



Faculty
of Science

Palacký University
Olomouc

BUNĚČNÁ SIGNALIZACE

Prof. RNDr. Zdeněk DVOŘÁK, DrSc., PhD
Katedra buněčné biologie a genetiky

Buněčná biologie II. (KBB/BB2)

BUNĚČNÁ SIGNALIZACE

SIGNÁL

Co se zde děje??

**KONEČNÁ
BUNĚČNÁ
ODPOVĚĎ**

Senzorický impulz z venčí

- světlo
- chlad
- tlak
- hypoxie



PŘEDMĚT FYZIOLOGIE

Reakce buňky - orgánu

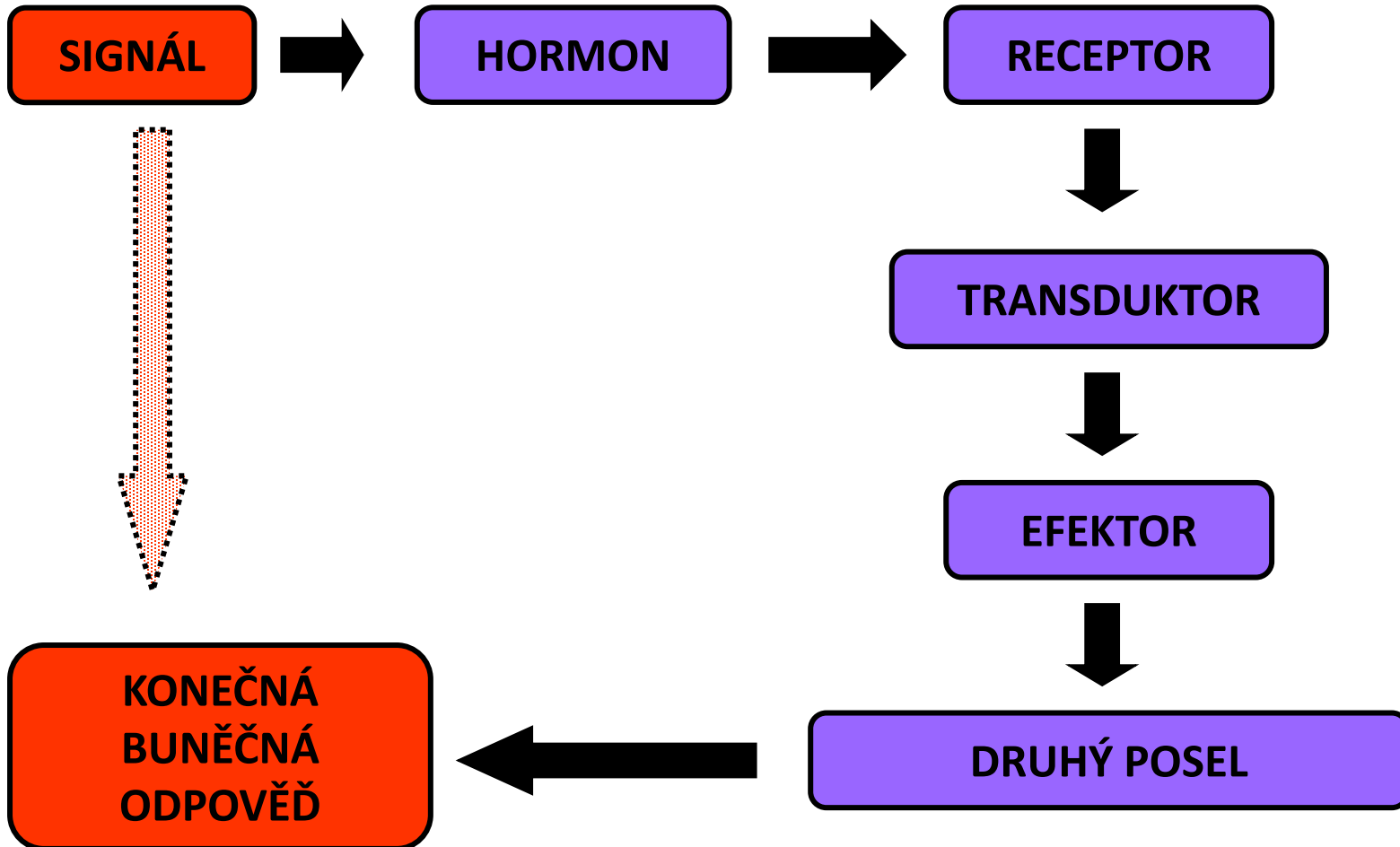
- vasokonstrikce
- třes
- motilita střeva
- vzrůst teploty

- široké spektrum signálních molekul - strukturní a funkční různorodost
- vnější stimulus vede k tvorbě kaskády informačních molekul a následných dějů, které vyústí v konečnou buněčnou odpověď
- růstové faktory, cytokiny, mitogeny, **hormony**, retinoidy, eikosanoidy, lipidy, žlučové kyseliny, **neurotransmitery**

HORMONY

- Syntetizovány v endokrinních žlázách
- Secretovány přímo do krevního řečiště a dopraveny na místo účinku
- Mění metabolické aktivity cílových buněk (dálkově ze sekrečních orgánů)
- Aktivní ve velmi nízkých koncentracích (pM - 1μM)
- Rapidně metabolizované - krátkodobý efekt

SIGNAL TRANSDUCTION



INTEGRATION AND CONTROL OF METABOLIC PROCESSES

Sensory inputs from the environment

CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Hypothalamus

Primary target

Anterior pituitary Posterior pituitary

Thyrotropin Corticotropin Somatotropin Luteinizing hormone Follicle Stimulating hormone Prolactin Vasopresin Oxytocin

Secondary target

Thyroid Adrenal cortex Adrenal medula Pancreatic Islet cells Ovary Testis

Thyroxine
Triiodo-
thyronne Cortisol
Corticosterone
Aldosterone Epinephrine
Nor-
epinephrine Insulin
Glucagon
Somatostatin Progesterone
Estradiol Testosterone

Muscles
Liver Many tissues Liver
Muscles
Heart Liver
Muscles Reproductive organs Mammary glands Smooth Muscle;
Mammary glands Arterioles

Ultimate target

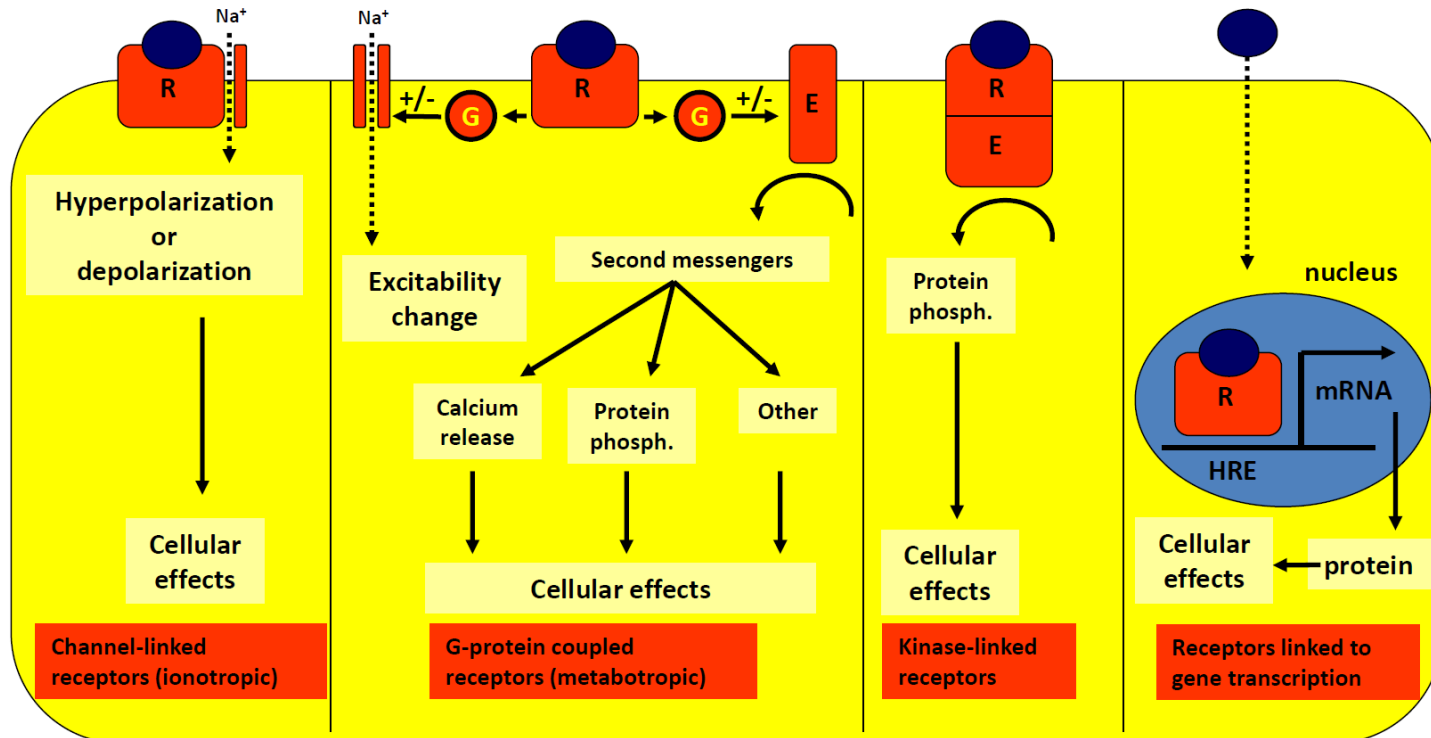
BUNĚČNÁ SIGNALIZACE: MECHANISMUS ÚČINKU

Signální molekuly neprocházející plasmatickou membránou

- aminokyseliny; peptidy - hydrofilní sloučeniny
- vazba ligandu na receptor na buněčném povrchu - odezva uvnitř buňky - změny v aktivitě klíčových proteinů/enzymů
- účinek přes druhé posly - aktivace enzymů v cytosolické doméně receptoru, otevírání iontových kanálů
- krátkodobý účinek; superrychlá odpověď

Signální molekuly procházející plasmatickou membránou

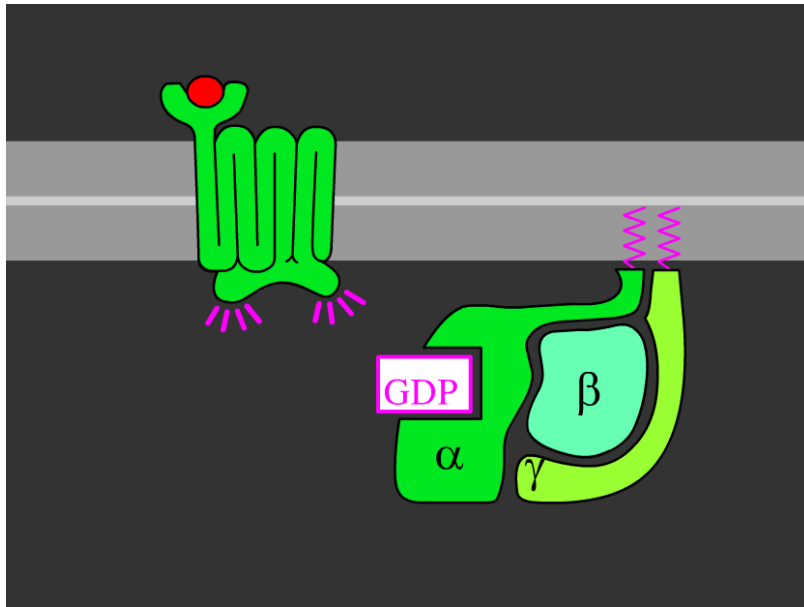
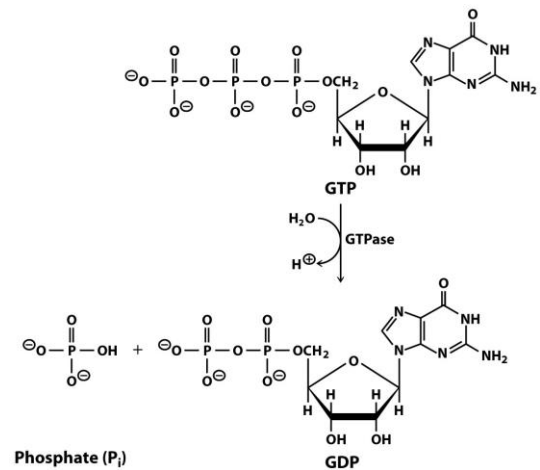
- steroidní a thyroidní hormony, retinoidy - lipofilní sloučeniny
- vazba ligandu na intracelulární receptor - komplex hormon-receptor se váže na DNA a spouští transkripci genů - změny v hladinách proteinů/enzymů
- dlouhodobý účinek, pomalá odpověď



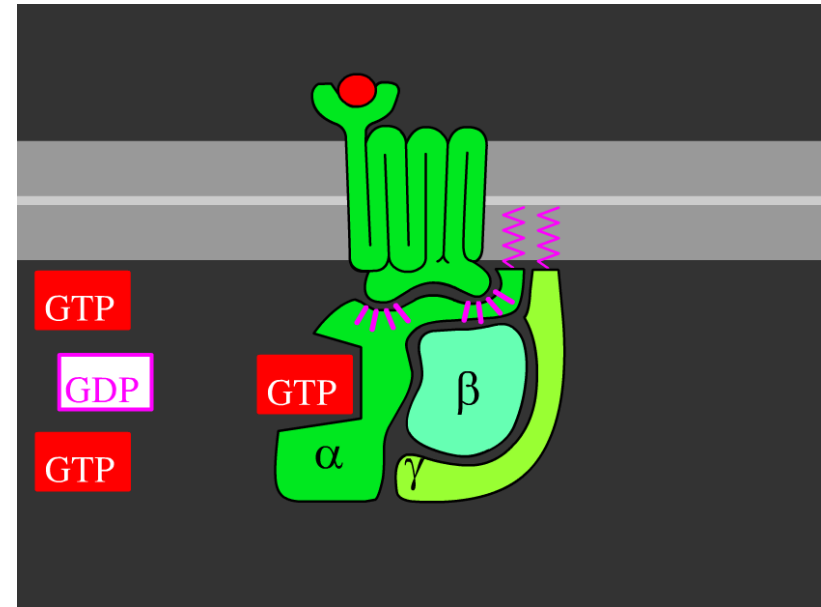
GTP- vázající proteiny

GPCR - G protein-coupled receptors

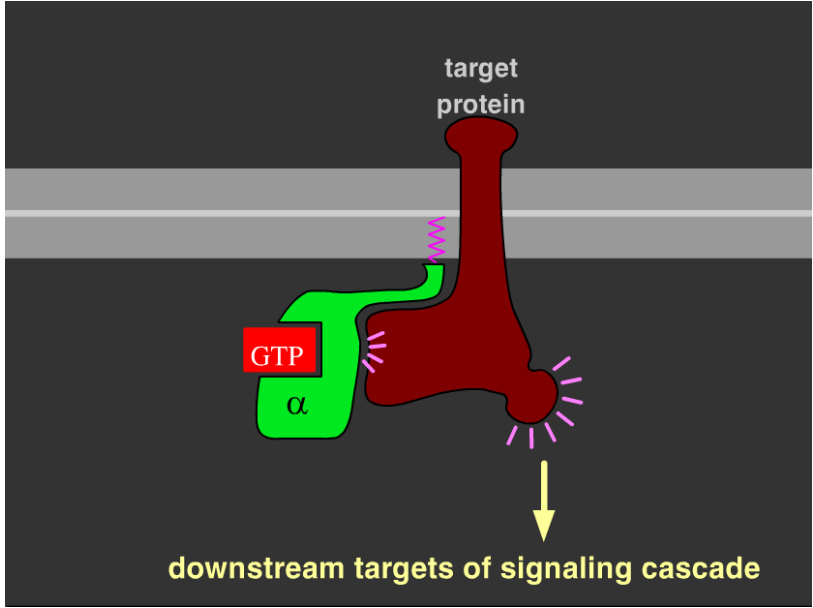
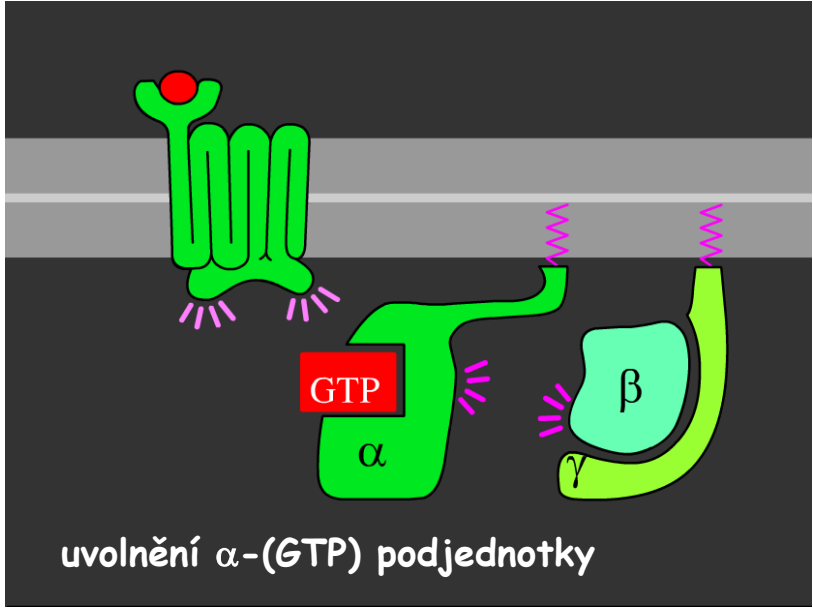
- guanyl-nukleotidové proteiny
- **transduktory** = převod excitačního signálu z **receptoru** na **efektor** v **plasmatické membráně**
- periferní membránové proteiny (umístěné na cytosolické straně)
- **TRIMER** = skládá se z α , β a γ podjednotek
- α podjednotka je vazebné místo pro **GDP/GTP**; **GTPasová aktivita**



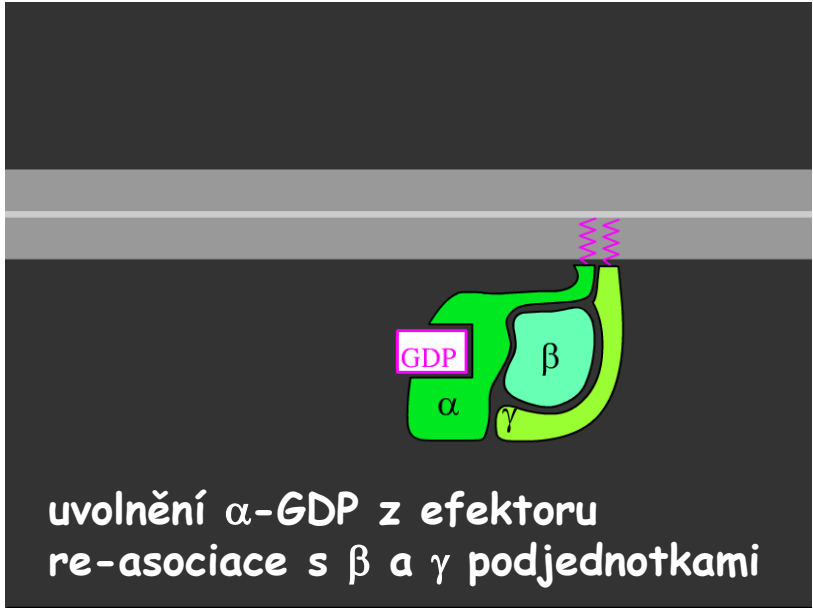
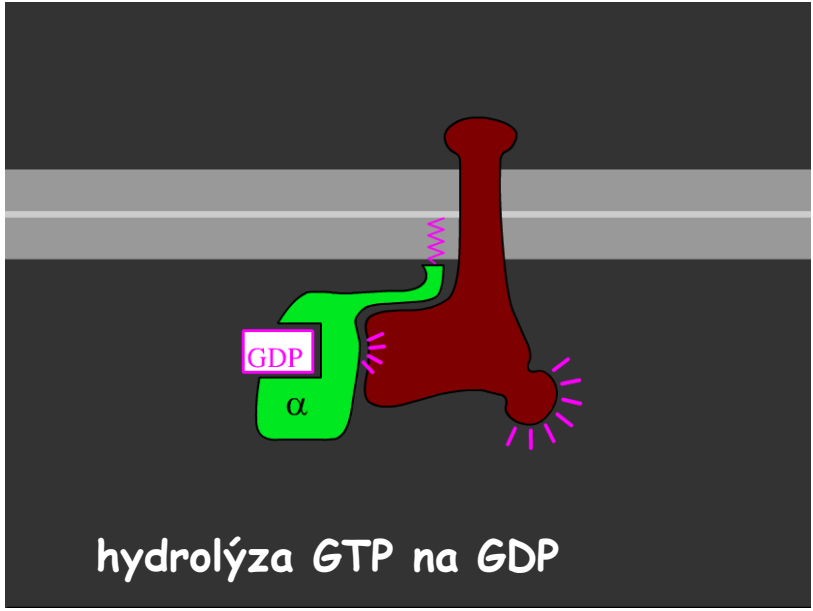
- **velká ligand-vazebná extracelulární doména**
- **tvorba komplexu hormon-receptor**
- **konformační změna receptoru**
- **převod signálu dovnitř do buňky**



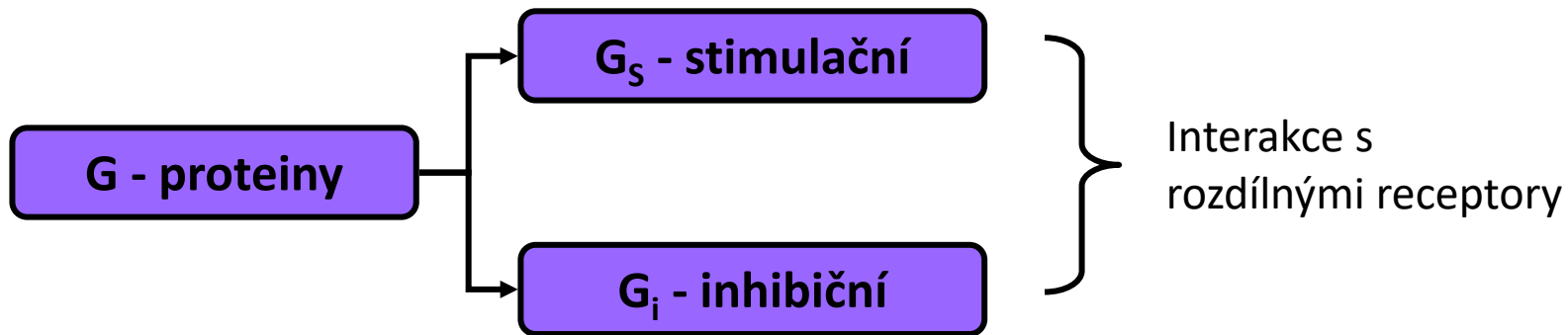
- **receptor interaguje s G-proteinem**
- **výměna GDP za GTP v α -podjednotce**



➤ aktivace efektoru



GTP- vázající proteiny = G-proteiny



- Inhibice GTPasové aktivity α -GTP podjednotky vede k ireversibilní aktivaci efektoru a následně k nekontrolovatelné buněčné odpovědi
- Příklad: *Vibrio cholerae* toxin inhibuje GTPasovou aktivitu v enterocytech, což vede k permanentní aktivaci efektoru (adenylát cyklasy). Výsledkem je, že sekrece Na^+ a H_2O je nekontrolovatelná a dochází k dehydrataci organismu.

| Stimulus | Receptor | G-prot. | Efektor | Odpověď |
|---------------------|------------------------|------------|------------------|----------------------------|
| Epinefrin | β -adrenergní r. | G_s | Adenylát cyklasa | Degradace glykogenu |
| Serotonin | Serotoninový r. | G_s | Adenylát cyklasa | Behaviorální sensitizace |
| Světlo | Rhodopsinový | Transducin | cGMP PD | Vizuální excitace |
| IgE-antigen komplex | Mast cell IgE r. | G_{PLC} | Fosfolipasa C | Sekrece |
| f-Met peptid | Chemotaktický r. | G_{PLC} | Fosfolipasa C | Chemotaxe |
| Acetylcholin | Muskarinový r. | G_K | Draslíkový kanál | Zpomalení pacemaker aktiv. |

SECOND MESSENGERS

- druzí poslové
- amplifikace vnitrobuněčných signálů - produkty aktivovaných efektorů
- malé molekuly nebo ionty - allosterické efektory
- **cAMP** - cyklický adenosinmonofosfát
- **cGMP** - cyklický guanosinmonofosfát
- **DAG** - 1,2-diacylglycerol
- **IP3** - inositol-1,4,5-trifosfát
- **Ca²⁺** - vápník (volný nebo vázaný na kalmodulin)

SYSTÉMY PRO PŘENOS SIGNÁLU

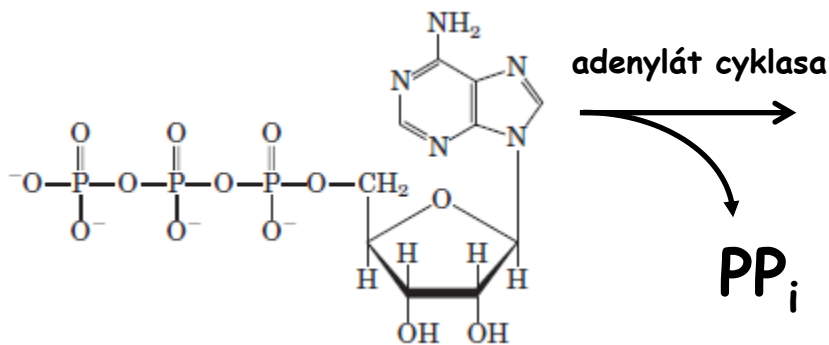
- **ADENYLÁT CYKLASOVÝ** systém
- **FOSFATIDYLINOSITOLOVÝ** systém
- **TYROSIN KINASOVÝ** systém
- **GUANYLÁT CYKLASOVÝ** systém
- **SIGNALIZACE STEROIDY/THYROIDY/RETINOIDY**

ADENYLÁT CYKLASOVÝ (AC) SYSTÉM

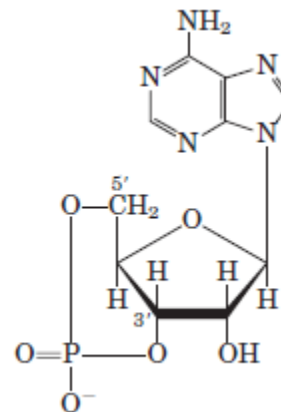
- druhým poslem je cyklický adenosin monofosfát (cAMP)
- cAMP je allosterický aktivátor proteinkinas
- aktivované proteinkiny fosforylují cílové proteiny, často další kiny
- amplifikace signálu!!!
- fosforylace proteinů (enzymů) = změněná funkce = buněčná odpověď

Účinky cAMP

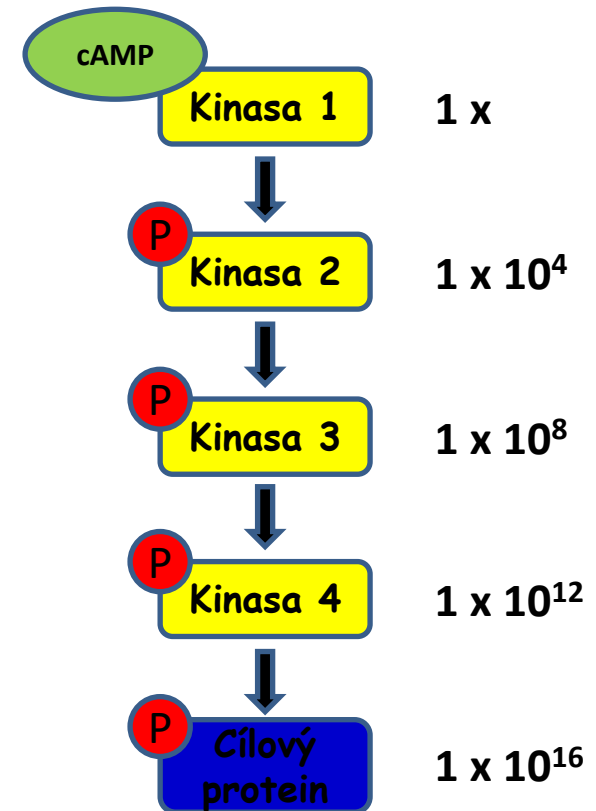
- ↑ degradace energetických zásob
- ↑ sekrece HCl žaludeční sliznicí
- ↓ agregace krevních destiček



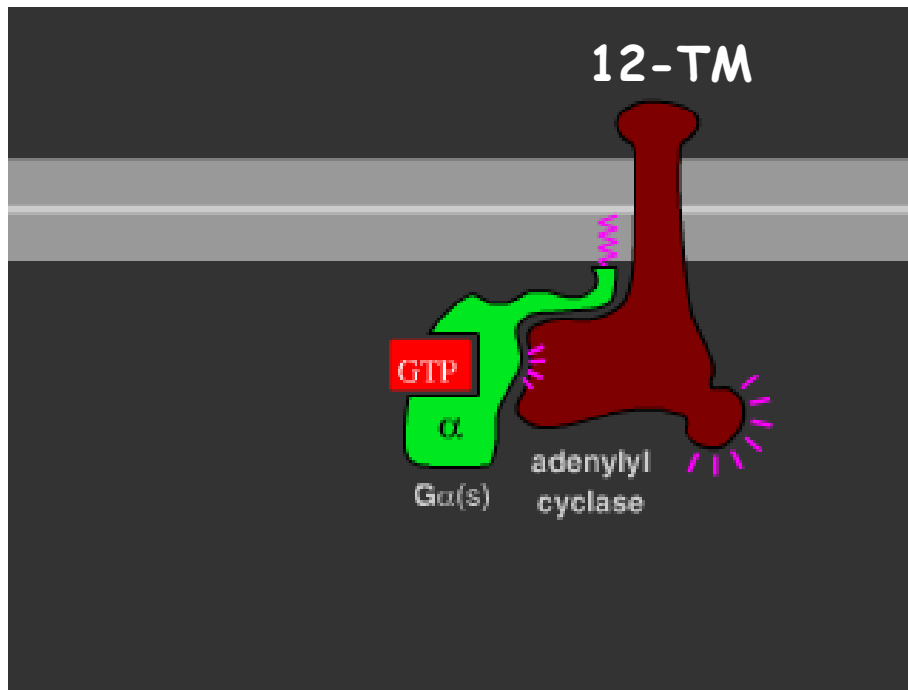
ATP



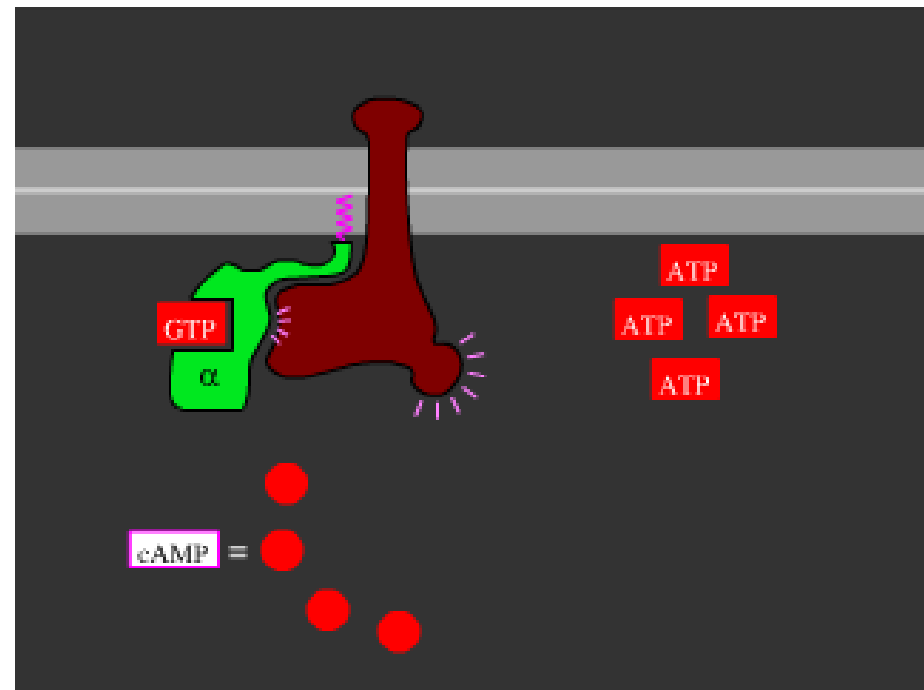
cAMP



ADENYLÁT CYKLASOVÝ (AC) SYSTÉM



- AC je aktivovaná přes G-protein
- efektor = membránová AC



- AC přeměňuje ATP na cAMP
- nárůst cytosolického cAMP
- cAMP je druhý posel

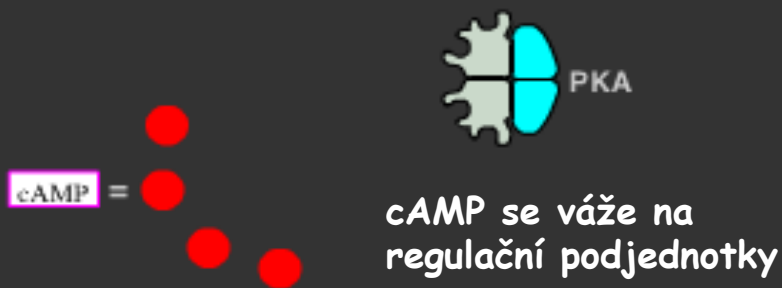
cAMP aktivuje protein kinasu A -fosforylace down-stream targetů

Alberts et al:

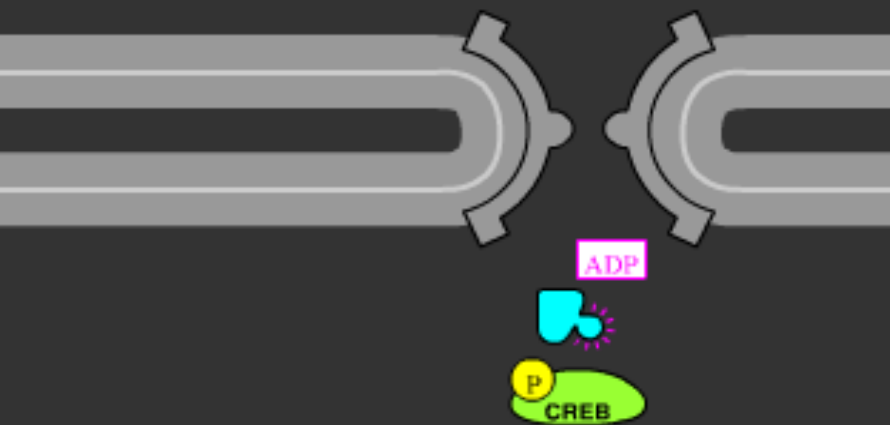
Molecular biology of the cell, 4th Edition

<https://www.youtube.com/watch?v=dfUIhhTJhdY>

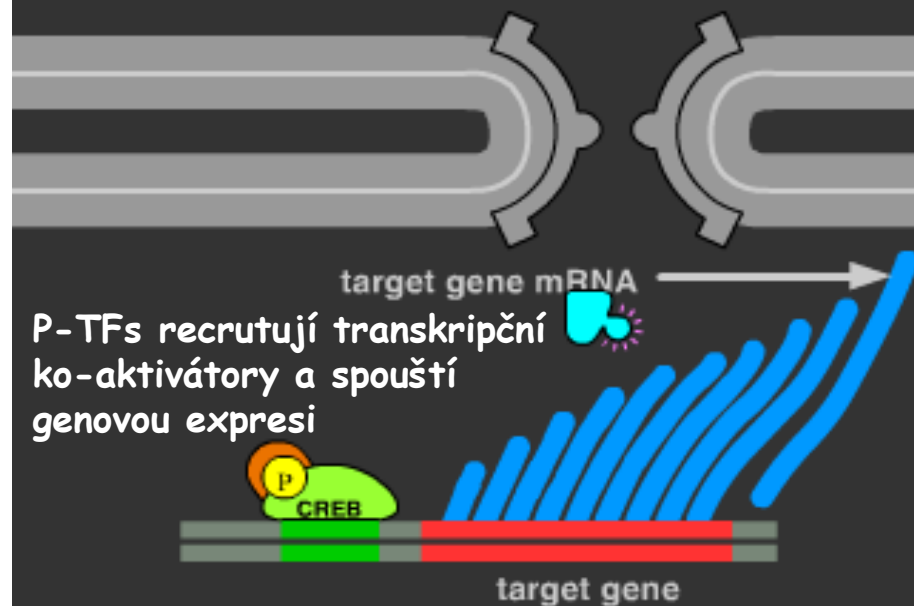
PKA: 2 katalytické a 2 regulační podjednotky



po vazbě cAMP dochází k disociaci tetrameru PKA a uvolňují se aktivní podjednotky PKA

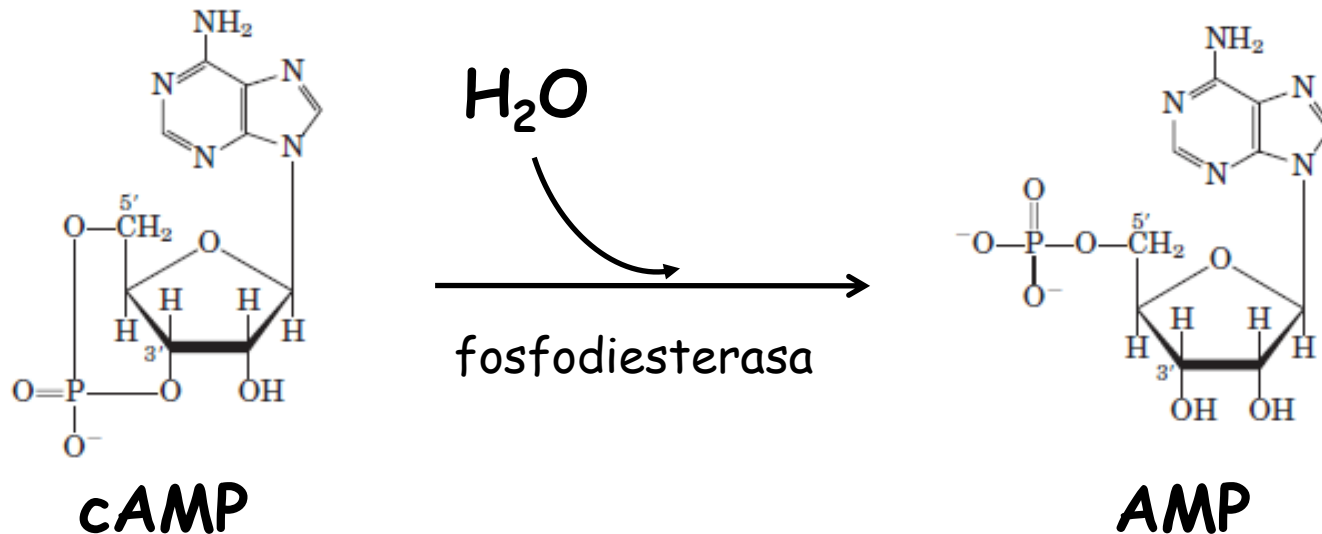


PKA fosforyluje cytosolické proteiny
PKA může vstoupit do jádra a fosforylovat transkripční faktory



DEGRADACE cAMP

- různá tkáňová distribuce fosfodiesteras a subtypy = terapeutické využití inhibice PD
- typickým inhibitorem je kofein - prodlouží účinek epinefrinu na kardiovaskulární systém (EPI působí přes β_2 -adrenergní receptory spojené s G-proteiny a AC)

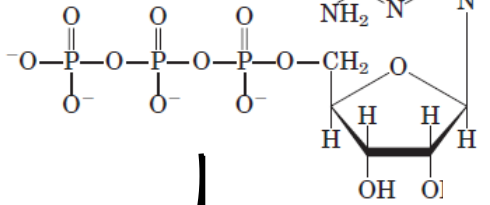


Hormony využívající AC systém a cAMP jako druhého posla

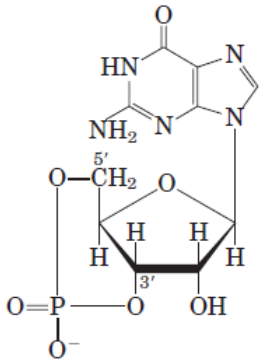
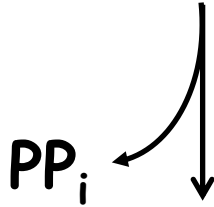
- | | | |
|--------------|---------------------------------|-------------------------------|
| - Kalcitonin | - Choriový gonadotropin | - Kortikotropin |
| - Epinefrin | - Follicle-stimulating hormon | - Parathyroidní hormon |
| - Glukagon | - Luteinizující hormon | - Nor-epinefrin |
| - Lipotropin | - Melanocyty-stimulující hormon | - Thyroidy-stimulující hormon |
| - Vasopresin | | |

GUANYLÁT CYKLASOVÝ SYSTÉM

GTP



PP_i



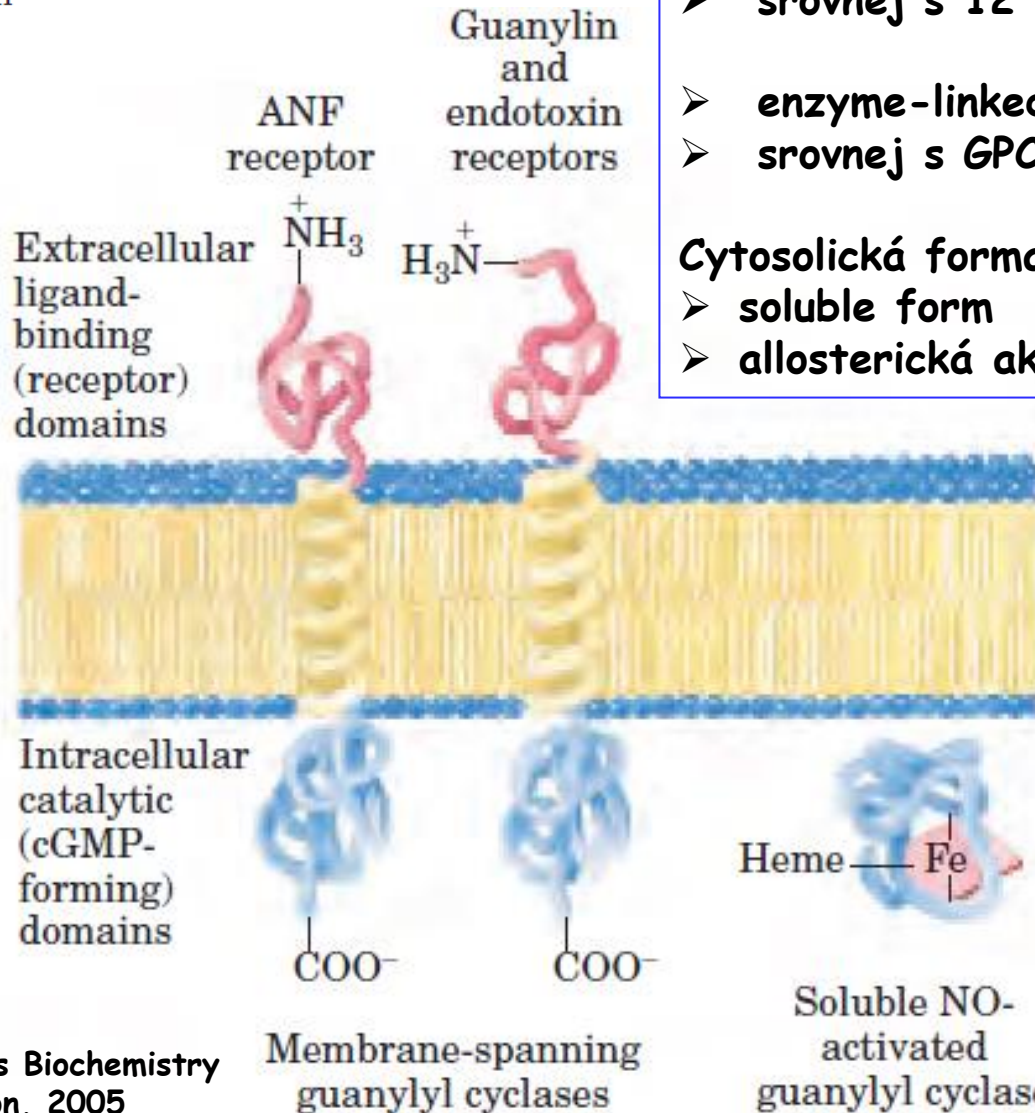
cGMP

Membránová forma GC

- single transmembrane domain
- srovnej s 12 TM u AC
- enzyme-linked receptor
- srovnej s GPCR u AC

Cytosolická forma GC

- soluble form
- allosterická aktivace



MEMBRÁNOVÁ GC - LEDVINY, SRDCE

- GC v ledvinách je aktivována hormonem „atrial natriuretic factor = ANF“
- ANF je uvolněn v srdeční síni, když je srdce roztažené zvýšeným objemem krve
- ANF je krevním řečištěm dopraven do ledvin, kde aktivuje GC ve sběrných kanálcích
- po aktivaci GC dojde k nárůstu cGMP, který spustí exkreci Na⁺ a vody
- ztráta vody vede k poklesu objemu krve, čímž vymizí stimulus vedoucí k sekreci ANF

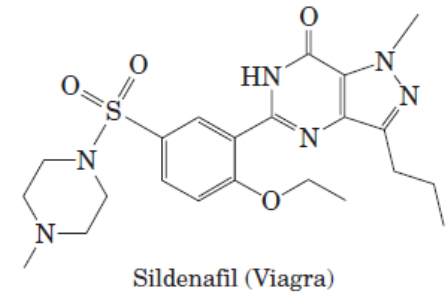
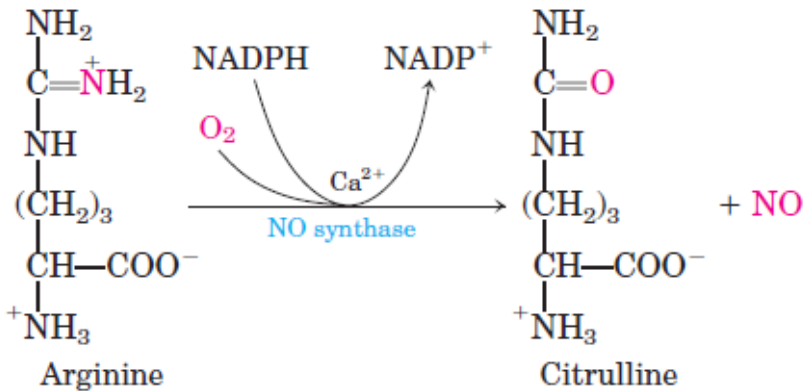
- hladká svalovina cév rovněž obsahuje ANF receptor, a ANF působí vasodilataci, čímž se zvýší průtok krve a sníží krevní tlak

MEMBRÁNOVÁ GC - STŘEVO

- GC v plasmatické membráně střevních epiteliálních buněk je aktivována intestinálním peptidem guanylinem, který reguluje sekreci Cl⁻ iontů ve střevě
- tento receptor je rovněž cílem pro termostabilní endotoxin produkovaný *Escherichia coli* a dalšími gram-negativními bakteriemi
- nárůst koncentrace cGMP v důsledku působení endotoxinu způsobí zvýšení sekrece Cl⁻ iontů a následně snížení resorpce vody střevním epitelem = výsledkem je průjem!

CYTOSOLICKÁ GC

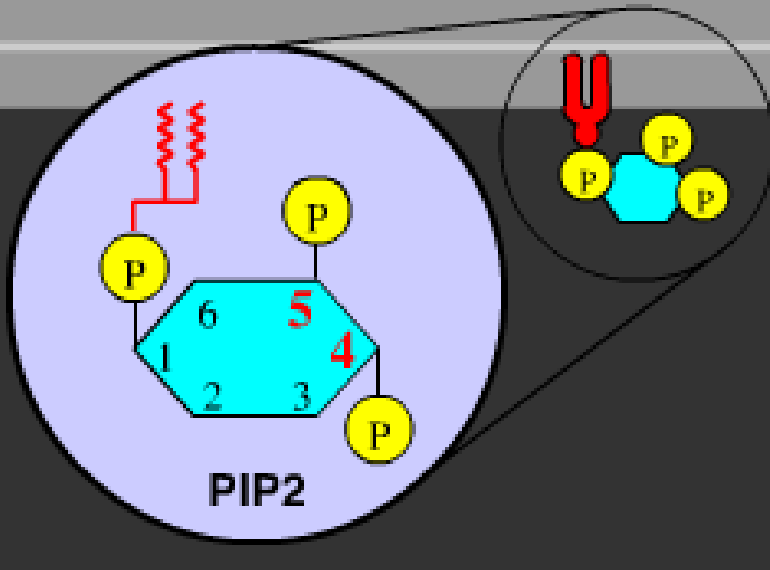
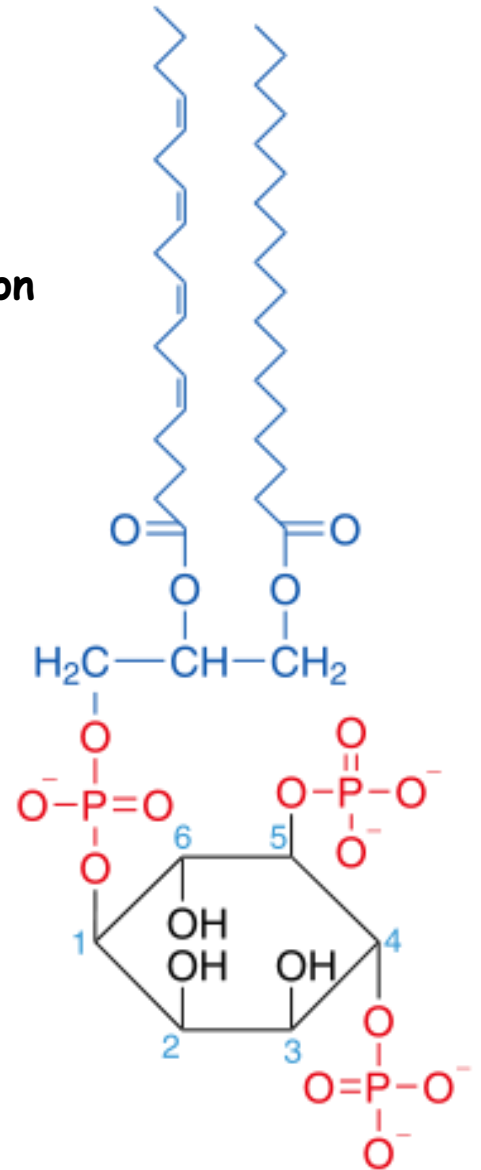
- enzym pevně asociovaný s hemovou skupinou; aktivovaný oxidem dusnatým - NO
- NO je produkován Ca^{2+} -dependentní NO-synthasou z argininu - mnoho tkání
- NO je nepolární a volně difunduje přes buněčnou membránu



- v srdci snižuje cGMP sílu kontrakce stimulací iontové pumpy exportující Ca^{2+} z cytosolu
- NO má vazodilatační účinek
- obdobný mechanismus (působení NO) u nitrátů - nitroglycerin v léčbě anginy pectoris - poprvé popisovali zaměstnanci v továrnách na výrobu výbušnin, že projevy anginy pectoris byly přes týden utlumeny a objevovaly se o víkendech
- působení cGMP je ukončeno působením specifické fosfodiesterasy PDE
- v lidském organismu jsou různé isoformy PDE s různou tkáňovou a orgánovou distribucí
- isoforma PDE v cévách penisu je inhibována sildenafilem (Viagra)
- Viagra způsobí, že hladina cGMP zůstane zvýšena, jakmile jednou vzroste po vhodném stimulu - princip využití v léčbě erektilní dysfunkce

PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHATE SYSTEM (PIP)

- two second messengers: - IP3 = inositol-1,4,5-triphosphate
- DAG = 1,2-diacylglycerol
- Ca^{2+} ions in signaling pathway - „third messenger“
- cascade „end point“ - activation of protein kinase C (PKC)
- PKC phosphorylates various target proteins - enzymes, receptors, transcription factors, transporters
- modulation of metabolic pathways, homeostasis, gene expression

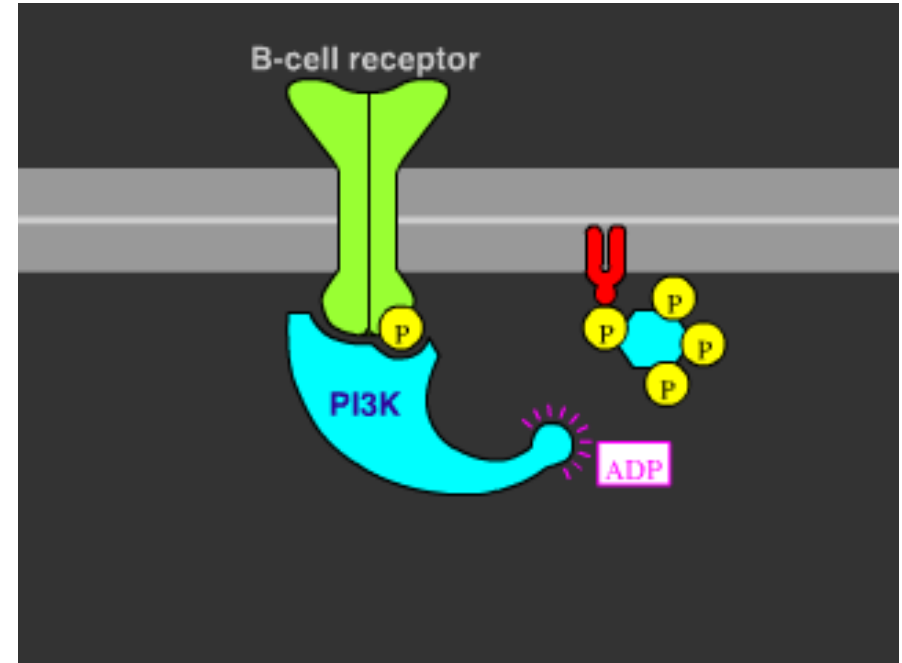
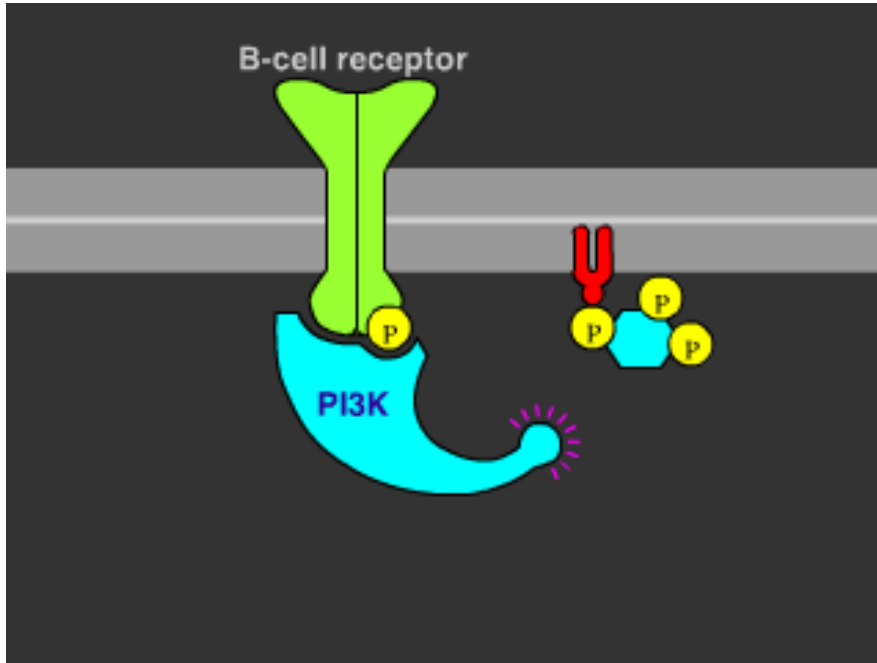


➤ central signal molecule is phosphatidylinositol-4,5-bis-phosphate (PIP2)

PHOSPHORYLATION OF PIP2 → PIP3

activation of PIP system:

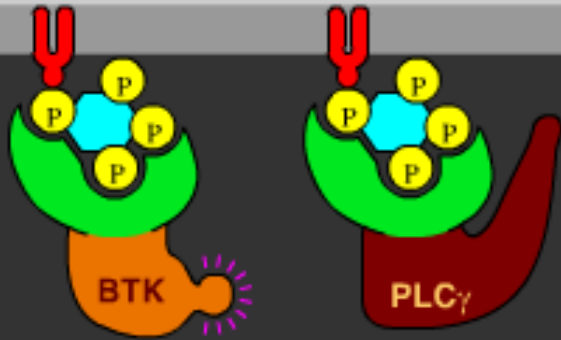
- various stimuli - e.g. ACTH, epinephrine, neurotransmitters, growth factors, antigens, etc.



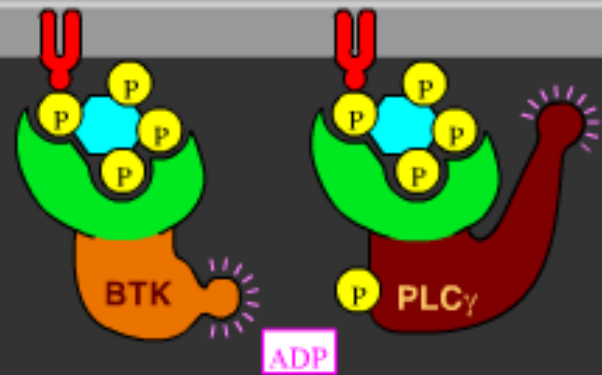
- membrane receptor is activated by ligand binding - transduction of a signal through cell membrane
- activation of effector - PI3K (phosphoinositide-3-kinase)

- PI3K phosphorylates PIP2 at „3“ position → PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate)

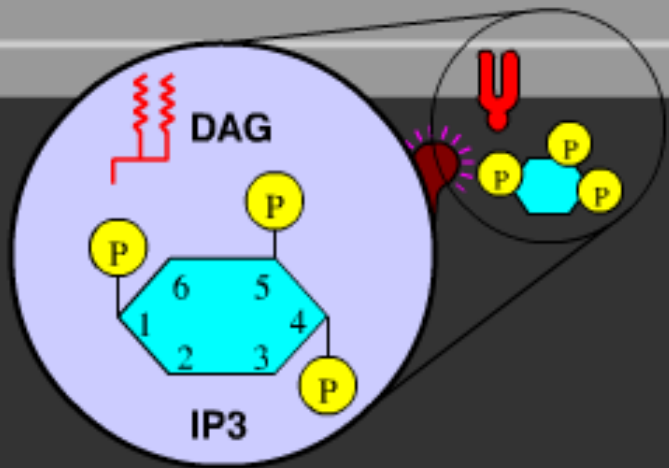
- PIP3 recruits tyrosinkinase (BTK) and phospholipase C (PLC)



- BTK phosphorylates PLC
- PLC-P is catalytically active



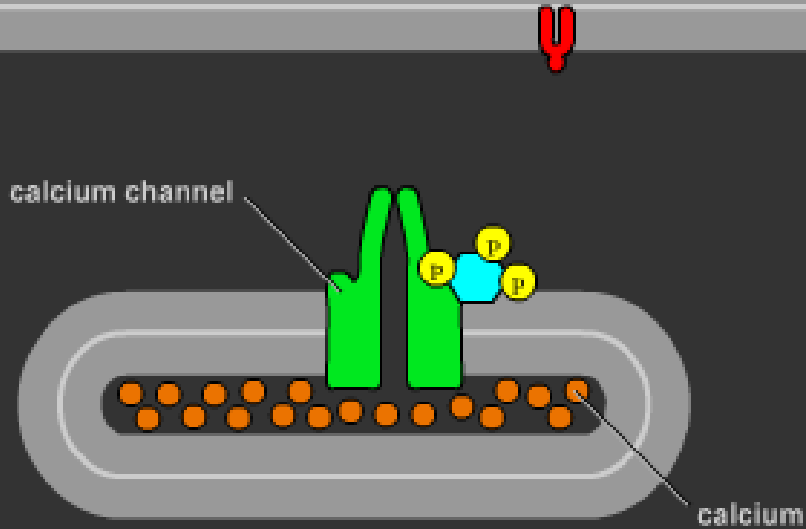
- activated PLC cleaves PIP2
- 2 second messengers formed



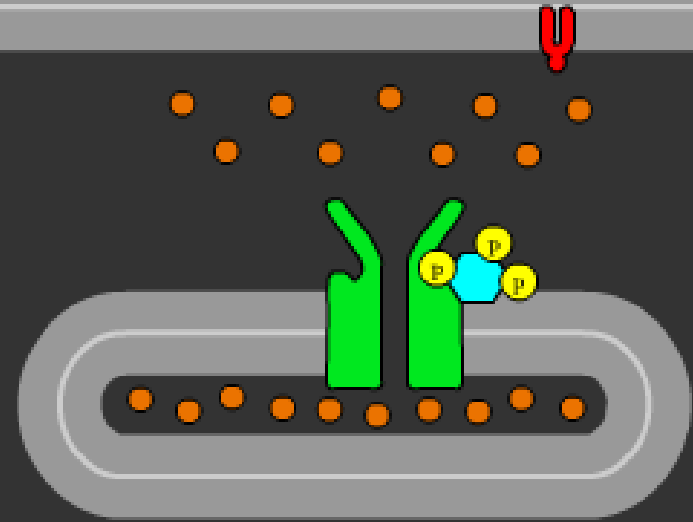
- IP3 = inositol-1,4,5-triphosphate
- DAG = 1,2-diacylglycerol



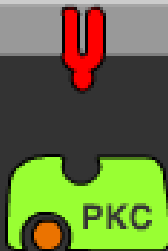
IP3 binds Ca^{2+} channel in ER



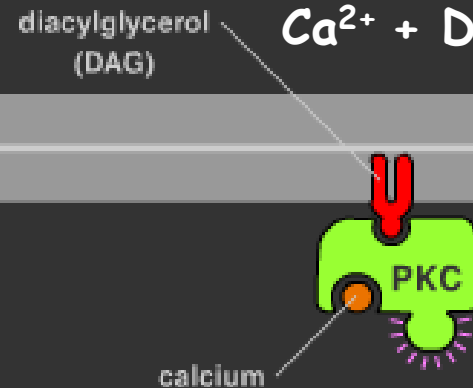
Ca^{2+} ch. opens and Ca^{2+} is released



- Ca^{2+} bind to PKC
- PKC migrates to plasma membrane



- PKC is active when both Ca^{2+} + DAG are bound



PKC phosphorylates target proteins



Target proteins

- RECEPTORS (Insuline receptor)
- ENZYMES (Tyrosin hydroxylase, CYPs)
- TRANSPORTERS (Glucose tr.)
- TRANSCRIPTION FACTORS

INACTIVATION OF PIP SYSTEM

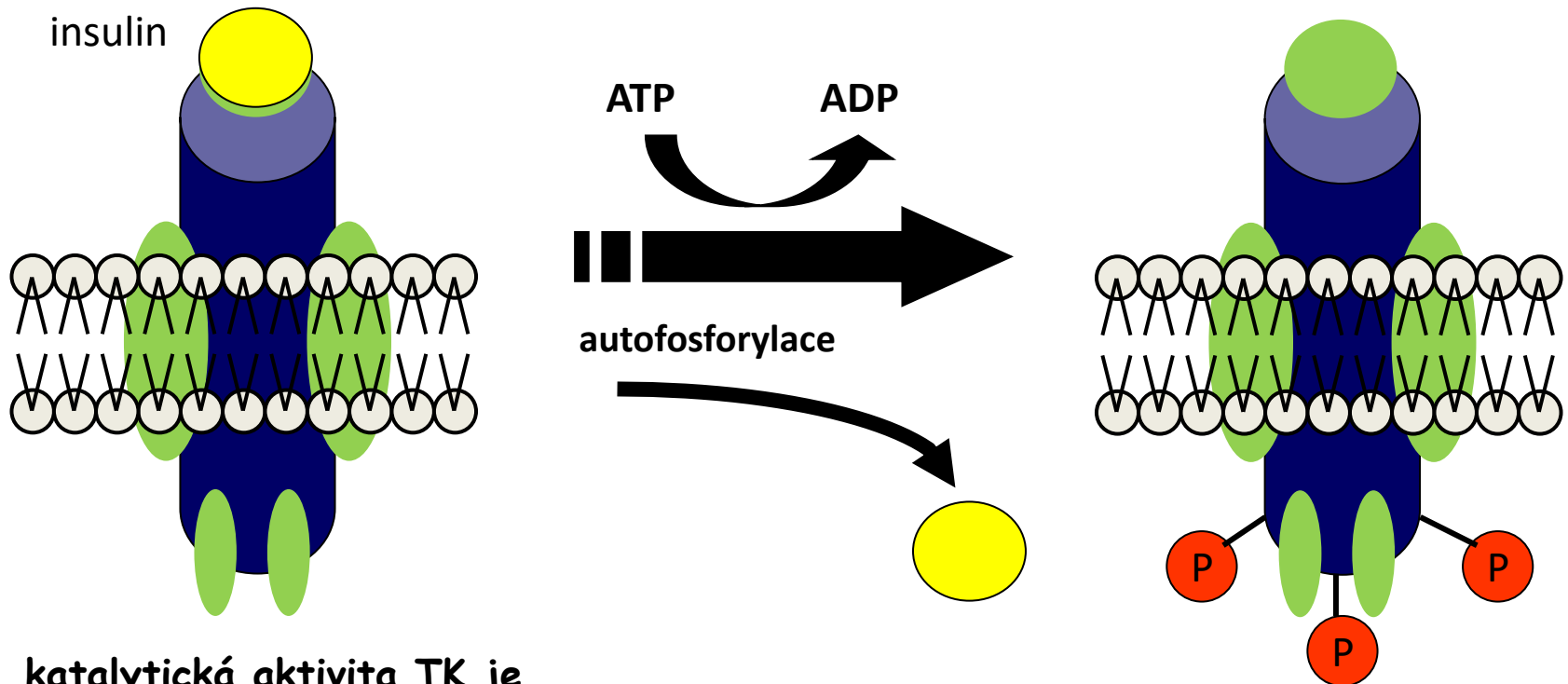


PIP system has diverse effects:

- glycogenolysis in liver cells
- secretion of histamine by mastocytes
- release of serotonin by blood platelets
- secretion of insulin by pancreatic islets
- contraction of smooth muscles
- secretion of epinephrine by chromaffin cells in adrenal glands

TYROSINKINASOVÝ (TK) SYSTÉM

- tzv. enzyme-linked receptors; membránové receptory - obsahují efektorovou doménu
- efektor = tyrosinkinasa (TK); proteinkinasa specifická pro fosforylaci Tyr-residuí cílových proteinů (fosfatasy; transportéry aminokyselin a glukosy, apod.)
- extracelulární signály - insulin, nervový růstový f.; epidermální růstový f.
- ligand se váže na extracelulární doménu TK → konformační změna → aktivace intracelulární enzymové domény
- autofosforylace TK → enzymová aktivita je „on“ i v nepřítomnosti ligandu → např. dlouhodobý účinek insulinu: **KRÁTKODOBÝ** = syntéza sacharidů a lipidů
DLOUHODOBÝ = syntéza nukleových kyselin a proteinů



- katalytická aktivita TK je zapnuta po vazbě insulinu

- zvýšená aktivita nezávisle na vazbě insulinu

CALcium MODULated proteIN - calmodulin, CaM

- protein naváže Ca^{2+} → konformační změna CaM → interakce s cílovým proteinem
- často se jedná o kinasy, tzv. calmodulin-dependent kinases
- mnoho buněk není schopno využít k signalizaci vápník přímo a využívá CaM
- CaM - 16 kDa protein; 4 domény, každá váže vápník
- CaM je zapojen do řady dějů - kontrakce hladkého svalstva, vnitrobuněčný pohyb, apoptosa, růst nervů, imunitní odpověď, krátkodobá a dlouhodobá paměť

