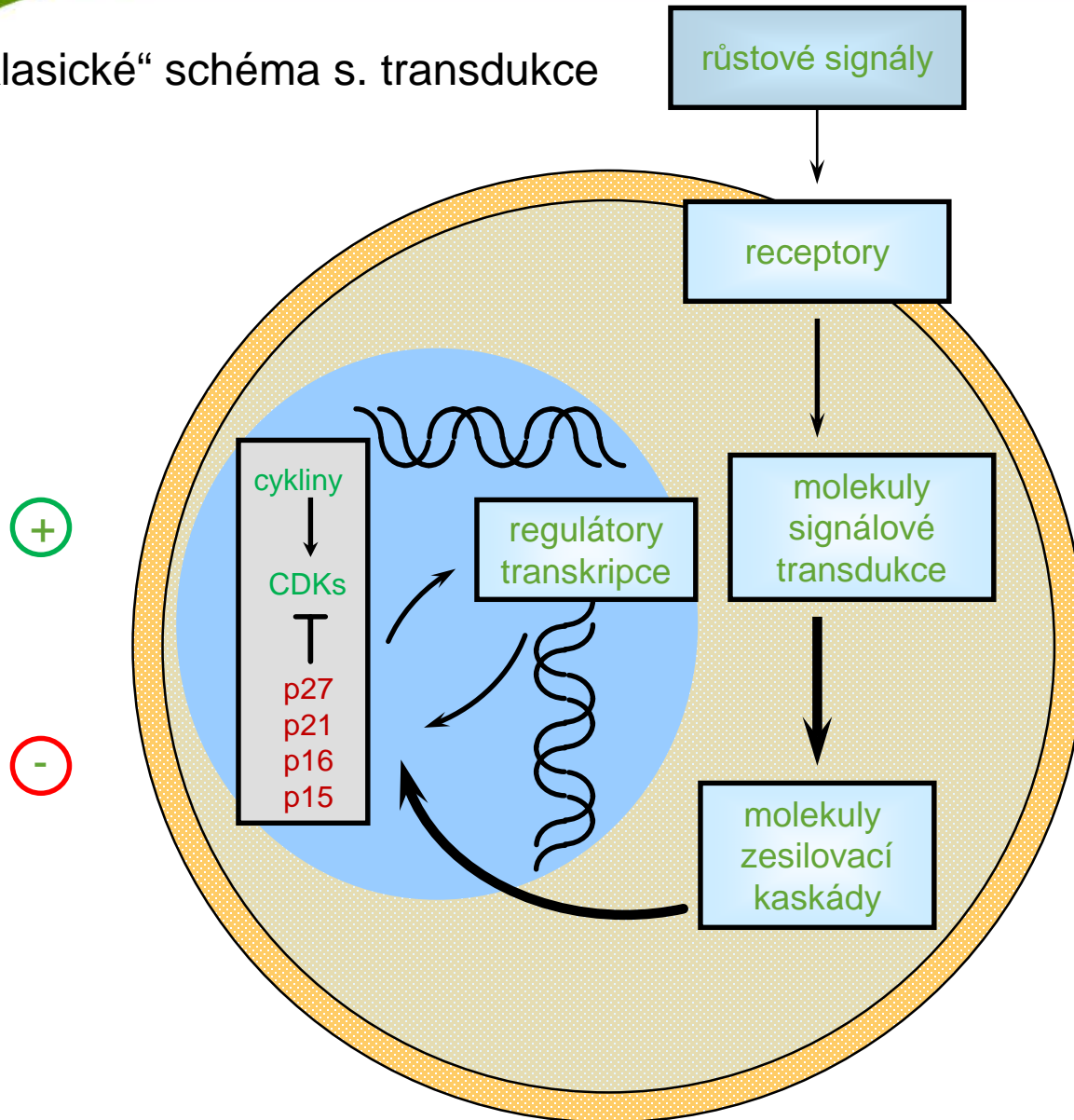
Je to děj lokalizovaný v největším počtu tkání a orgánů.

Má největší spektrum xenobiotik, se kterými vytváří konjugáty.

To zvyšuje polárnost a rozpustnost substrátu ve vodě, což ulehčuje detoxikaci a vylučování.

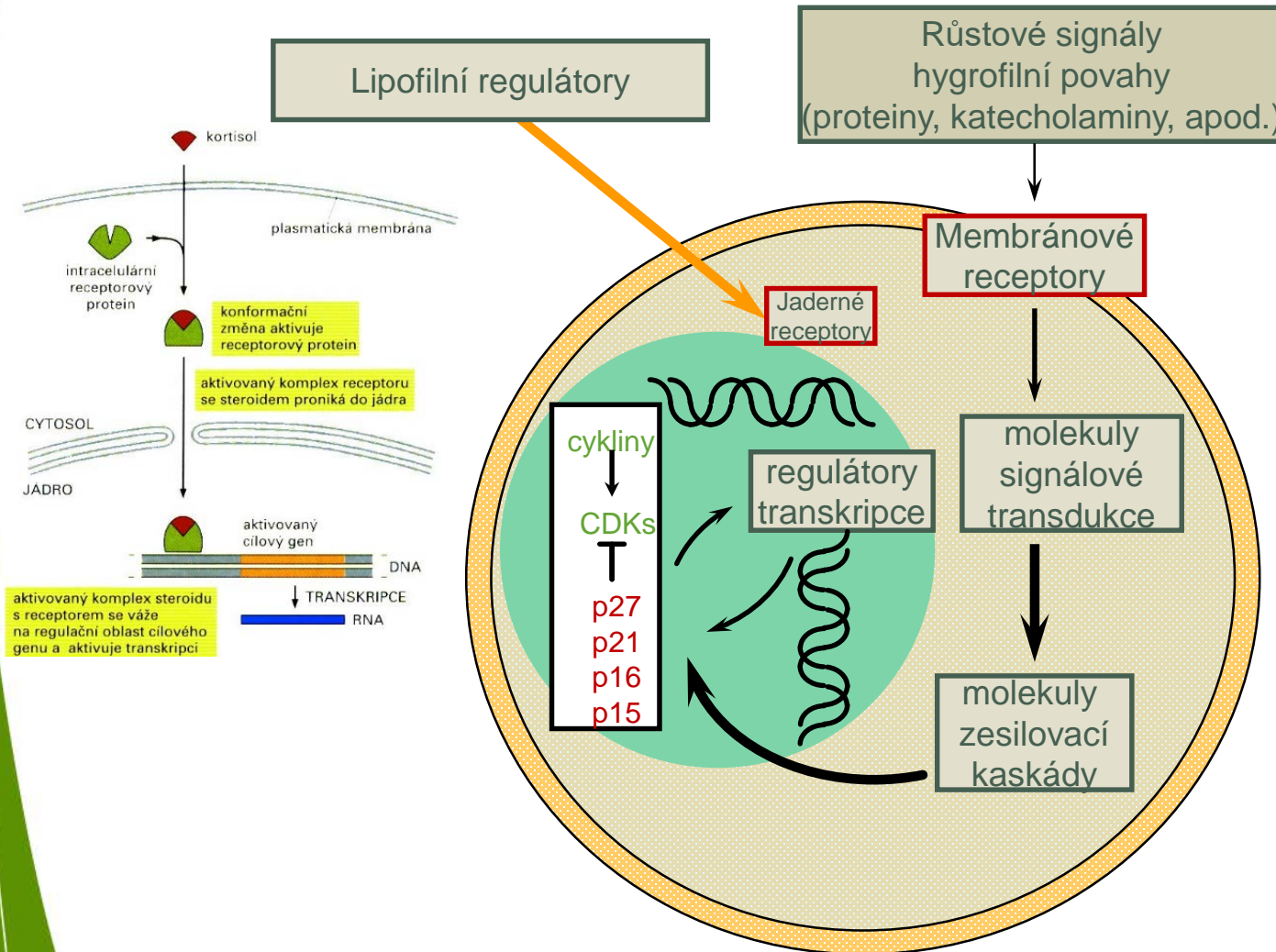
Transdukce (přenos) signálů

„klasické“ schéma s. transdukce



Transdukce (přenos) signálů

Způsob signalizace odvislý od chemické podstaty ligandů

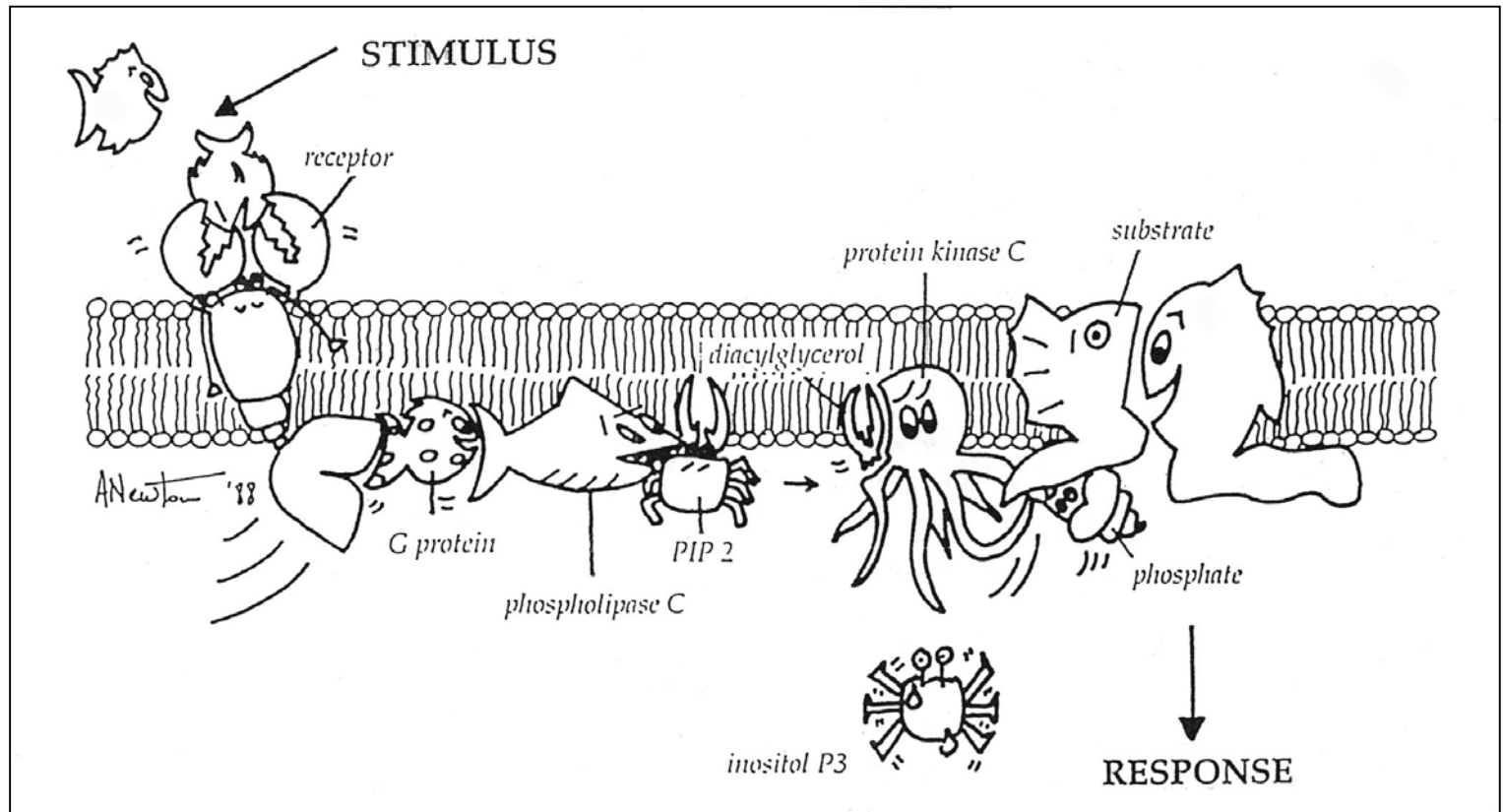


Transdukce (přenos) signálů - podstata

- ▶ Představuje **zákonitě koordinovanou** (a nesmírně rychlou) **souslednost dějů** (reakcí) vedoucích **od vnější plasmatické membrány** (návázání regulátoru -ligandu- na plasmatickou membránu anebo průchod regulátoru touto membránou) **přes cytosol k jádru** (expresi genetické informace). Jedná se o **PŘENOS INFORMACE**.
- ▶ **Výsledkem je** zabezpečení všech fyziologických funkcí buněk a organismu včetně regulace cytokinetiky (proliferace, diferenciaci a smrti buněk v čase).
- ▶ Procesu se účastní **řada regulátorů různé chemické povahy**.
- ▶ **Charakter přenosu** signálu se odvíjí se od **specifické chemické struktury** jednotlivých komponent dané signální dráhy.
Podstatou je změna konformace molekul (souslednost změn konformací).
- ▶ Jeden z **principiálních rozdílů způsobu signalizace** spočívá zejména v tom, zda má daný **regulátor** povahu **hygrofilní** (lipofóbní) anebo **hygrofóbní** (lipofilní).

Receptorem zprostředkovaná dráha aktivace

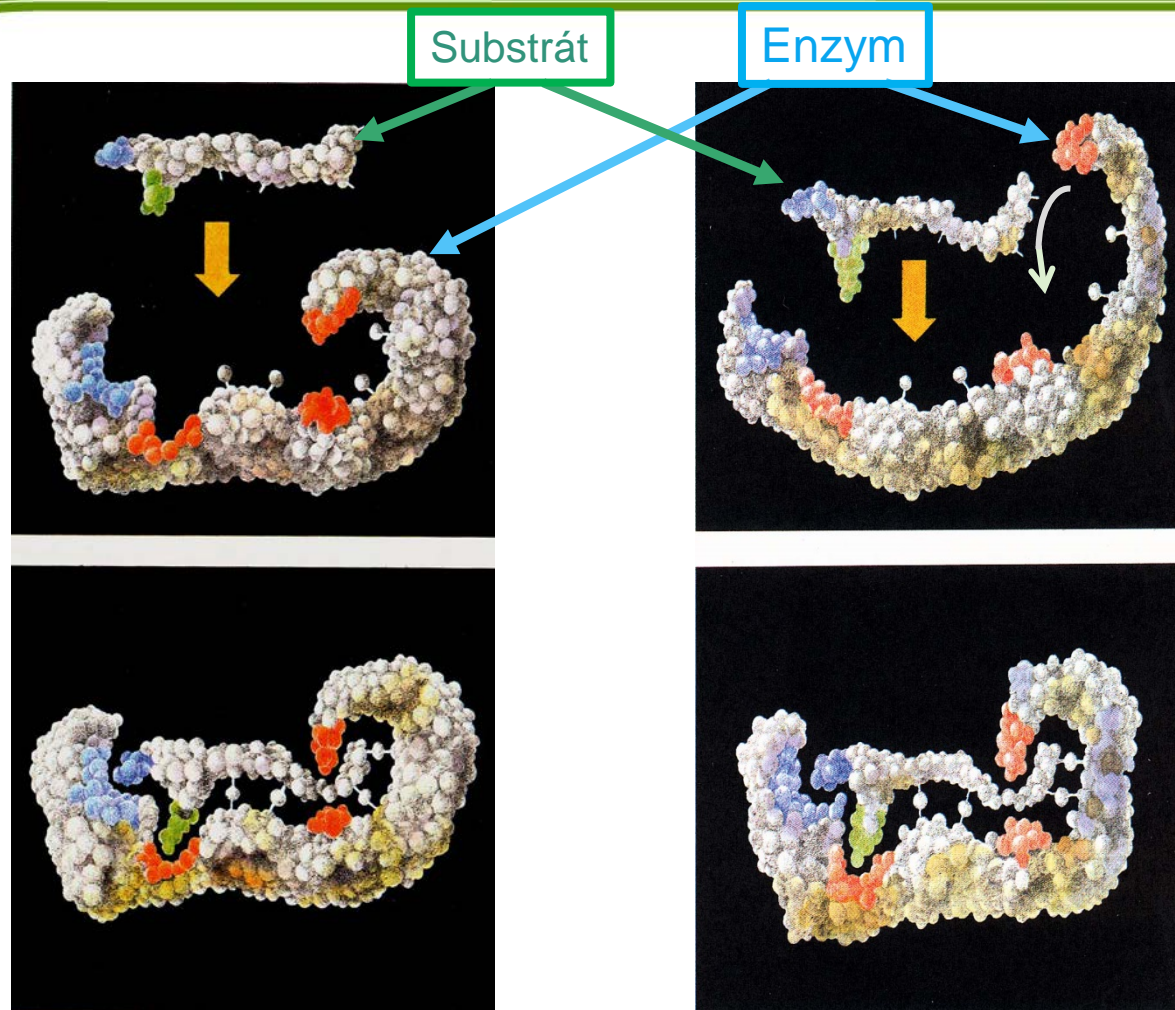
(naznačení sousledností konformačních změn)



Podstatou je
změna konformace

PŘÍKLADY - ENZYMY

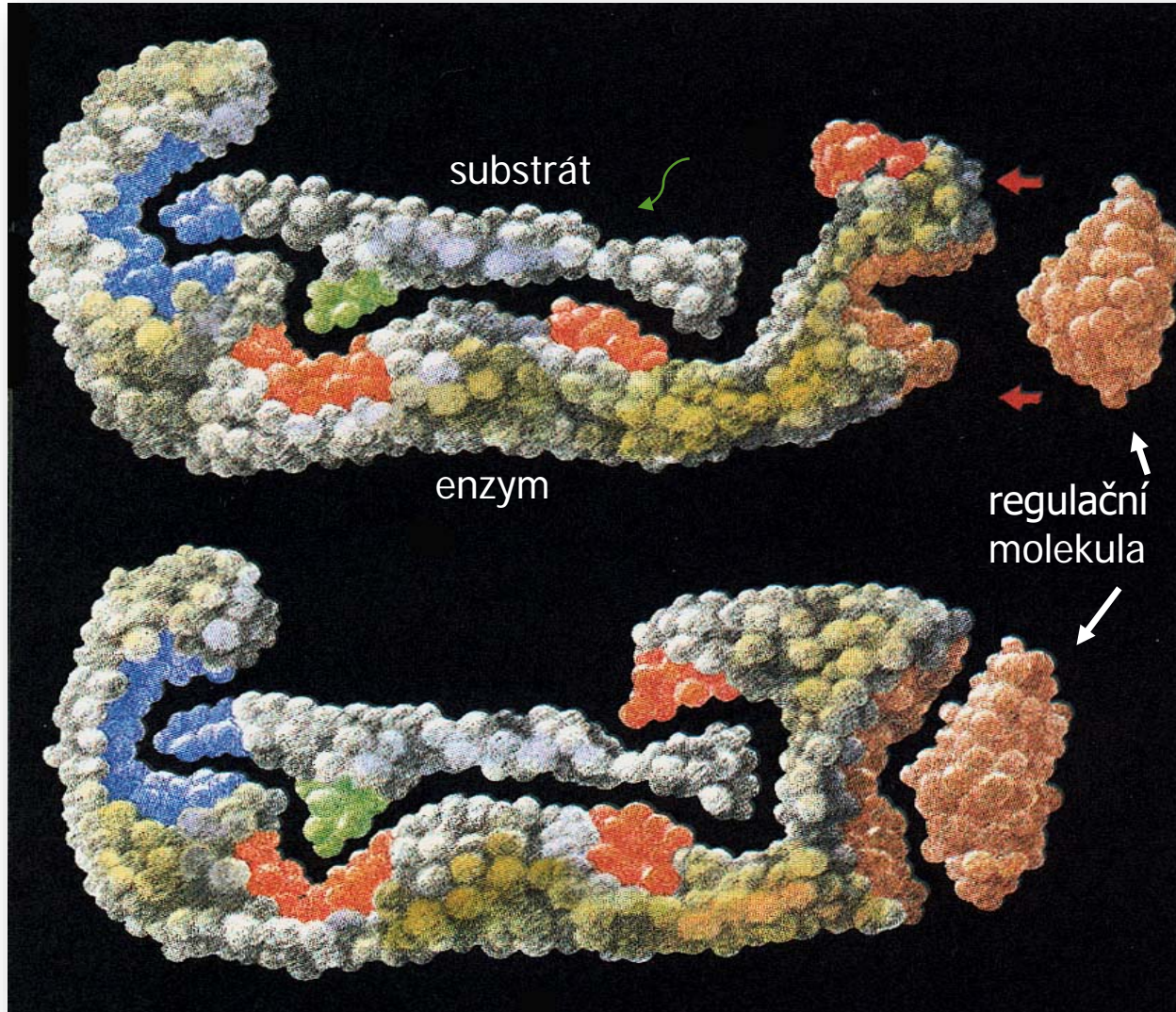
Jak vzniká komplex substrát – enzym



Substrát přesně zapadne do lůžka v molekule enzymu. V tomto lůžku ho poutají různé typy sil: hydrofobní (modrá), přitahování opačně nabitých skupin (zelená v substrátu a červená v lůžku), vodíkové můstky. Štěpená vazba se tím dostane mezi „nůžky“ silně polárních skupin (např. karboxylů).

Při „vyvolaném přizpůsobení“ je enzym teprve domodelován silami, které poutají substrát k jeho lůžku.

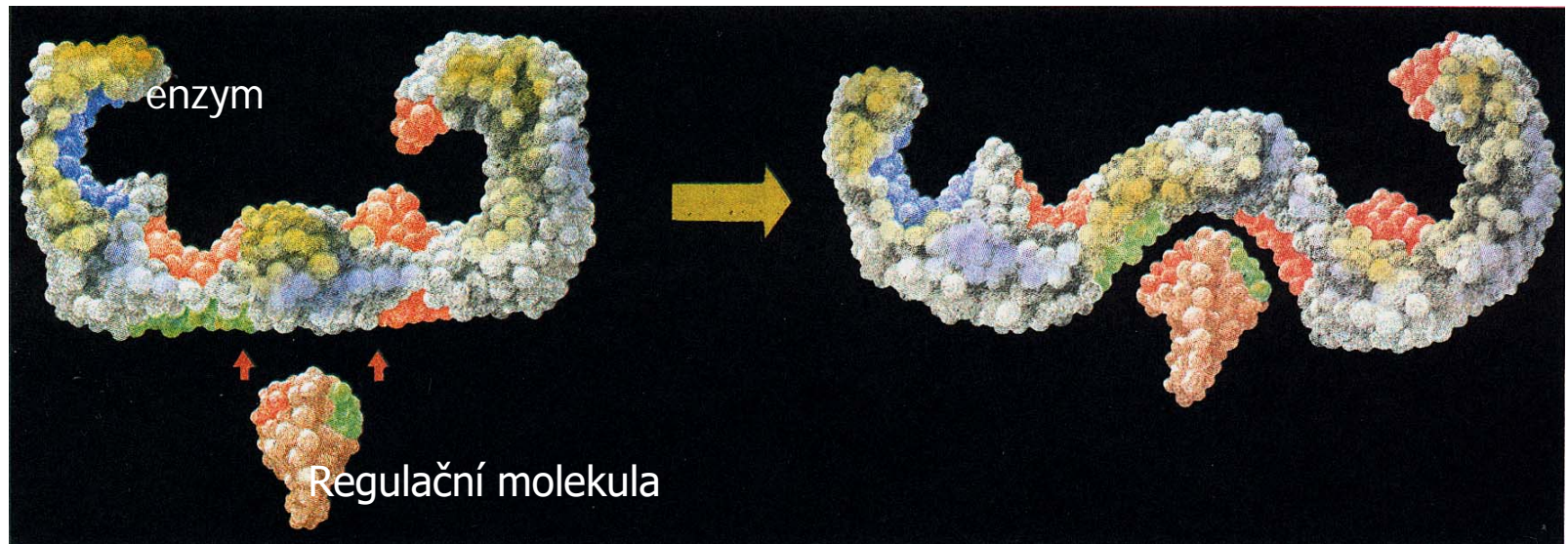
Alosterická aktivace enzymu.



Enzym sám není schopen rozštěpit substrát, neboť jeho molekula nemá správný tvar.

Teprve naváže-li se na jiné místo regulační molekula (hnědá zprava), než se váže substrát, získá funkční formu.

Alosterická inaktivace enzymu.

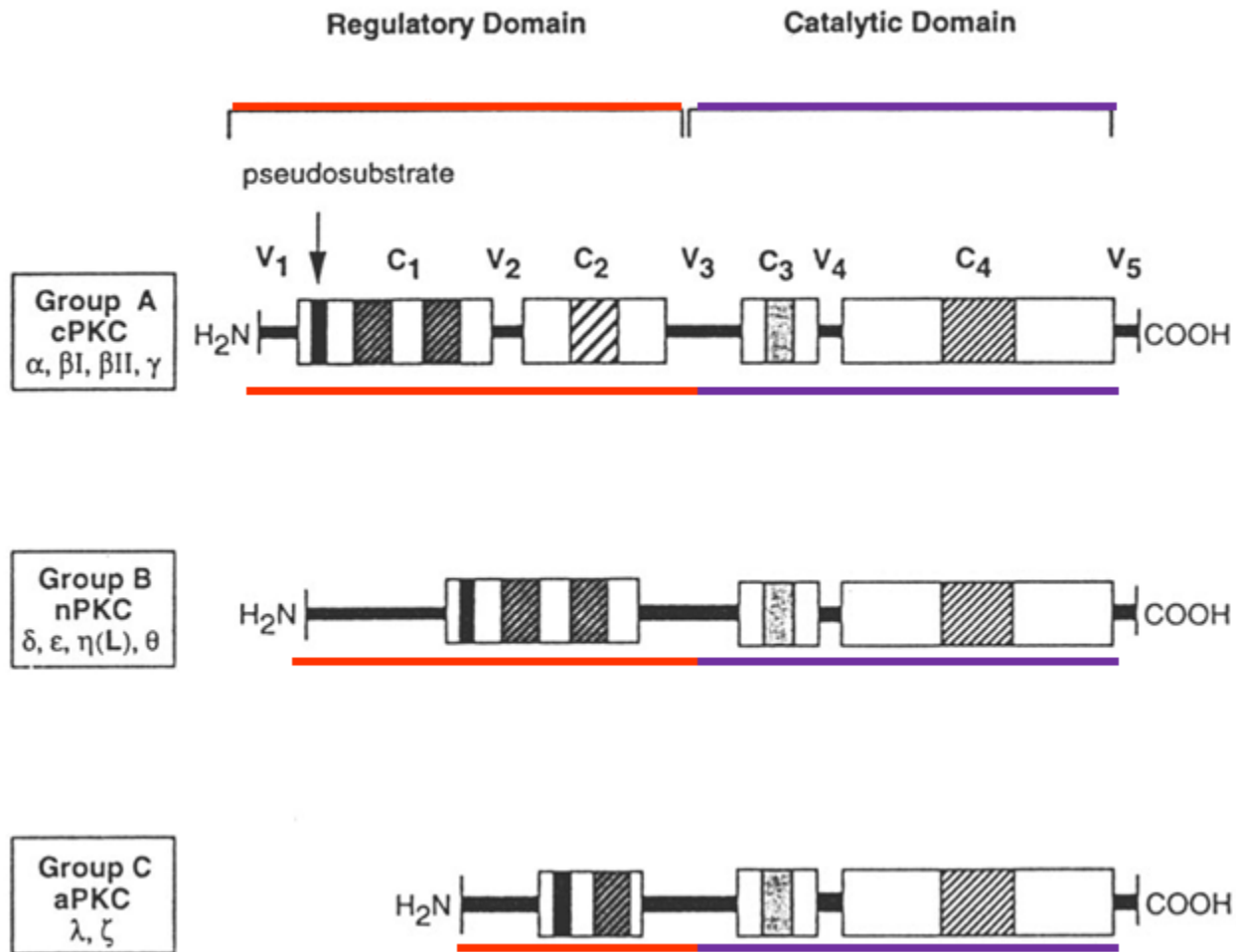


Regulační molekula se připojuje opět na jiném místě molekuly enzymu, než kam se váže substrát.

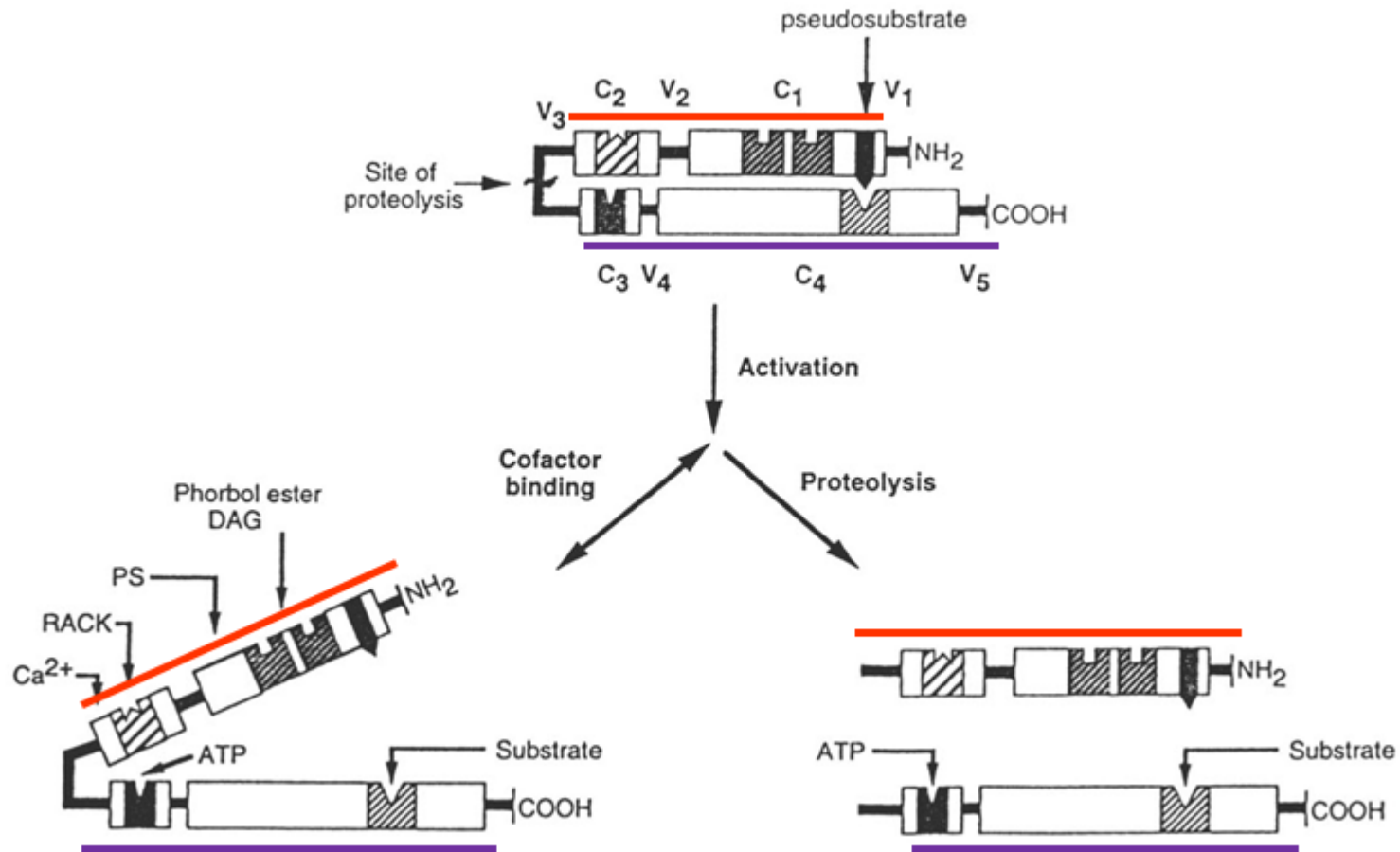
Tím se liší od pouhého blokování lůžka, které může způsobit látka podobná substrátu (soutěživá čili kompetitivní inhibice).

Alosterická inaktivace patří k regulačním pochodům. Může ji vyvolat jen zcela určitá látka, ta, která svými vlastnostmi *přesně odpovídá* místu, na které se váže.

Struktura izoform protein kinázy C (PKC) - schéma



Model aktivace protein kinázy C

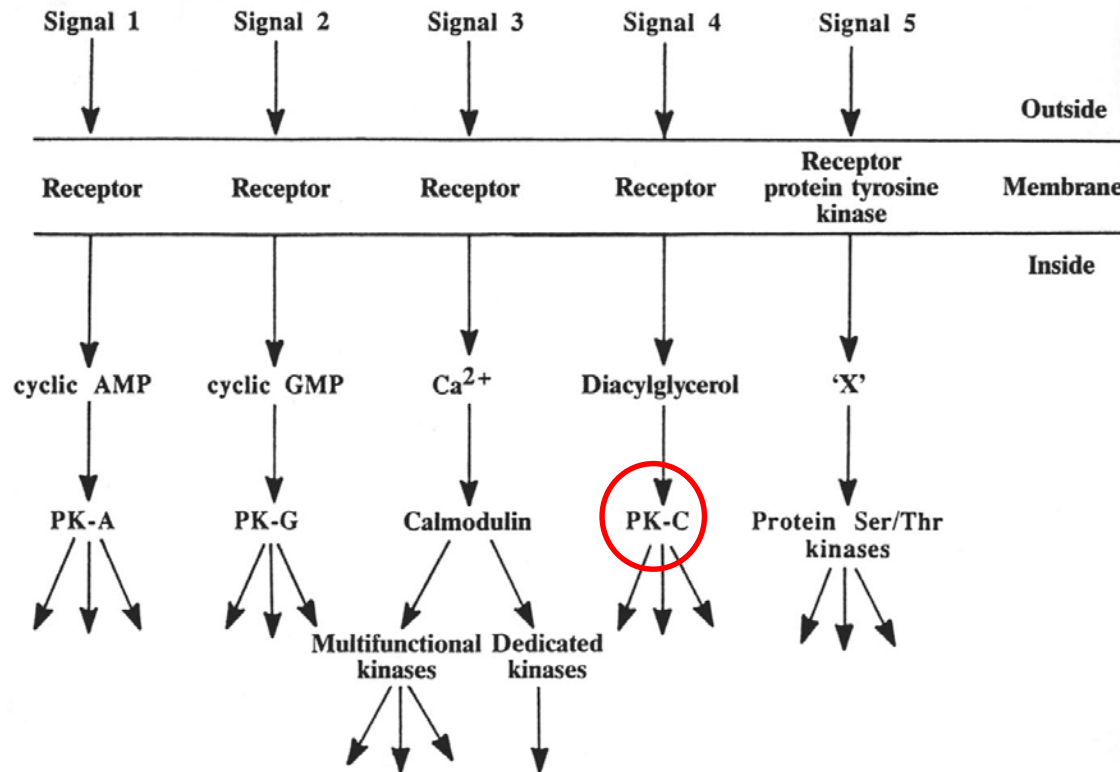


A. Basu: Pharmacol. Ther., 59 (3), 257-280, 1993

Buněčné signalizace obecněji

**s důrazem na
metabolismus fosfolipidů**

Pět základních signálních systémů, které fungují v eukaryotických buňkách – základní schéma



P. Cohen: TIBS, 17 (10), 408–413, 1992

Pět mezibuněčných paralelních signálních drah aktivovaných receptory svázanými s G-proteiny, tyrozin kinázovými receptory nebo oběma typy

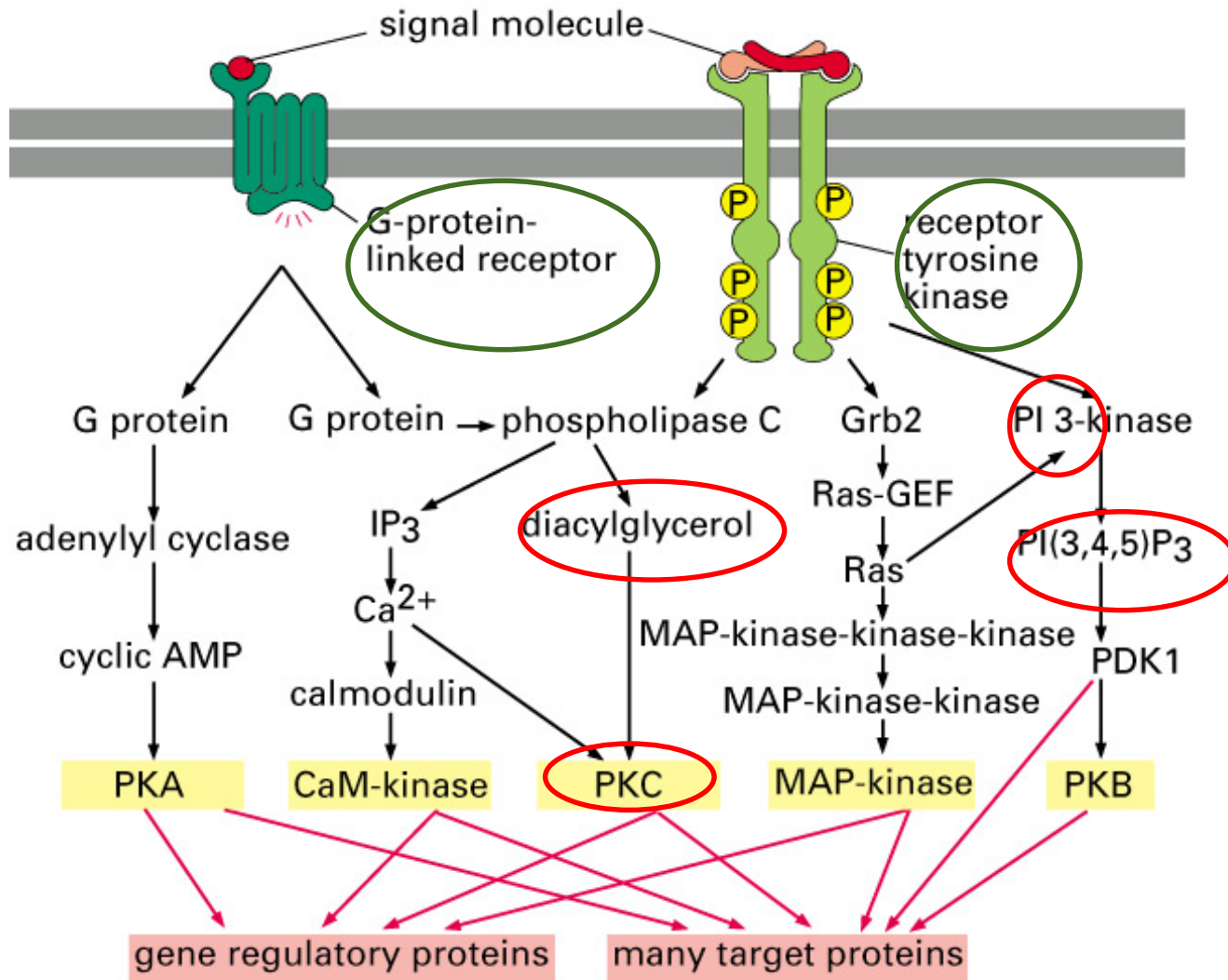
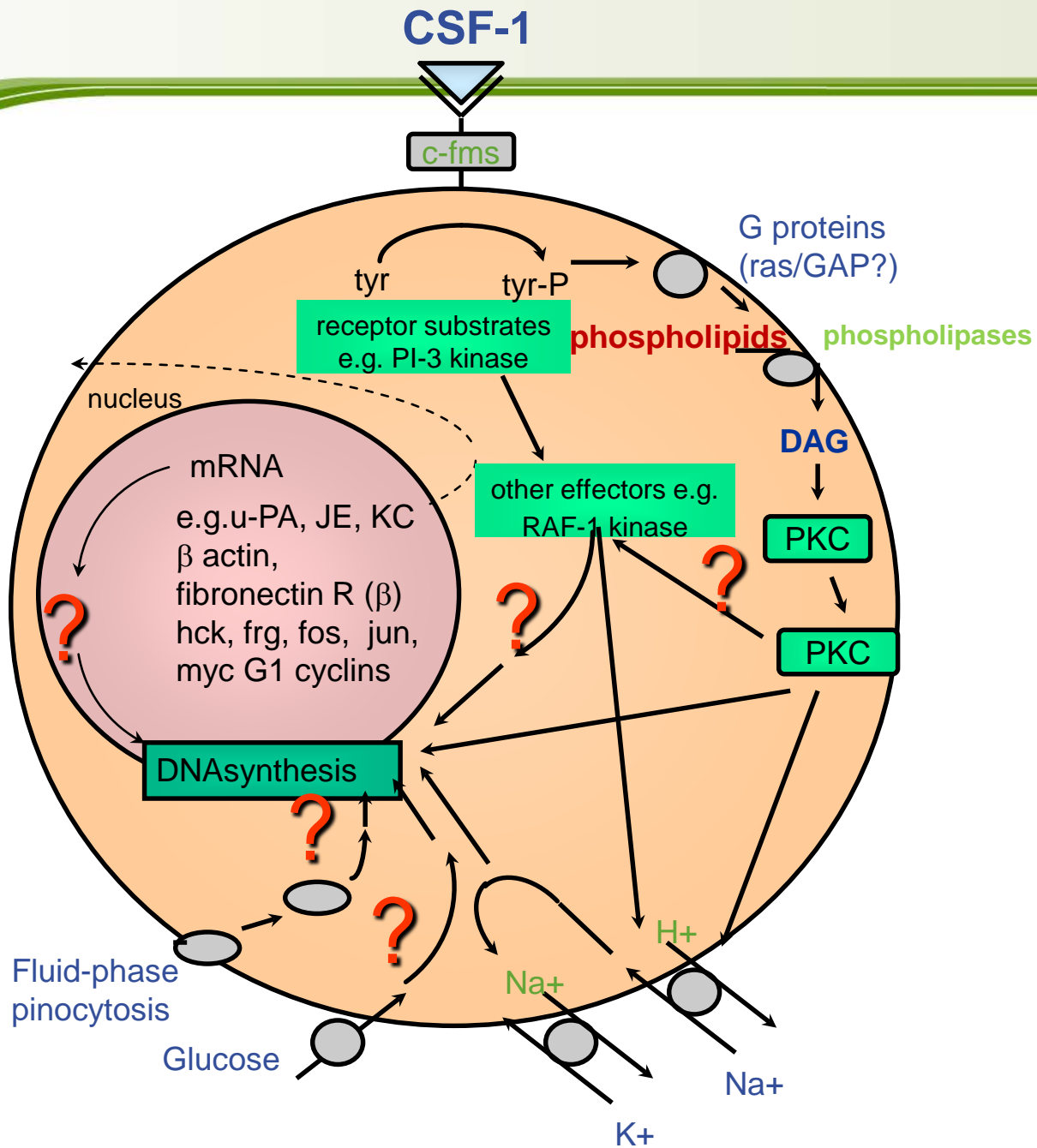
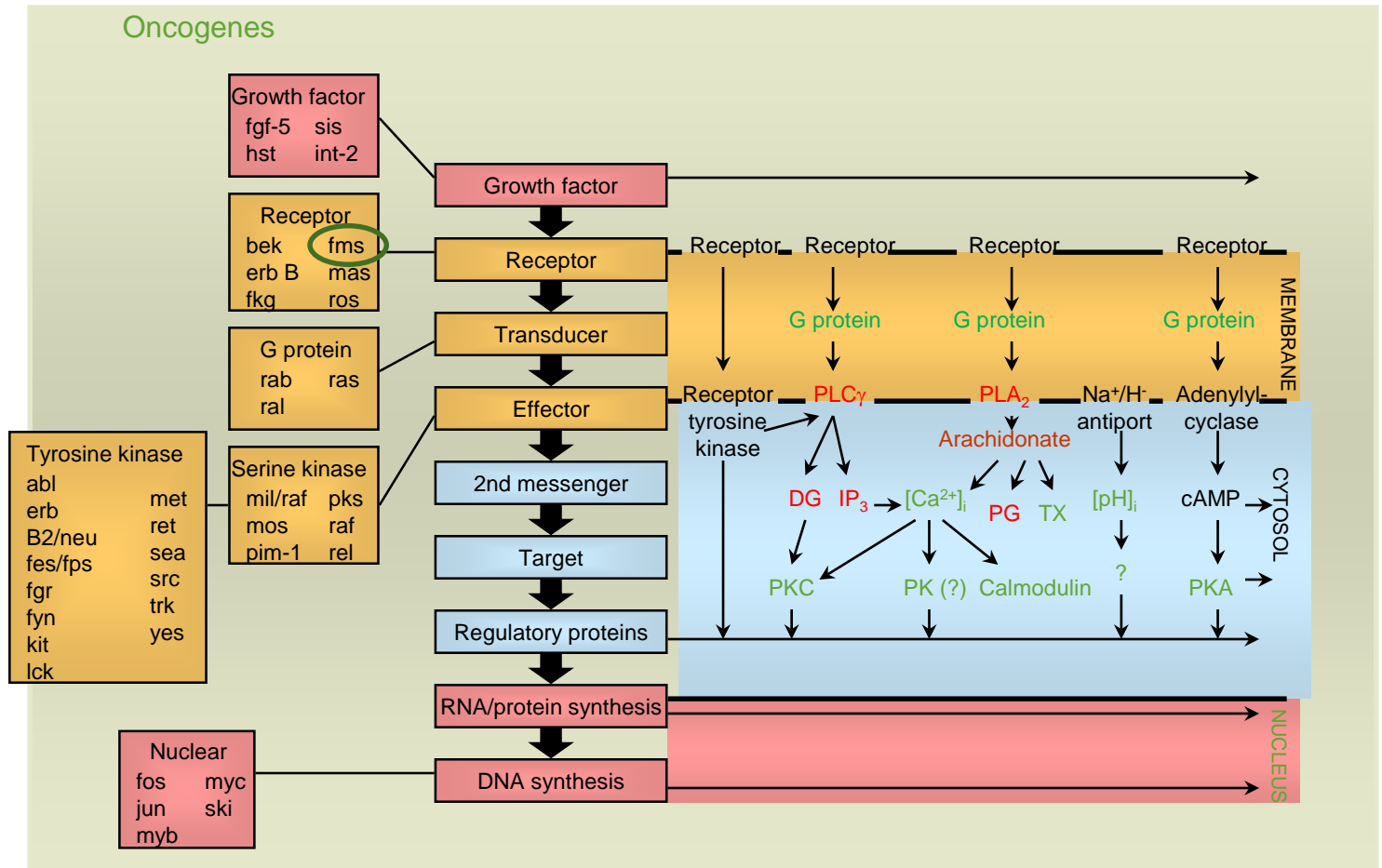


Figure 15-61. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

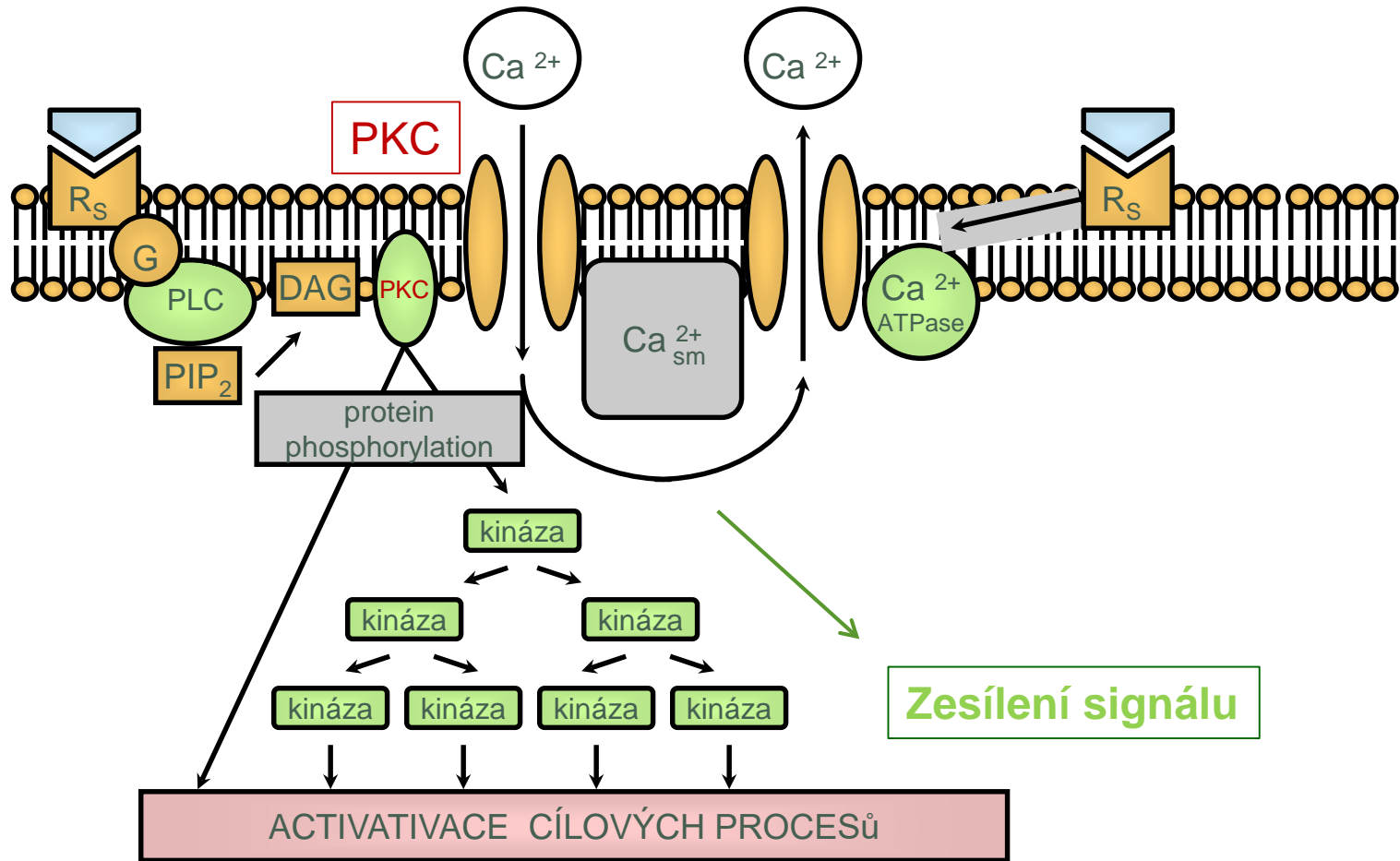


Jednotlivé úrovně signálních kaskád s naznačením zapojení fosfolipidových komponent



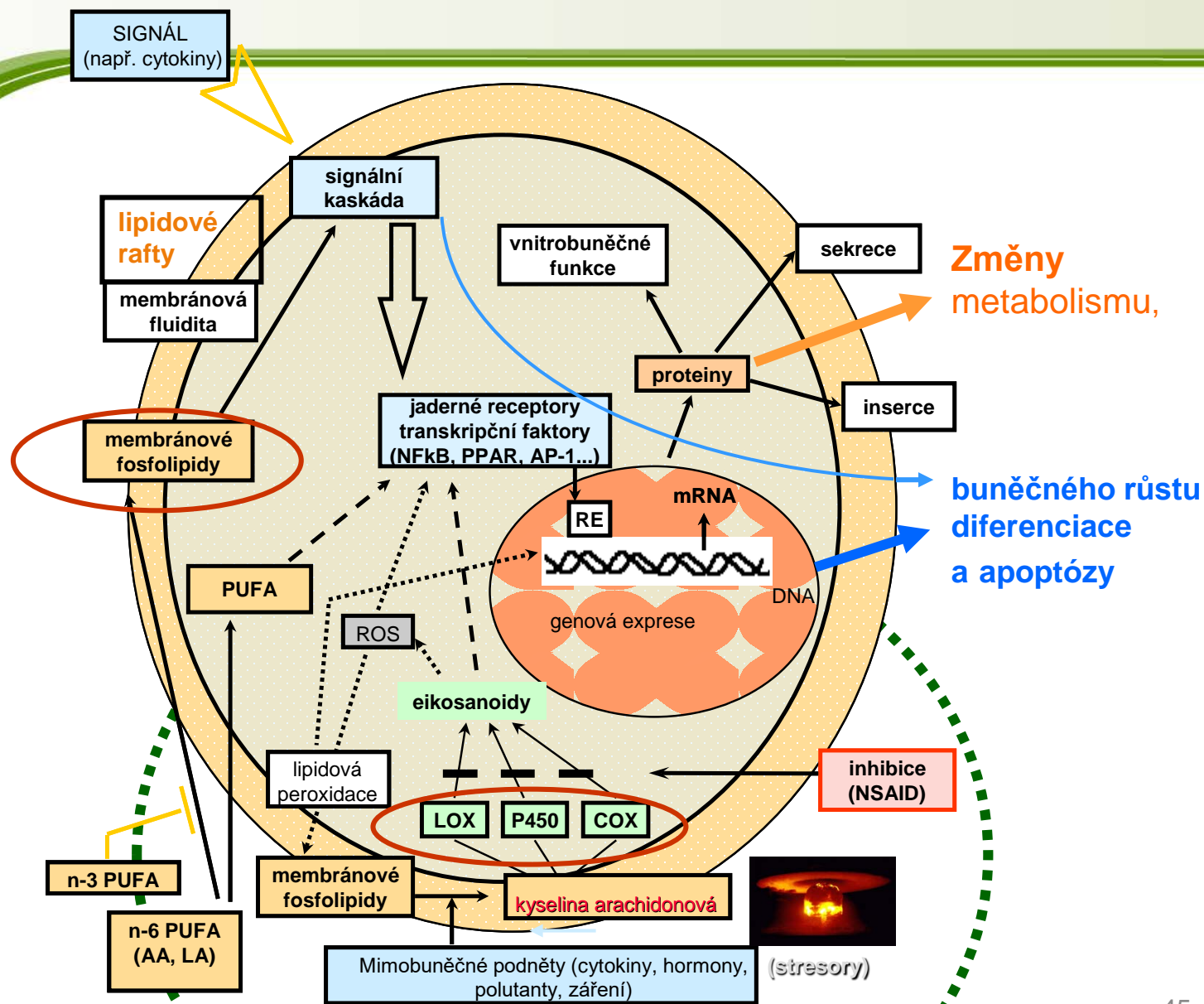
podle: G.Powis: TiPS; 12: 188 -194, 1991

Kaskáda proteinových kináz v přenosu signálů v propojení se složkami fosfolipidového metabolismu

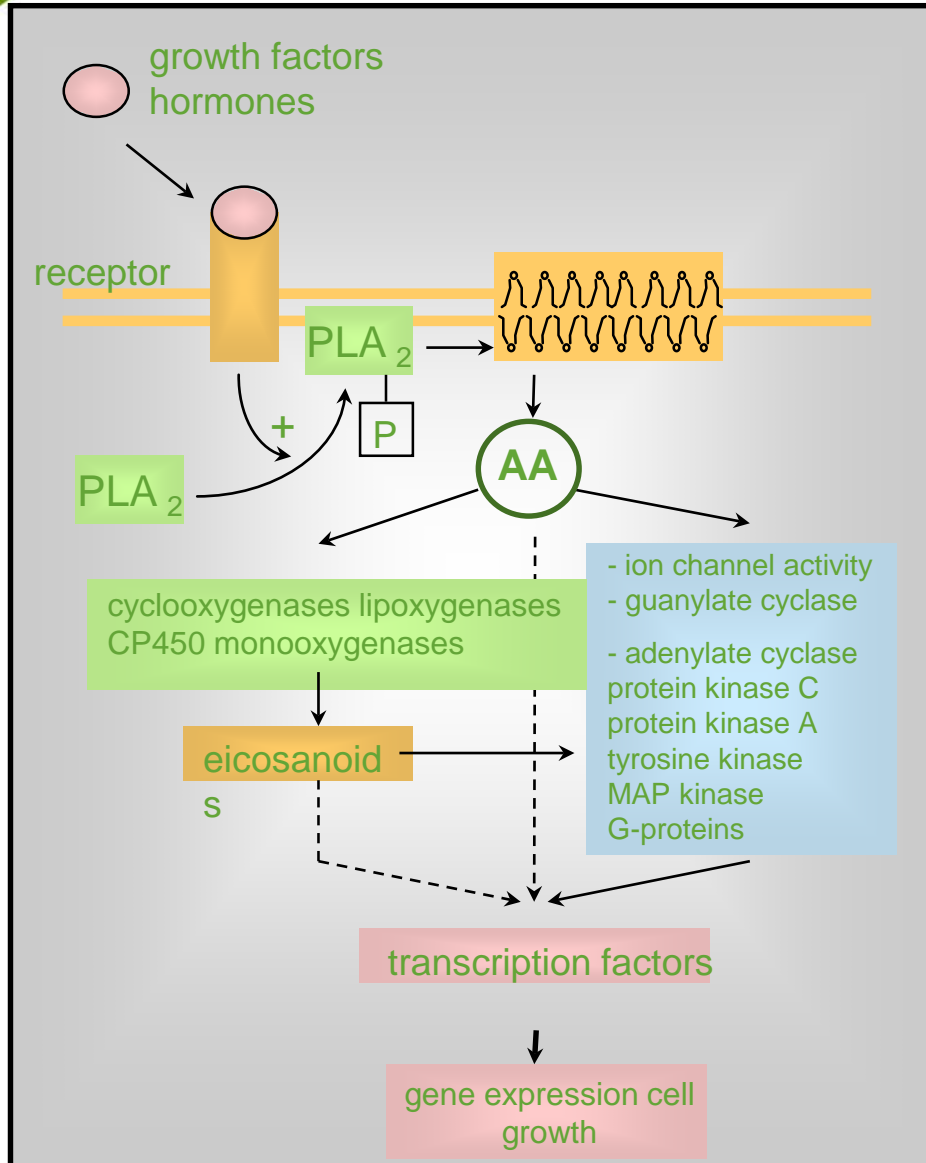


MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY působení ω -3 a ω -6 VNMK

(mediátory a modulátory buněčné signalizační sítě)



Zjednodušené schéma úlohy eikosanoidů v buněčných signalizacích



According to: A. Sellmayer et al.:
Prostaglandins, Leukotrienes and
Essential Fatty Acids ;
57: 353 - 357, 1997.

Fosfolipidy a zejména jejich složky

vysoce nenasycené kyseliny (PUFA), včetně jejich metabolitů **eikosanoidů**, patří mezi významné epigeneticky působící faktory schopné ovlivnit jak dělení a zánik normálních, ale i transformovaných buněčných populací, tak proces maligní transformace.

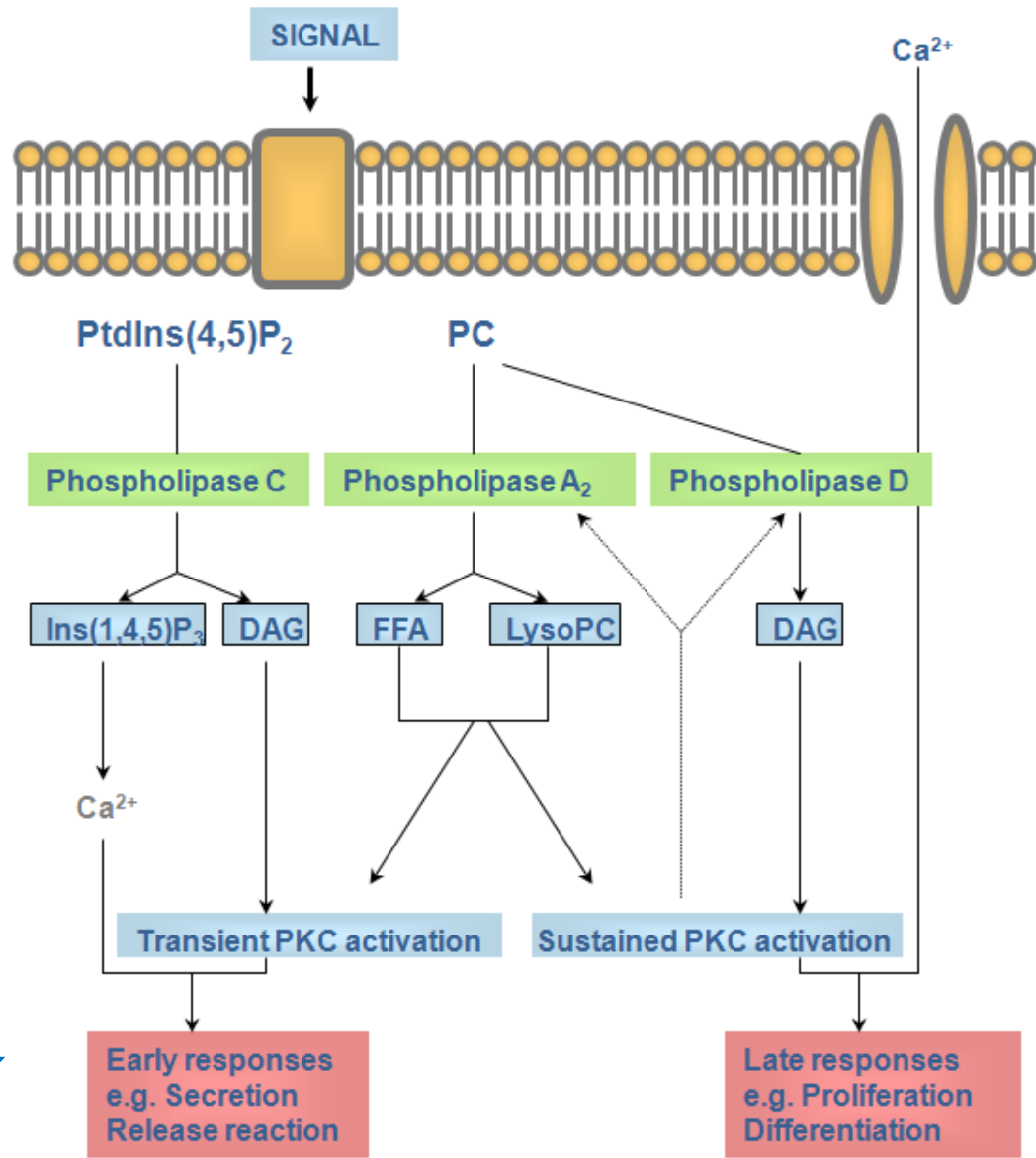
Hlavní mechanismy působení PUFAs

- 1) přímé ovlivnění aktivity transkripčních faktorů regulujících expresi genů významných z hlediska cytotkinetiky
- 2) produkce eikosanoidů působících na přenos signálů růstových regulátorů, cytotkinů a imunitní systém
- 3) produkce reaktivních kyslíkových metabolitů vznikajících peroxidací lipidů.

VŠECHNY HLAVNÍ KOMPONENTY SPOLUPŮSOBÍ

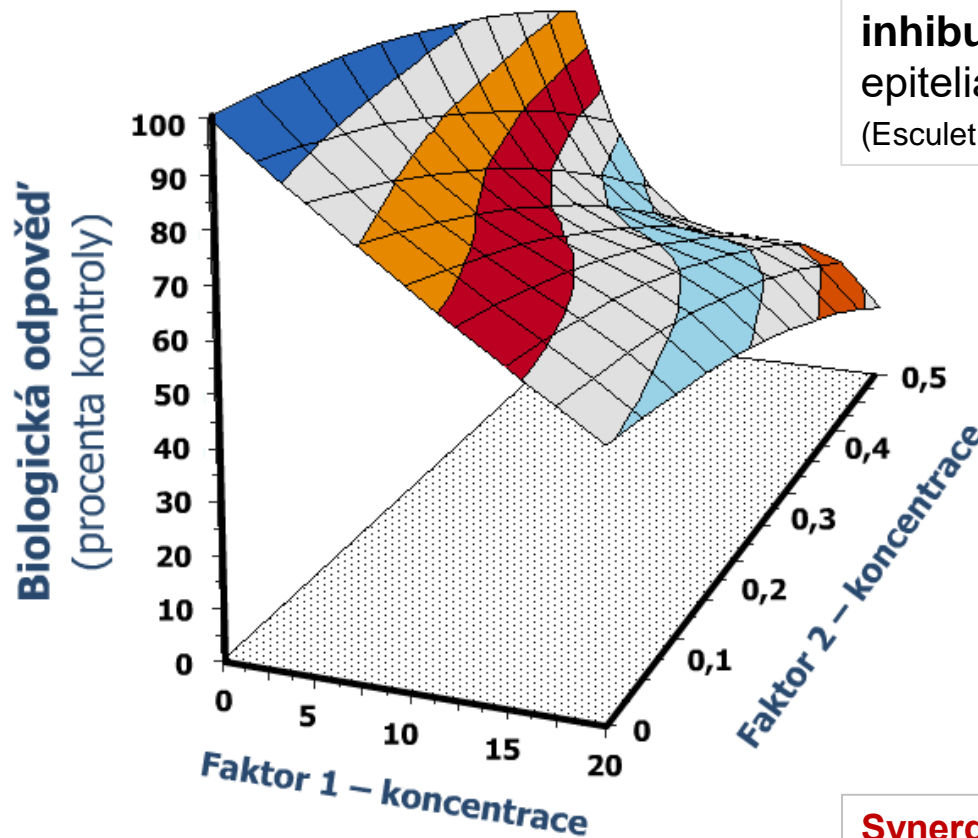
Otázkou je charakter interakcí

Časové hledisko: efekt je závislý na délce působení



doba působení

V reálném prostředí jednotlivé faktory spolupůsobí v různých koncentracích



Příklad interakce dvou faktorů inhibujících proliferaci epitelálních buněk CCL64 (%) (Esculetin = Faktor 1) a (TGF- β 1= faktor 2)

Interakce závisí na koncentraci látek a mohou mít **různý charakter** (*antagonistický, aditivní, synergický*)

Synergické působení a nelineární charakter odpovědi jsou zjevné po kombinaci vyšších koncentrací obou faktorů.

(Použita vlastní data z: Eur. J. Pharmacol. 316, 349–357, 1996)

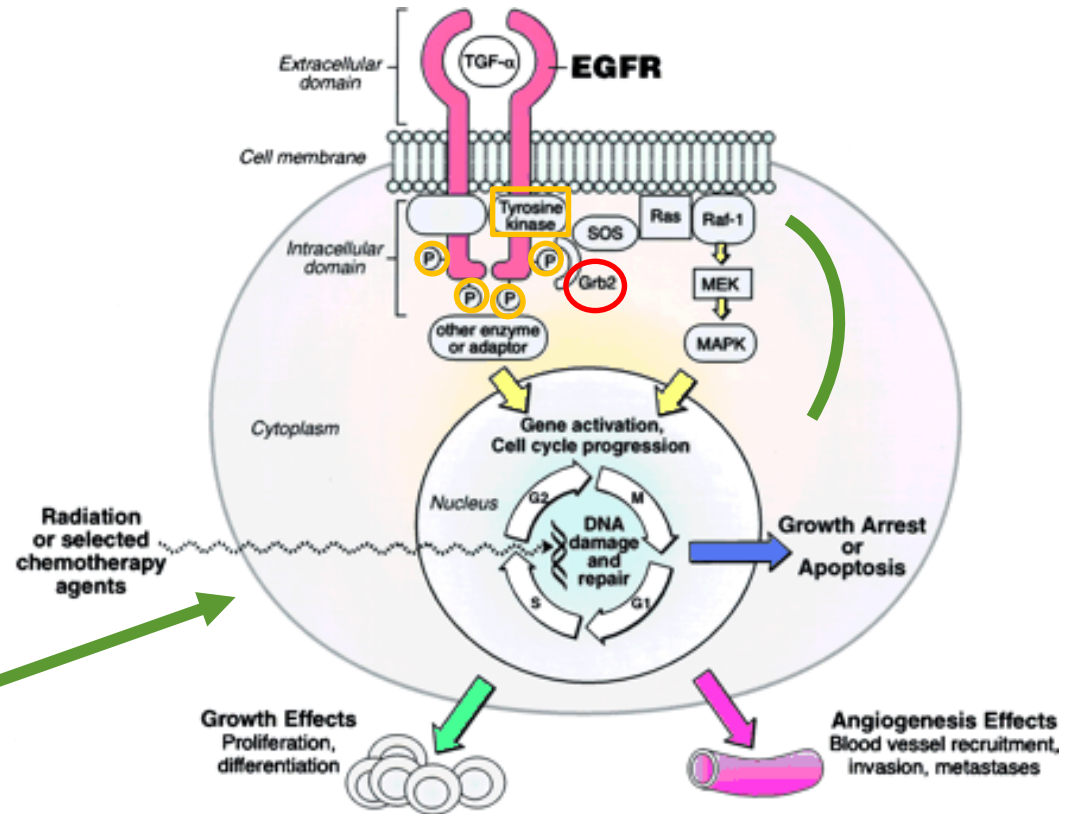
Jednotlivé signální dráhy
bývají mezi sebou propojeny.

Mohou interagovat, „spolupůsobit“.

Obecné schéma aktivace rec. TKs

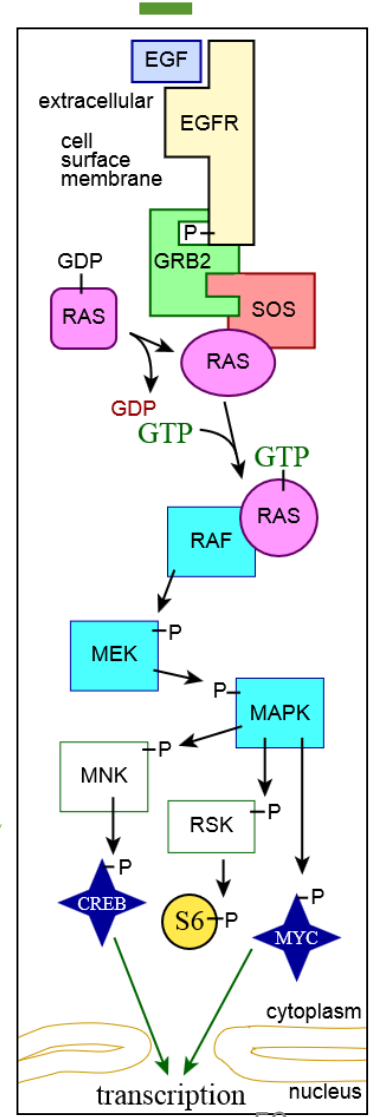
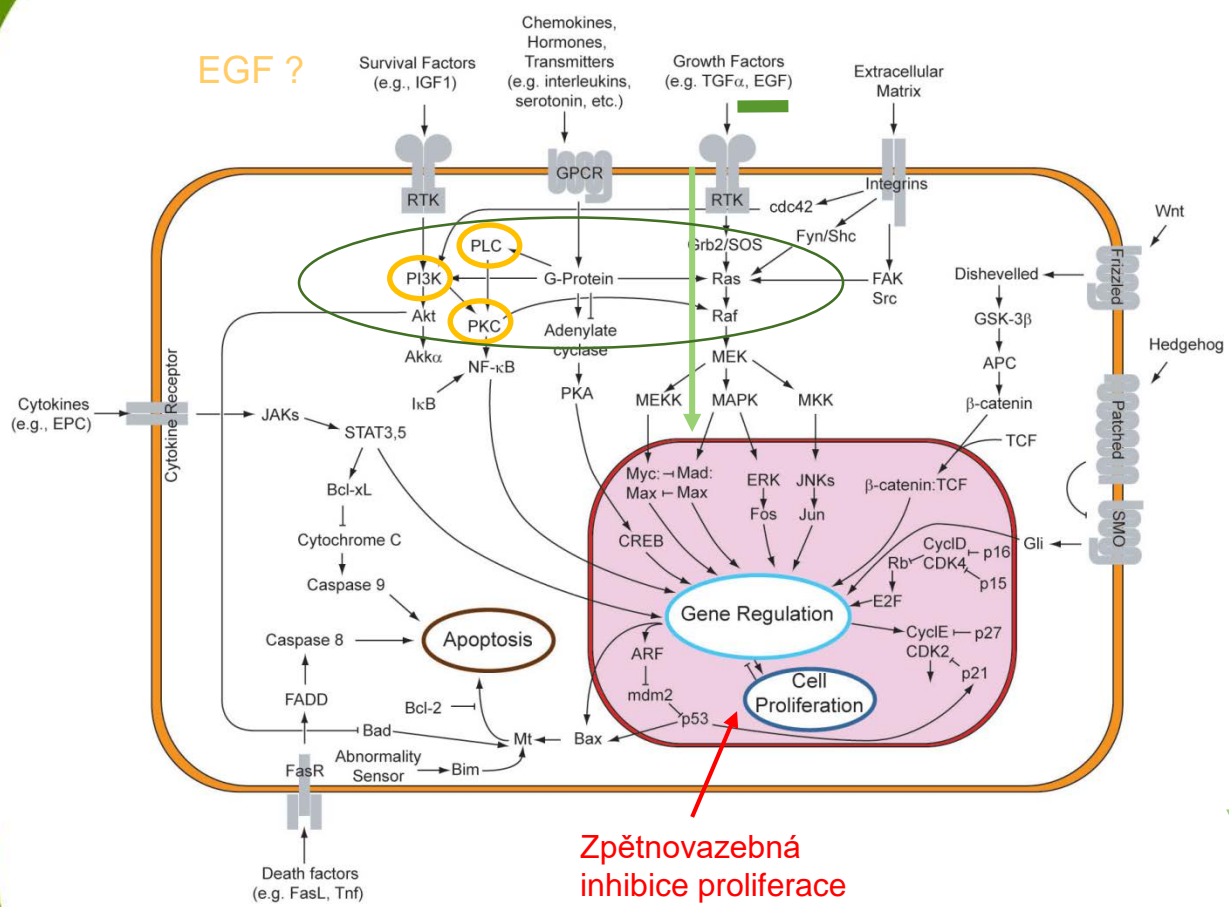
(zde na příkladu EGFR)

1. ligand se specificky váže na receptor
2. receptor dimerizuje
3. tyrosin-kinázové domény se navzájem fosforylují
4. autofosforylace vede k navázání (recruitment) adaptérových proteinů (zde **Grb2**)
5. v závislosti na receptoru se aktivují „downstream“ signální dráhy – zde např. **Ras/Raf1/MEK/MAPK kinázová dráha,**
6. která vede k regulaci transkripce



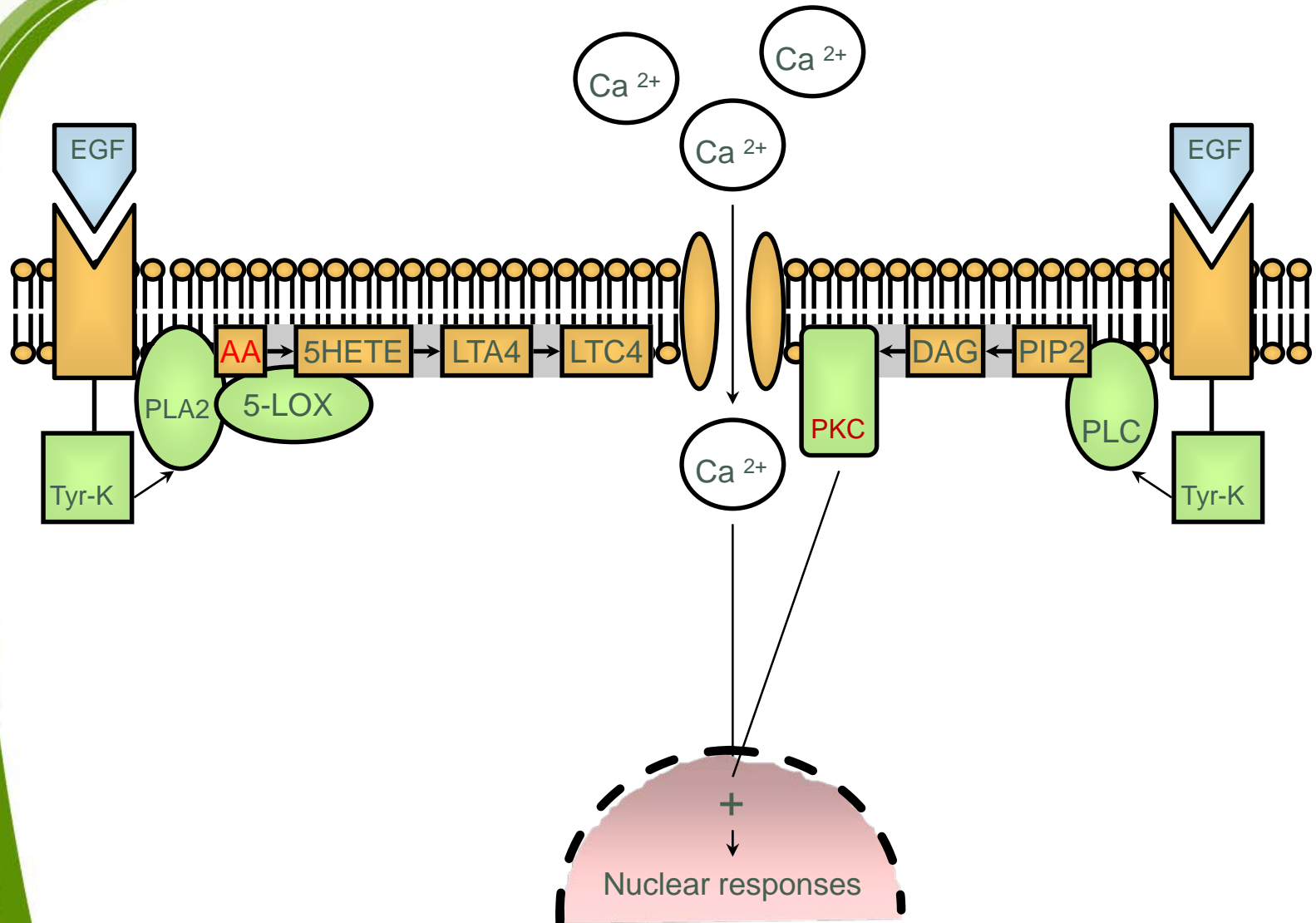
Ukázka propojení některých klíčových signálních drah

Key components of a signal transduction pathway (MAPK/ERK pathway shown)



https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_signaling

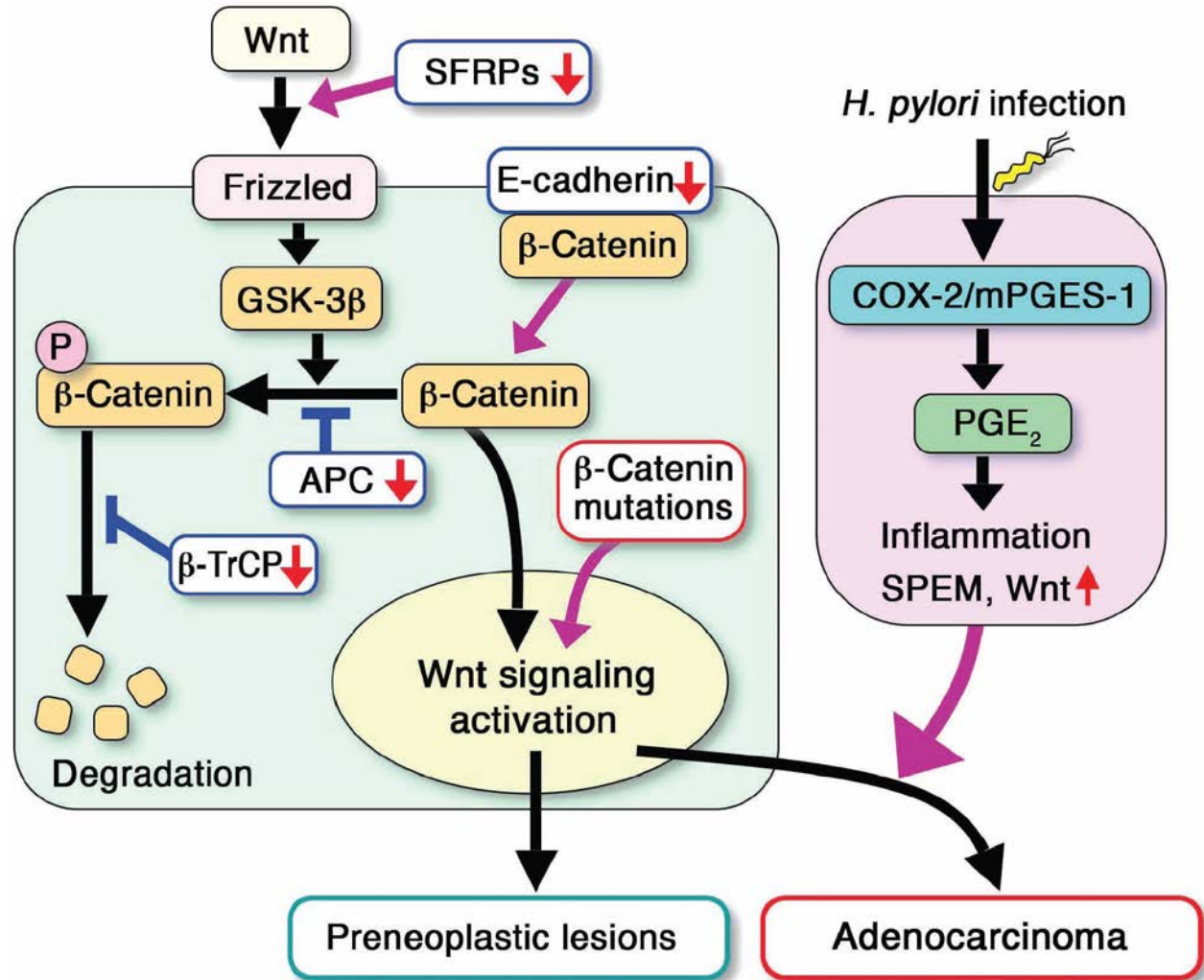
Přenos signálu Epidermálního Růstového Faktoru (EGF) modulovaný metabolity kyseliny arachidonové (AA)



EGF: epidermální růstový faktor, PLA2: fosfolipáza A2, AA: kyselina arachidonová, 5-LOX: 5-lipoxygenáza, 5HETE: 5 hydroxykyselina, LTA4, C4: leukotrien A4, C4, PKC: protein kináza C, DAG: diacylglycerol, PIP2: fosfoinositoldifosfát, PLC: fosfolipáza C, Tyr K: tyrosin kináza

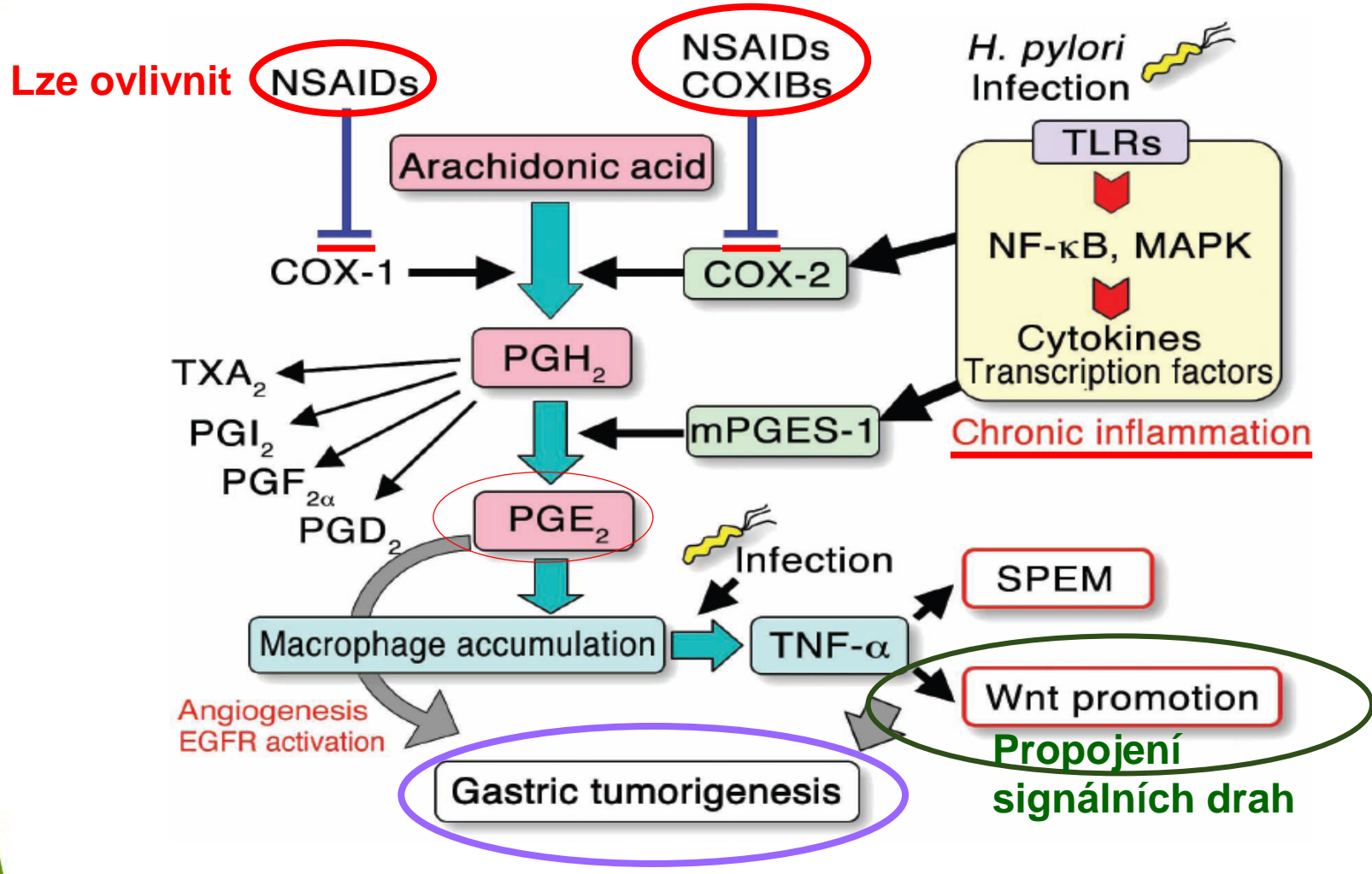
Prostaglandin E₂, Wnt, and BMP in gastric tumor mouse models

Příklad propojení (Wnt dráha a její modulace eikosanoidy)



Prostaglandin E₂, Wnt, and BMP in gastric tumor mouse models

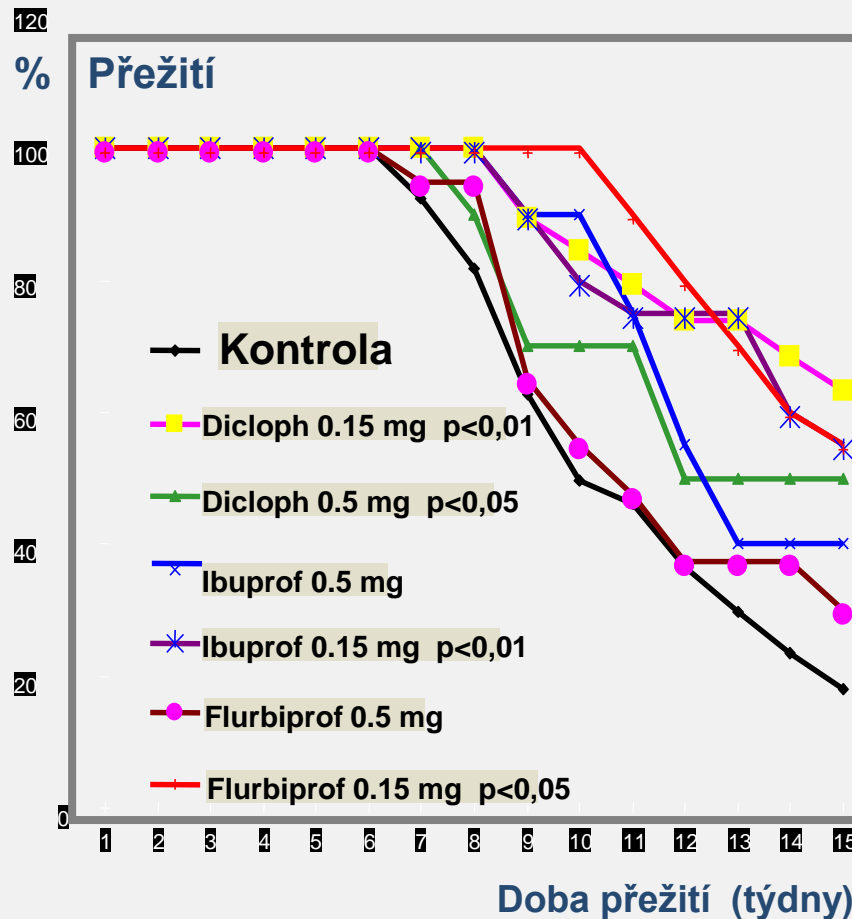
Nadměrná produkce PGE₂ podporuje v žaludku a kolonu vznik nádorů



(Cancer Sci 2009; 100: 1779–1785)

Vlastní výsledky - Příklad praktického využití NSAIDs

NSAIDs inhibují COX2 a působí protizánětlivě



Působení NSAIDs na nádorové buňky *in vivo*

Inhibitory COX-2
tlumí zánět a inhibují proliferaci některých typů nádorových buněk

PŘEŽÍVÁNÍ ZVÍŘAT s nádorem (fibrosarkom G:5:113)

PO TERAPII INHIBITORY COX-2

K zamyšlení

Dovedeš popsat a vysvětlit

- strukturu biologických membrán a co jsou tzv. lipidové rafty?
- Co je „transdukce signálů“ (molekulární podstata) a jakým způsobem dochází k multiplikaci signálů? Obecné principy.
- Úlohu lipidů a fosfolipidů **obecněji**, jejich význam pro regulaci buněčných procesů a pro organismus (včetně úlohy v energetickém a intermediárním metabolismu)?
- Metabolismus kyseliny arachidonové (AA) a hlavní dráhy přeměny? Co můžete odvodit z její struktury a ze struktury jejich metabolitů? Nakreslit tyto struktury (AA, LTC₄, PGE atd.)? Nakreslit schéma libovolného fosfolipidu a vyznačit místa jeho štěpení fosfolipázami s uvedením jejich názvů?
- Molekulární mechanismy působení **konkrétních** vysoce nenasycených mastných kyselin (n-3, n-6) a eikosanoidů, jejich fyziologickou úlohu?
- Spolupůsobení látek různé chemické povahy a propojení jednotlivých signálních drah? Uveď příklady.

Děkuji za pozornost