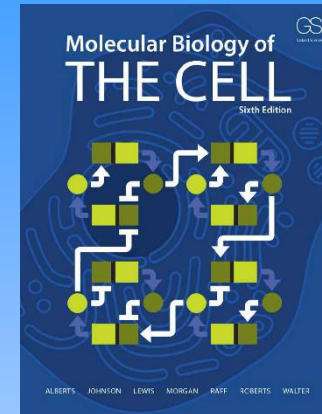
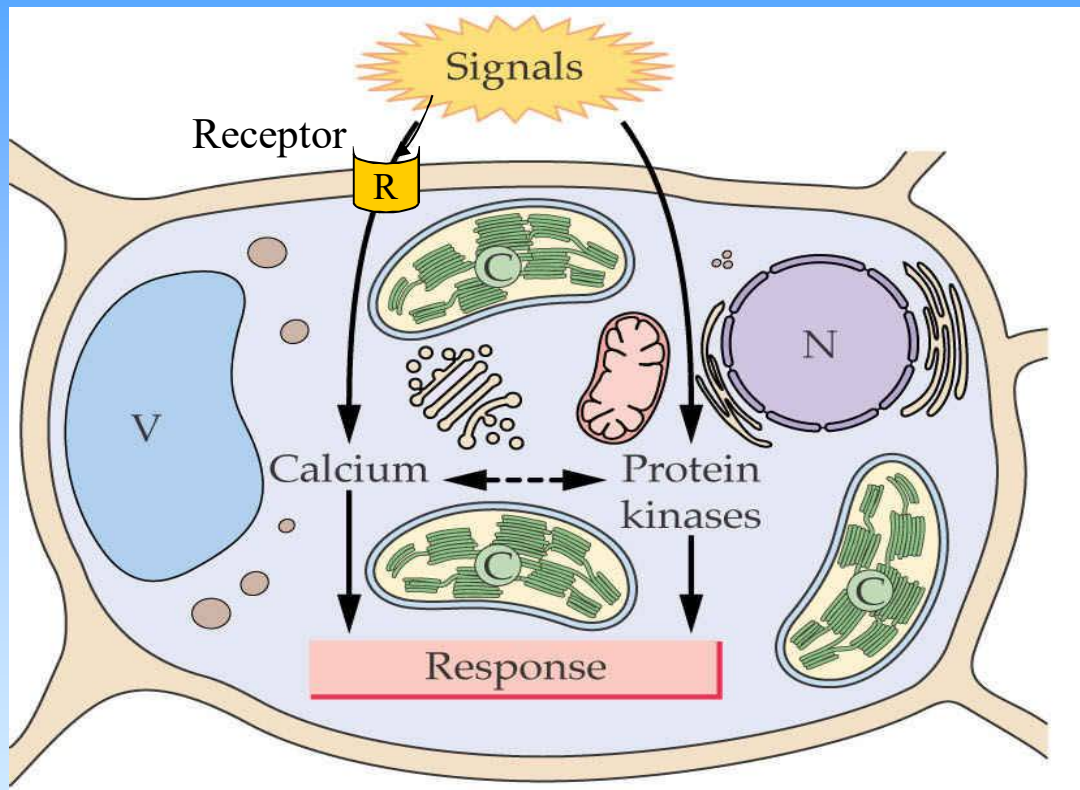


11) Buněčná signalizace



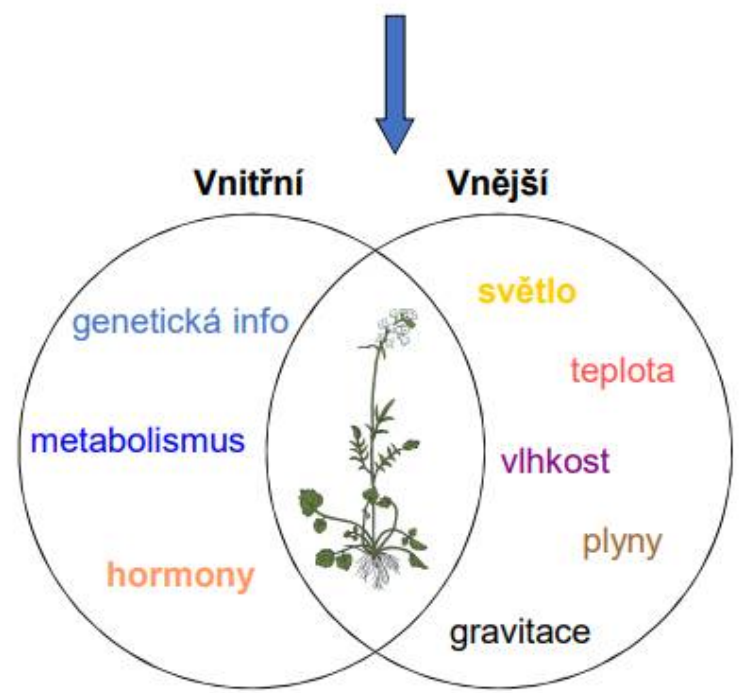
Bruce Alberts

Martin Fellner, LRR, Př UP v Olomouci

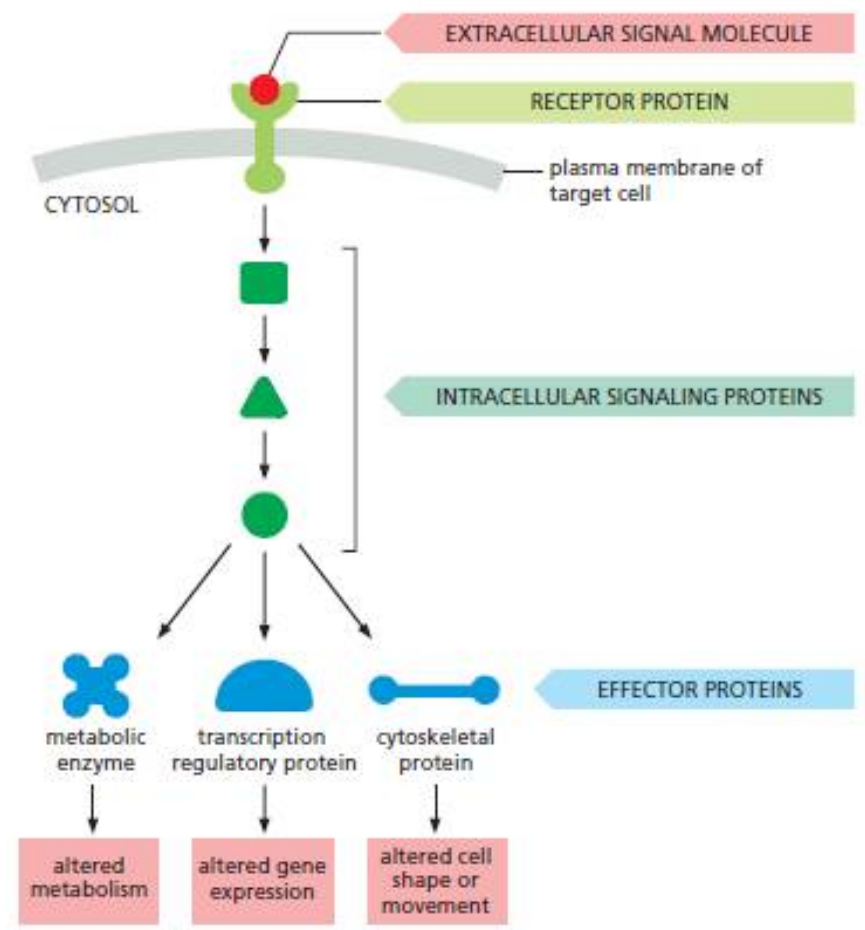
Podle Alberts B et al. (2015) Molecular Biology of the Cell, 6th ed., Garland Science

Principy buněčné signalizace

Vývoj organismu regulují signály (faktory)

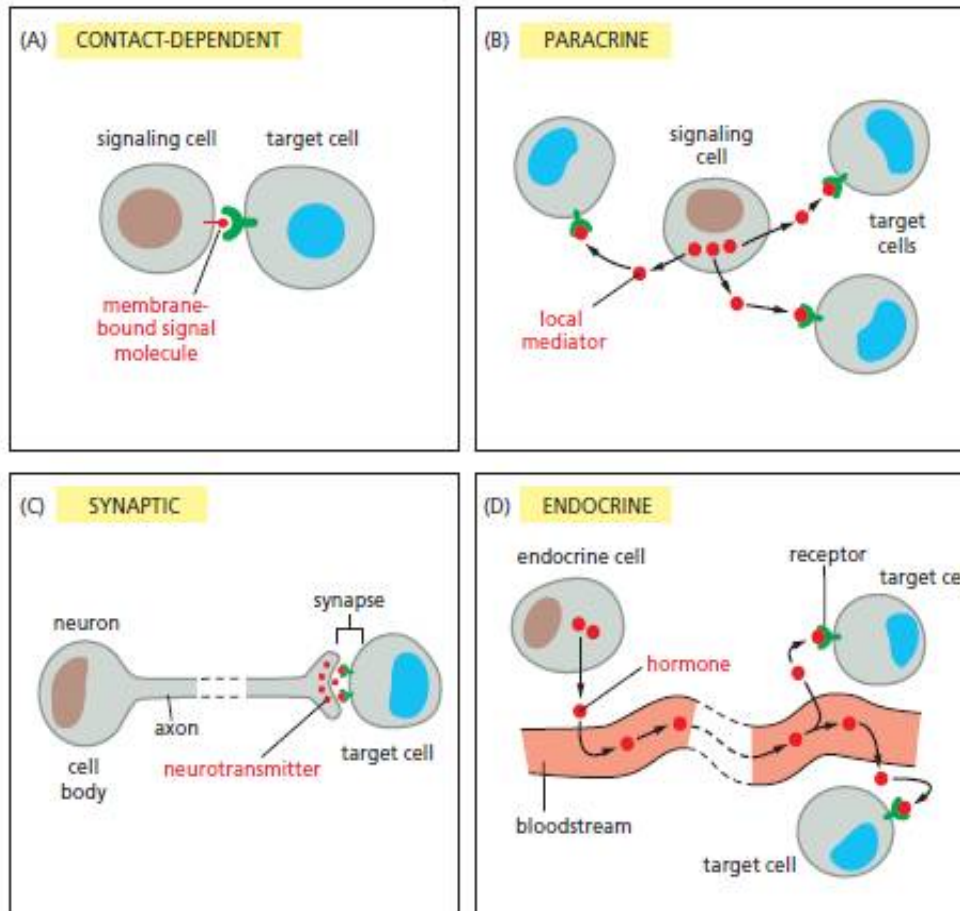


Signální systémy u živočichů jsou propracovanější než u bakterií či rostlin => lidský genom obsahuje více než 1500 genů, které kódují receptorové proteiny.



Extracelulární signály mohou působit na krátké nebo dlouhé vzdálenosti.

1) **Na kontaktu závislá signalizace** – extracelulární signální molekula ovlivňuje pouze buňky, které jsou s ní v kontaktu



2) **Parakrinní signalizace** – signální molekula účinkuje na buňky v lokálním prostředí signální buňky

3) **Dálková signalizace** – koordinace chování buněk ve vzdálených částech těla – **synaptická** (neurotransmitter)

4) **Endokrinní signalizace** – endokrinní buňky vylučují signální molekuly (hormony) – jsou roznášeny po těle organismu (např. krví)

Extracelulární signální molekuly se vážou na specifické receptory

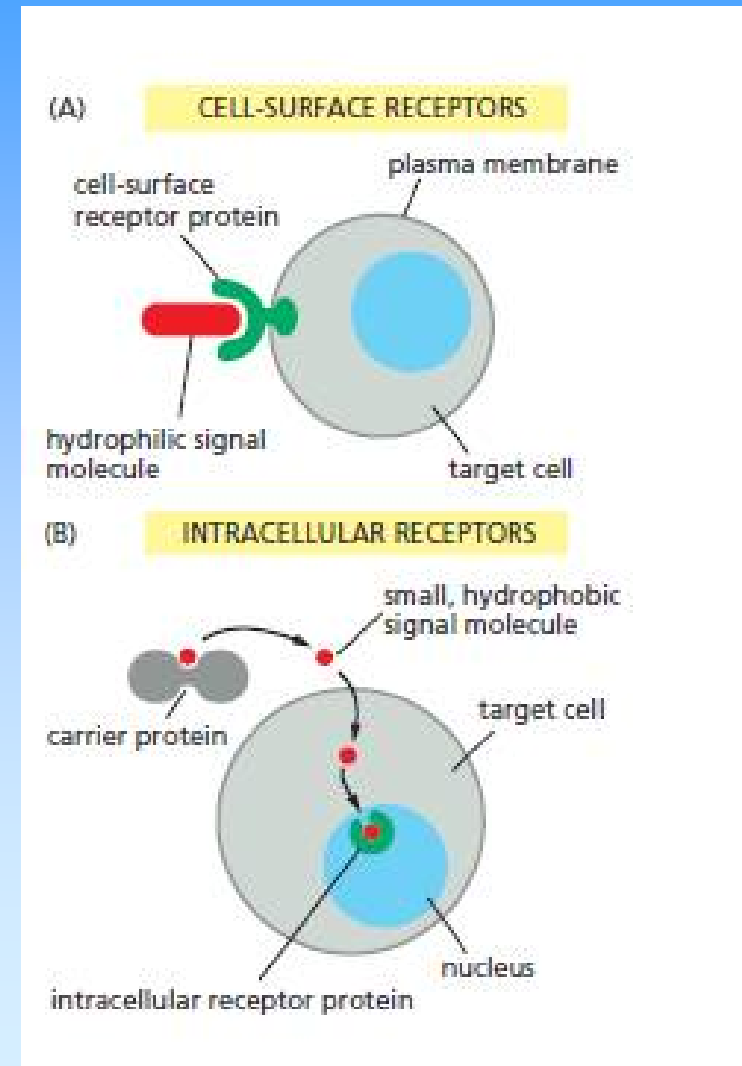
Extracelulární signální molekuly (ligandy): proteiny, peptidy, aminokyseliny, nukleotidy, steroidy, retinoidy, deriváty mastných kyselin, atd., plyny – NO, CO

Receptory na povrchu buňky – transmembránové proteiny; hydrofilní signální molekula, váže se na povrchu buňky

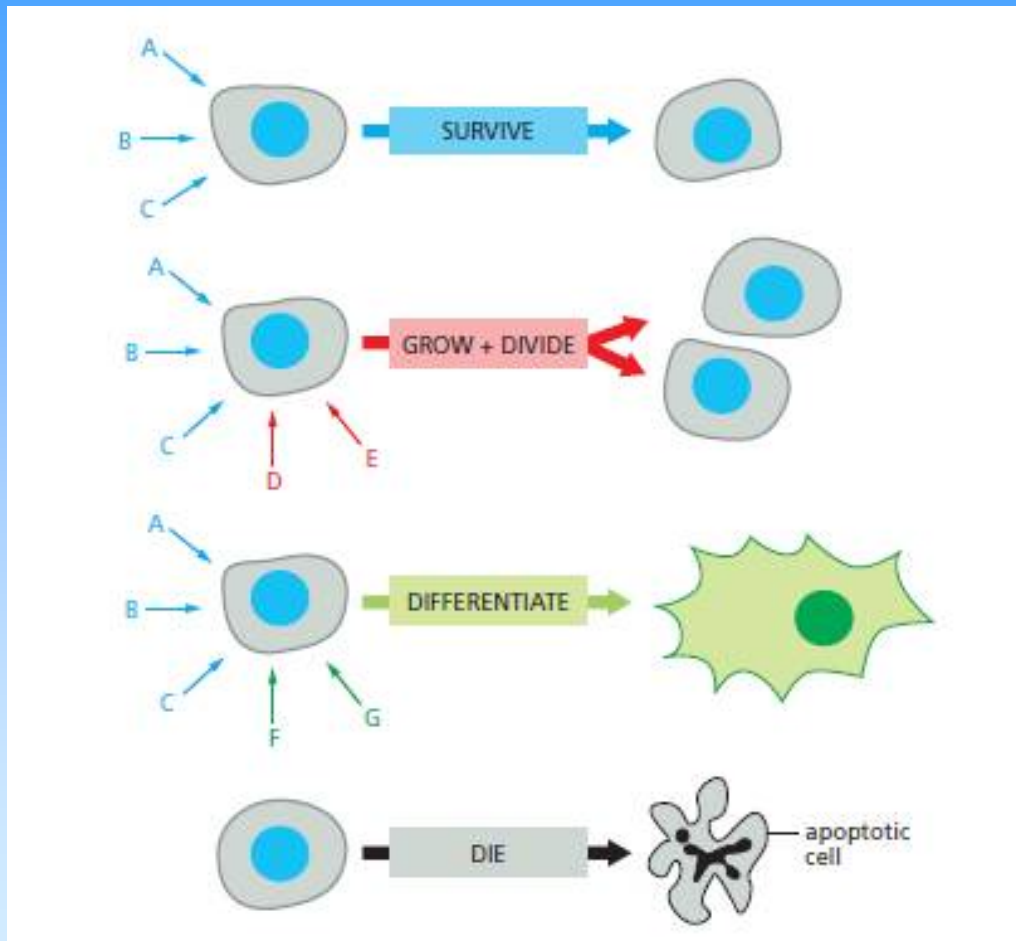
Receptory uvnitř buňky – jaderné receptory, receptory v endoplazmatickém retikulu; hydrofobní signální molekula musí vstoupit dovnitř buňky – difúze, transportéry

Signální molekuly působí často ve velmi nízkých koncentracích ($< 10^{-8}$ M) a jejich receptory se vážou s vysokou afinitou (disociační konstanta $K_d < 10^{-8}$ M).

Vazba receptoru na ligand => aktivace intracelulárních signálů => změna chování buňky



Každá buňka je naprogramována – reaguje na specifické kombinace extracelulárních signálů



Signální molekuly:

- 1) rozpustné, navázané na extracelulární matrici nebo na povrch sousední buňky
- 2) stimulační, inhibiční
- 3) působí v různých kombinacích



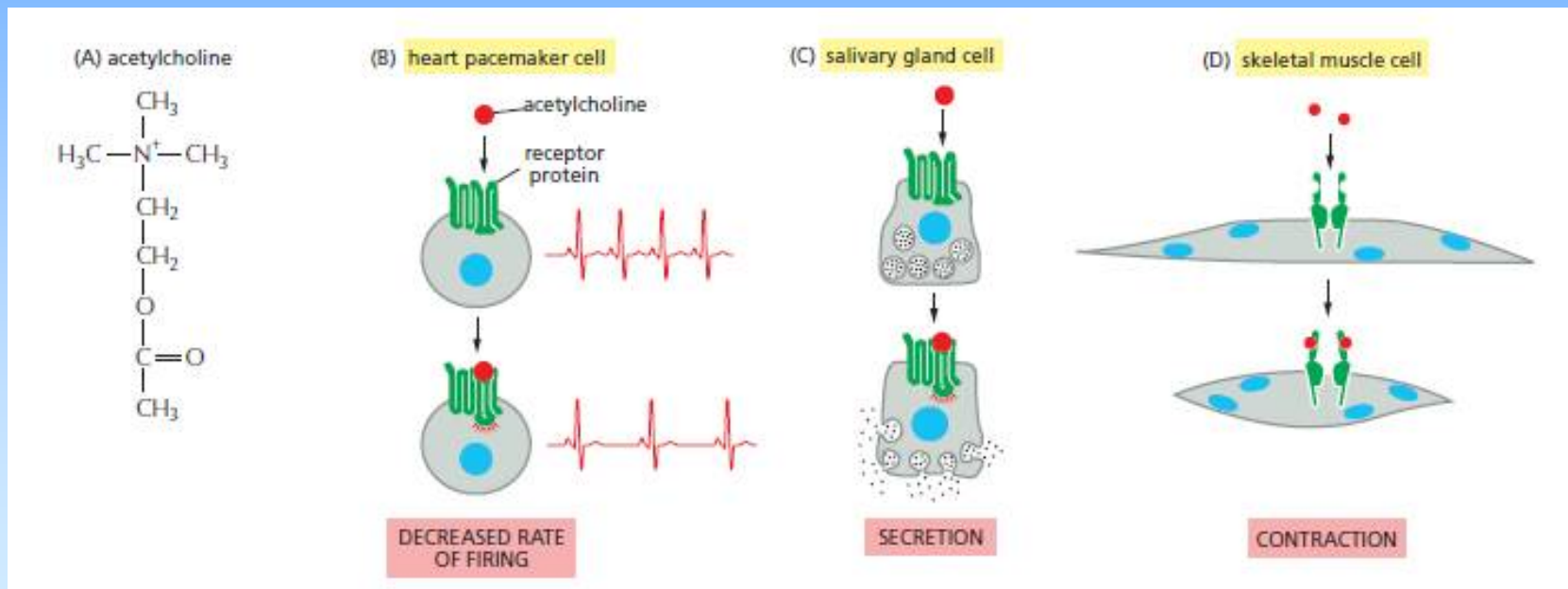
Buňka reaguje selektivně – exprimuje pouze receptory a intracelulární systémy, které jsou nutné pro regulaci této buňky.

Cílem biologů je odhalit, jak buňka integruje všechny tyto signální informace.

Účinky stejné signální molekuly mohou být různé u různých typů cílových buněk.

Acetylcholin

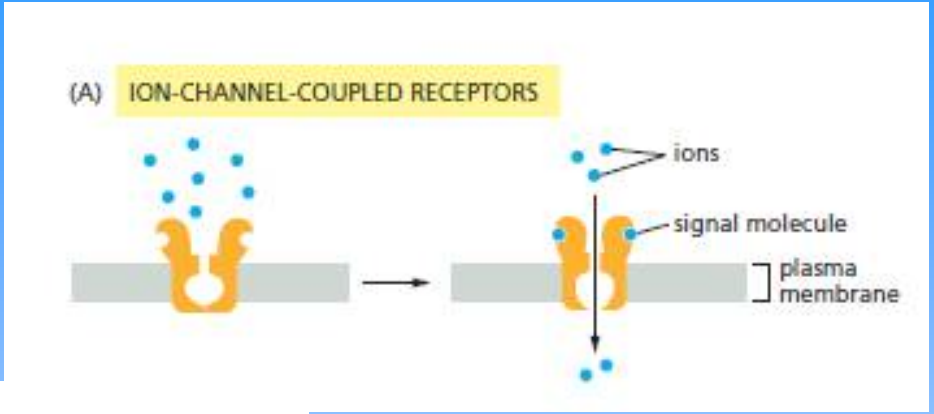
- snižuje rychlost aktivace akčního potenciálu v buňkách pacemakeru
- stimuluje produkci slin buňkami slinných žláz
- způsobuje kontrakci buněk v kosterním svalstvu



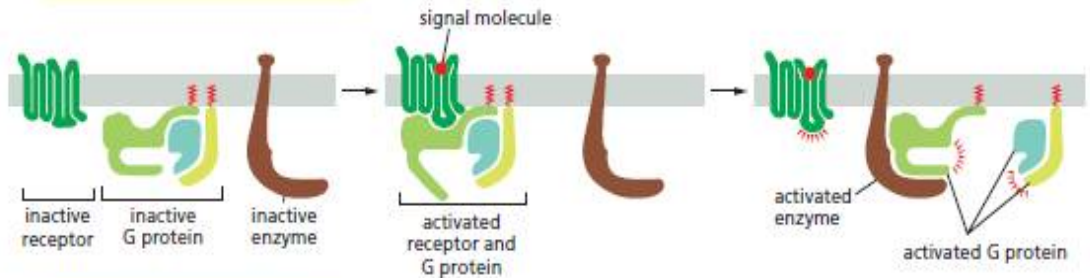
Rozdílné účinky acetylcholinu v těchto buňkách vyplývají z rozdílů v intracelulárních signálních proteinech, efektorových proteinech a genech, které jsou aktivovány.

Existují tři hlavní třídy buněčných povrchových receptorových proteinů.

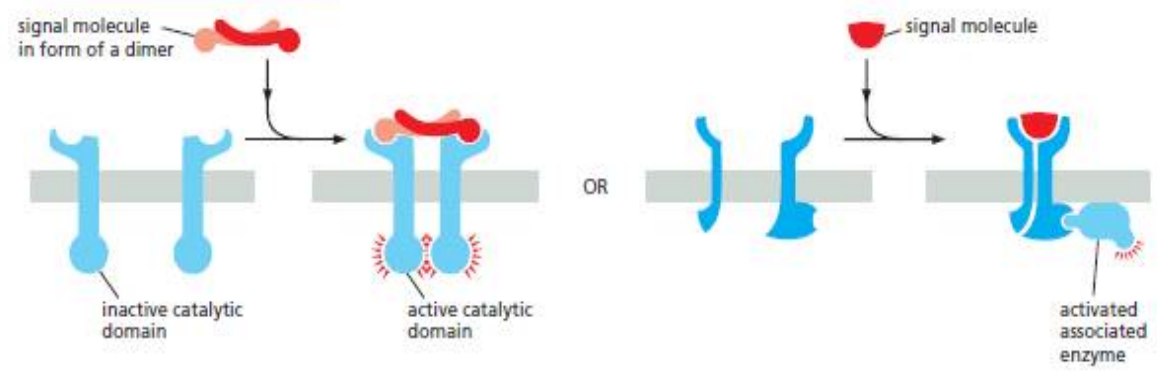
1) Receptory spřažené s iontovými kanály (např. ve svalových a nervových buňkách); transmembránové proteiny



(B) G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS



(C) ENZYME-COUPLED RECEPTORS



2) Receptory spřažené s G-proteinem – nepřímo regulují aktivitu samostatného cílového proteinu; G-protein = trimerní protein vázající GTP

3) Receptory spřažené s enzymem – fungují jako enzymy, nebo se přímo spojují s enzymy => aktivace enzymu; většina těchto receptorů jsou protein kinázy => fosforylace cílových proteinů

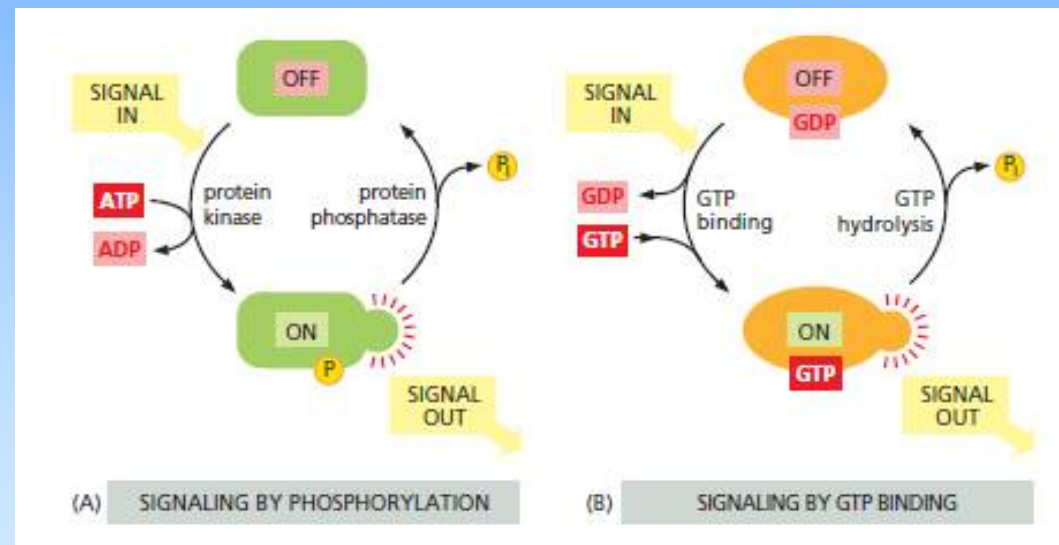
Receptory na povrchu buňky předávají signály prostřednictvím intracelulárních signálních molekul.

Druzí poslové (secondary messengers): Ca^{2+} , cyklický AMP, diacylglycerol – předávají signál vazbou na vybrané signální nebo efektorové proteiny => změni jejich chování

Molekulární spínače: pomáhají přenášet signál do buňky – generují druhé posly, nebo aktivují další signální nebo efektorový protein; po příjmu signálu přecházejí z neaktivovaného do aktivovaného stavu;

2 skupiny molekulárních spínačů:

1) Proteiny aktivovány či deaktivovány fosforylací; lidský genom – 520 protein kináz, 150 protein fosfatáz; fosforylace = připojení fosfátu na OH skupinu specifických AMK cílového proteinu; defosforylace = proces opačný; serin/threonin kinázy, tyrosin kinázy

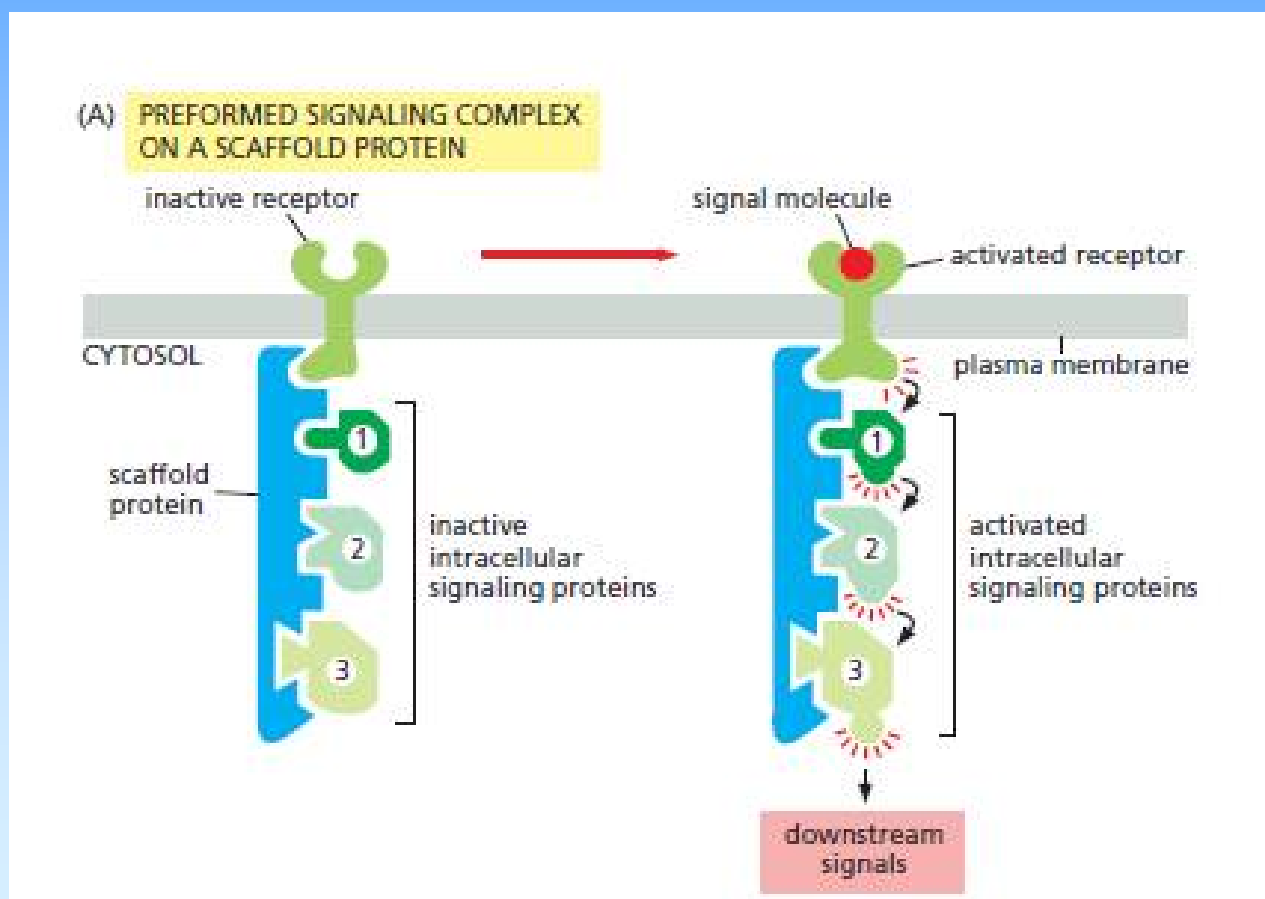


2) Proteiny vázající GTP – přepínají mezi stavem zapnuto (navázán GTP) a stavem vypnuto (navázán GDP); velké trimerní proteiny vázající GTP (**G proteiny**; přenáší signál z receptorů) a malé monomerní proteiny GTPázy (pomáhají přenášet signály z receptorů na povrchu buňky)

Na aktivovaných receptorech se tvoří intracelulární signální komplexy.

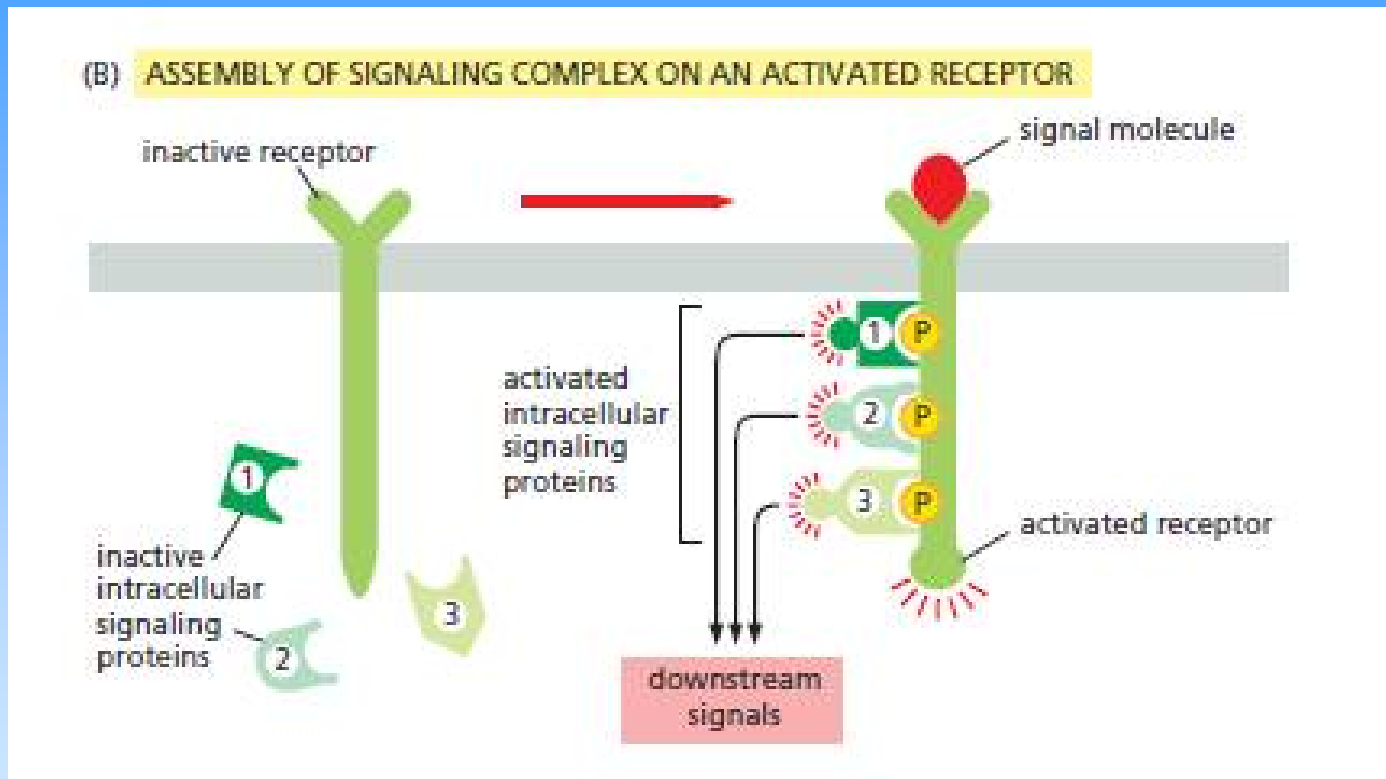
Pro zvýšení specifičnosti interakcí mezi signálními molekulami se tyto nachází ve stejné části buňky a/nebo vytváří velké proteinové komplexy. Tím je zajištěno, že signální molekuly budou interagovat pouze mezi sebou a ne s nevhodnými partnery.

Scaffoldové proteiny – spojují skupiny interagujících proteinů do signálních komplexů



Scaffold = lešení

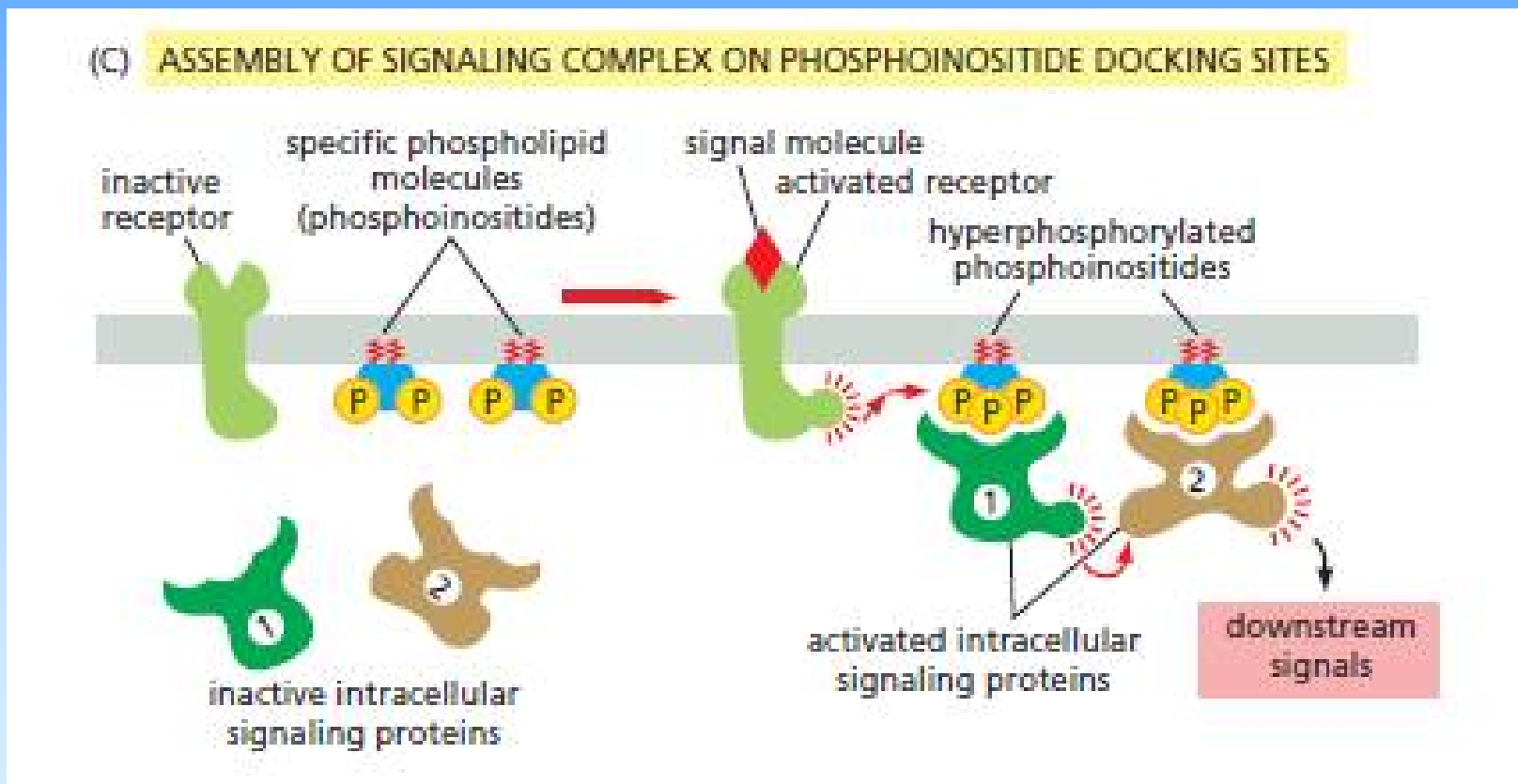
Signální komplexy se tvoří pouze přechodně v reakci na extracelulární signál = receptor je aktivován. Signální komplexy se rozpadají, když signál zmizí.



Cytoplazmatický konec aktivovaného receptoru je fosforylován a fosforylované aminokyseliny slouží jaké dokovací místa pro sestavení dalších signálních proteinů.

Aktivace receptoru může vést k produkci fosfolipidových molekul – fosfoinositidy.

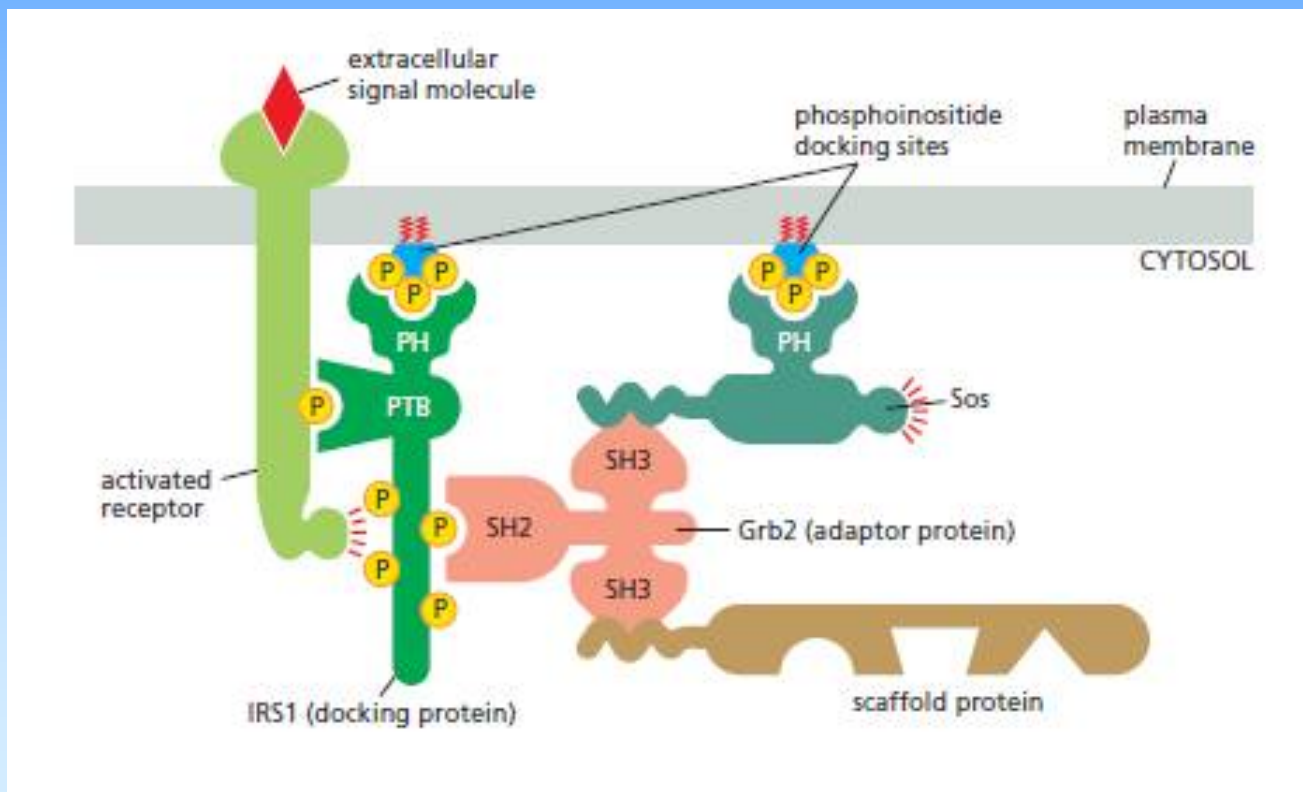
Fosfoinositidy – spojeny s plazmatickou membránou => vazba specifických intracelulárních signálních proteinů => jejich aktivace



Intracelulární signální proteiny obsahují **interakční domény** – konzervované části proteinů, které zprostředkovávají interakce

Domény: **SH2** = Src homology 2, **PTB** = phosphotyrosine-binding, **SH3** = Src homology 3, **PH** = pleckstrin homology

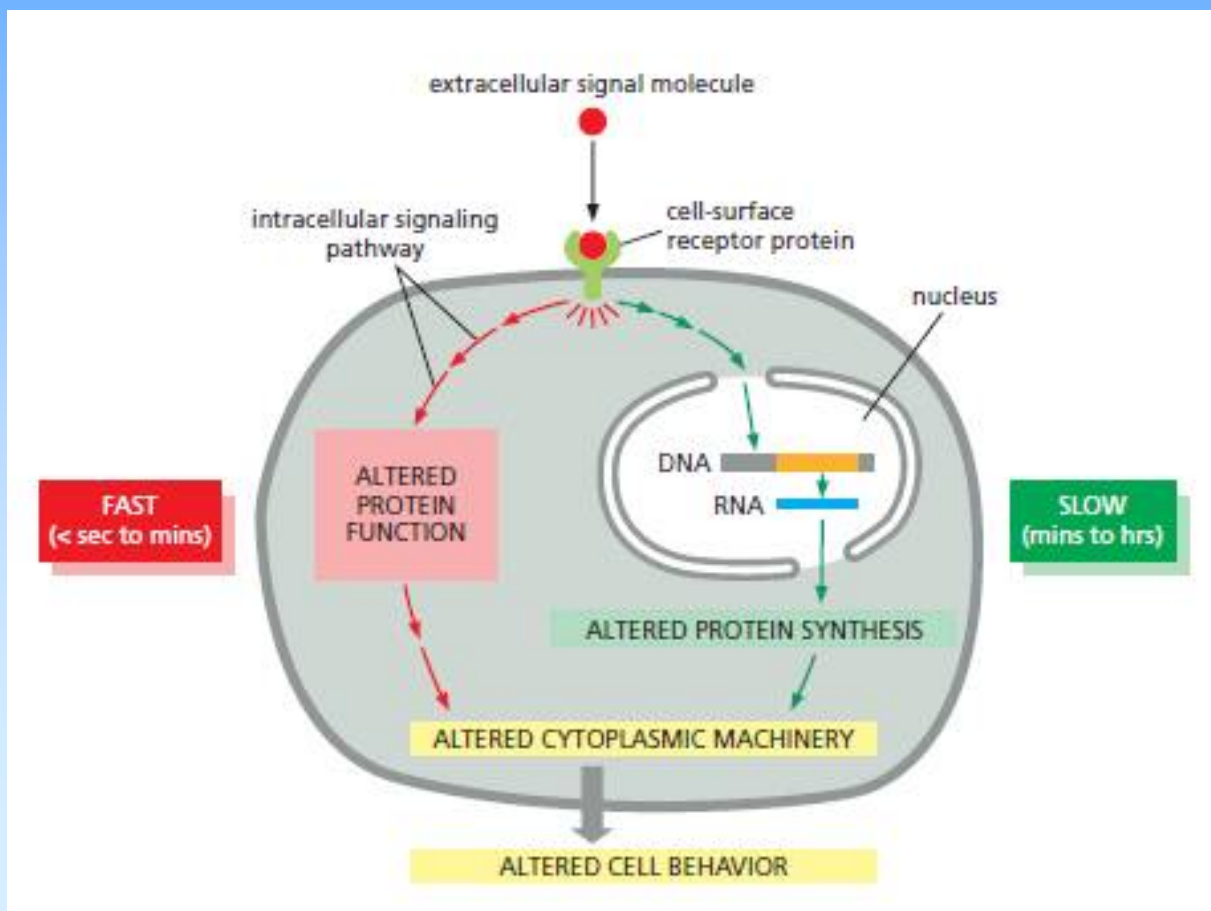
Signální proteiny, které mají dvě nebo více interakčních domén – fungují pouze jako **adaptéry** pro spojení dvou dalších proteinů dohromady



Signální komplex kolem receptoru pro inzulin

Rychlost odezvy závisí na povaze intracelulárních signálních molekul.

- 1) Odezva vyžaduje pouze změny v proteinech, které jsou v buňce přítomné => odpověď je rychlá (sekundy); alosterická změna v iontovém kanálu, změna membránového potenciálu, reakce závislé na fosforylaci
- 2) Odezva vyžaduje změny v genové expresi a syntéze nových proteinů => odpověď je pomalá (minuty, hodiny)



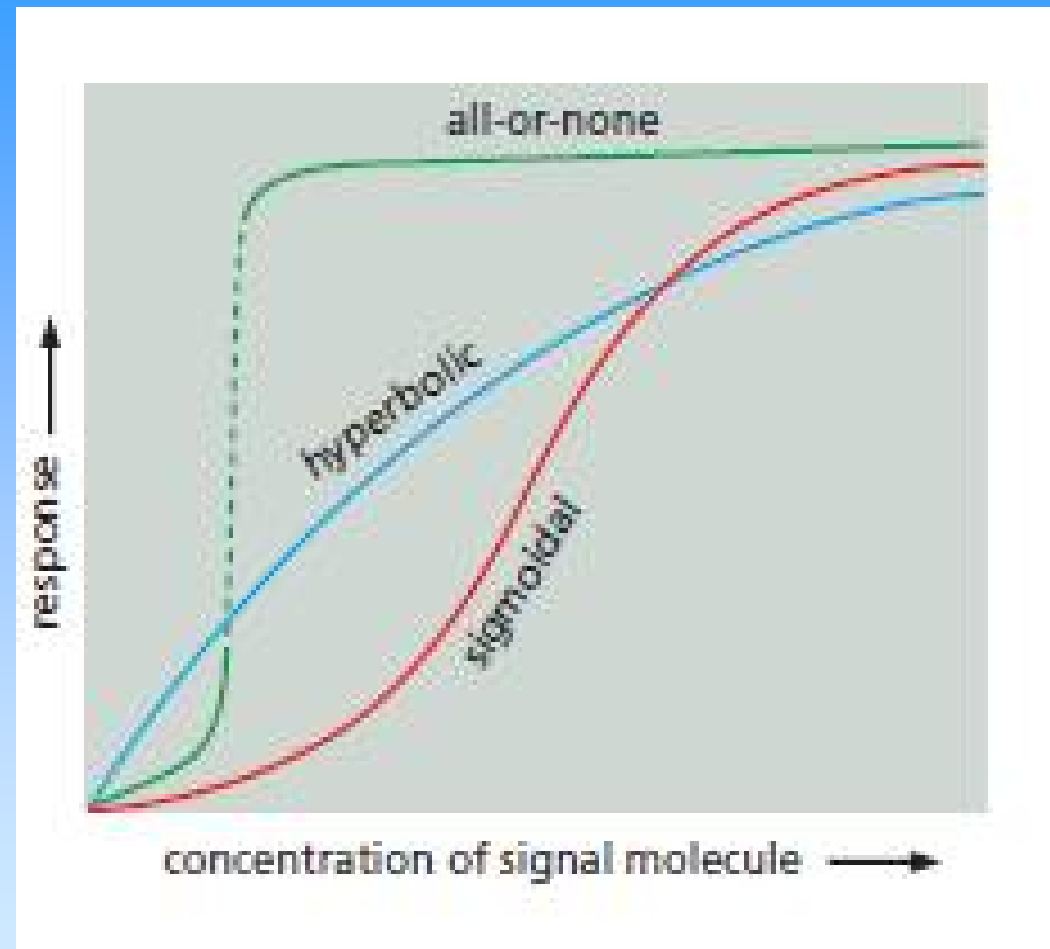
Buňky reagují na postupně se zvyšující signál.

1) Plynule odstupňovaná odezva (reakce; hyperbola); např. jemné doladování metabolických procesů hormony

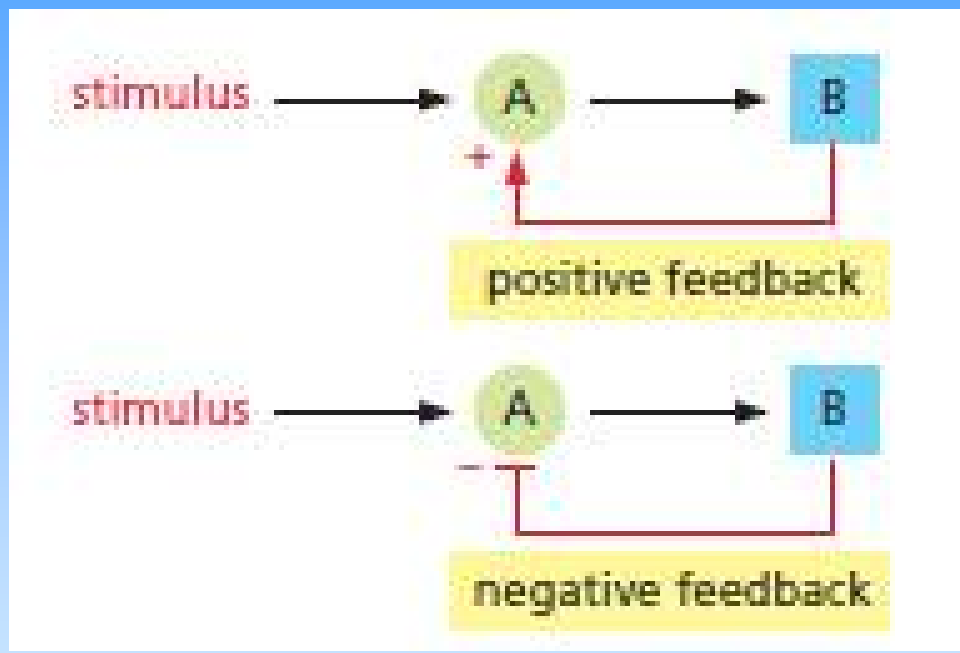
2) Odezva nastává, když koncentrace signálu překročí prahovou hodnotu

- esovitá odpověď (**sigmoidální**); nízké koncentrace – nízký účinek, pak účinek plynule stoupá; tyto systémy poskytují filtr – snižují nevhodné reakce na signály nízké úrovně pozadí, ale jsou citlivé na stimuly v malém koncentračním rozsahu fyziologických signálů.

- nespojitá odezva – „**vše nebo nic**“; odezva zcela (a často nevratně) zapne při prahové koncentraci; kontrola volby mezi oběma alternativními buněčnými stavy a zahrnují zpětnovazebné reakce

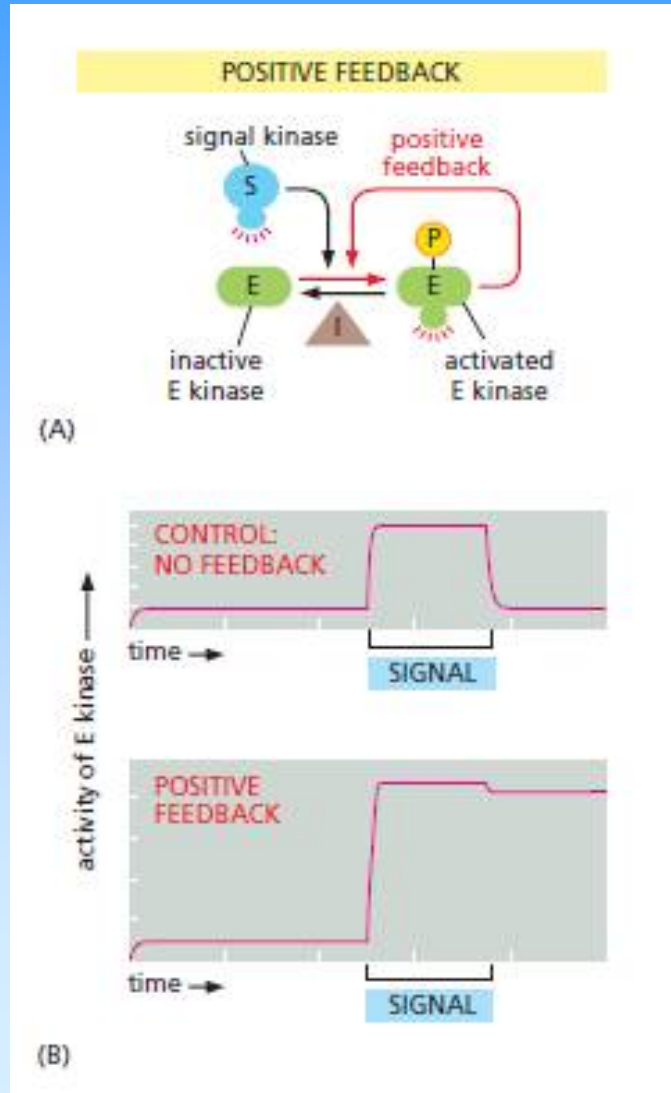


Většina intracelulárních signalizačních systémů zahrnuje zpětnovazebné smyčky.



Zpětnovazebné smyčky mají velký obecný význam a regulují mnoho chemických a fyzikálních procesů v buňkách. Smyčky v buněčné signalizaci působí buď v cílové buňce nebo zahrnují sekreci extracelulárních signálů.

Pozitivní zpětná vazba



Pozitivní zpětná vazba v signální dráze může změnit chování buňky.

Mírná síla pozitivní vazby – pouze zostřeje odpověď na signál => esovitá odezva

Velká síla pozitivní vazby => odezva „vše nebo nic; při vysoké aktivaci reakce se tento stav může stát soběstačným => přetrvává i když síla původního signálu klesne pod kritickou hodnotu = **bistabilní systém** (stav zapnuto nebo vypnuto) – přechodný podnět může odezvu převrátit z jednoho stavu do druhého.

Prostřednictvím pozitivní zpětné vazby může přechodný extracelulární signál vyvolat dlouhodobé změny v buňkách a jejich potomcích, které mohou přetrvávat po celý život organismu.

Příklad: specifikace vývoje svalových buněk

Negativní zpětná vazba

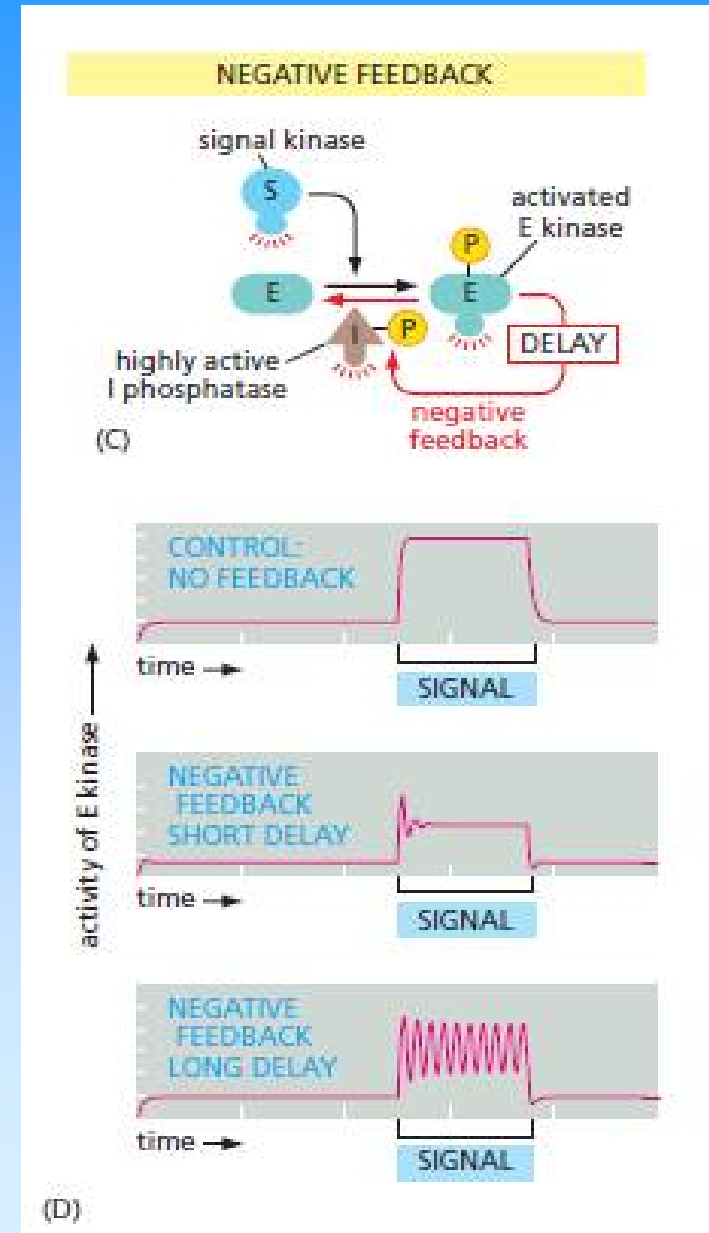
Negativní zpětná vazba je běžná v signalizačních systémech.

Negativní zpětná vazba působí proti účinku podnětu => zkracuje a omezuje úroveň reakce.

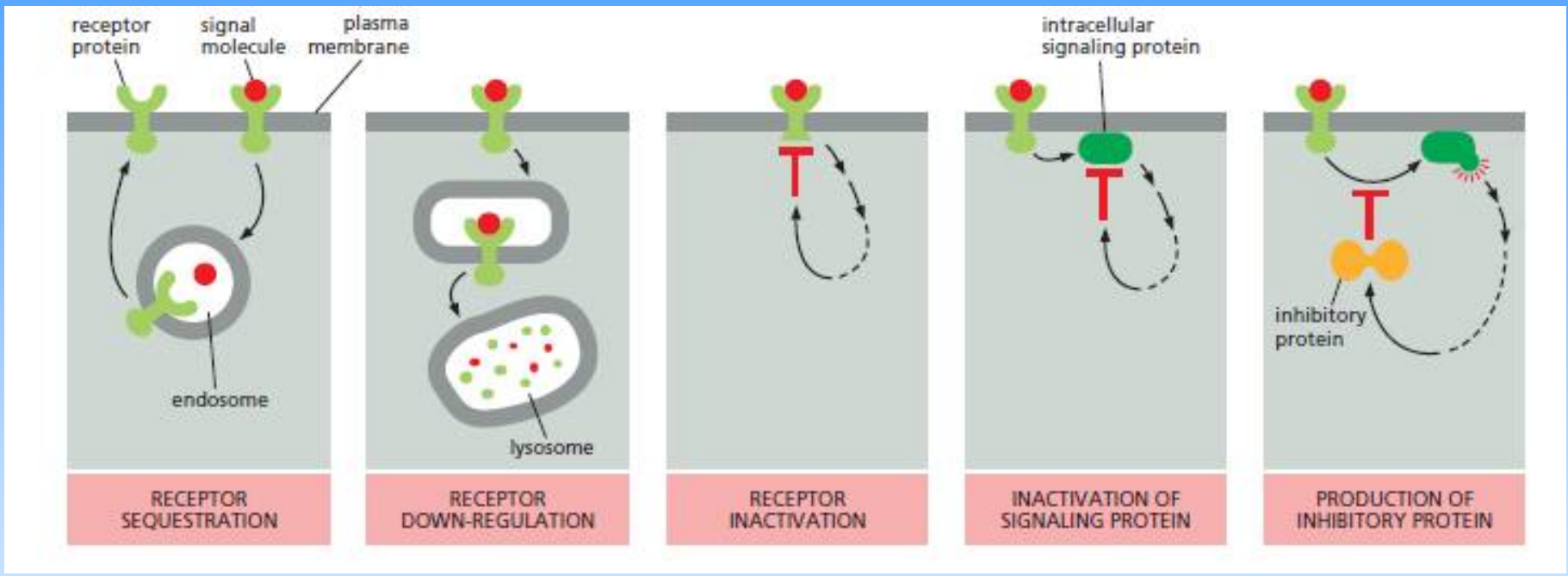
Negativní zpětná vazba má zpoždění:

Krátké zpoždění => systém se chová jako detektor změny; dává silnou odpověď na signál, ale reakce rychle klesá, i když signál přetrvává => **fenomém adaptace**

Dlouhé zpoždění => oscilující odezvy; přetrvávají tak dlouho, dokud trvá stimul



Negativní vazba může probíhat různými způsoby.



Vychytávání receptoru

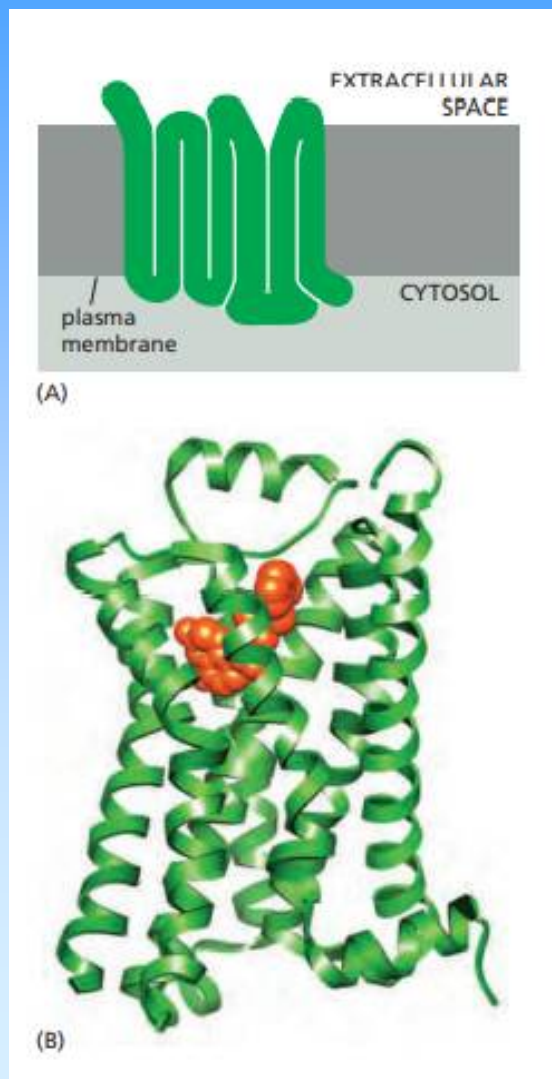
Snižování množství receptoru

Inaktivace receptoru

Inaktivace signálního proteinu

Produkce inhibičního proteinu

Signalizace prostřednictvím receptorů spřažených s G proteinem (GPCR)



Receptory spojené s G proteinem (GPCR – G-Protein Connected Receptors) - největší rodina receptorů na buněčném povrchu; zprostředkovávají většinu reakcí na vnější signály i signály z jiných buněk (hormony, neurotransmitery, lokálních mediátory); **zapojeny ve zraku, čichu a chuti.**

Člověk – 800 GPCR
 Myši – 1000 GPCR } zapojených jen v čichu

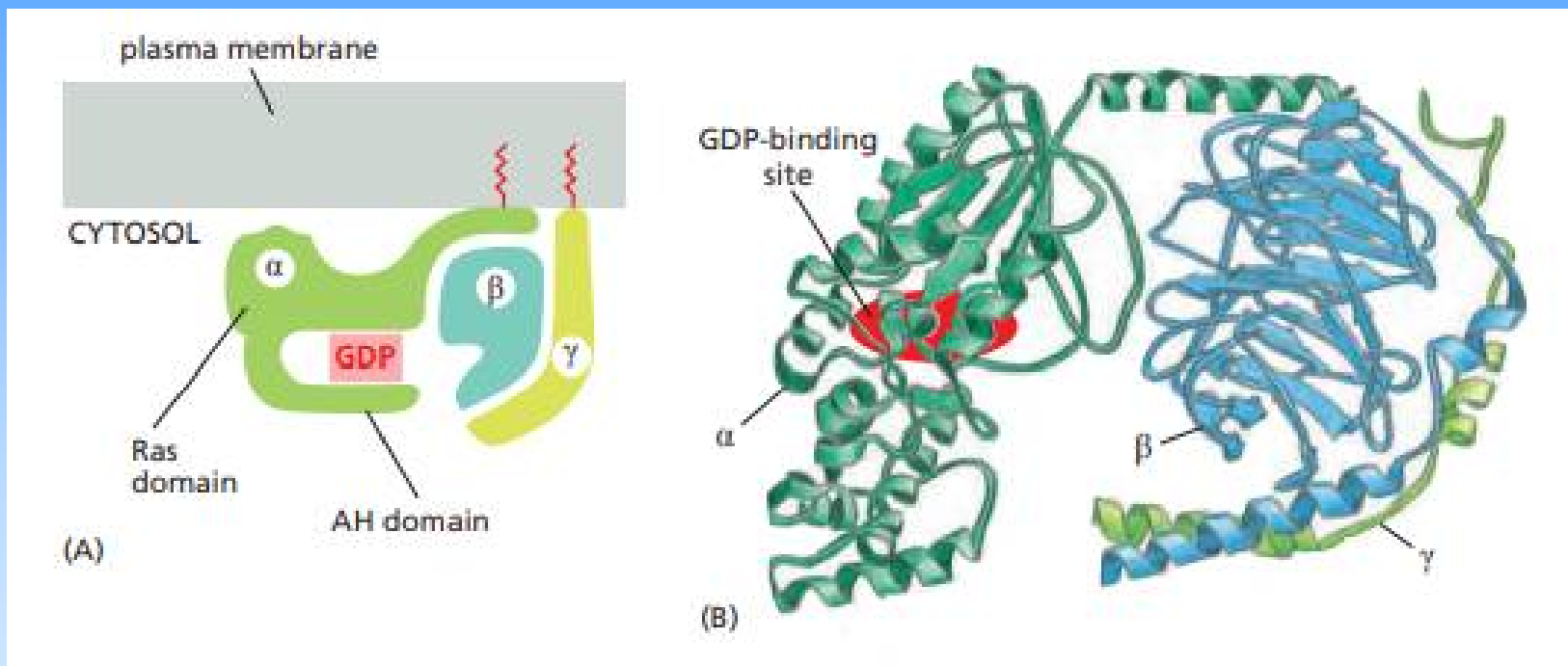
Signální molekuly působící na GPCR jsou velice rozmanité, přesto GPCR mají všechny podobnou strukturu = jediný polypeptidový řetězec a má 7 membránových domén – tvoří válcovitou strukturu s hlubokým místem pro vazbu ligandu.

Všechny GPCR využívají G-proteiny k přenosu signálu dovnitř buňky.

Zajímavost: polovina všech známých léků působí prostřednictvím GPCR nebo signálních drah, které GPCR aktivují.

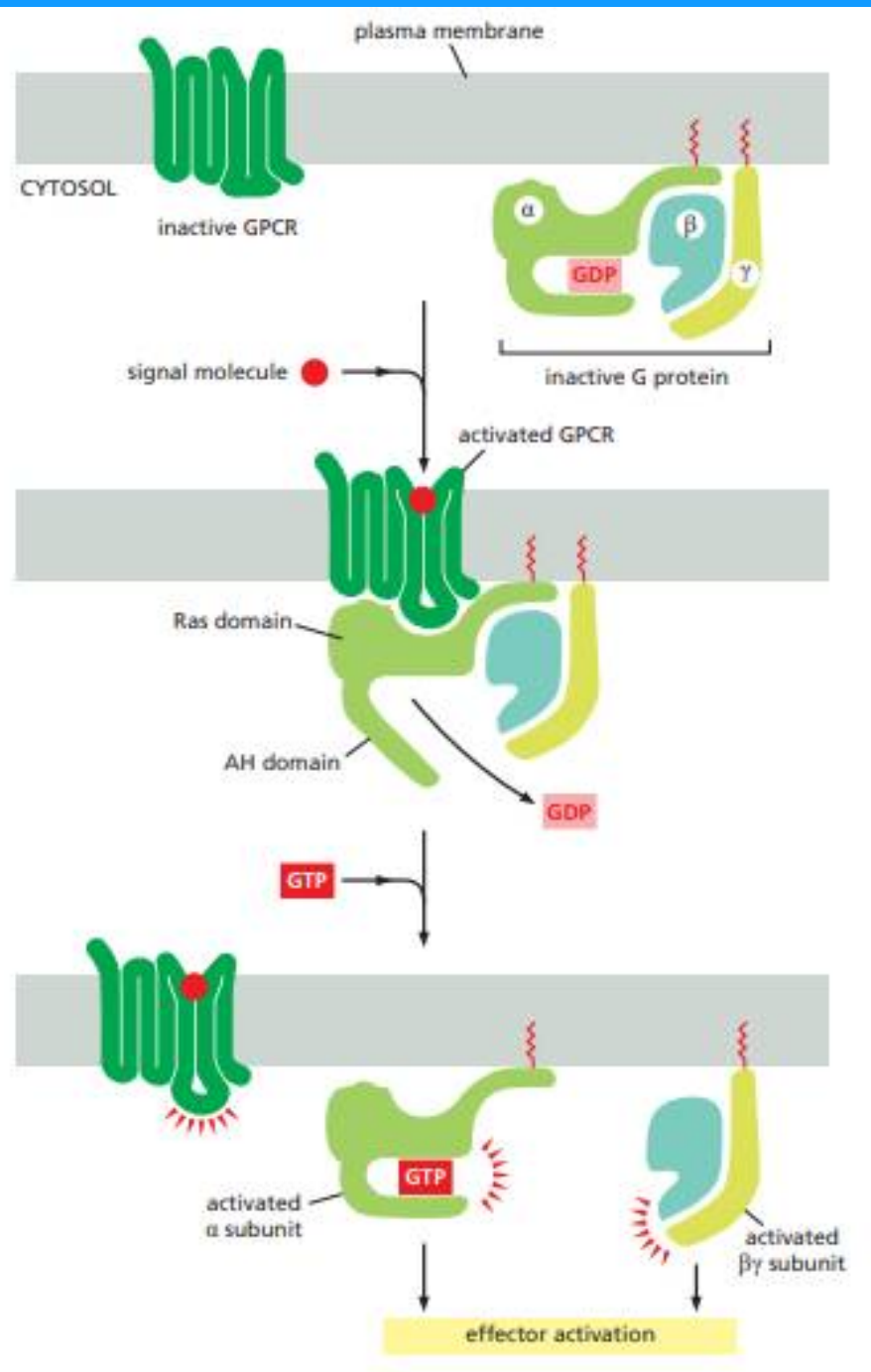
Trimerní G proteiny přenáší signály z GPCR

Signál => vazba na GPCR => konformační změna GPCR => vazba GPCR na **trimerní G protein vázající GTP** – spojuje receptor s enzymy nebo iontovými kanály.



G protein – 3 proteinové podjednotky: α , β , γ

Nestimulovaný stav – α je navázaná na GDP => G protein je neaktivní



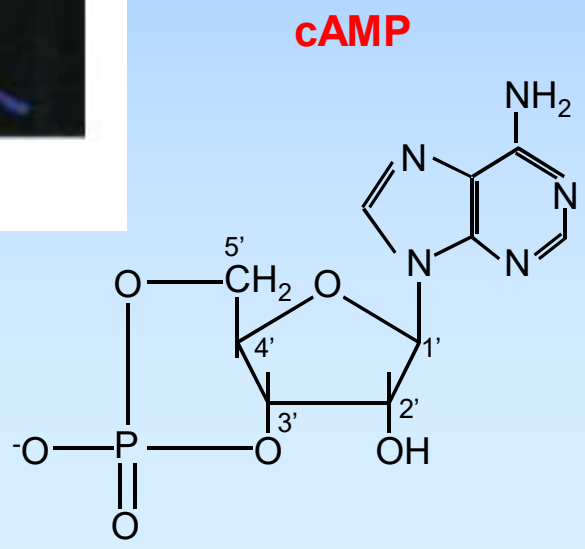
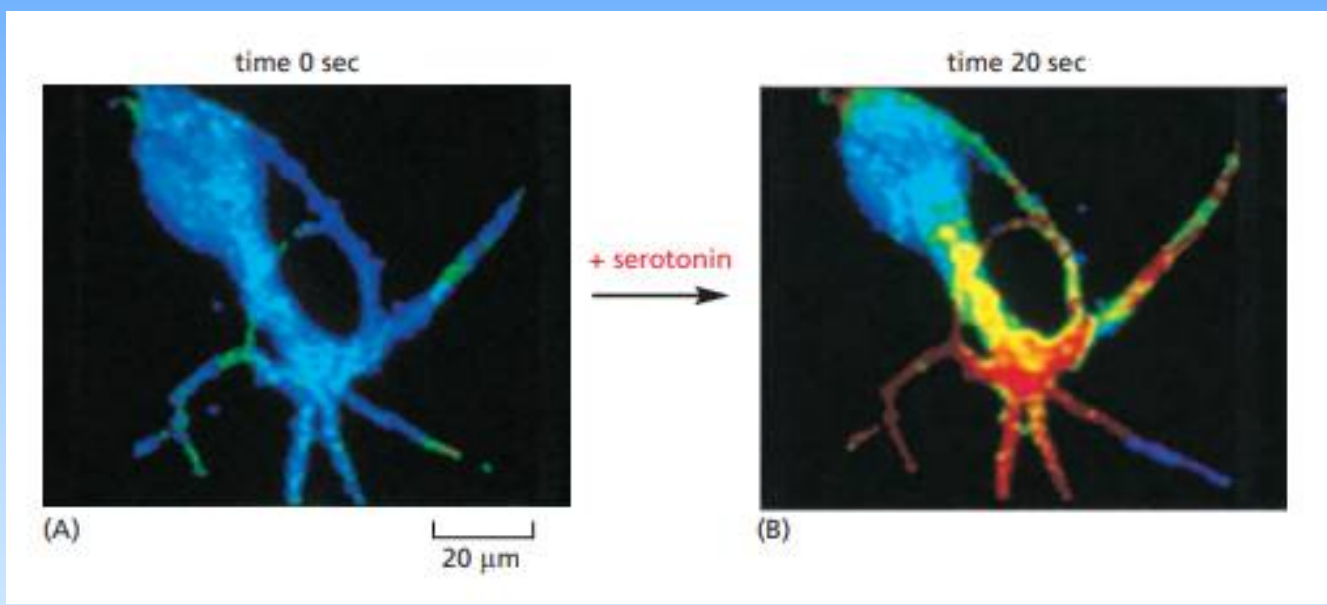
Stimulovaný stav (vazba signální molekuly na GPCR) – GPCR indukuje podjednotku α => uvolnění GDP => GTP se váže na jeho místo => konformační změna podjednotky α => G-protein se uvolní z receptoru => disociace $G\alpha$ od $G\beta\gamma$. $G\alpha$ a $G\beta\gamma$ interagují s různými cíly = enzymy či kanály v plazmatické membráně => přenos signálu dále

Podjednotka α = GTPáza – hydrolyzuje vázaný GTP na GDP => podjednotka α se inaktivuje

Některé G proteiny regulují produkci cyklického AMP.

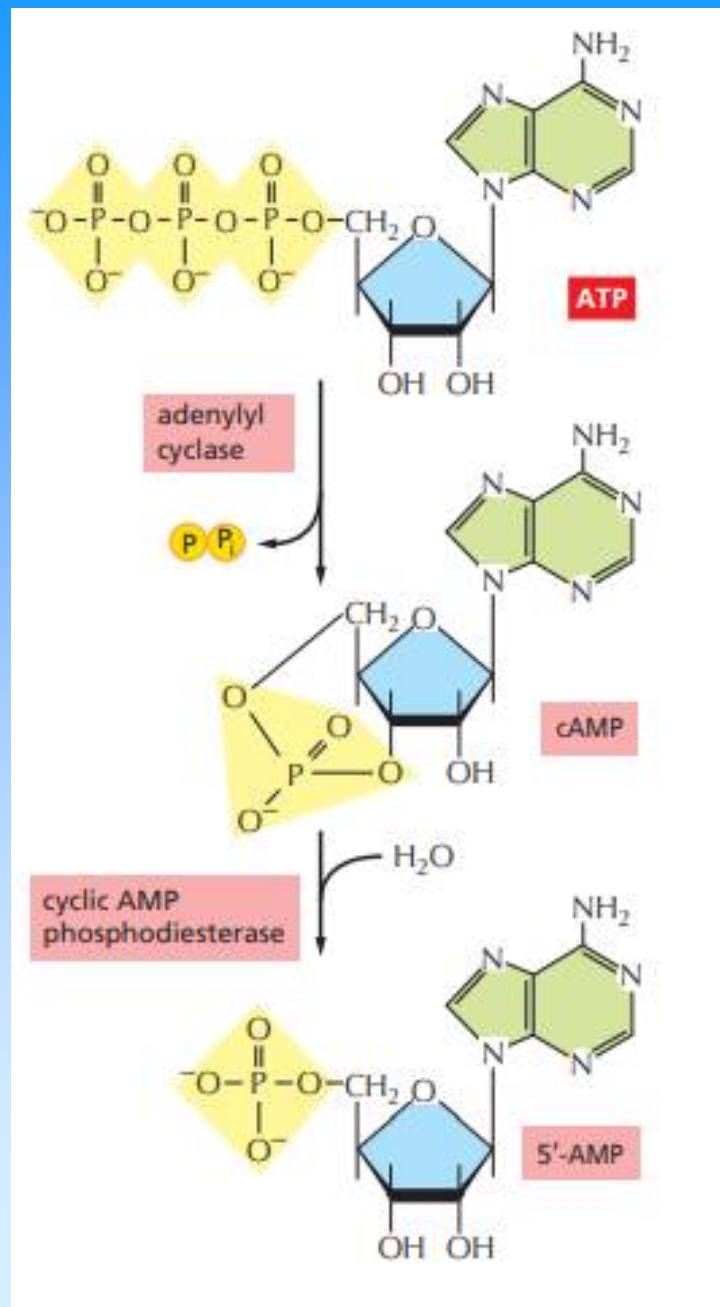
Cyklický adenosin monofosfát (cAMP) – druhý posel

Extracelulární signál může během sekund zvýšit koncentraci cAMP až 20x => potřeba i rychlé degradace cAMP.



cAMP je syntetizován z ATP pomocí enzymu **adenylylcykláza**.

cAMP je degradován enzymem **cyklickou AMP fosfodiesterázou**.



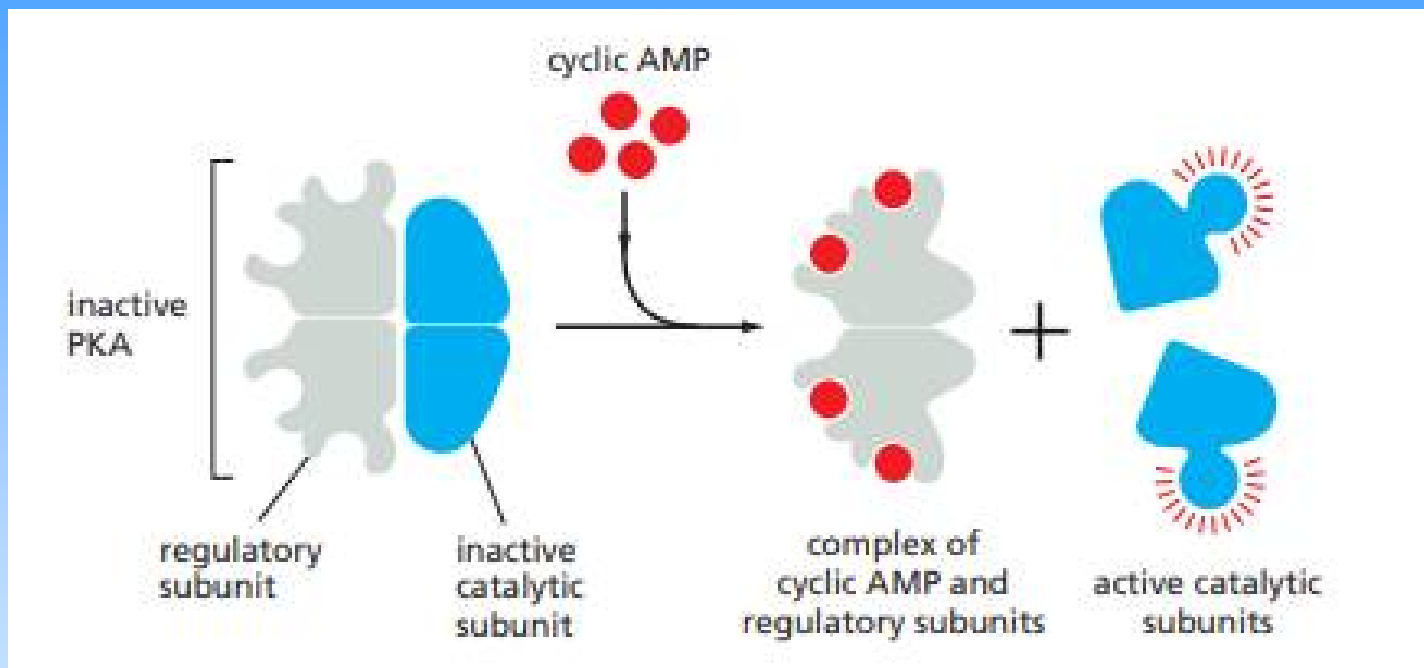
Mnoho extracelulárních signálů funguje zvýšením koncentrace cAMP uvnitř buňky prostřednictvím **stimulačního G proteinu (Gs)**. Jiné extracelulární podněty působící prostřednictvím GPCR snižují hladiny cAMP aktivací **inhbičního G proteinu (Gi)**.

Příklady odpovědí zprostředkovaných zvýšením cAMP:

TABLE 15-1 Some Hormone-induced Cell Responses Mediated by Cyclic AMP		
Target tissue	Hormone	Major response
Thyroid gland	Thyroid-stimulating hormone (TSH)	Thyroid hormone synthesis and secretion
Adrenal cortex	Adrenocorticotrophic hormone (ACTH)	Cortisol secretion
Ovary	Luteinizing hormone (LH)	Progesterone secretion
Muscle	Adrenaline	Glycogen breakdown
Bone	Parathormone	Bone resorption
Heart	Adrenaline	Increase in heart rate and force of contraction
Liver	Glucagon	Glycogen breakdown
Kidney	Vasopressin	Water resorption
Fat	Adrenaline, ACTH, glucagon, TSH	Triglyceride breakdown

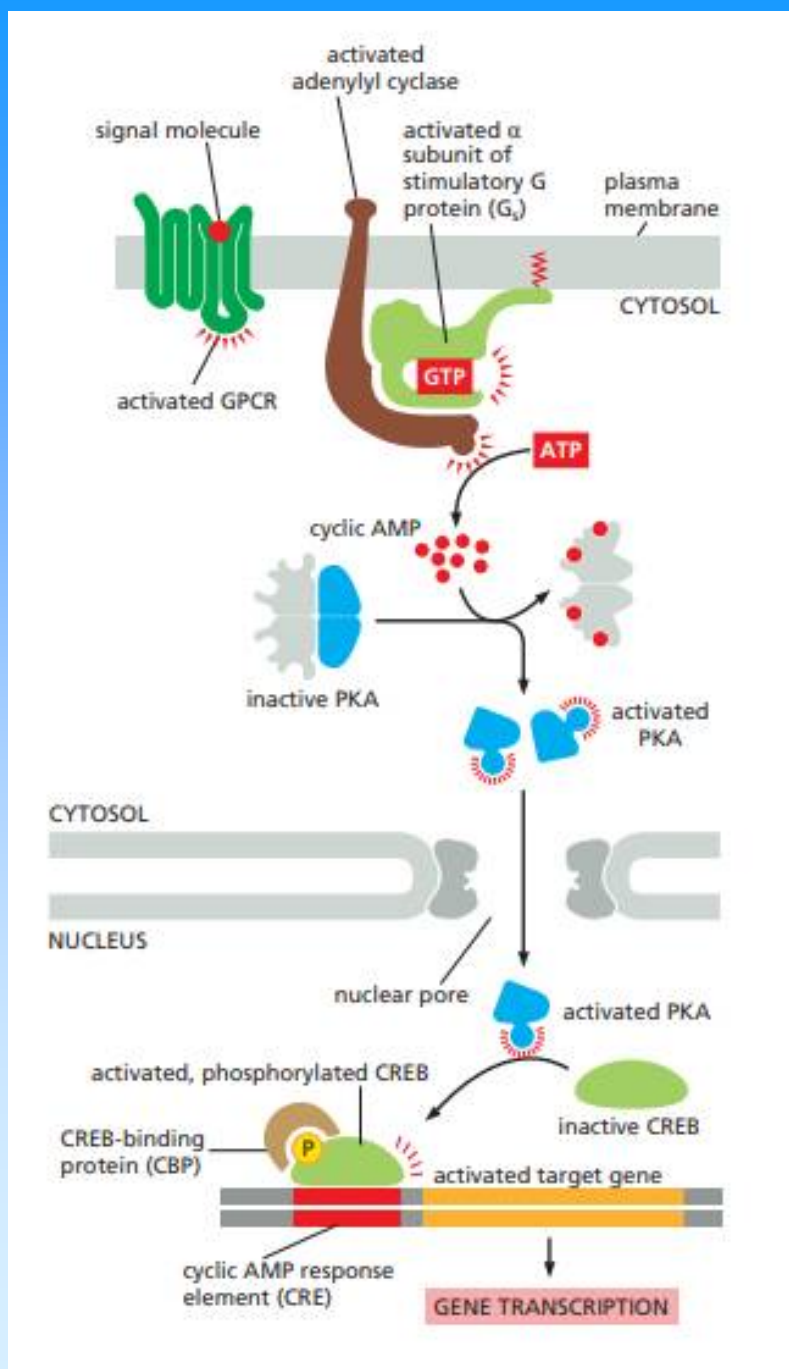
Většinu účinků cAMP zprostředkovává **cAMP-dependentní proteinkináza (PKA)**

PKA fosforyluje specifické seriny nebo threoniny na cílových proteinech.



Neaktivní stav – PKA se skládá z komplexu dvou katalytických podjednotek a dvou regulačních podjednotek.

Vazba cAMP na regulační podjednotky PKA => změna konformace => disociace katalytických podjednotek z komplexu => jejich **aktivace** => fosforylace specifických cílových proteinů



Zvýšení intracelulární koncentrace cAMP vede ke změně transkripce genů.

Příklad: biosyntéza hormonu somatostatinu

Regulační oblast somatostatinového genu obsahuje krátkou cis-regulační sekvenci zvanou **cAMP responzivní element (CRE)**. Specifický regulátor transkripce zvaný **CRE-binding (CREB)** protein rozpoznává tuto sekvenci.

cAMP => aktivace PKA => fosforylace CREB na jediném serinu; fosforylovaný CREB aktivuje transkripční koaktivátor **CREB-binding protein (CBP)** => stimulace transkripce cílových genů.

CREB tedy může přeměnit krátký cAMP signál na dlouhodobou změnu v buňce. Tento proces probíhá v mozku a pravděpodobně hraje důležitou roli v některých formách učení a paměti.

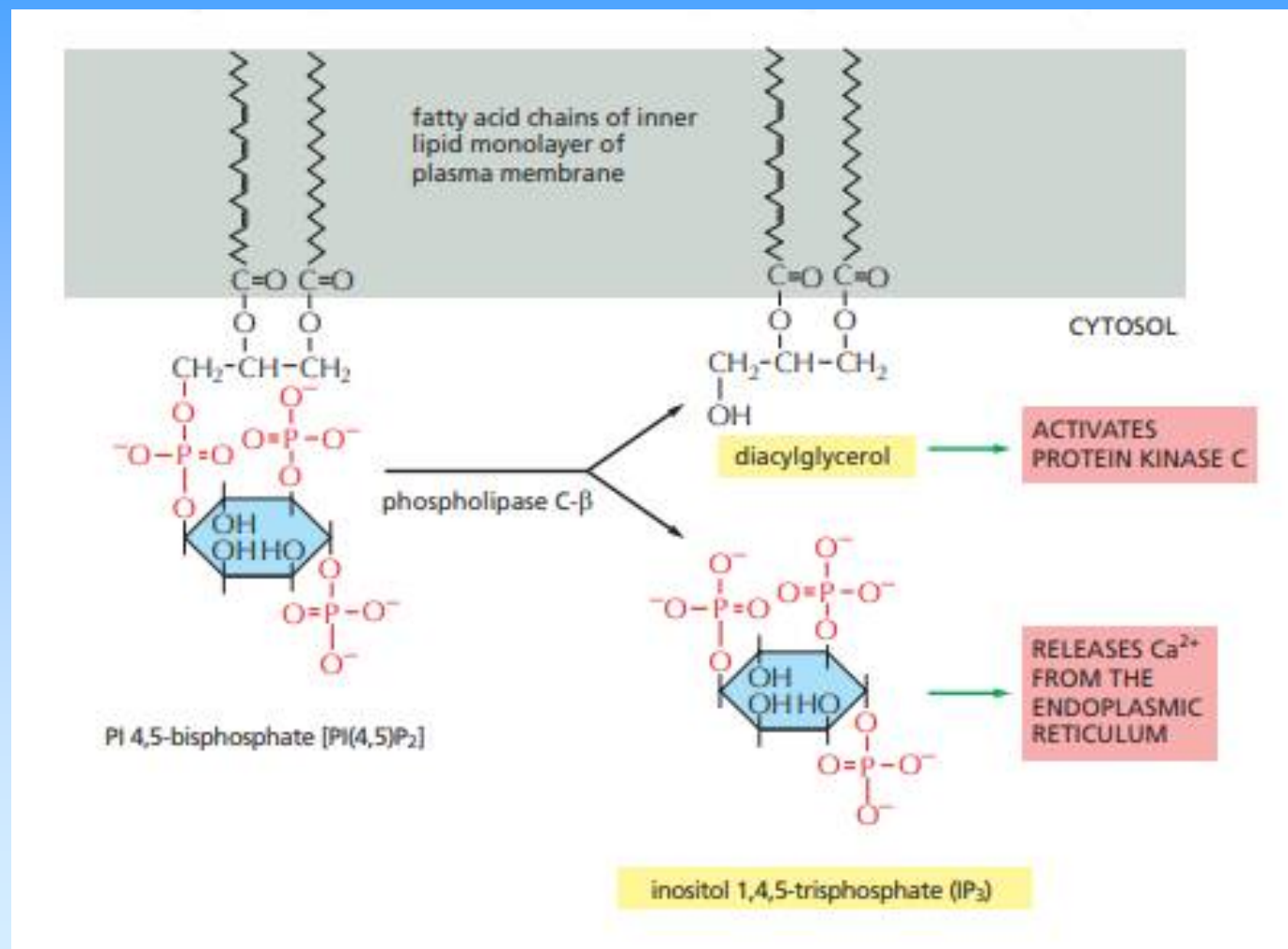
Signalizace G proteinů prostřednictvím fosfolipidů

Mnoho GPCR uplatňuje svůj účinek prostřednictvím G proteinů, které aktivují enzym **fosfolipázu C- β (PLC β)** vázaný na plazmatickou membránu.

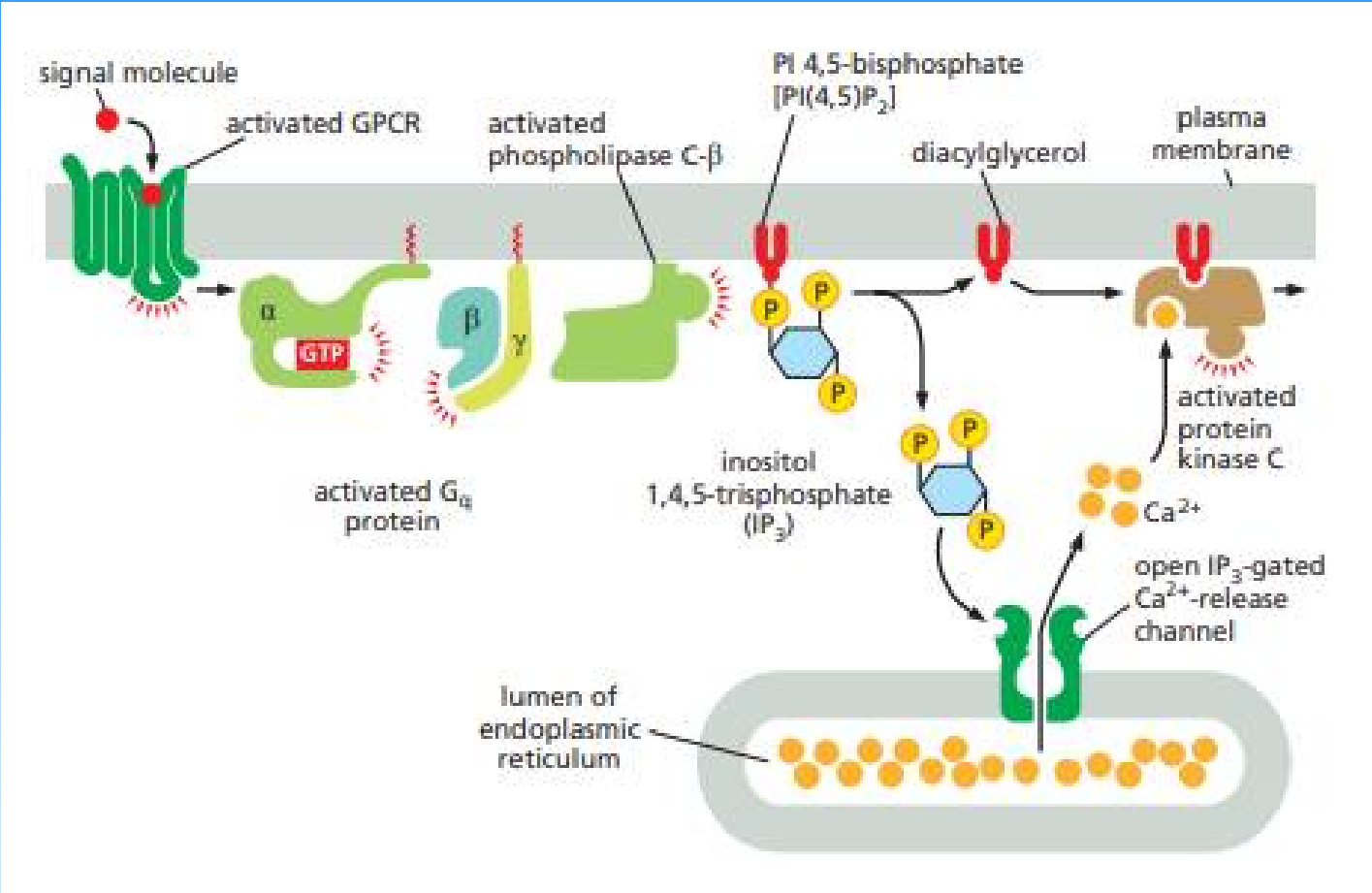
Příklady odpovědí zprostředkovaných aktivací fosfolipázy C- β :

Target tissue	Signal molecule	Major response
Liver	Vasopressin	Glycogen breakdown
Pancreas	Acetylcholine	Amylase secretion
Smooth muscle	Acetylcholine	Muscle contraction
Blood platelets	Thrombin	Platelet aggregation

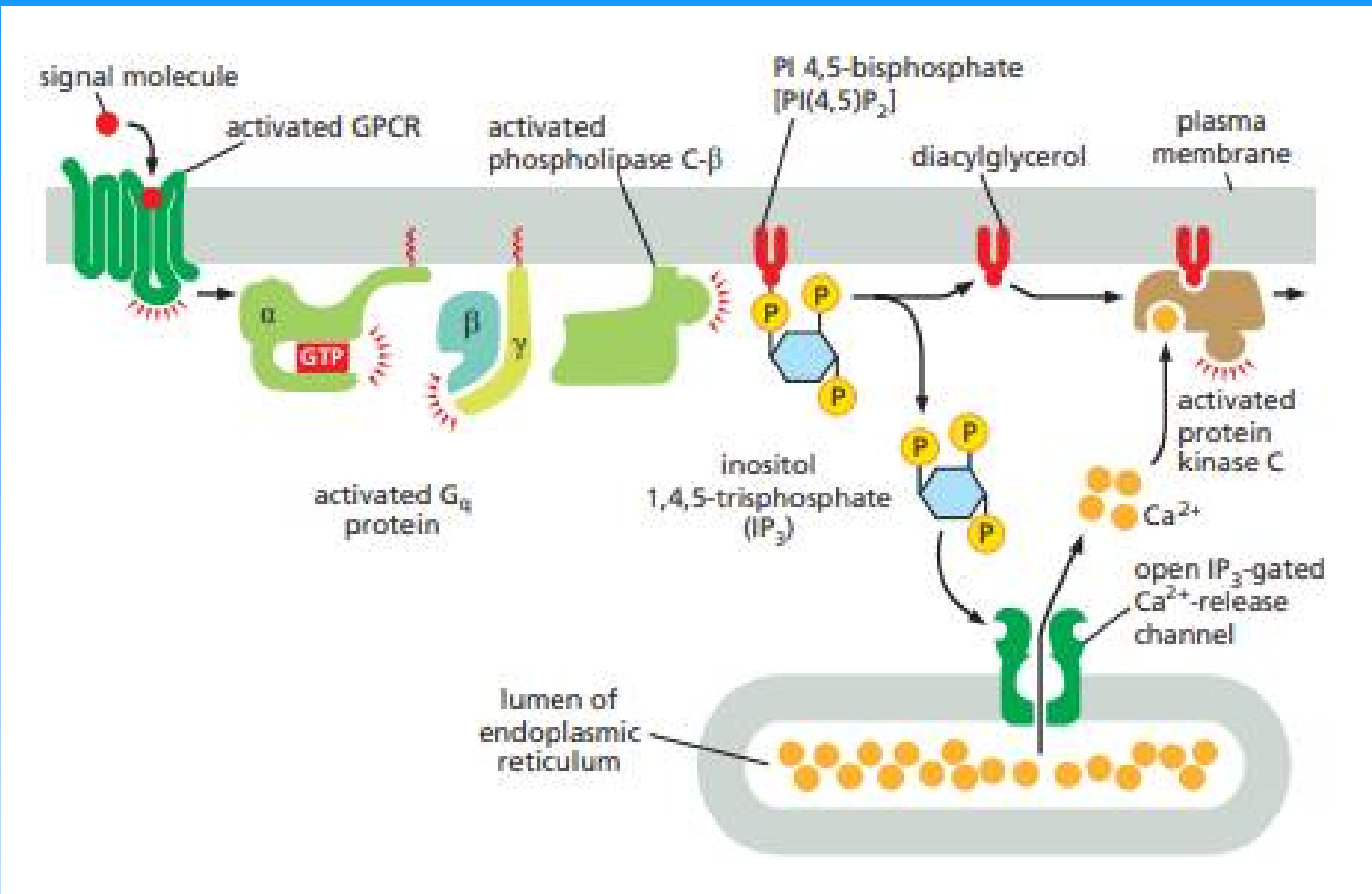
Fosfolipáza působí na fosforylovaný inositol fosfolipid (fosfoinositid) zvaný **fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát [PI(4,5)P₂]** – přítomen v malých množstvích ve vnitřní polovině lipidové dvojvrstvy plazmatické membrány



Inositol fosfolipidová signální dráha



Aktivovaný GPCR => aktivace G proteinu => aktivace fosfolipázy C-β => rozštěpení fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátu na **inositol 1,4,5-trisfosfát (IP₃)** a **diacylglycerol** => dráha se dělí na 2 části:



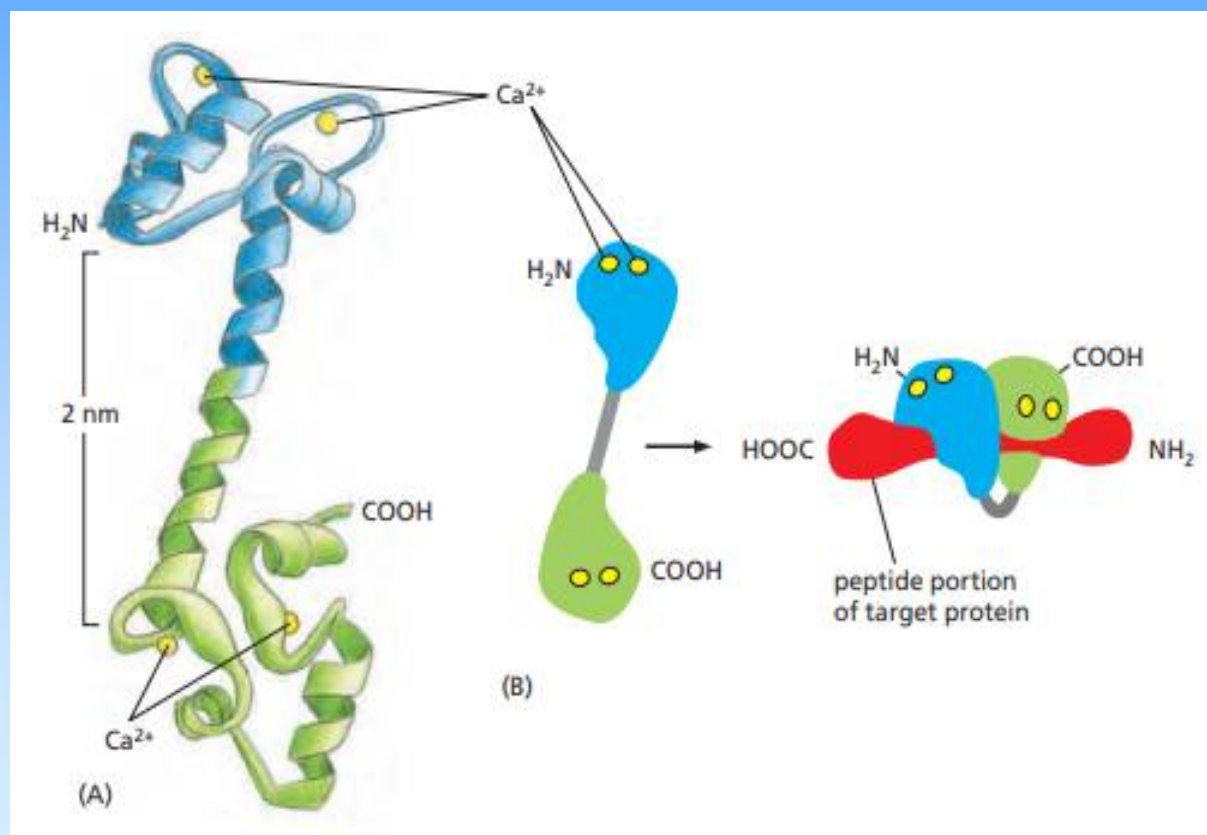
1) **IP₃** (v H₂O rozpustná molekula) opouští PM a difunduje přes cytosol k ER – vazba na IP₃-gated Ca²⁺ kanály (tzv. IP₃ receptory) v ER membráně => uvolnění Ca²⁺ z ER => zvýšení koncentrace Ca²⁺ v cytosolu => ovlivnění aktivity intracelulárních proteinů citlivých na Ca²⁺ => šíření signálu. Nárůst Ca²⁺ později vede ke zpětnovazební inhibici IP₃ receptorů.

2) **Diacylglycerol** – druhý posel, zůstává zabudován v PM – různé signalizační úlohy. Hlavní funkce – aktivace **proteinkinázy C (PKC)**; závislá na Ca²⁺). Ca²⁺ stimuluje pohyb PKC z cytosolu na cytoplazmatickou stranu plazmatické membrány, kde je aktivována diacylglycerolem => PKC fosforyluje cílové proteiny.

Proteinové kinázy závislé na Ca^{2+} /kalmodulinu zprostředkovávají mnoho reakcí na signály Ca^{2+} .

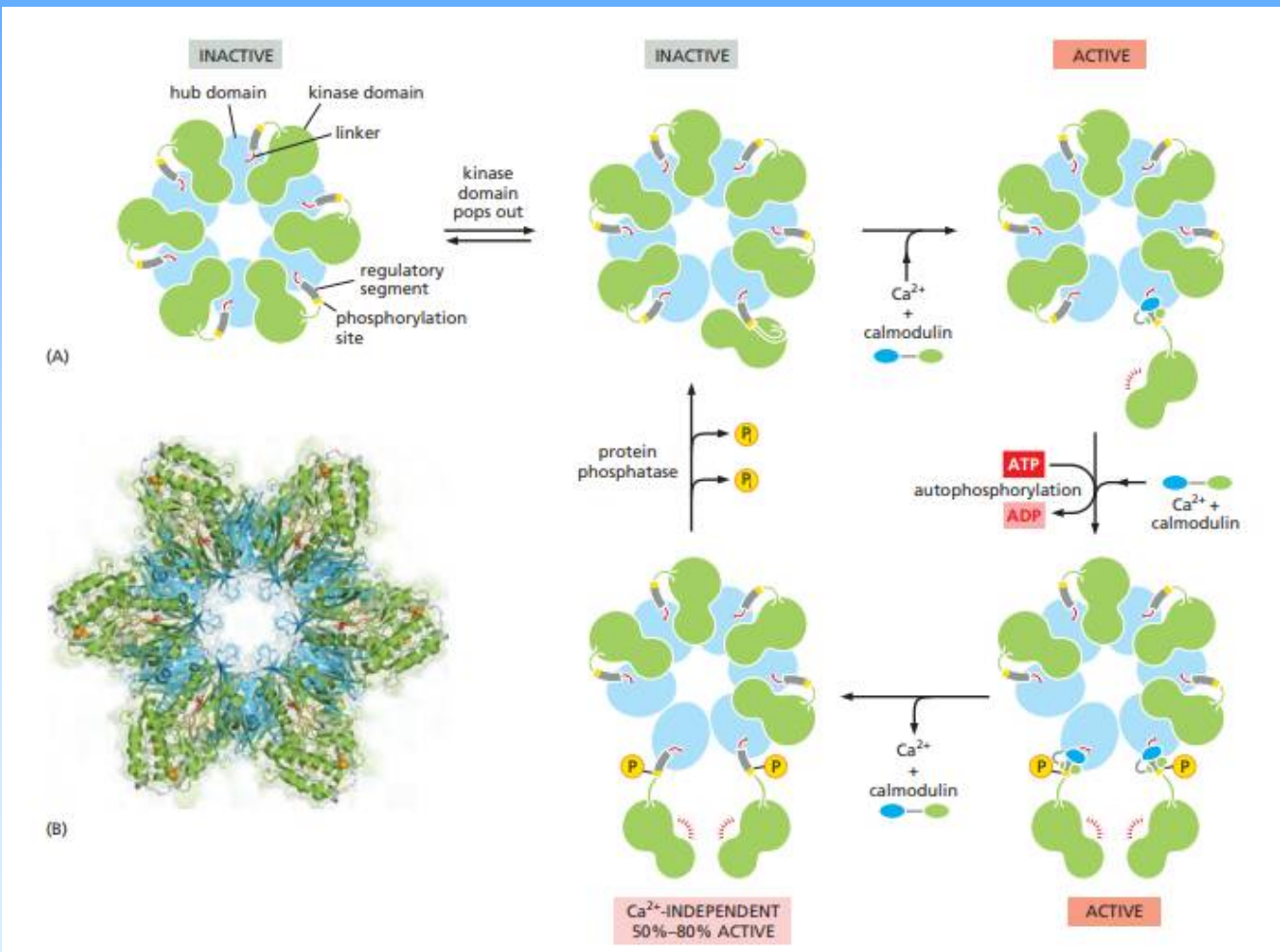
Kalmodulin – nejdůležitější protein, který váže Ca^{2+} ; ve všech eukaryotických buňkách, 1% všech proteinů; jediný polypeptidový řetězec se 4 vazebnými místy pro Ca^{2+}

Vazba Ca^{2+} na kalmodulin => změna konformace => vazba kalmodulinu k cílovým proteinům – enzymy, membránové transportní proteiny – např. Ca^{2+} pumpa nebo **Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní kinázy (CaM-kinázy)**.



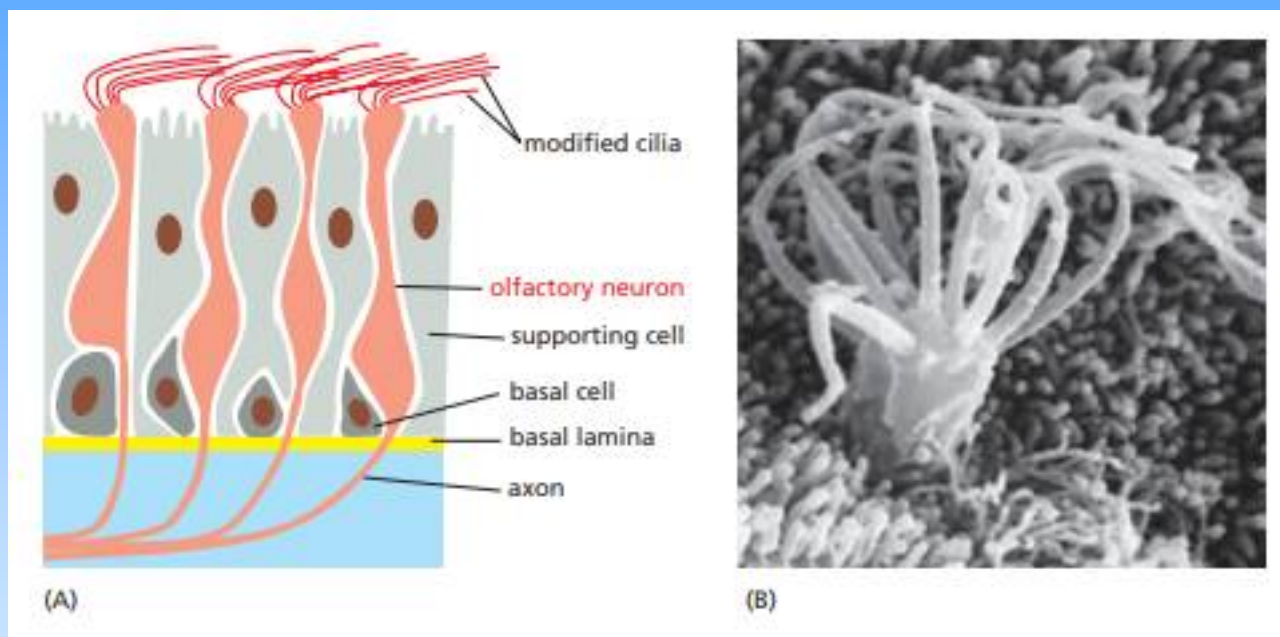
Aktivace CaM-kinázy II

CaM-kináza II – živočišné buňky, většinou v nervovém systému - v synapsích; každý protein - 2 domény: amino-terminální kinázová doména a karboxyl-terminální hub doména – spojeny regulačním elementem; Ca^{2+} /kalmodulin aktivuje CaM-kinázu II; sousední podjednotky kinázy se navzájem fosforylují => zůstává aktivní i po odeznění Ca^{2+} signálu => paměťové zařízení => CaM-kináza II hraje roli v typech paměti a učení v nervovém systému.



Čich a vidění závisí na GPCR, které regulují iontové kanály.

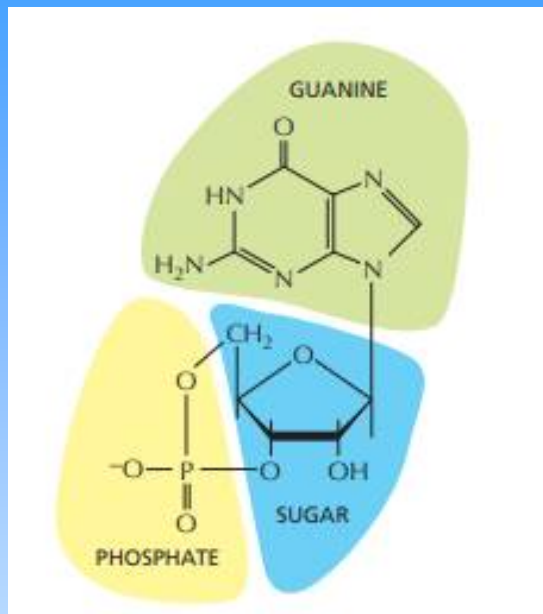
Lidé dokáží rozlišit více než 10 000 různých pachů, které detekují pomocí specializovaných neuronových čichových receptorů ve sliznici nosu. Tyto buňky používají k rozpoznání pachů specifické GPCR zvané **čichové receptory**. Receptory působí prostřednictvím cAMP.



Receptor stimulován vazbou pachu => aktivace čichově specifického G proteinu => aktivace adenylycyklázy => akumulace cAMP => proud Na^+ => depolarizace neuronu čichového receptoru => nervový impuls do mozku

Člověk – 350 různých čichových receptorů, každý kódován jiným genem a každý rozpoznává jinou sadu vonných látek; lidé postrádají funkční feromonové receptory; myš – 1000 čichových receptorů

Vidění obratlovců využívá podobně propracovaný, vysoce citlivý proces detekce signálu. Rozhodujícím cyklickým nukleotidem je **cyklický guanosinmonofosfát (cGMP)**.

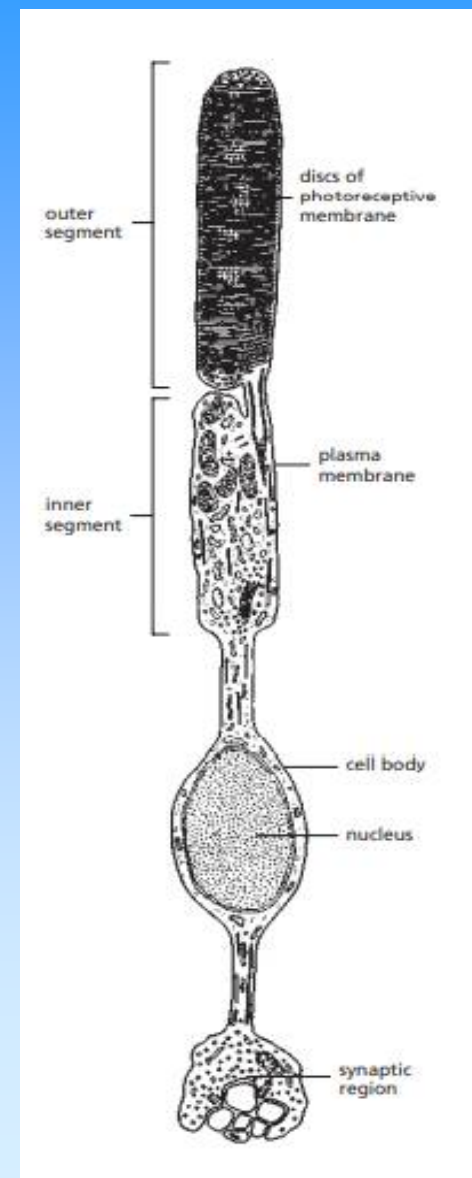


Zrakové transdukční reakce – nejrychlejší reakce zprostředkované G-proteinem známé u obratlovců; způsobeny aktivací receptoru vlivem světla => pokles hladiny cGMP (opak od čichu); dobře známo u **tyčinkových fotoreceptorů (tyčinek)** v sítnici obratlovců

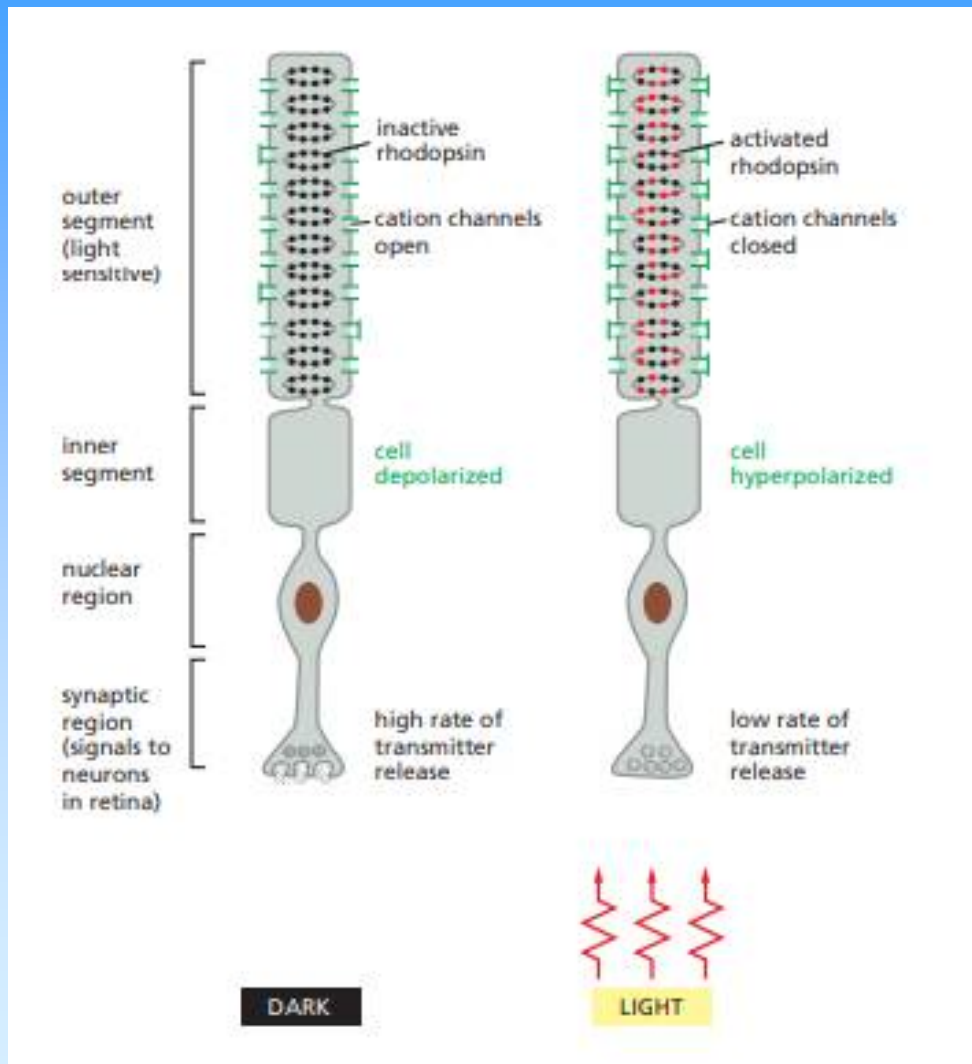
Syntéza cGMP – enzymem **guanylylcyklázou (guanylcykláza, guanylátcykláza)**

Degradace cGMP – enzymem **cGMP fosfodiesterázou**

Tyčinka – zodpovědná za nebarevné vidění v šeru; synaptická oblast tyčinky předává chemický signál nervové buňce sítnice => přenos signálu do jiné nervové buňky sítnice => přenos do mozku



Fototransdukční aparát – ve vnějším segmentu tyčinky; obsahuje stoh disků - každý je tvořen uzavřeným membránovým vakem, naplněným fotosenzitivními molekulami **rodopsinu**.



Rodopsin patří do rodiny GPCR, ale aktivačním signálem není molekula, ale foton.

Molekula rodopsinu obsahuje kovalentně připojený **chromofor – 11-cis retinal**.

Plazmatická membrána obklopující vnější segment obsahuje kationtové kanály řízené **cGMP**.

Tma – cGMP udržuje kationtové kanály otevřené => depolarizace PM

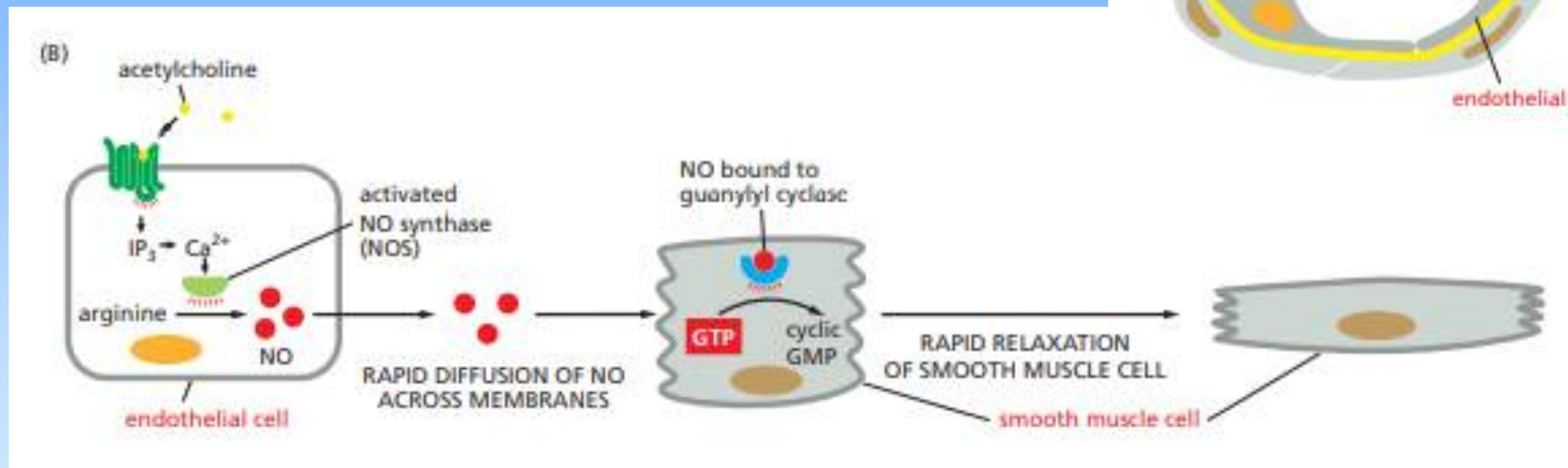
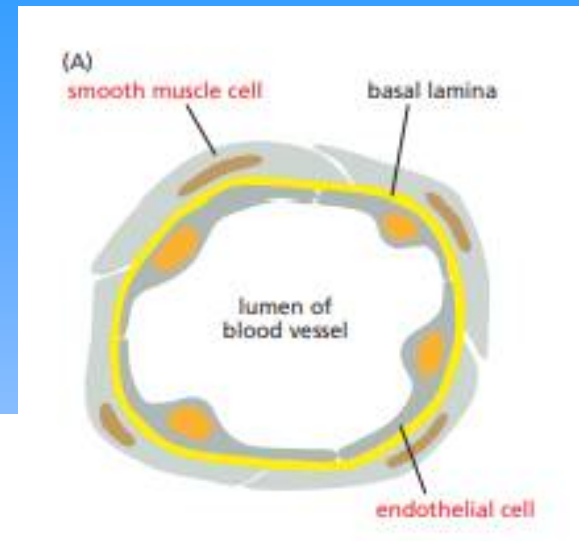
Světlo – aktivace molekuly rodopsinu => snížení množství cGMP => uzavření kationtových kanálů => hyperpolarizace PM

Oxid dusnatý je plynný signalizační mediátor, který prochází mezi buňkami.

36

Oxid dusnatý (NO) – hydrofobní, dostatečně malá molekula => snadno prochází plazmatickou membránou a přenáší signály do blízkých buněk; signální molekula v mnoha tkáních živočichů i rostlin.

Savci – funkce NO – uvolnění hladkého svalstva ve stěnách krevních cév.



Neurotransmitter acetylcholin stimuluje syntézu NO aktivací GPCR na membránách endotelových buněk, které lemují vnitřek cévy. Aktivace GPCR => syntéza IP_3 a uvolňování Ca^{2+} => stimulace NO syntázy => syntéza NO. NO snadno prochází membránami => difunduje ven z buňky a po té do sousedních buněk hladkého svalstva => způsobuje svalovou relaxaci a tím dilataci cév. NO působí pouze lokálně – v extracelulárním prostoru má krátký poločas rozpadu (asi 5–10 sekund), pak jej O_2 a H_2O přemění na dusičnany a dusitany.

Zesílení signálu pomocí druhých posílů a enzymatických kaskád.

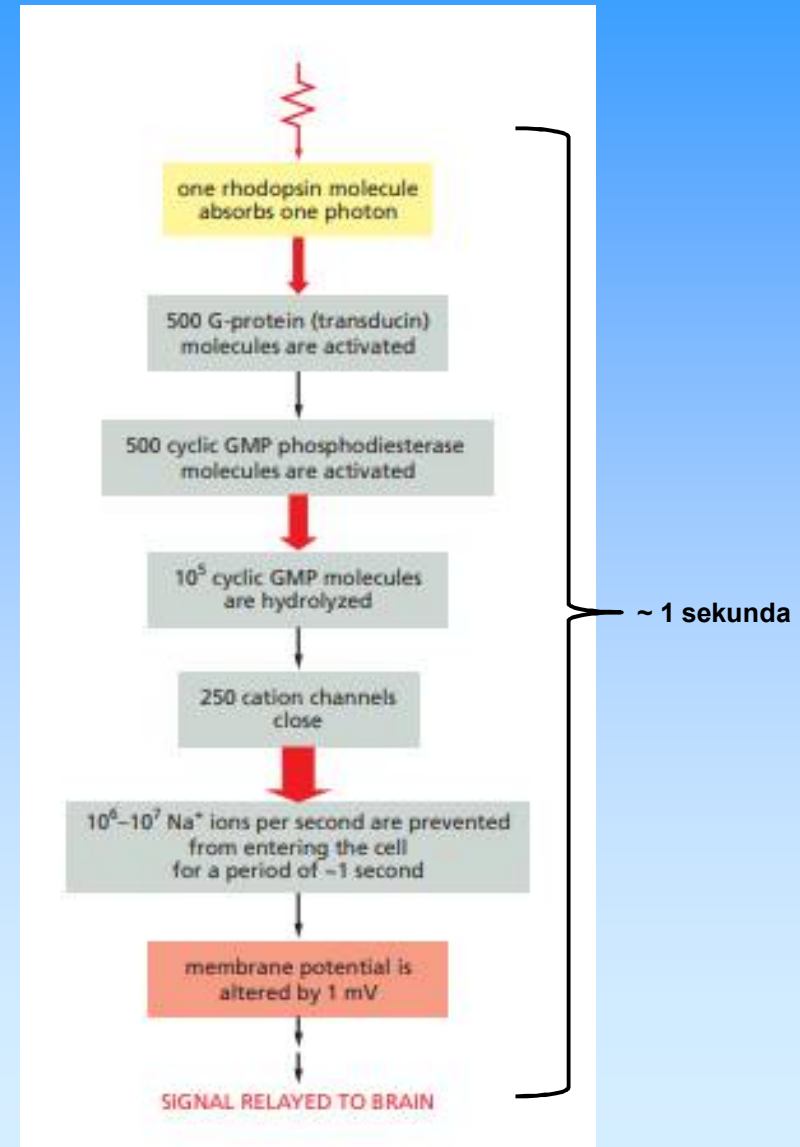
I když intracelulární signální kaskády se liší v molekulárních detailech, sdílejí určité rysy a řídí **se podobnými obecnými principy**. Závisí to na přenosových řetězcích intracelulárních signálních proteinů a druhých poslech. Tyto přenosové řetězce obecně zesilují reakce na extracelulární signály.

Případ zrakové transdukční reakce

Každá taková zesilující kaskáda stimulačních signálů vyžaduje vyvažovací mechanismy v každém kroku kaskády, aby se systém vrátil do klidového stavu, když stimulace ustane - **reakce na stimulaci může být rychlá pouze tehdy, jsou-li rychlé i inaktivační mechanismy**.

Buňky mají účinné mechanismy pro:

- rychlou degradaci (a resyntézu) cyklických nukleotidů
- pufrování cytozolického Ca^{2+}
- inaktivaci odpovídajících enzymů a iontových kanálů



Signalizace prostřednictvím enzymových receptorů

Receptory spojené s enzymem – transmembránové proteiny obsahující doménu vázající ligand na vnějším povrchu plazmatické membrány.

Cytoplazmatická doména: - vnitřní enzymatická aktivita
 nebo
 - asociuje se přímo s enzymem

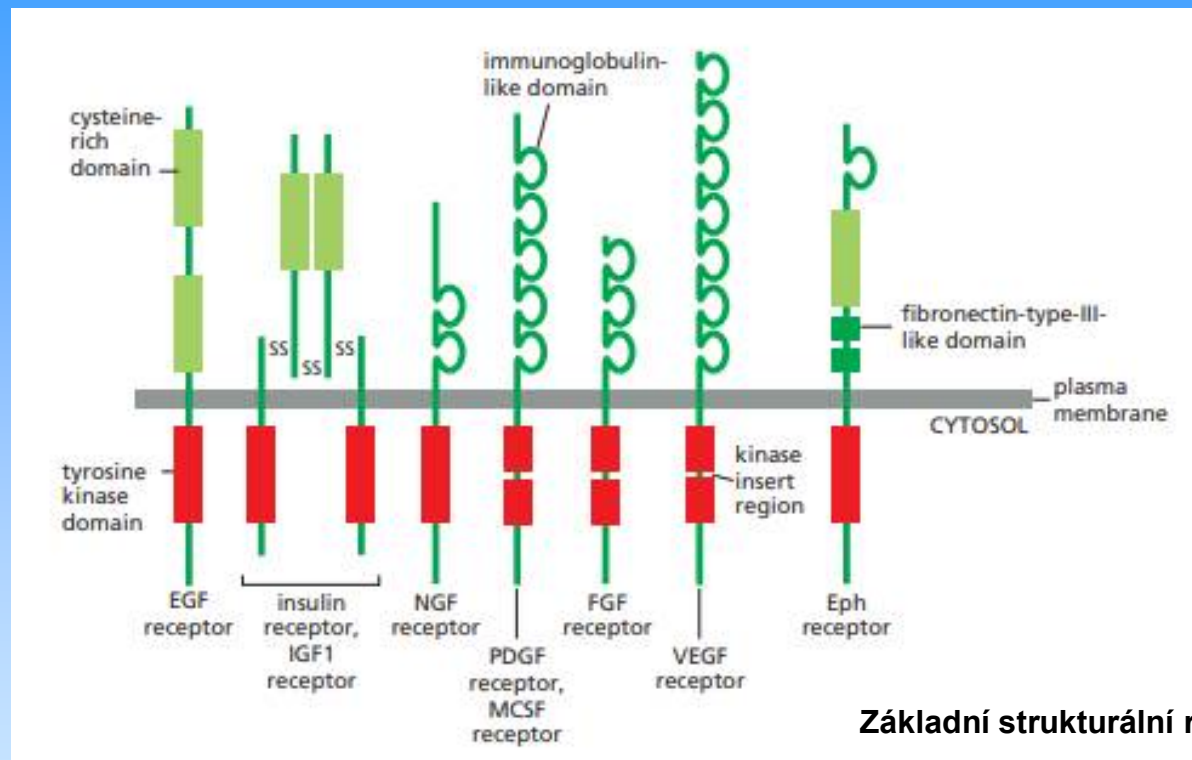
Každá podjednotka receptoru spráženého s enzymem má typicky pouze jeden transmembránový segment.

Extracelulární signální proteiny (ligandy) působí prostřednictvím **receptorových tyrosinkináz (RTK)**

TABLE 15-4 Some Signal Proteins That Act Via RTKs		
Signal protein family	Receptor family	Some representative responses
Epidermal growth factor (EGF)	EGF receptors	Stimulates cell survival, growth, proliferation, or differentiation of various cell types; acts as inductive signal in development
Insulin	Insulin receptor	Stimulates carbohydrate utilization and protein synthesis
Insulin-like growth factor (IGF1)	IGF receptor-1	Stimulates cell growth and survival in many cell types
Nerve growth factor (NGF)	Trk receptors	Stimulates survival and growth of some neurons
Platelet-derived growth factor (PDGF)	PDGF receptors	Stimulates survival, growth, proliferation, and migration of various cell types
Macrophage-colony-stimulating factor (MCSF)	MCSF receptor	Stimulates monocyte/macrophage proliferation and differentiation
Fibroblast growth factor (FGF)	FGF receptors	Stimulates proliferation of various cell types; inhibits differentiation of some precursor cells; acts as inductive signal in development
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	VEGF receptors	Stimulates angiogenesis
Ephrin	Eph receptors	Stimulates angiogenesis; guides cell and axon migration

Signální proteiny působící prostřednictvím RTK:

Receptorové tyrosinkinázy u lidí – 60 receptorů klasifikovaných do 20 skupin z nichž každá má svoje komplementární proteinové ligandy.

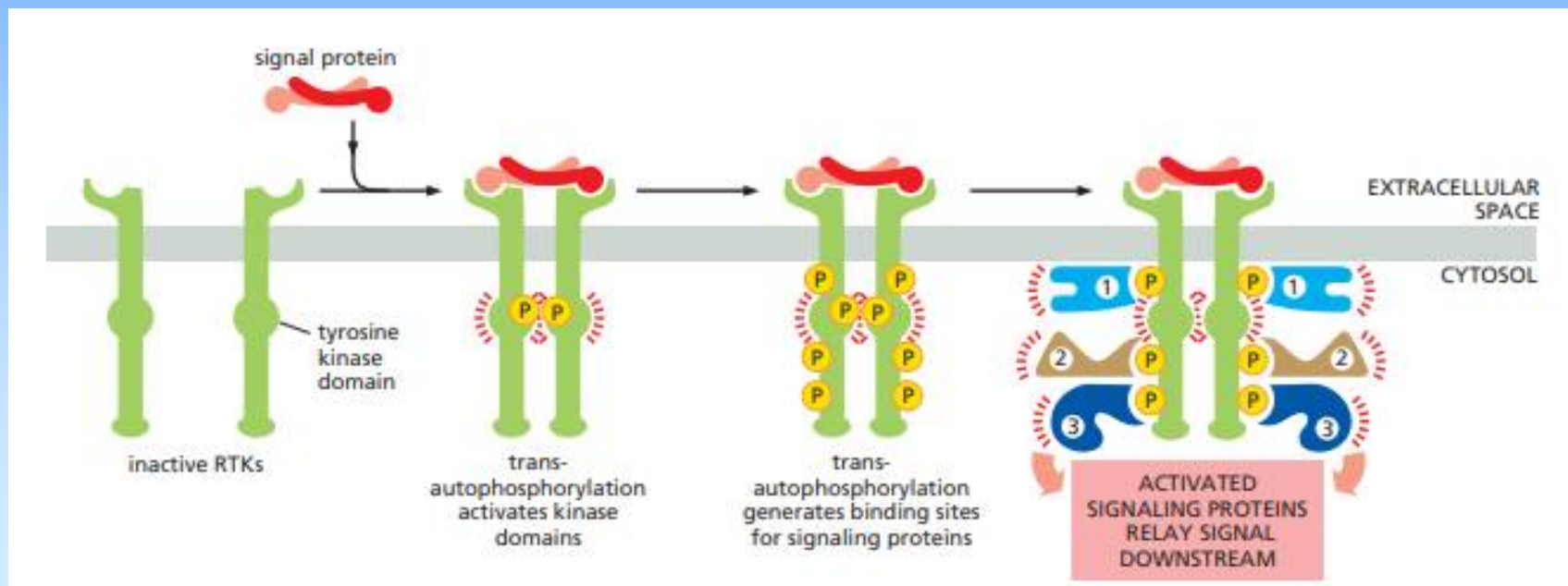


Navázání signálního proteinu k doméně na extracelulární straně receptoru => aktivace tyrosinkinázové domény v cytozolu => fosforylace tyrosinových postranních řetězců => vytvoření fosfotyrosinových dokovacích míst pro intracelulární signální molekuly => přenos signálu

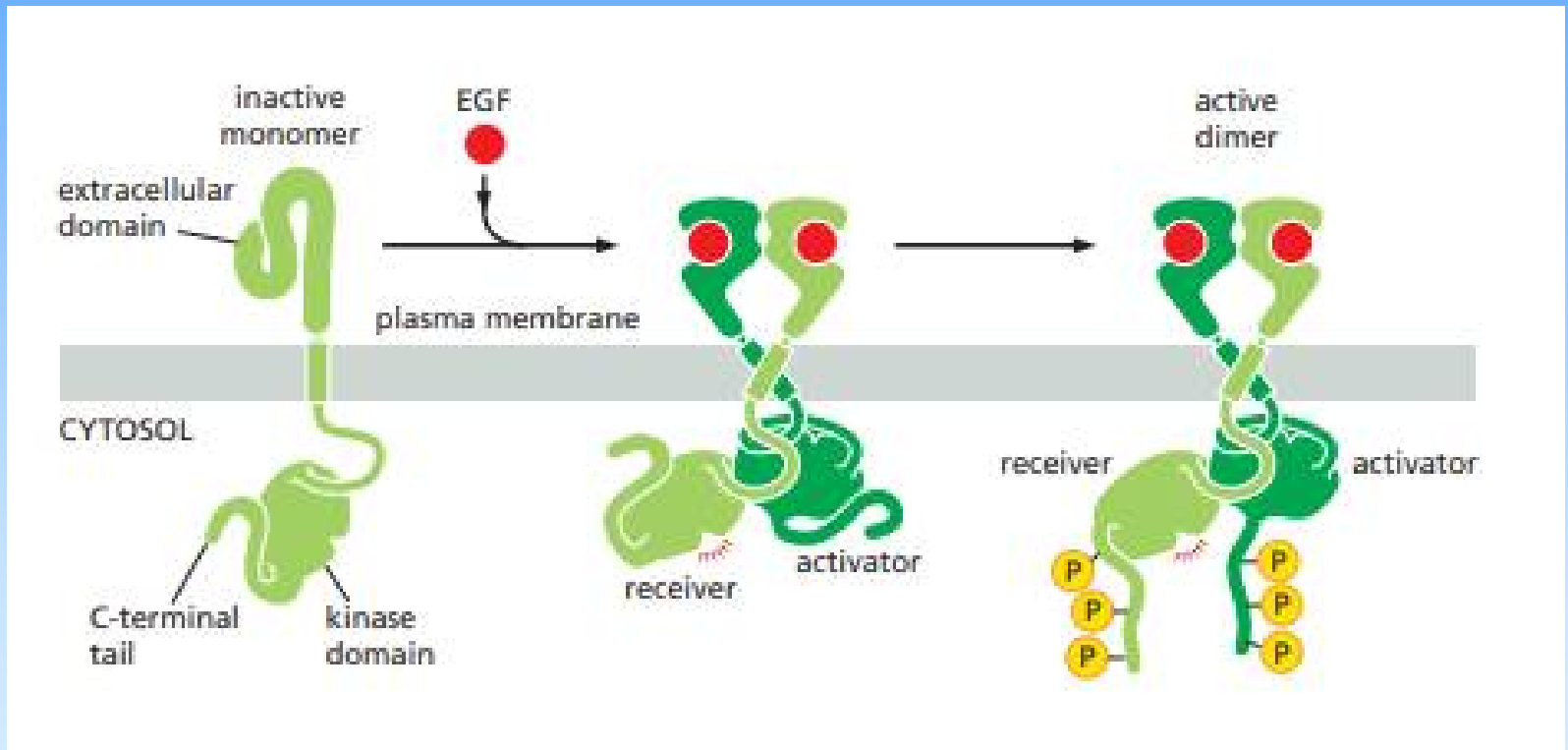
Aktivace kinázové domény

Vazba ligandu => dimerizace receptorů => podpoření aktivace – dva způsoby:

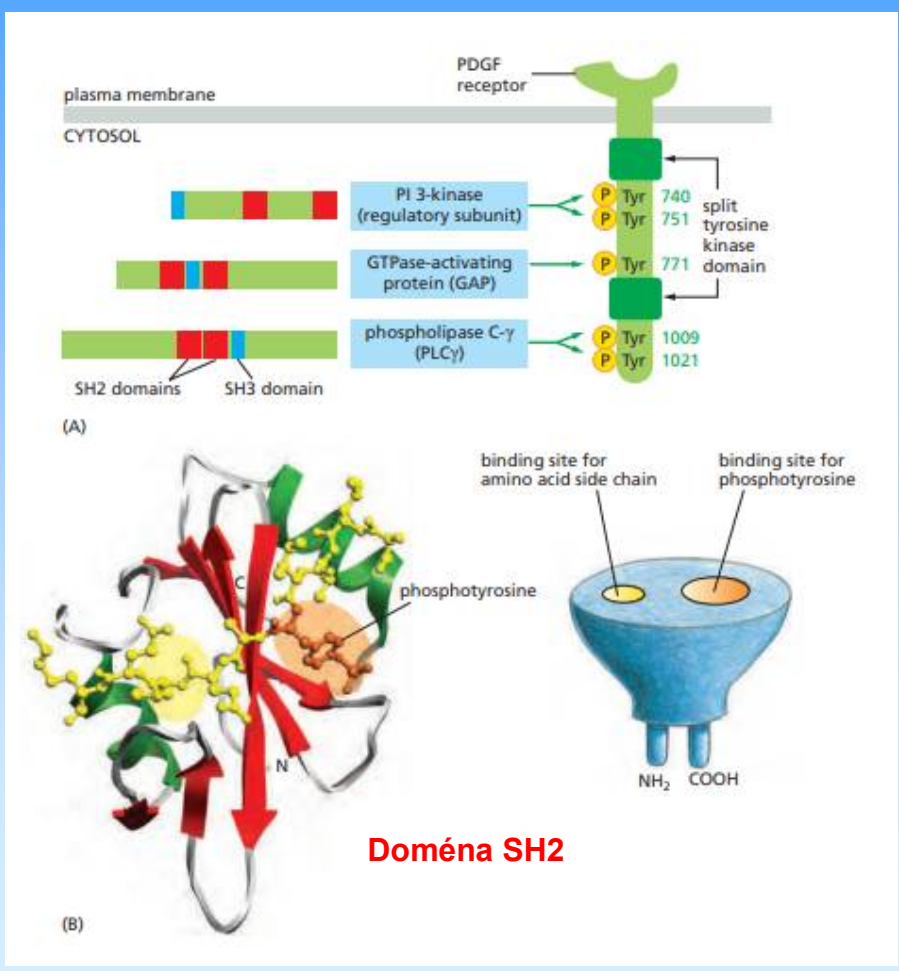
1) Přiblížení kinázových domén blízko k sobě => možnost se vzájemně **fosforylovat na specifických tyrosinech** v aktivních místech kinázy (př. inzulínový receptor)



2) Kináza je aktivovaná konformačními změnami způsobenými interakcemi mezi dvěma kinázovými doménami mimo jejich aktivní místa (př. epidermální růstový faktor, EGF)



Fosforylované tyrosiny na RTK slouží jako dokovací místa pro intracelulární signální proteiny.



Fosforylace kinázové domény RTK



Vznik vysoce afinitních dokovacích míst pro intracelulární signální proteiny.



Vazba signálního proteinu na fosforylované místo RTK doménou specifickou pro vazbu k fosfotyrosinu.



Fosforylace signálního proteinu = aktivace

Na fosfotyrosiny na aktivovaných RTK se váží např. proteiny PI-3, GAP či fosfolipáza γ s doménami SH2, SH3 či PTB.

GTPázy Ras zprostředkovávají signalizaci od RTK.

Proteiny rodiny **Ras** a **Rho** (řadí se mezi GTPázy) – přenášejí signály z receptorů buněčného povrchu = od RTK

Proteiny **Ras** obsahují jednu nebo více kovalentně připojených lipidových skupin, které pomáhají ukotvit protein k cytoplazmatické straně PM, odkud přenáší signály do jiných částí buňky.

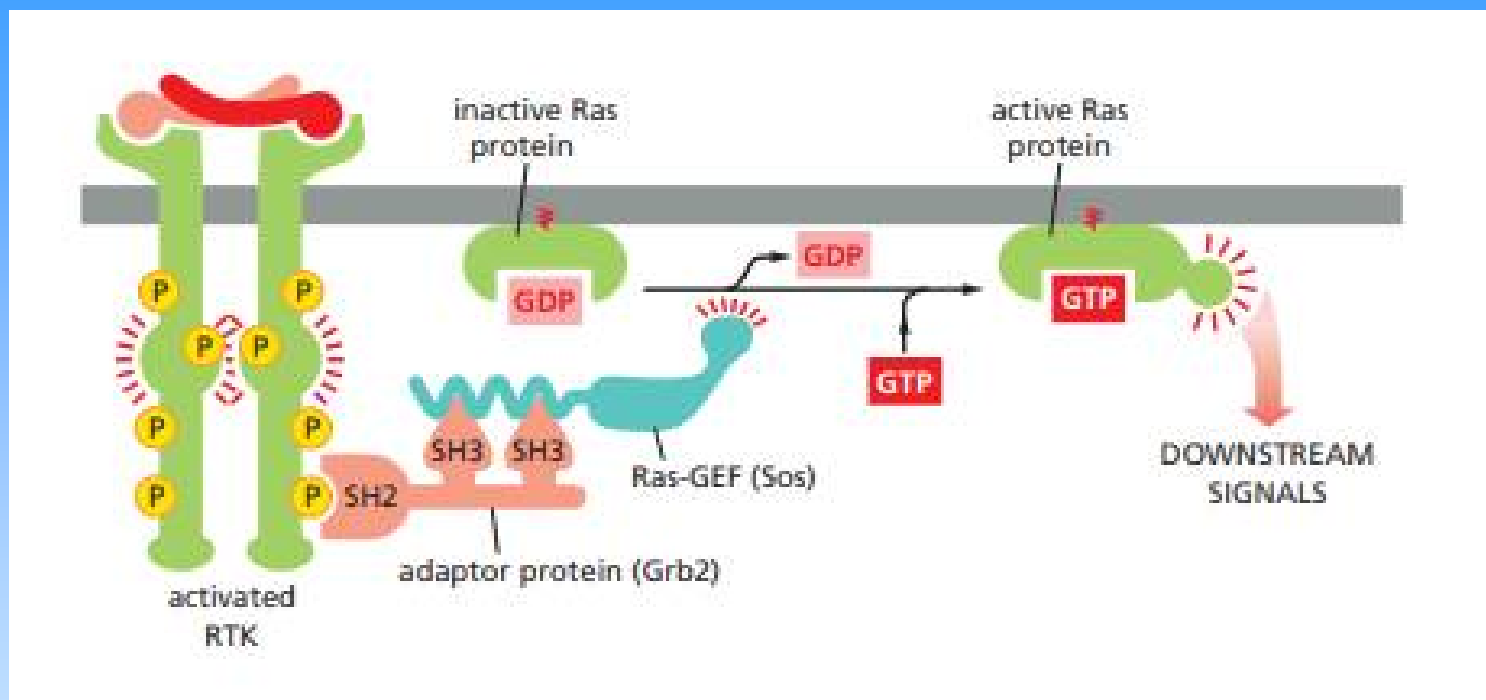
TABLE 15-5 The Ras Superfamily of Monomeric GTPases

Family	Some family members	Some functions
Ras	H-Ras, K-Ras, N-Ras	Relay signals from RTKs
	Rheb	Activates mTOR to stimulate cell growth
	Rap1	Activated by a cyclic-AMP-dependent GEF; influences cell adhesion by activating integrins
Rho*	Rho, Rac, Cdc42	Relay signals from surface receptors to the cytoskeleton and elsewhere
ARF*	ARF1-ARF6	Regulate assembly of protein coats on intracellular vesicles
Rab*	Rab1-60	Regulate intracellular vesicle traffic
Ran*	Ran	Regulates mitotic spindle assembly and nuclear transport of RNAs and proteins

*The Rho family is discussed in Chapter 16, the ARF and Rab proteins in Chapter 13, and Ran in Chapters 12 and 17. The three-dimensional structure of Ras is shown in Figure 3-67.

Monomerní GTPázy rodiny **Rho** regulují aktin, cytoskelet mikrotubulů, řídí tvar buněk, polaritu, pohyblivost a adhezi; regulují buněčný cyklus, genovou transkripci a membránový transport, regulují růst axonů. Členové rodiny Rho proteinů: **Rho, Rac, Cdc42**

Ras funguje jako molekulární přepínač = cykluje mezi dvěma odlišnými konformačními stavy: **aktivní** = vázán GTP, **neaktivní** = vázán GDP



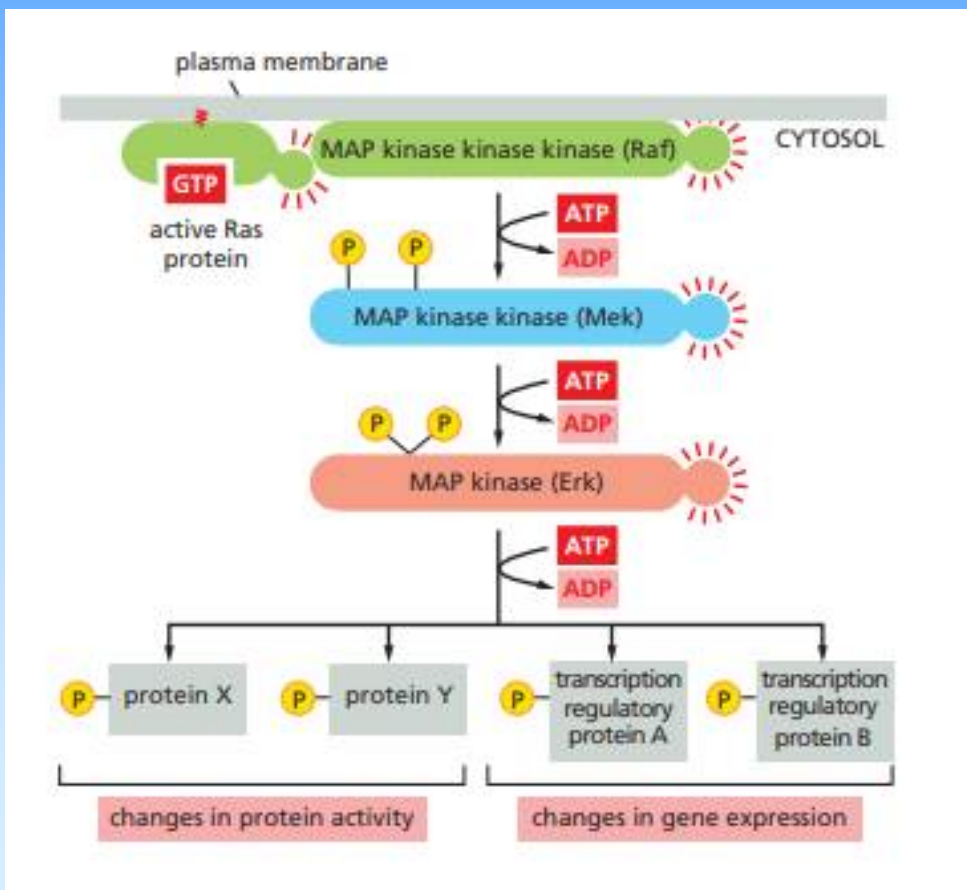
Ras-GEF (Ras guanin) – stimuluje disociaci GDP => vychytávání GTP z cytozolu => aktivace Ras

Protein Grb2 (adaptorový protein) – spojuje receptor s proteinem Ras-GEF

System objevený genetickými studiemi vývoje oka Drosophily a později objeven i u savců => **konzervovaný mechanismus v signalizaci RTK**

Ras aktivuje signální modul **MAP kinázy**

Fosforylace tyrosinu i aktivace Ras spouštěné aktivovanými RTK jsou **krátkodobé**. Aby se buňky stimulovaly k proliferaci nebo diferenciaci, musí být tyto krátkodobé signální události převedeny na déle trvající, které mohou udržet signál a přenést jej do jádra, aby došlo ke změně genové exprese.



Klíčový mechanismus = systém proteinů nazývaný **mitogenem aktivovaný protein-kinázový modul (MAP kinase module)**

3 komponenty systému zachované během evoluce:

1) **MAP kináza kináza kináza (MAPKKK; Raf)**: fosforyluje => aktivuje MAPKK

2) **MAP kináza kináza (MAPKK; Mek)** – fosforyluje => aktivuje MAPK

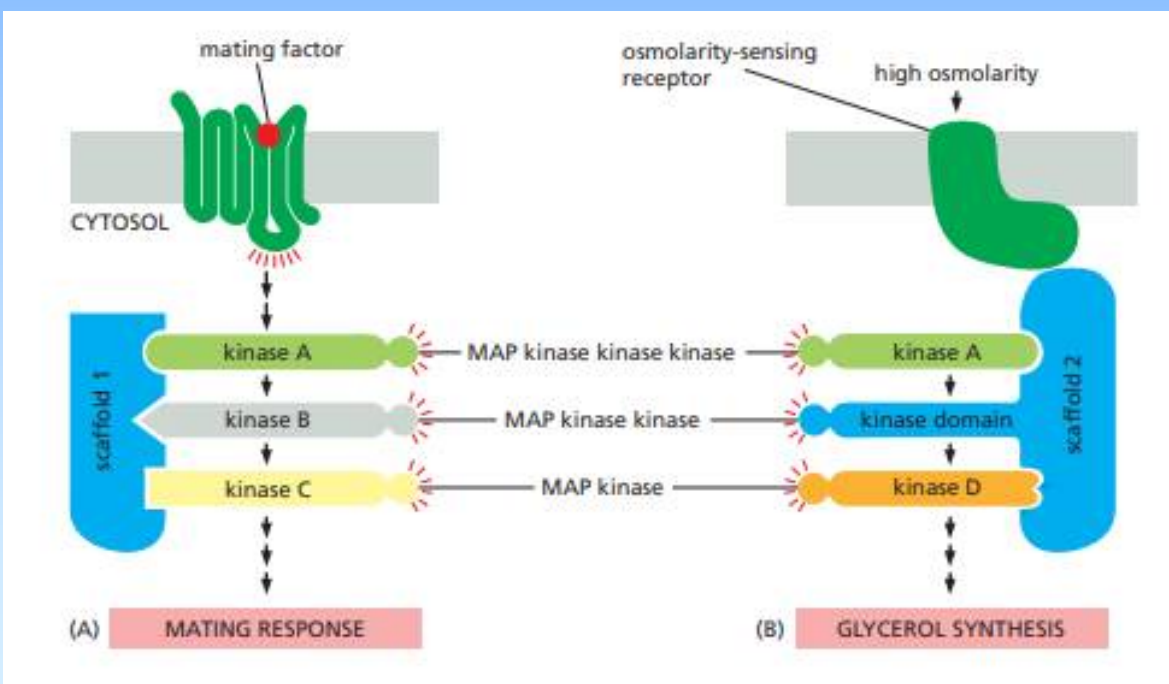
3) **MAP kináza (MAPK; Erk)** – přenáší signál = fosforyluje další proteiny v buňce

Specificitu odpovědí zajišťují skafoldové proteiny.

Tříšložkové signální moduly kinázy MAP fungují ve všech eukaryotických buňkách – různé moduly zprostředkovávají různé odpovědi ve stejné buňce.

Příklad: U pučících kvasinek jeden takový modul zprostředkovává odpověď na pářicí feromony, další odpověď na hladovění a další odpověď na osmotický šok.

Některé z MAK kinázových modulů používají jednu nebo více stejných kináz. **Jak je zajištěno, že stejná kináza dokáže aktivovat různé efektorové proteiny a vyhne se interakcím?**



Skafoldové proteiny – váží se na ně všechny nebo některé kinázy v každém modulu kinázy MAP => komplex => zajištění specificity.

Scaffold = řešení

Cytokinové receptory aktivují signální dráhu JAK–STAT.

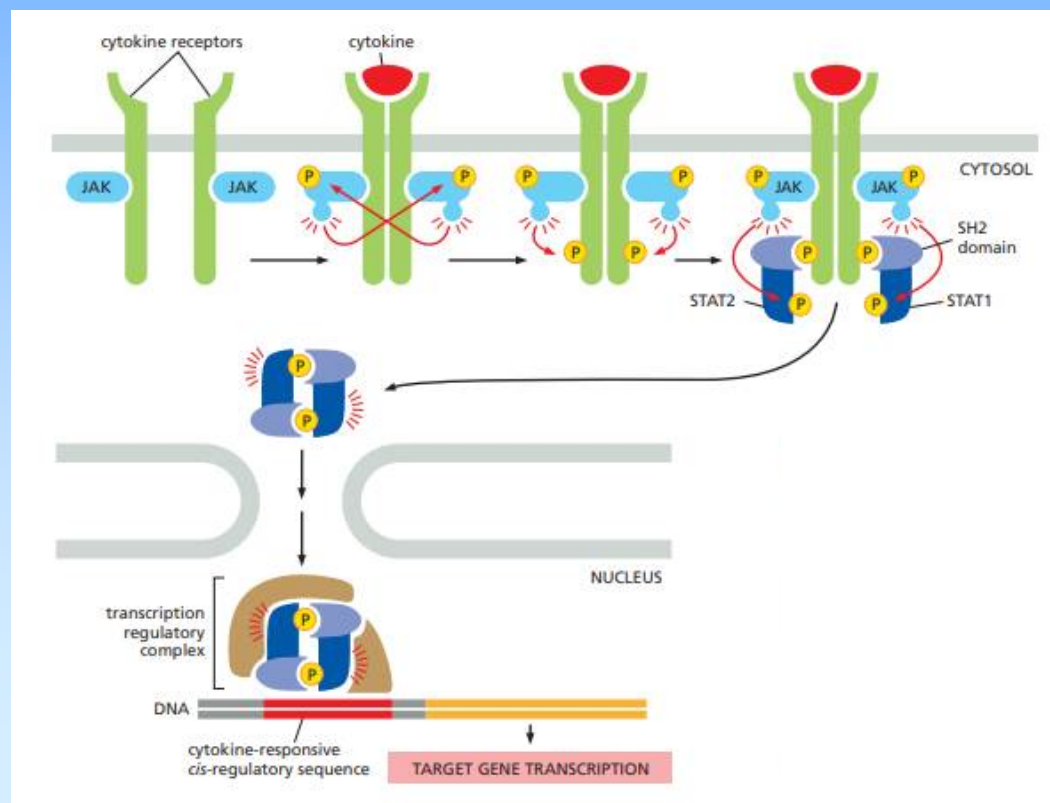
Cytokinové receptory – receptory pro mnoho druhů lokálních mediátorů (cytokinů) a receptory pro některé hormony (růstový hormon a prolaktin); spojeny s tyrosin kinázou Janus kináza (JAK); JAK fosforylují a aktivují regulátory transkripce **STAT** (STAT migrují do jádra až po té, co jsou aktivovány).

Vazba cytokinů => změna uspořádání = dvě JAK v těsné blízkosti => navzájem se fosforylují => fosforylace tyrosinů na cytoplazmatických koncích cytokinových receptorů => vznik fosfotyrosinových dokovacích míst pro STAT

STAT proteiny obsahují doménu **SH2**
– **dvě funkce**:

- zprostředkuje vazbu STAT na dokovací místo na receptoru
- zprostředkuje vznik homodimeru STAT

STAT je transportován do jádra => spojení s dalšími regulačními proteiny => vazba na cis-regulační DNA sekvenci terčových genů => spuštění transkripce



Cytokiny a hormony aktivující JAK-STAT vazbou na cytokinové receptory:

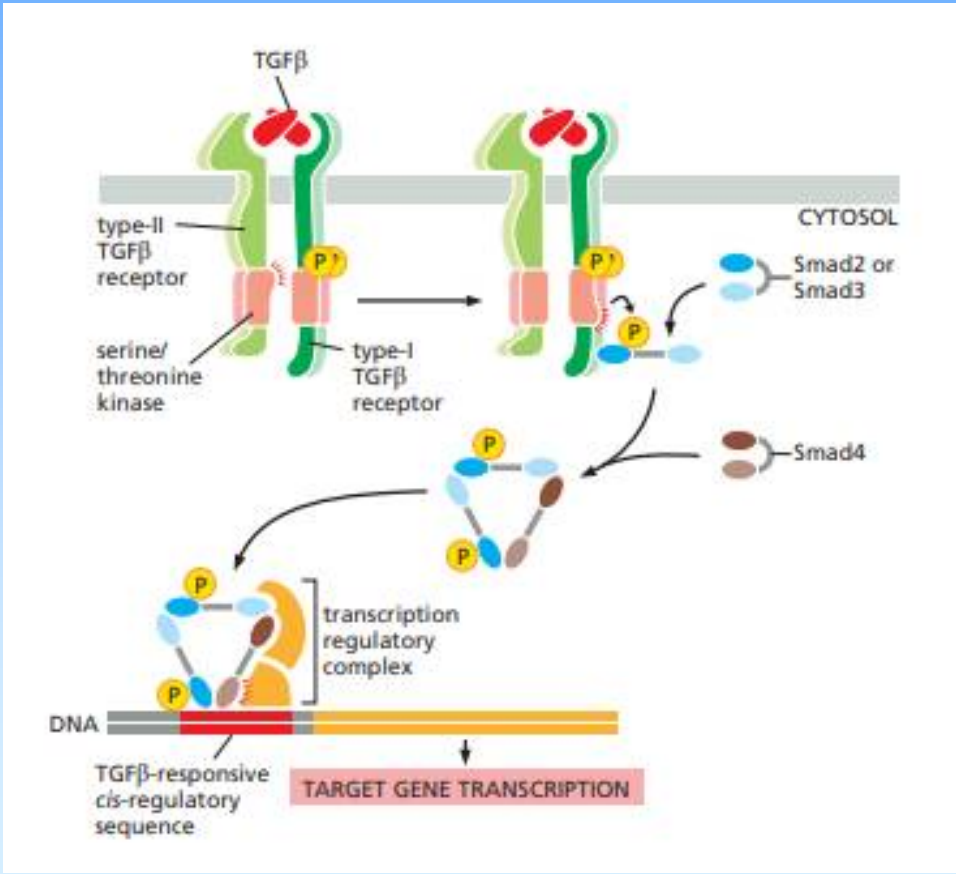
TABLE 15-6 Some Extracellular Signal Proteins That Act Through Cytokine Receptors and the JAK-STAT Signaling Pathway

Signal protein	Receptor-associated JAKs	STATs activated	Some responses
Interferon- γ (IFN γ)	JAK1 and JAK2	STAT1	Activates macrophages
Interferon- α (IFN α)	Tyk2 and JAK2	STAT1 and STAT2	Increases cell resistance to viral infection
Erythropoietin	JAK2	STAT5	Stimulates production of erythrocytes
Prolactin	JAK1 and JAK2	STAT5	Stimulates milk production
Growth hormone	JAK2	STAT1 and STAT5	Stimulates growth by inducing IGF1 production
Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)	JAK2	STAT5	Stimulates production of granulocytes and macrophages

Člověk má asi 30 cytokinů a hormonů, které aktivují JAK-STAT signalizaci.

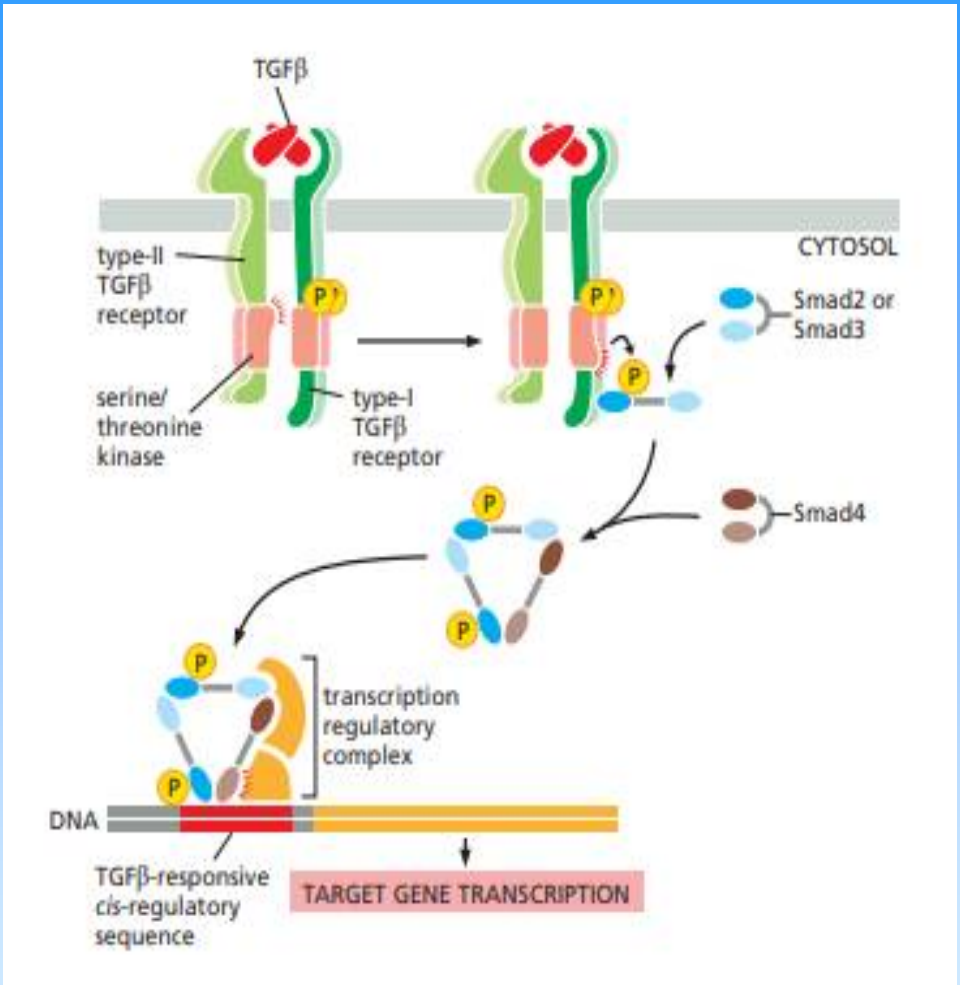
Signální proteiny superrodiny TGF β působí prostřednictvím receptorových serin/threonin kináz a Smads.

Superrodina **transformujícího růstového faktoru β (TGF β)** – velký počet strukturně příbuzných, sekretovaných dimerních proteinů (33 u lidí); fungují jako hormony, nebo jako lokální mediátory regulace řady biologických funkcí u živočichů; ovlivňují proliferaci, specifikaci a diferenciaci buněk a buněčnou smrt; **2 typy proteinů:** TGF β/aktiviny a kostní morfogenetické proteiny (BMP)



Tyto proteiny působí prostřednictvím receptorů spřažených s enzymem = transmembránové **proteiny se serin/threonin kinázovou doménou** na cytosolické straně plazmatické membrány.

Receptorové serin/threonin kinázy: **typ I** a **typ II** – strukturně podobné homodimery; každý člen proteinů TGF β se váže na charakteristickou kombinaci dimerů receptoru typu I a typu II => spojení kinázových domén dohromady => receptor typu II může fosforylovat a aktivovat receptor typu I => tvorba aktivního tetramerního receptorového komplexu.



Smad – pojmenovaný podle prvních dvou identifikovaných proteinů, **Sma** u *C. elegans* a **Mad** u *Drosophila*.

Aktivace receptorového komplexu vlivem TGF β

Fosforylace transkripčního regulátoru rodiny **Smad** (Smad2 nebo Smad3)

Disociace Smad z receptoru

Vazba na Smad4

Translokace komplexu Smad do jádra

Spojení s dalšími regulátory transkripce

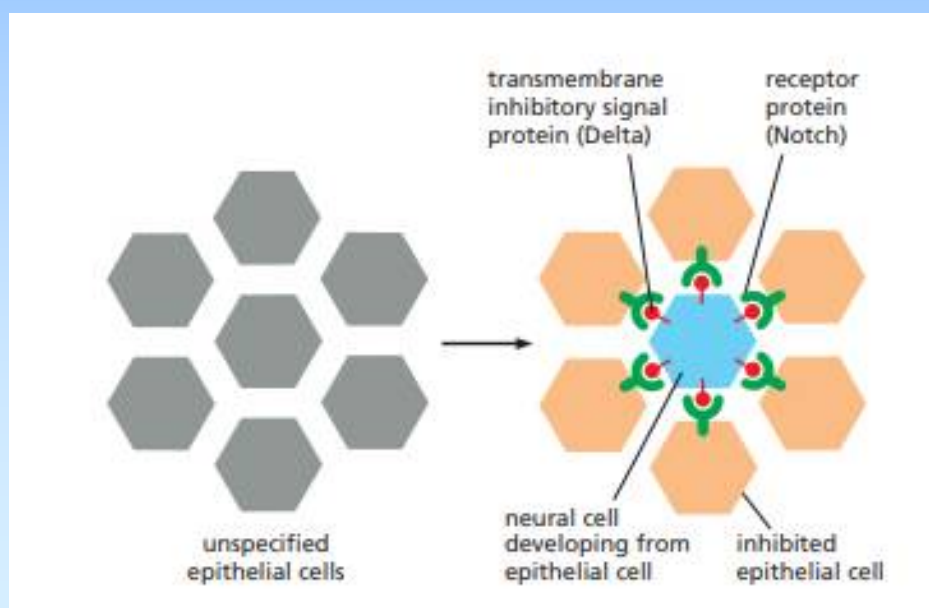
Regulace transkripce specifických cílových genů

Alternativní signální dráhy v genové regulaci

Signalizace prostřednictvím receptorového proteinu **Notch**

Široce uplatňovaná ve vývoji živočichů – např. **produkce nervových buněk u Drosophily**.

Nervové buňky obvykle vznikají jako izolované jednotlivé buňky v epitelovém listu prekursorových buněk. Když se prekursorová buňka rozhodne k diferenciaci na nervovou buňkou, dává svým bezprostředním sousedům signál, aby nedělaly totéž; místo toho se inhibované buňky vyvinou v epidermální buňky. Proces se nazývá **laterální inhibice** - závisí na signálním mechanismu aktivovaném transmembránovým signálním proteinem zvaným **Delta**.



Delta se naváže na **receptorový protein Notch** => signál sousední buňce, aby se nestala nervovou.

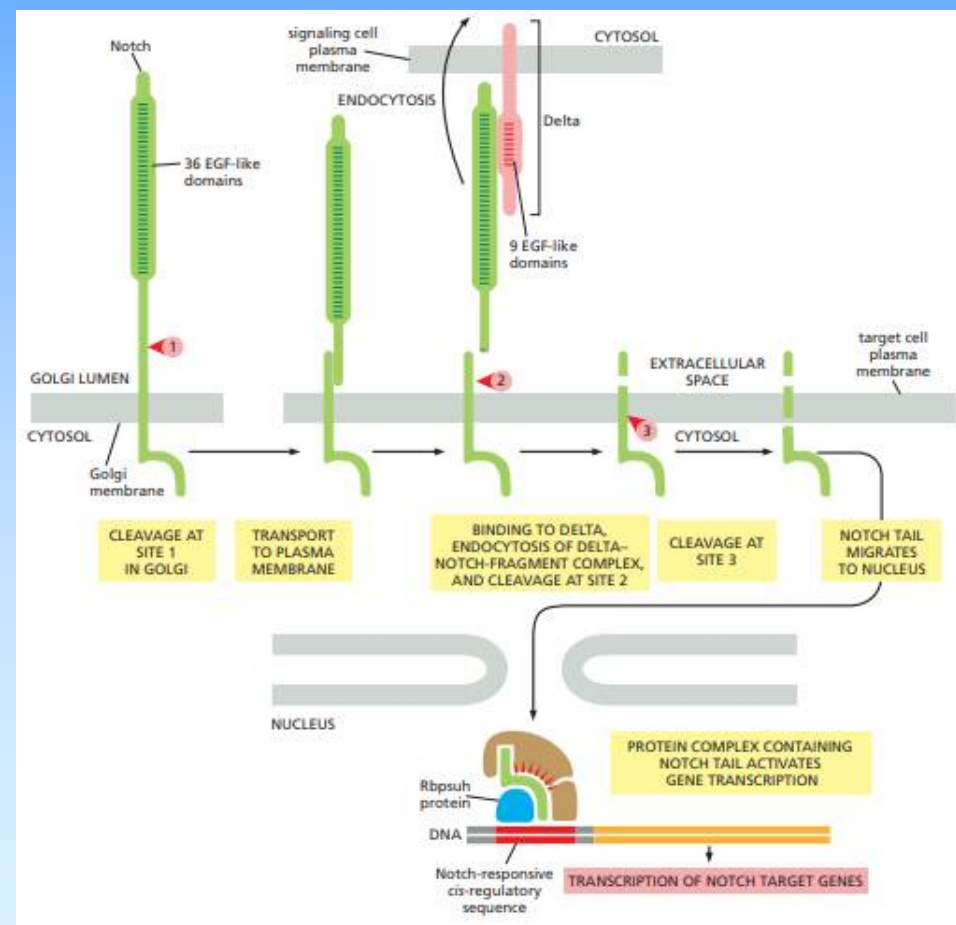
Při defektu toho procesu vzniká přebytek nervových buněk => vede ke smrti organismu

Notch – transmembránový protein – aby fungoval, musí být proteolyticky zpracován. První proteolytické štěpení (1) nastává v Golgiho aparátu => vzniká zralý heterodimerický receptor Notch – je vystrčen na povrch buňky.

Při aktivaci vazbou Delta odštěpí proteáza (vázaná na PM) cytoplazmatický konec Notch (2 a 3) a uvolněný konec je translokován do jádra. Uvolněný konec proteinu Notch působí tak, že se váže na protein Rbpsuh, který se váže k DNA => Rbpsuh se stává aktivátorem transkripce => aktivace transkripce sady Notch responsivních genů.

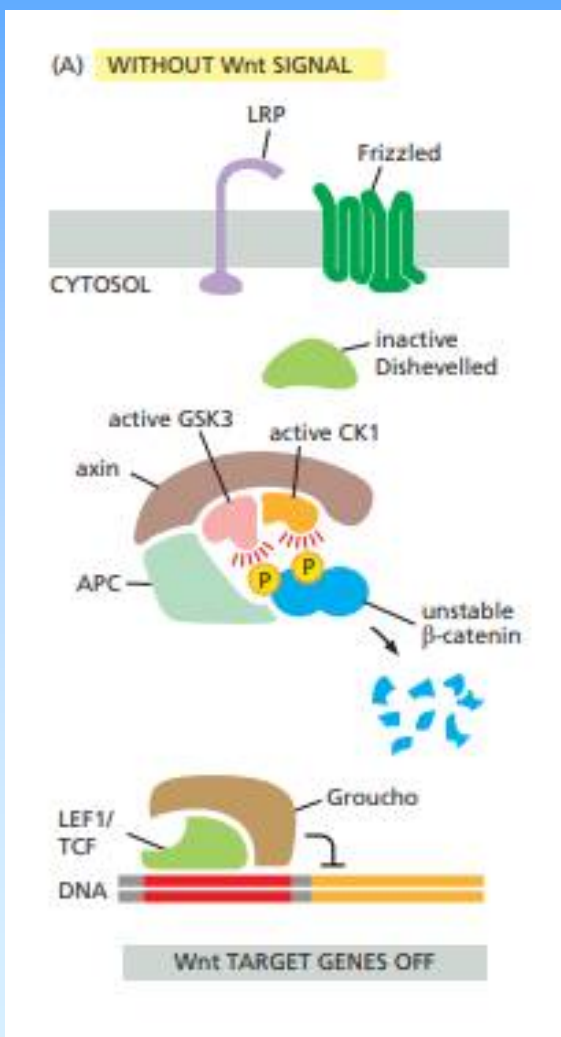
Zajímavost:

Konečné (3.) štěpení konce Notch nastává právě v transmembránovém segmentu a je zprostředkováno proteázovým komplexem zvaným **γ-sekretáza**, který je také zodpovědný za intramembránové štěpení různých jiných proteinů. Jednou z jeho základních podjednotek je **presenilin**, nazývaný proto, že **mutace** v genu, který jej kóduje, jsou častou **příčinou časného nástupu familiární Alzheimerovy choroby** (forma presenilní demence). Proteázový komplex přispívá k této a dalším formám Alzheimerovy choroby generováním extracelulárních peptidových fragmentů z transmembránového neuronového proteinu. Fragменты se hromadí v nadměrném množství a tvoří agregáty špatně složeného proteinu zvaného **amyloidní plaky**, které mohou poranit nervové buňky a přispět k jejich degeneraci a ztrátě.



Signální dráha regulace degradace β -kateninu proteiny **Wnt**

Wnt proteiny (kodované geny Wg-Wingless/Int1) jsou sekretované signální molekuly, které působí jako lokální mediátory a morfogeny pro kontrolu mnoha aspektů vývoje živočichů.



Wnt může aktivovat 2 typy intracelulárních signálních drah:

- dráha **Wnt/ β -kateninu**
- dráha planární polarity

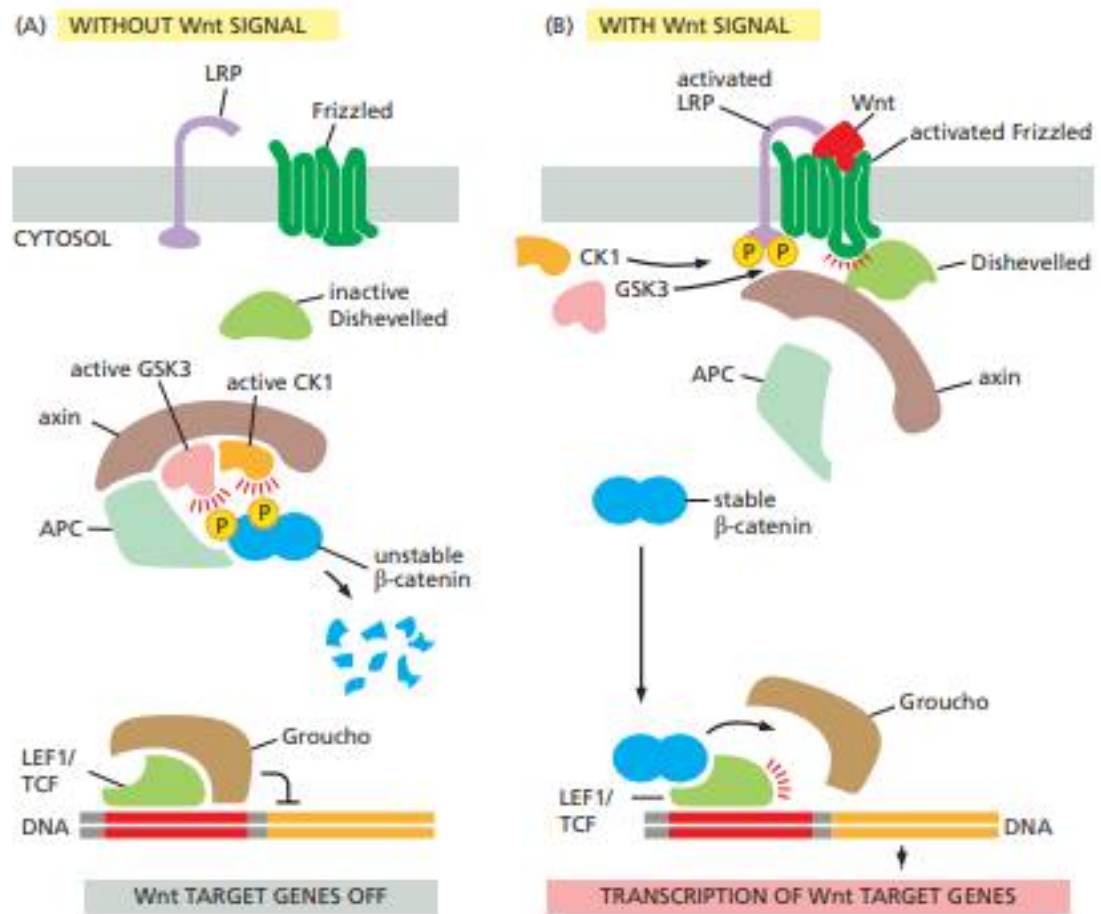
Obě dráhy začínají vazbou Wnt na receptory buněčného povrchu z rodiny **Frizzled** - transmembránové proteiny. Po aktivaci vazbou Wnt získávají Frizzled proteiny skafoldový protein **Dishevelled**, který pomáhá předávat signál dalším signálními molekulám.

Protein **β -katenin** se nachází na spojkách buňka–buňka a přispívá tak ke kontrole adheze buňka–buňka. Zbývající β -katenin je rychle degradován proteolýzou v cytoplazmě.

Degradace závisí na velkém proteinovém degradačním komplexu, který váže β -katenin a udržuje jej mimo jádro, přičemž podporuje jeho degradaci.

Absence Wnt:

Degradační komplex obsahuje proteinkinázu **kaseinkinázu 1 (CK1)** - fosforyluje β -katenin na serinu a připravuje jej pro další fosforylaci proteinkinázou **glykogensyntáza kináza 3 (GSK3)** => ubiquitinace a rychlá degradace **β -kateninu** v proteazomech. Dva skeletové proteiny zvané **axin** a **Adenomatous polyposis coli (APC)** drží proteinový komplex pohromadě. Wnt responsivní geny jsou tedy udržovány v klidu proteinovými faktory **LEF1/TCF** vázanými na protein **Groucho**.



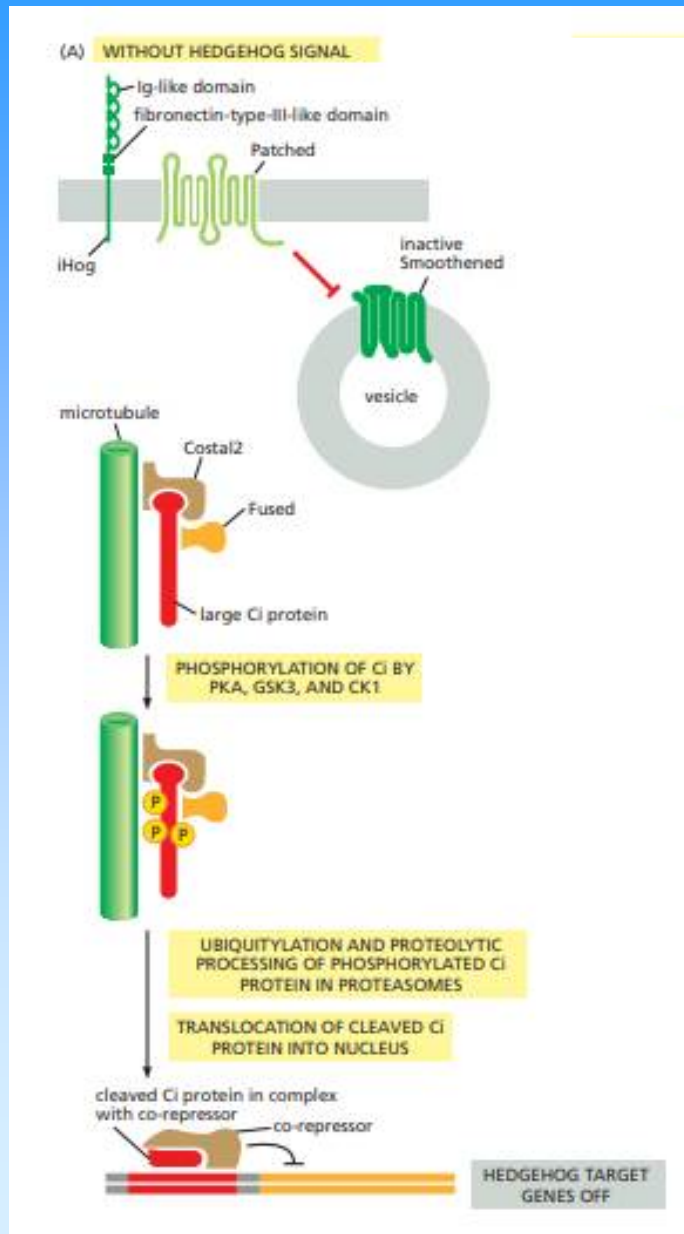
Přítomnost Wnt:

Proteiny **Wnt** se vážou na **Frizzled** protein a na koreceptor **LRP** => aktivovaný receptorový komplex rekrutuje protein **Disheveled** => podporuje fosforylaci **LRP** receptoru proteinkinázami **GSK3** a **CK1**. **Axin** je přiveden do receptorového komplexu a je inaktivován => naruší se komplex degradace β -kateninu v cytoplasmě => akumulace nefosforylovaného β -kateninu => translokace do jádra => **ovlivnění genové transkripce**.

Geny aktivované β -kateninem: Myc - kóduje protein Myc - důležitý regulátor buněčného růstu a proliferace.

Mutace genu Apc se vyskytují u 80 % lidských rakovin tlustého střeva.

Signální dráha regulovaná signální proteiny **Hedgehog**



Hedgehog proteiny působí podobně jako Wnt proteiny = sekretované signální molekuly – působí jako lokální mediátory a morfogeny v mnoha vyvíjejících se tkáních bezobratlých a obratlovců.

Aktivují latentní regulátory transkripce zabráněním jejich degradace => spouštějí přechod z represe transkripce na aktivaci transkripce => nadměrná signalizace v dospělých buňkách může vést k rakovině.

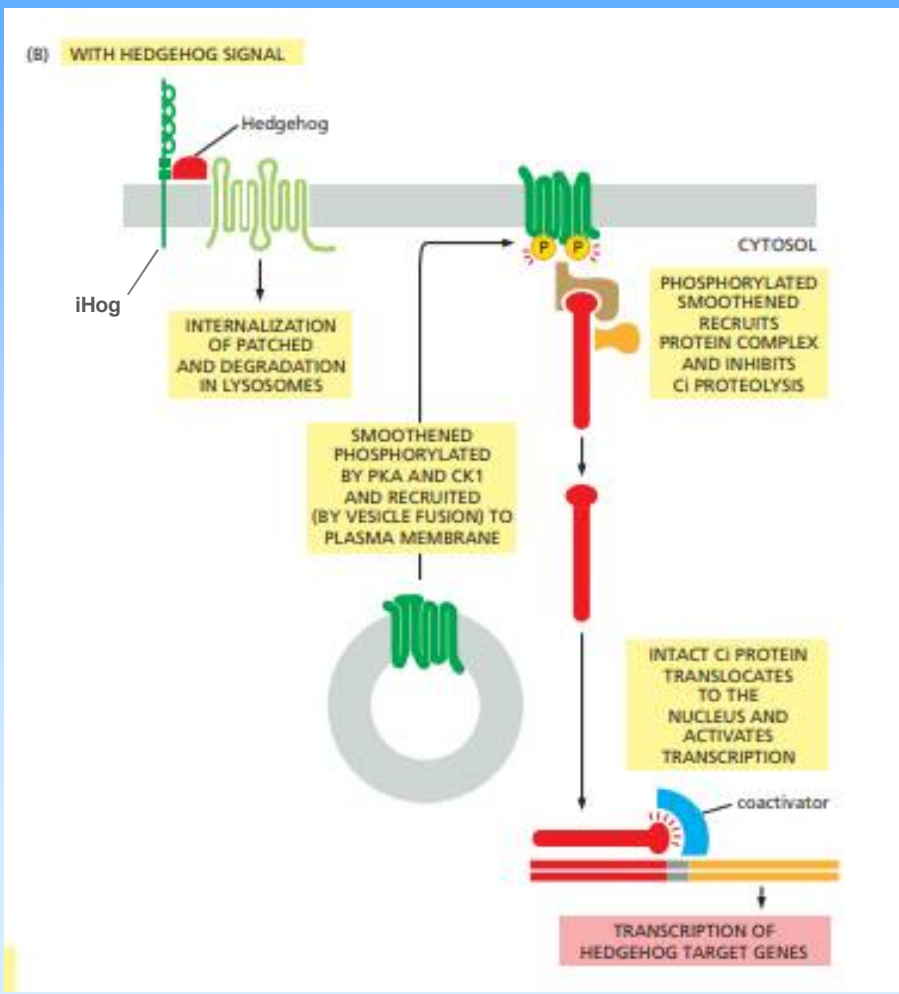
Absence Hedgehog:

Protein **Patched** využívá neznámého mechanismu k udržení proteinu **Smoothened** v intracelulárních vezikulách => velký protein **Ci** (**Cubitus interruptus**, latentní regulátor transkripce) je zpracován => menší fragment Ci, který se hromadí v jádře a působí jako transkripční represor => pomáhá udržet Hedgehog responsivní geny v klidu.

Proteolytické zpracování proteinu Ci závisí na jeho fosforylaci třemi proteinkinázami – **PKA** a dvěma kinázami, které fungují v dráze Wnt, tedy **GSK3** a **CK1**. Probíhá v multiproteinovém komplexu protein kinázy **Fused** a skafoldového proteinu **Costal2**.

Přítomnost Hedgehog:

Hedgehog blokuje proteolytické zpracování Ci => Ci se stává transkripčním aktivátorem. Dělá to prostřednictvím proteinů **Patched**, **iHog** a **Smoothened**. Přestože je velká část proteinu Patched v intracelulárních vezikulách, část se nachází na buněčném povrchu, kde se může vázat na Hedgehog protein. Protein iHog slouží jako koreceptor pro Hedgehog.



Vazba Hedgehog na iHog a Patched



Inhibice aktivity Patched a indukce jeho endocytózy a degradace



Smoothened není inhibován => transport do PM => vazba na proteinový komplex Ci, Fused a Costal2



Costal2 již není schopen vázat další tři kinázy.



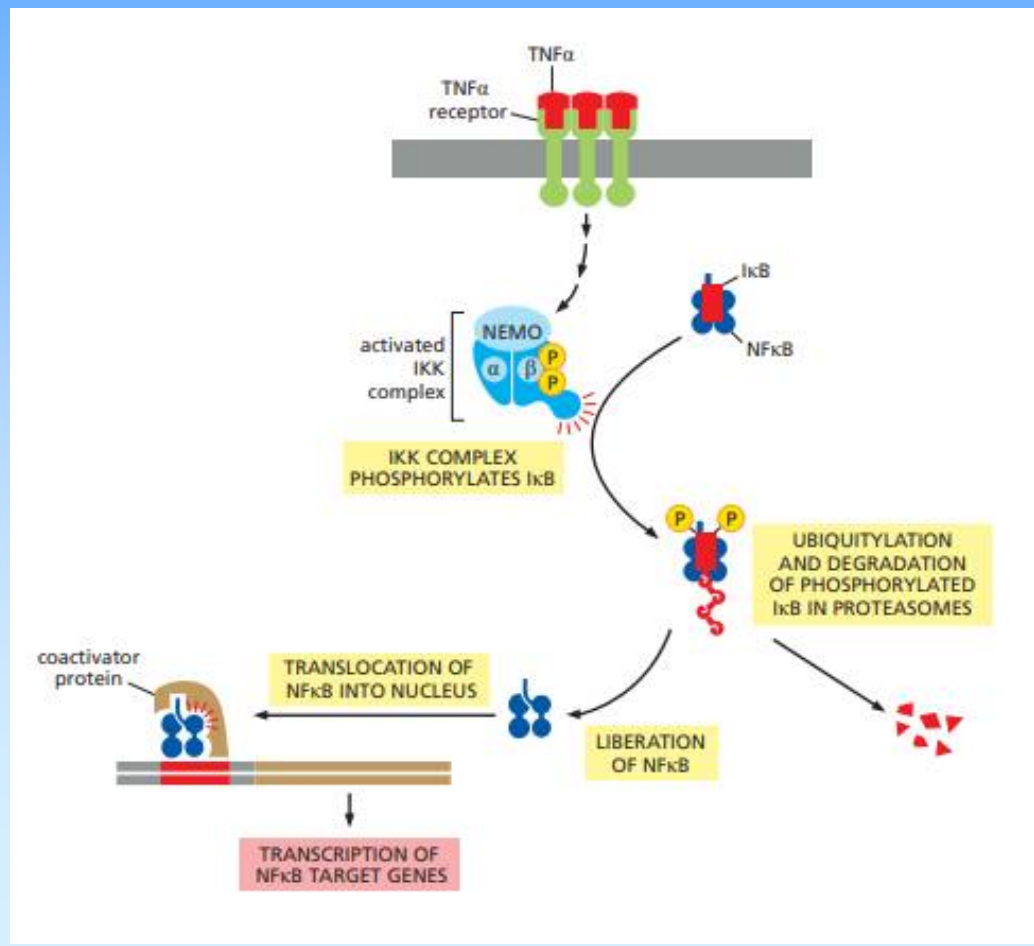
Ci není štěpen, vstupuje do jádra.



Transkripce Hedgehog responsivních genů

Mnoho stresových a zánětlivých podnětů působí prostřednictvím signální dráhy závislé na **NFκB**.

Proteiny NFκB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – latentní regulátory transkripce, které jsou přítomny ve většině živočišných buněk a jsou ústředním prvkem stresových, zánětlivých a vrozených imunitních reakcí. Tyto reakce se objevují jako reakce na infekci nebo poranění a pomáhají chránit stresované mnohobuněčné organismy a jejich buňky.



Nadměrná nebo nepřiměřená zánětlivá reakce => poškození tkáně, silná bolest a chronický zánět => rakovina

Stejně jako v případě signalizace Wnt a Hedgehog se nadměrná signalizace NFκB nachází u řady lidských nádorových onemocnění.

Signální dráhu NFκB aktivují různé povrchové receptory:

- Toll receptory
- Toll-like receptory
- TNFα receptory – receptory pro **tumor nekrotizující faktor α (TNFα)**
- 1 IL1 –receptory – receptory pro interleukin-1

Savčí proteiny NFκB (RelA, RelB, c-Rel, NFκB1 a NFκB2) tvoří různé homodimery a heterodimery – každý aktivuje svou vlastní charakteristickou sadu genů.

Nestimulovaný stav:

Vazba inhibičních proteinů IκB na NFκB



NFκB neaktivní

Stimulace signální dráhy:

Vazba TNFα (tumor nekrotizující faktor α)



Změna konformace cytozolického konce receptoru



Aktivace IKK komplexu



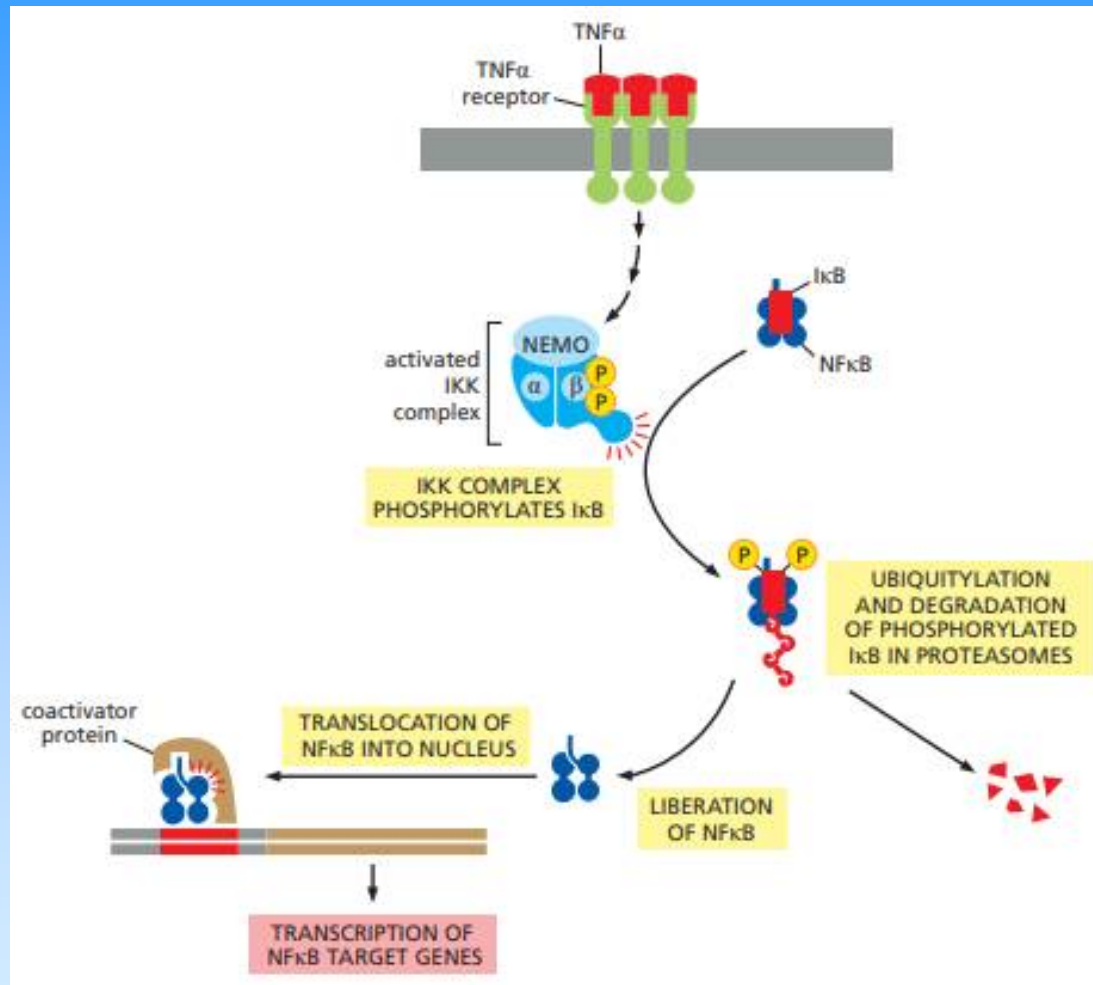
Fosforylace IκB



Degradace IκB a uvolnění NFκB

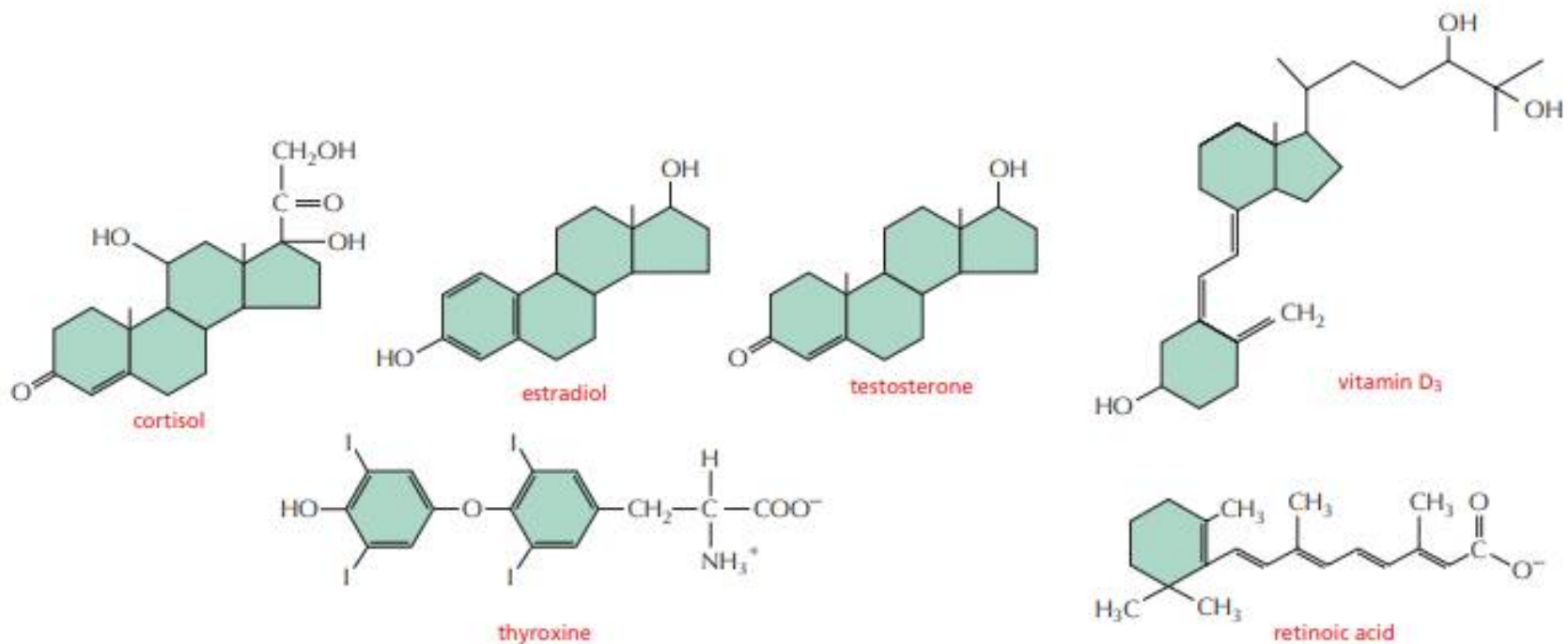


Transport NFκB do jádra a spuštění transkripce terčových genů



Signalizace prostřednictvím jaderných receptorů

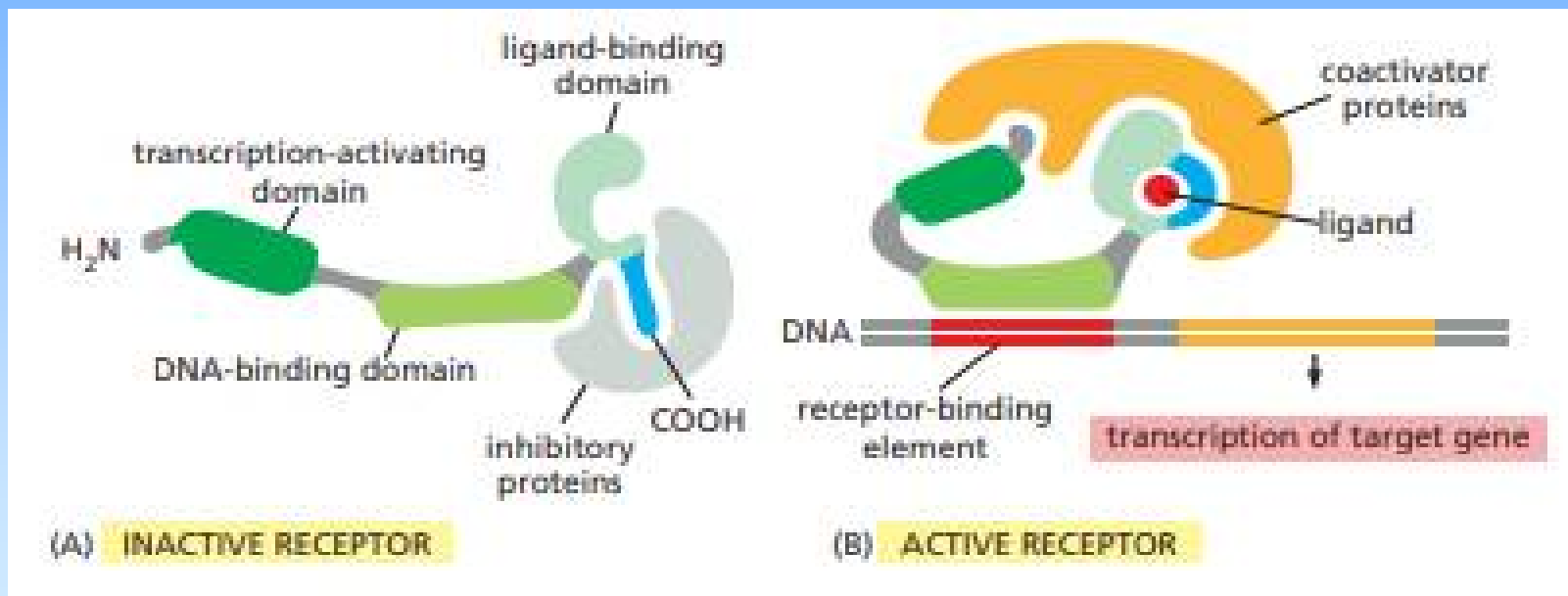
Malé, hydrofobní signální molekuly jsou schopny difundovat snadno přes plazmatickou membránu cílových buněk a vážou se na intracelulární receptory, které jsou současně regulátory transkripce. Tyto signální molekuly zahrnují steroidní hormony, hormony štítné žlázy, retinoidy a vitamin D. Vážou se na jejich příslušné intracelulární receptorové proteiny a mění schopnost těchto proteinů řídit transkripci specifických genů.



Všechny **jaderné receptory** jsou strukturálně příbuzné a jsou součástí velké superrodiny receptorů.

- receptory bez známého ligandu = orphan (sirotčí) jaderné receptory
- receptory regulovány intracelulárními metabolity

Jaderné receptory se vážou na specifické sekvence DNA sousedící s geny, které ligand reguluje. Některé z receptorů, např. pro kortizol, se nacházejí primárně v cytosolu a vstupují do jádra až po navázání ligandu.

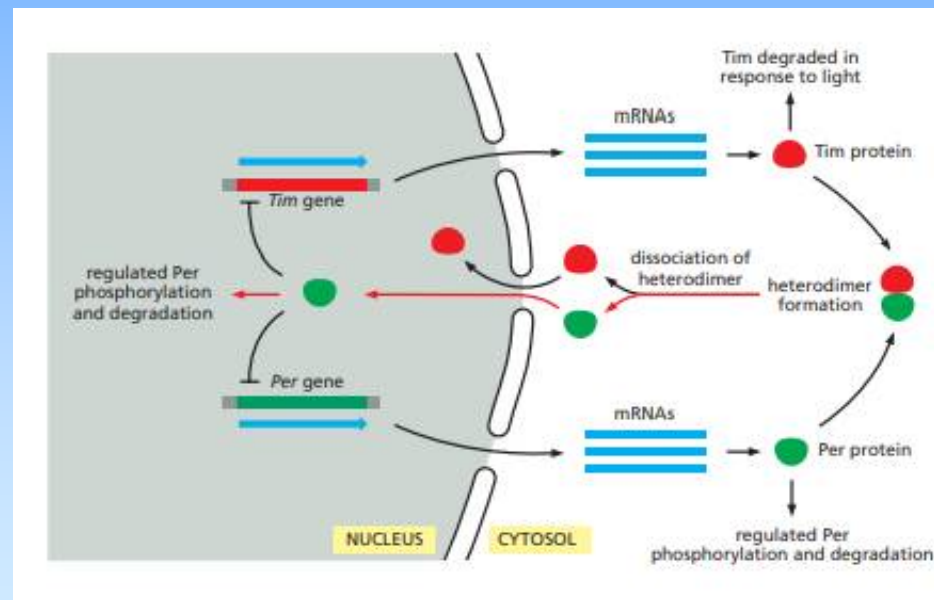


Neaktivní receptory jsou ve vazbě s inhibičními proteinovými komplexy. Vazba ligandu => změna konformace receptorového proteinu => disociace inhibičního komplexu a zároveň vazba receptoru na koaktivátorové proteiny => stimulace genové transkripce

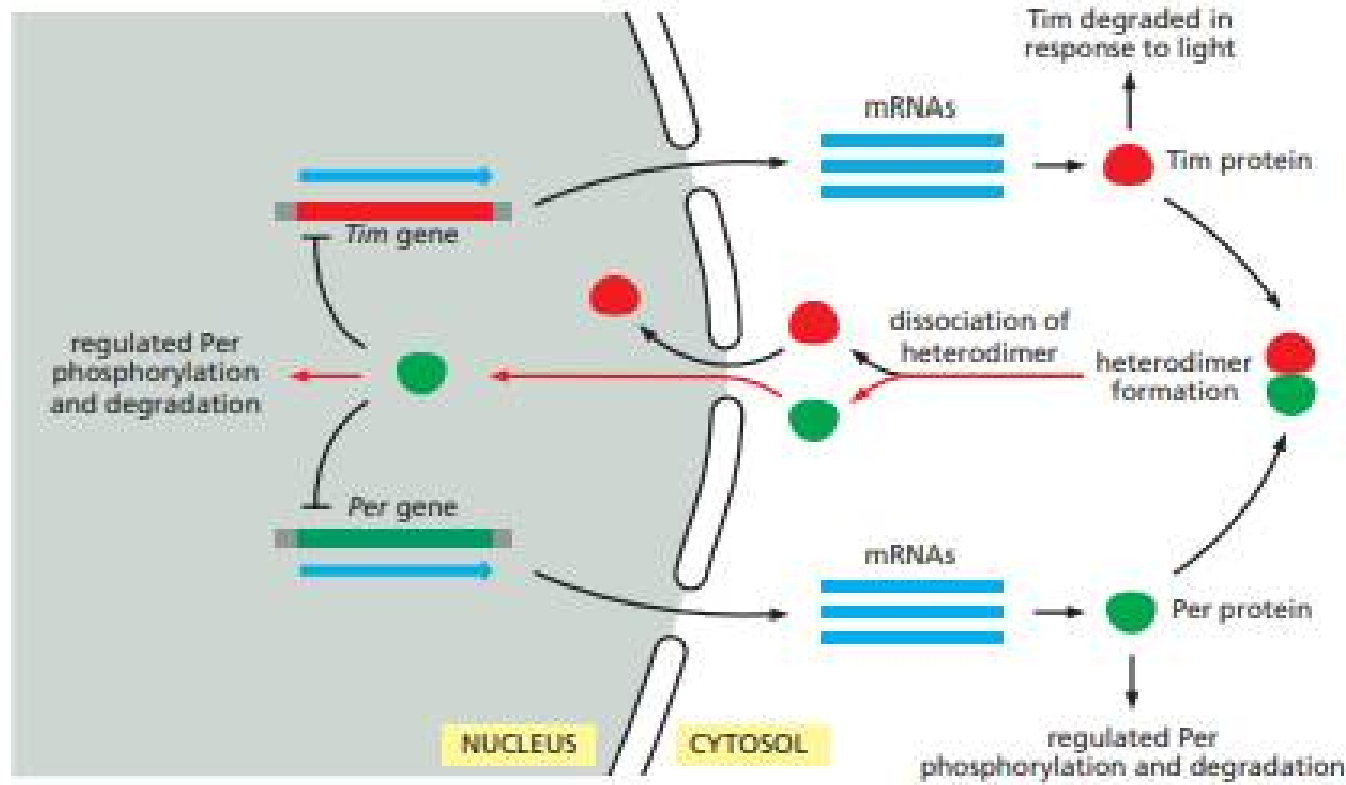
Genová exprese může být regulována i externími environmentálními faktory, např. střídáním světla a tmy – příklad **cirkadiální rytmus**.

Cirkadiální hodiny obsahují smyčky negativní zpětné vazby, které řídí expresi genů.

Život na Zemi se vyvíjel v přítomnosti denního cyklu dne a noci a mnoho současných organismů (včetně lidí) má vnitřní rytmus, který diktuje různé chování v různých denních dobách. Toto chování sahá od cyklických změn v metabolických enzymových aktivitách bakterie až po komplikované cykly spánku a bdění u lidí. Vnitřní oscilátory, které řídí takové denní rytmy, se nazývají **cirkadiální hodiny**.



Cirkadiální hodiny umožňují organismu předvídat pravidelné denní změny ve svém prostředí a reagovat na ně. Cirkadiální hodiny běží, i když jsou odstraněny environmentální signály (změny světla a tmy), ale perioda tohoto volně běžícího rytmu je obecně o něco méně nebo více než 24 hodin. Vnější signály udávající denní dobu způsobují drobné úpravy chodu hodin, aby byl organismus v synchronizaci s jeho okolím. Po drastičtějším posunech se cirkadiální cykly postupně resetují novým cyklem světla a tmy (příklad jet lag).



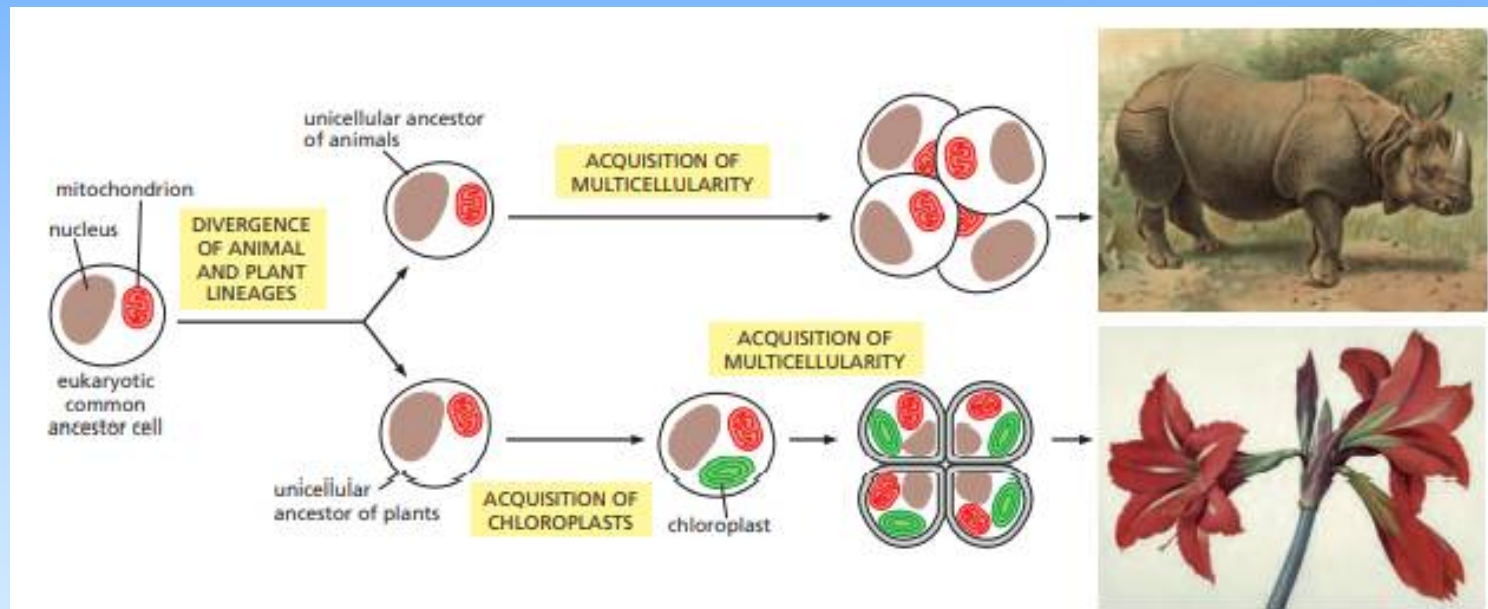
Klíčovým principem cirkadiálních hodin je, že obecně závisí na negativních zpětnovazebních smyčkách.

Ústředním rysem hodin je periodická akumulace a rozpad dvou transkripčních regulačních proteinů, **Tim** a **Per**. Množství mRNA kódující tyto proteiny během dne stoupá a v cytosolu se vzniklé proteiny spojují za vzniku heterodimeru. Po časové prodlevě se heterodimer disociuje a **Tim** a **Per** jsou transportovány do jádra. V jádře **Per** potlačuje geny **Tim** a **Per** => negativní zpětná vazba => pokles hladin **Tim** a **Per**. Řízená degradace **Per** rovněž způsobuje zpoždění (červené linky) v akumulaci **Tim** a **Per**. Kroky, při kterých dochází ke konkrétnímu zpoždění, jsou zobrazeny červeně.

Signalizace u rostlin

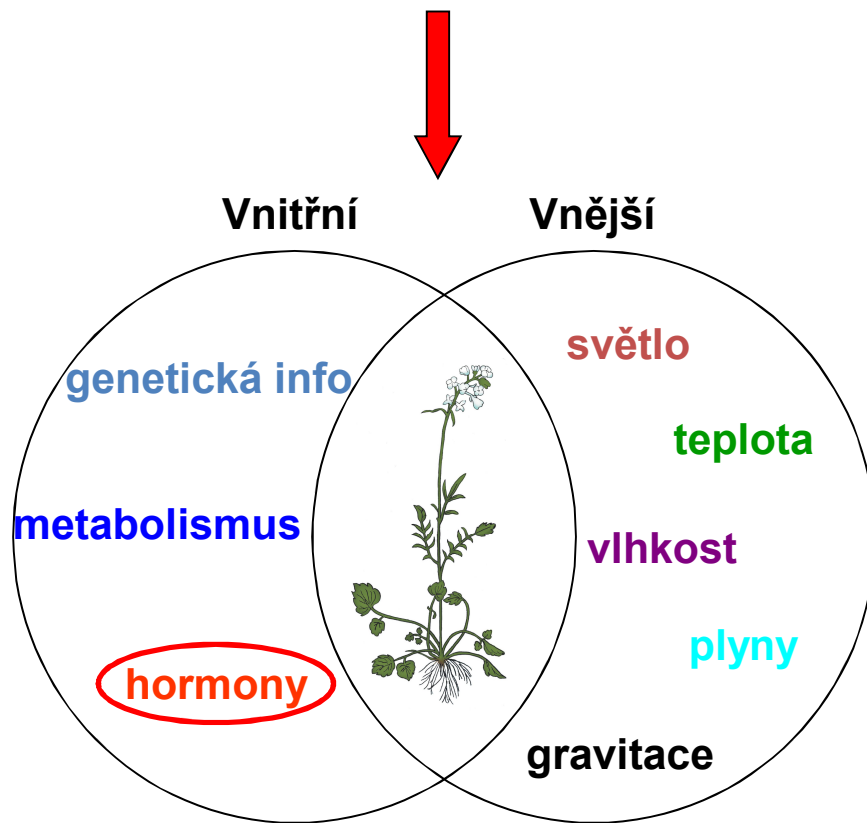
63

Přestože jsou rostliny i zvířata eukaryota, vyvíjely se odděleně po více než miliardu let. Předpokládá se, že jejich posledním společným předkem byl **jednobuněčný eukaryot, který měl mitochondrie, ale žádné chloroplasty**. Rostlinná linie získala chloroplasty poté, co se rostliny a zvířata rozcházely. Nejstarší fosilie mnohobuněčných živočichů a rostlin pocházejí z doby před téměř 600 miliony let. Zdá se tedy, že **rostliny a živočichové vyvinuly mnohobuněčnost nezávisle**, přičemž každý vycházel z jiného jednobuněčného eukaryota, někdy před 1,6 až 0,6 miliardami let.

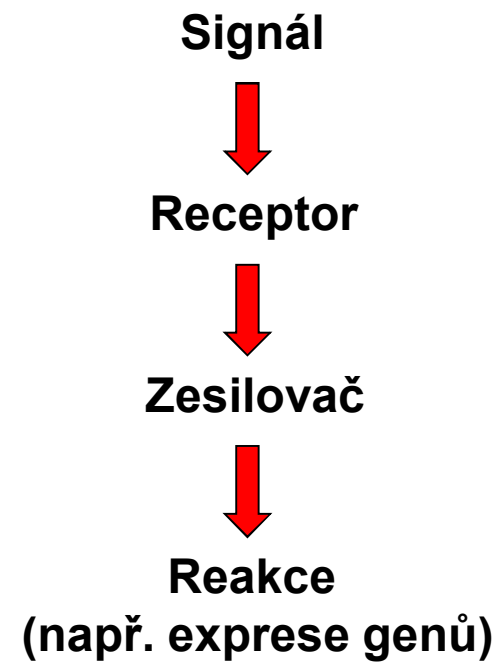
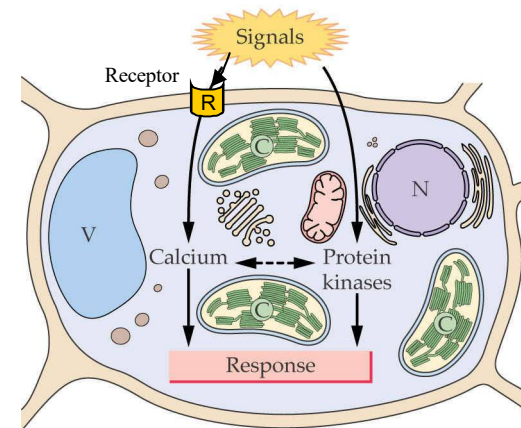


Existuje však určitý **stupeň podobnosti**. Rostliny i živočichové používají k signalizaci NO, cyklické GMP, Ca^{2+} a Rho GTPázy. Rostliny však postrádají homology jaderných receptorů, receptorů Ras, JAK, STAT, TG Notch, Wnt nebo Hedgehog.

Vývoj rostlin regulují signály



Rostlinné hormony: auxiny, cytokininy, gibereliny, brasinosteroidy, etylén, kyselina abscisová, kyselina salicylová, kyselina jasmonová.

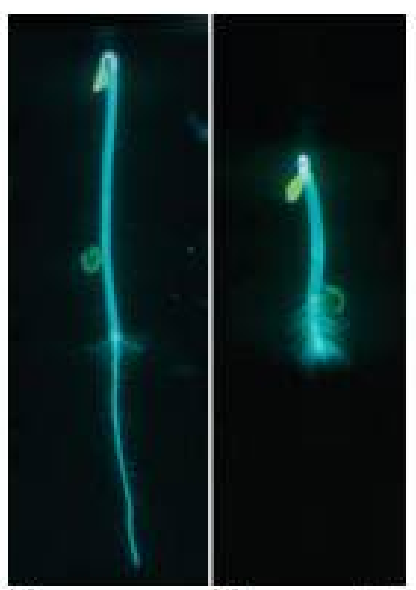


Signální dráha etylénu

Rostlinný hormon **etylén** – malá molekula plynu (jediný známý plynný hormon) – ovlivňuje vývoj rostlin různými způsoby: podporuje zrání plodů, opadávání listů a stárnutí rostlin. Funguje také jako stresový signál v reakci na zranění, infekci a záplavy (nedostatek O₂ v půdě).



(A)



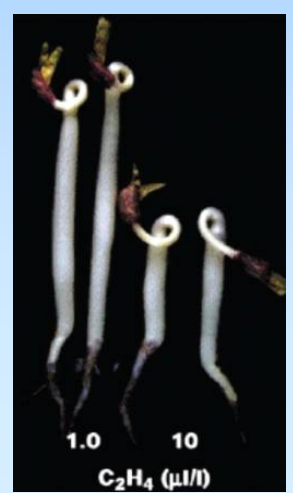
(B)

(C)

1 mm

Typická reakce rostliny na etylén: **triple response**

- 1. Ztloustnutí hypokotylu
- 2. Zkrácení hypokotylu
- 3. Vytvoření háčku

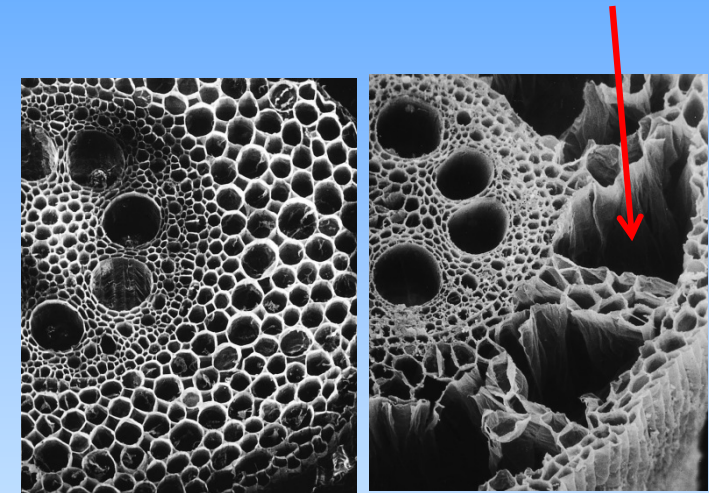


1.0

10

C₂H₄ (μl/l)

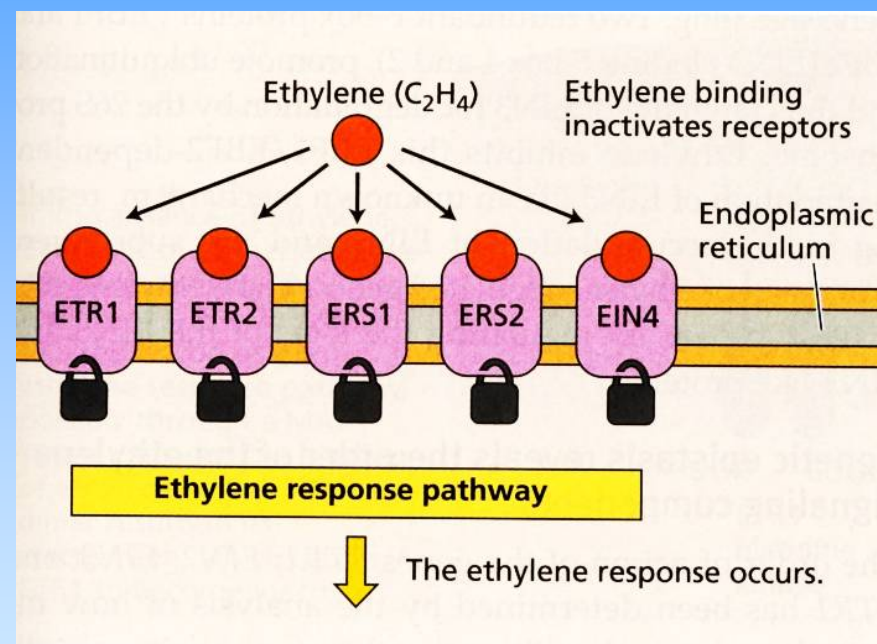
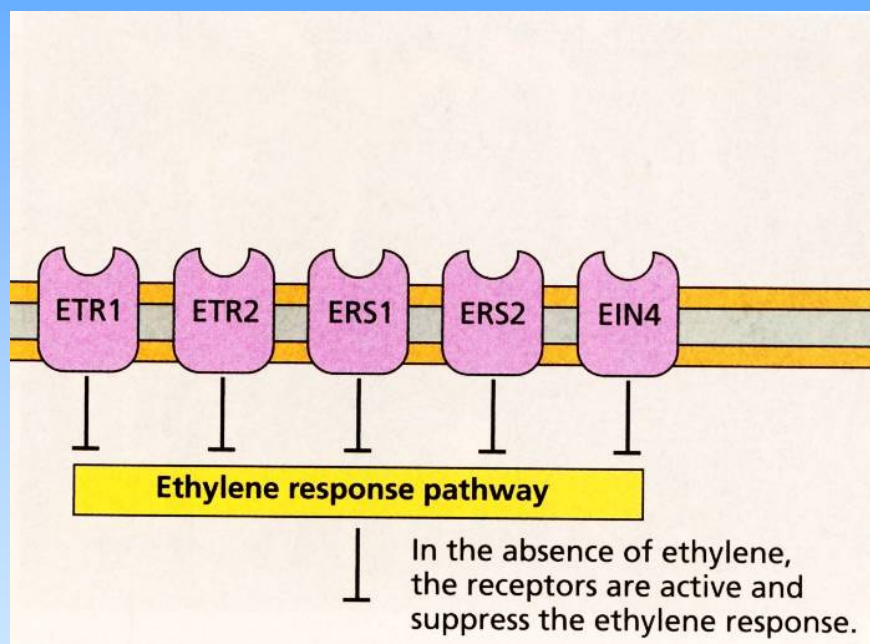
aerenchym



V ponořených rostlinách dochází v kořenech k hypoxii (nedostatku kyslíku). Hypoxie v kořenech stimuluje tvorbu etylénu. Etylén zvyšuje cytozolickou koncentraci Ca²⁺, což indukuje smrt některých buněk v kortexu - vzniká **aerenchym**.

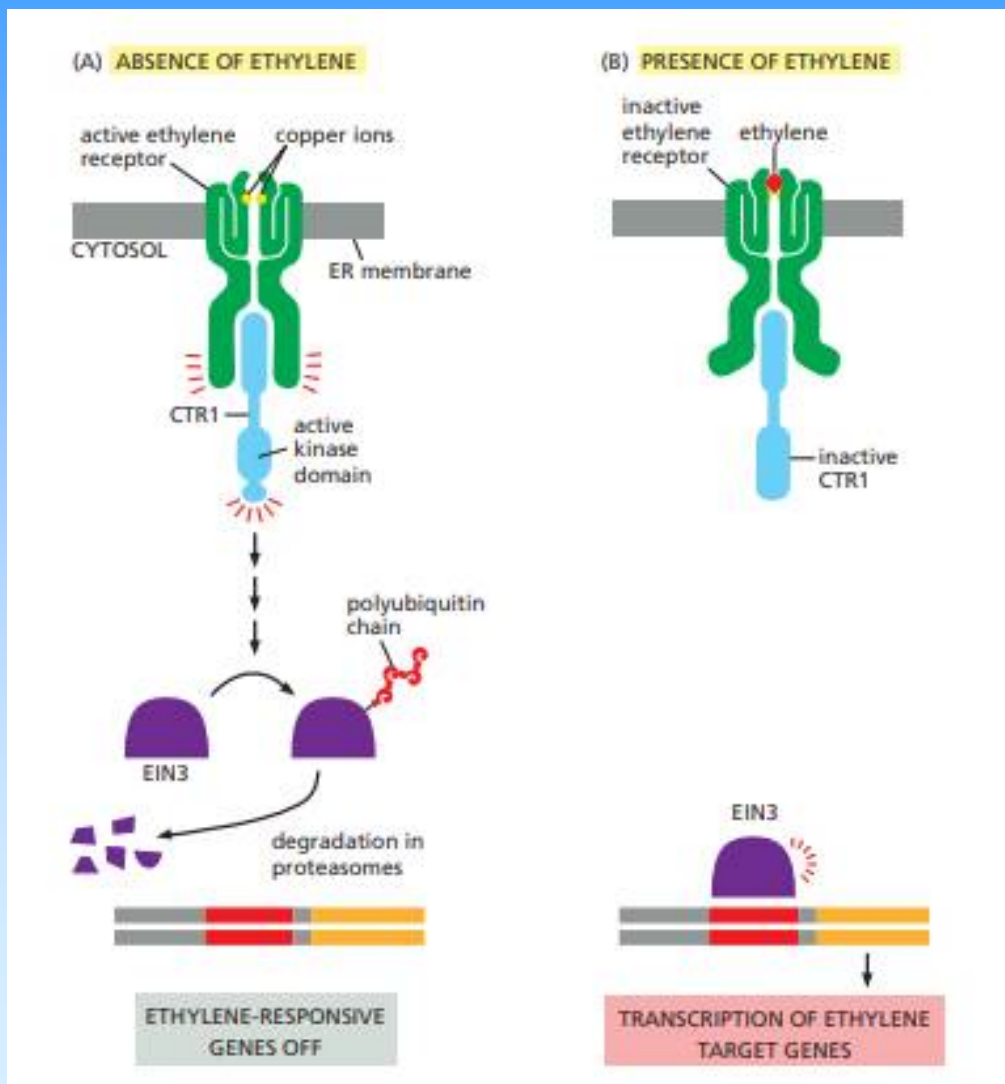
Rostliny mají více etylenových receptorů – lokalizované v endoplazmatickém retikulu; jsou strukturně příbuzné.

Výjimečné: v nepřítomnosti etylénu jsou receptory na **membráně endoplazmatického retikula** aktivní a blokují signální dráhu.



Vazba etylénu k receptorům vede k jejich zablokování. Tím se uvolní signální dráhy a dochází k indukčním reakcím k etylénu.

Receptory pro etylén – dimerní, transmembránové proteiny s doménou vázající etylén obsahující měď a doménou, která interaguje s cytoplazmatickým proteinem zvaným **CTR1**.



Absence etylénu

Aktivní protein CTR1 neznámým mechanismem stimuluje ubiquitinaci a degradaci regulátoru jaderné transkripce zvaného **EIN3**, který je nezbytný pro transkripci genů aktivovaných etylénem. Tímto způsobem prázdné, ale aktivní receptory udržují geny odezvy na etylén v klidu.

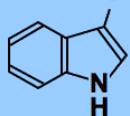
Přítomnost etylénu

Vazba ethyleny inaktivuje receptory a mění jejich konformaci => nedochází k aktivaci CTR1 => protein EIN3 není ubiquitinován a degradován => aktivace transkripce genů reagujících na etylén.

Signální dráha auxinů

Naturally Occurring Auxins

indole-3-acetic acid **IAA**
CH₂COOH



4-chloroindole-3-acetic acid **4-CI-IAA**
Cl CH₂COOH



phenylacetic acid
CH₂COOH

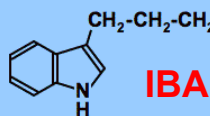


Auxiny – důležité rostlinné hormony zapojené v širokém spektru růstových a vývojových procesů:

- embryogeneze
- prodlužování stonku
- apikální dominance
- foto- a gravitropismus
- tvorba laterálních kořenů

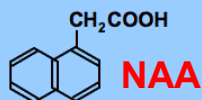
Commonly Used Synthetic Auxins

indole-3-butyric acid
CH₂-CH₂-CH₂-COOH



IBA

naphthalene acetic acid



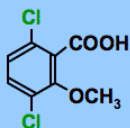
NAA

2,4-dichlorophenoxyacetic acid



2,4-D

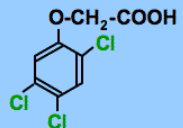
2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid



4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid



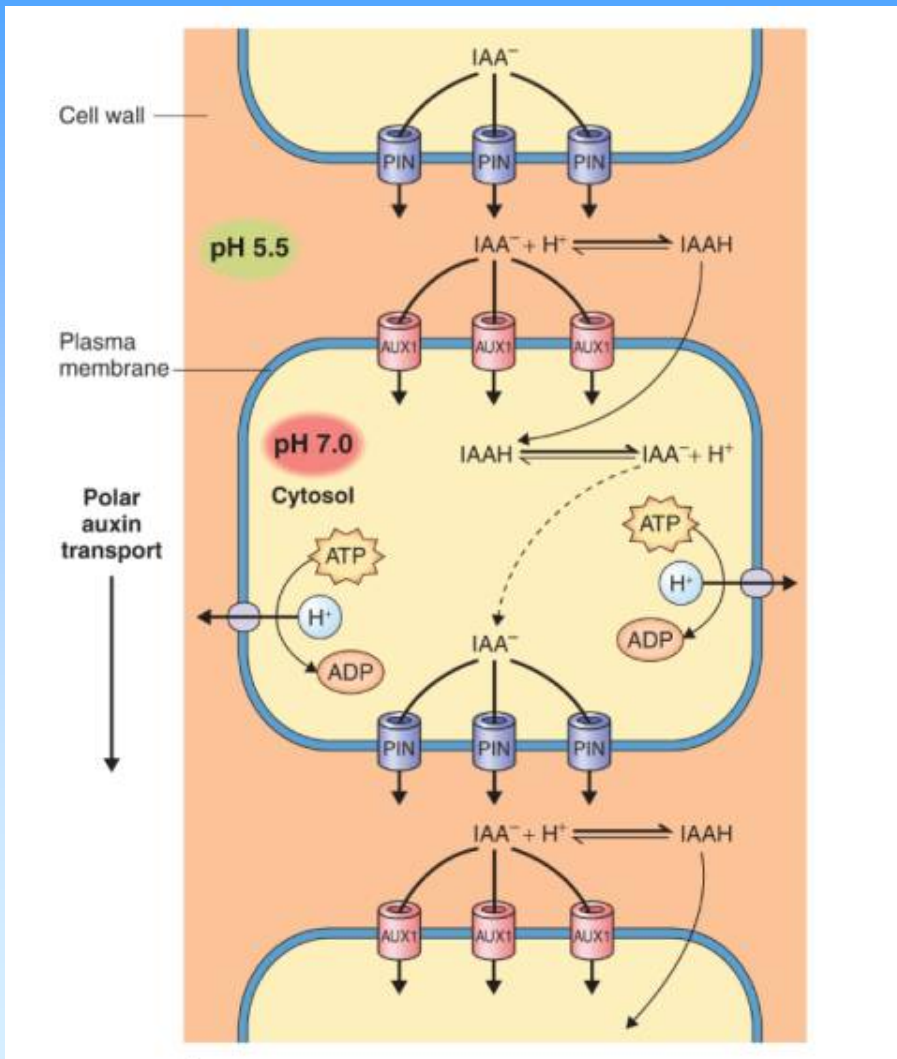
2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid



Buněčná úroveň:

- buněčné dělení
- expanze buněk
- diferenciacie buněk

Buněčné základy polárního transportu auxinů objasnili John Raven a Mary Helen Goldsmith



1. V cytoplasmě (pH 7) se auxin vyskytuje v ionizované formě. Když se v této formě dostane do prostředí buněčné stěny (pH 5), váže na sebe H^+ a stává se elektricky neutrálním (IAAH).

2. Jako relativně malá a neutrální molekula je auxin schopen procházet přes plazmatickou membránu dovnitř buňky.

3. Když se neutrální auxin dostane dovnitř buňky s pH 7, ionizuje se. V této formě se auxin po určitou dobu akumuluje v buňce, protože v ionizované formě má menší schopnost prostupovat plazmatickou membránou než stejně velké neutrální molekuly.

4. Uvolněný H^+ je transportován protonovou pumpou do apoplastu (prostor buněčné stěny).

5. Anionty auxinu se dostávají z buňky pomocí membránového proteinového přenašeče. Protonová pumpa udržuje transport auxinu tím, že generuje membránový potenciál, který favorizuje transport aniontů auxinu ven z buňky

Intracelulární receptor **TIR1** (**T**ransport **I**nhibitor **R**esponse **1**) byl identifikovaným nezávisle dvěma výzkumnými týmy nezávisle na sobě v roce 2005.



Mark Estelle



Ottoline Leyser

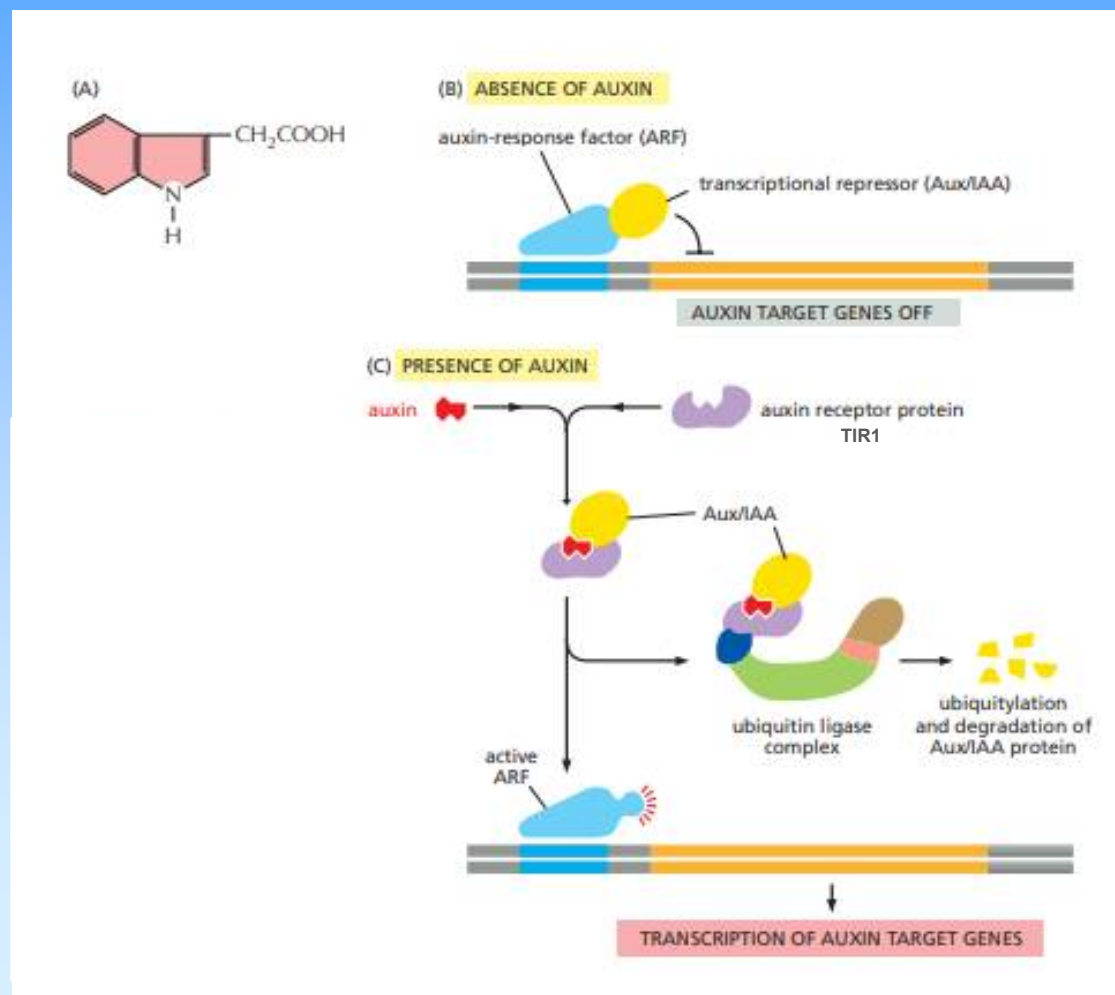
Auxin stimuluje ubiquitinaci a degradaci represorových proteinů, které blokují transkripci cílových genů.

Absence auxinu

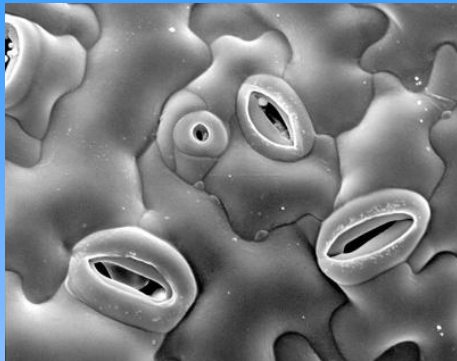
Transkripční represorový protein **Aux/IAA** se váže k transkripčnímu regulačnímu proteinu **ARF** (Auxin-Response Factor) => funkce ARF blokována => inhibice exprese genů.

Přítomnost auxinu

Receptor TIR1 se nachází v jádře a tvoří součást komplexu ubiquitin ligázy. Auxin se váže na receptor TIR1 => vazba komplexu na Aux/IAA => ubiquitinace Aux/IAA => uvolnění ARF => aktivace transkripce genů reagujících na auxin.



Signální dráha kyseliny abscisové (ABA)



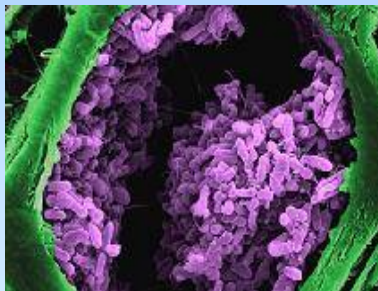
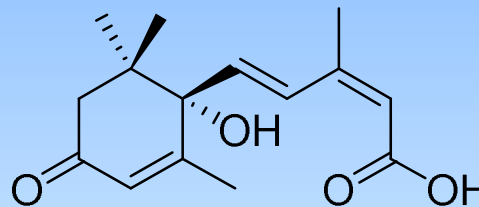
Regulace otevírání
průduchů



Dormance
semen



Klíčení semen



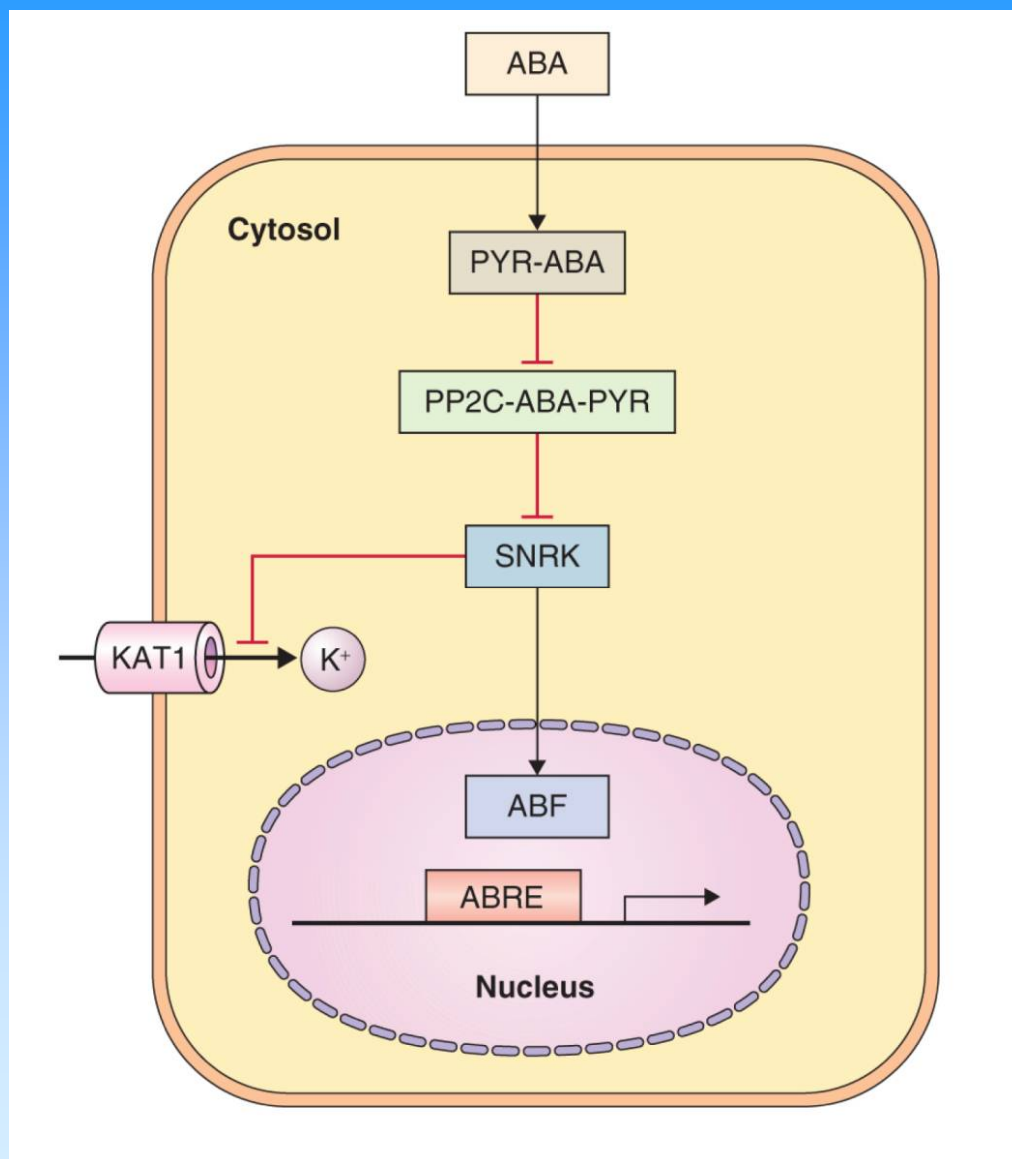
Biotické stresy



Abiotické
stresy



Růst a vývoj



ABA receptory:

PYrabactin Resistance 1 (PYR1)
(homology **PYL = PYR-Like**).

Vazba ABA k PYR1 vede k inhibici fosfatáz typu 2C (PhosPhatase type **2C**, **PP2C = negativní regulátory ABA signalizace, co-receptor**)

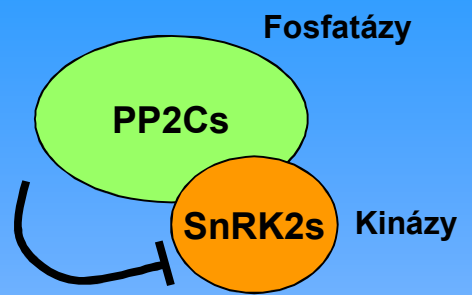
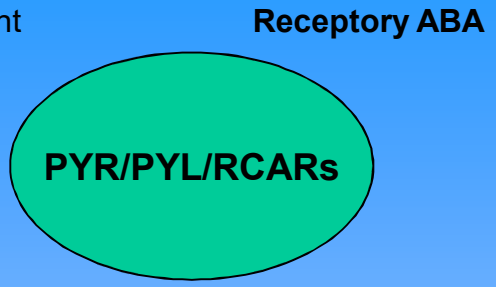
Terčem proteinů PP2C je skupina proteinů zvaných SNF1-podobná protein kináza 2 (**SNF1-Related protein Kinase 2, SNRK2 = pozitivní regulátory ABA signalizace**).

Absence ABA: Fosfatáza PP2C (ABI1, ABI2) je aktivní a defosforyluje SNRK2. SNRK2 kináza je tak inaktivována.

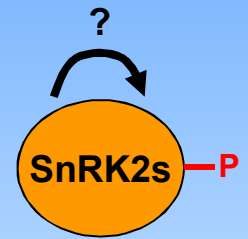
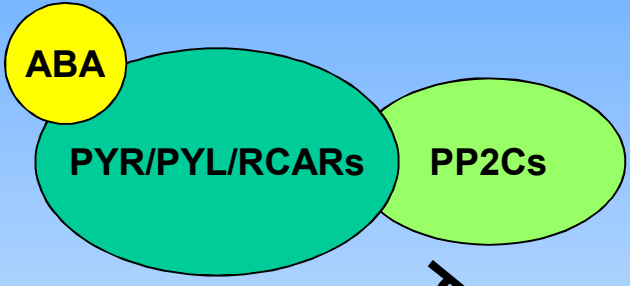
Přítomnost ABA: Fosfatáza PP2C je inhibována a SNRK kinázy jsou aktivní.

PYR = PYrabactin Resistance
PYL = PYR-Like
RCARs = Regulatory Component of ABA Receptors

- ABA



+ ABA



Aktivace ABA-zprostředkované exprese genů (v jádře)

Aktivace pomalých aniontových kanálů

Inhibice K⁺ kanálů

Objev ABA receptorů v roce 2009 - nezávisle na sobě dvě skupiny

Skupina Erwina Grilla - Technische Universität München
(Ma Y et al. 2009, Science 324: 1064 – 1068)



Erwin Grill



Sean Cutler

**Skupina Seana Cutlera - University of California
Riverside**
(Park SY et al. 2009, Science 324: 1068 – 1071)

**Růst ve tmě
(etioloizovaný růst, skotomorfogeneze)**



**Růst na světle
(fotomorfogeneze)**

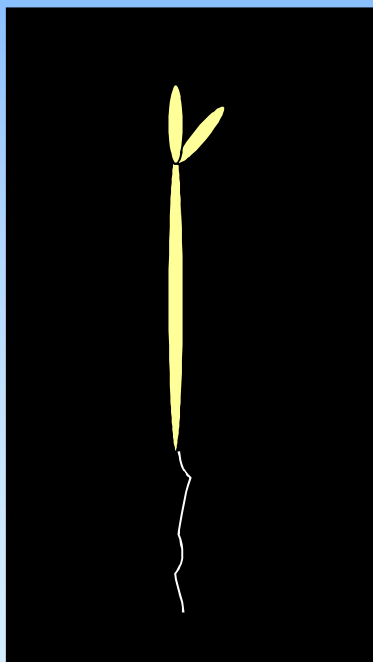


Fotomorfogeneze

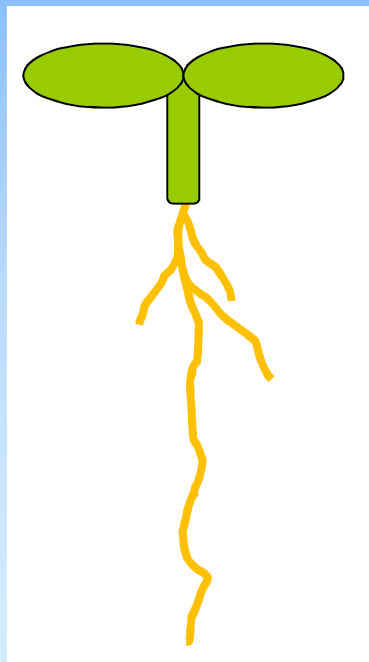
Proces, při kterém světlo jako signál změni vývoj rostliny tak, aby mohla pro svůj další růst využít světlo jako energii.

Světlo je zdrojem informace pro adaptaci růstu a vývoje k prostředí

Tma



Světlo



Základní fotomorfogenické reakce:

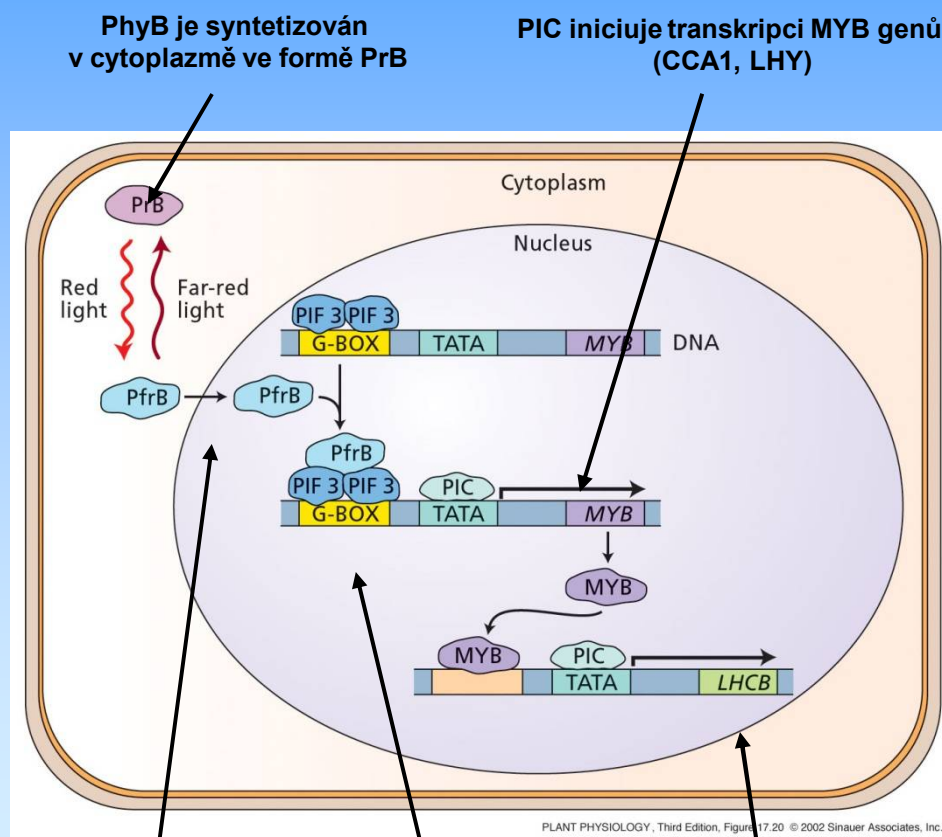
- inhibice prodlužování
- stimulace syntézy chlorofylu
- stimulace růstu listu

Světelné receptory:

- **Fytochromy – červené světlo**
- **Kryprochromy, fototropiny – modré světlo, UV-A**
- **LOV-domains/F-box proteiny – modré světlo**
- **UVR8 – UV-B**

Všechny fotoreceptory vnímají světlo pomocí kovalentně připojeného **chromoforu** absorbujícího světlo. Příjem světla chromoforem => změna konformace proteinu a fosforylace receptoru = aktivace fotoreceptoru => přenos signálu.

Fytochromy - přítomny ve všech rostlinách, u zvířat chybí. Jsou to dimerní, cytoplazmatické serin/threoninové kinázy. Vlivem červeného světla mění konformaci Pr na Pfr.



Přenos signálu a aktivace reakce

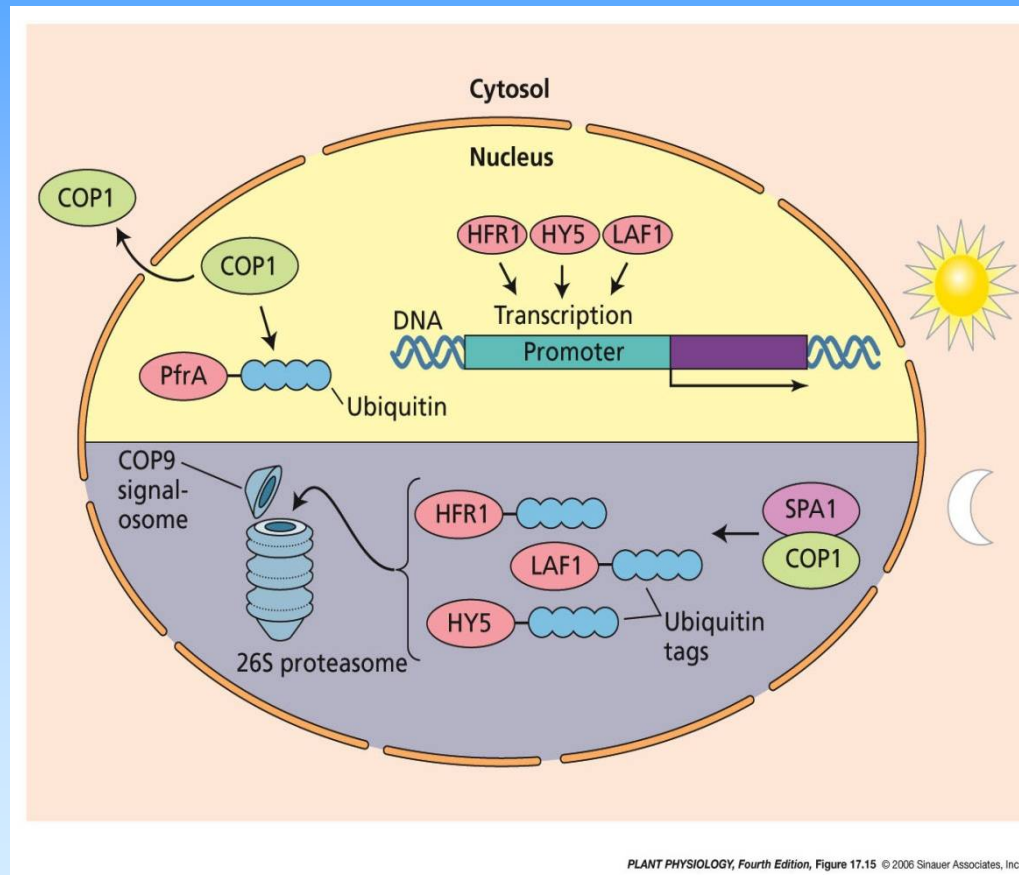
Fytochrom ve formě Pfr je transportován do jádra => blokáda represorů transkripce PIF3 => uvolnění transkripce fotomorfogenních genů.

Ve formě PfrB je fytochrom transportován do jádra

PfrB se váže k dimeru PIF3

Transkripční faktor MYB aktivuje transkripci LHCB

Regulace genové exprese světlem prostřednictvím fitochromu A a proteinu COP1



Tma

Akumulace COP1 v jádře



Represe exprese fotomorfogenních genů díky ubiquitinaci transkripčních faktorů (HY5, HFR1, LAF1,...)

Světlo

Transport COP1 z jádra do cytoplazmy předáním ubiquitinu proteinu PfrA



Obnovení exprese fotomorfogenních genů odblokováním transkripčních faktorů (HY5, HFR1, LAF1,...)