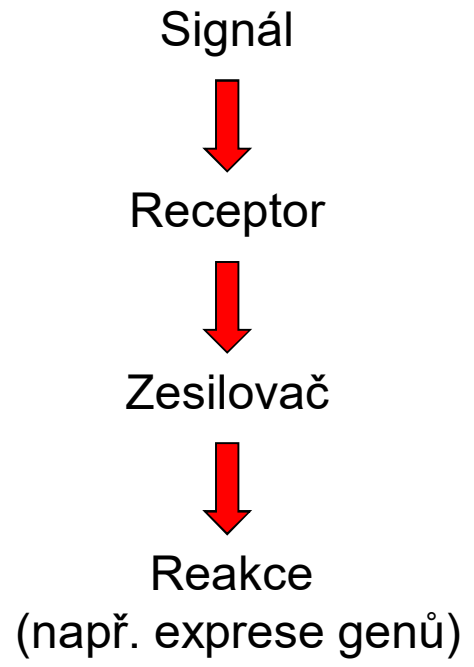
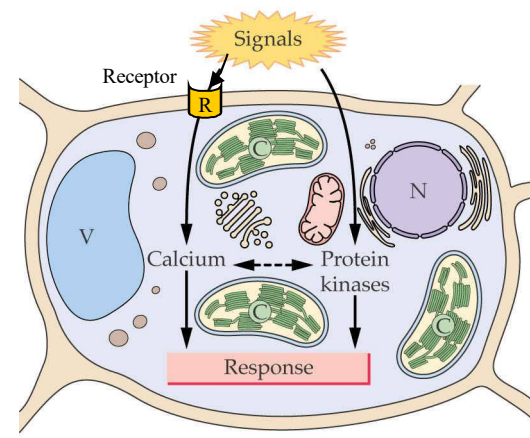
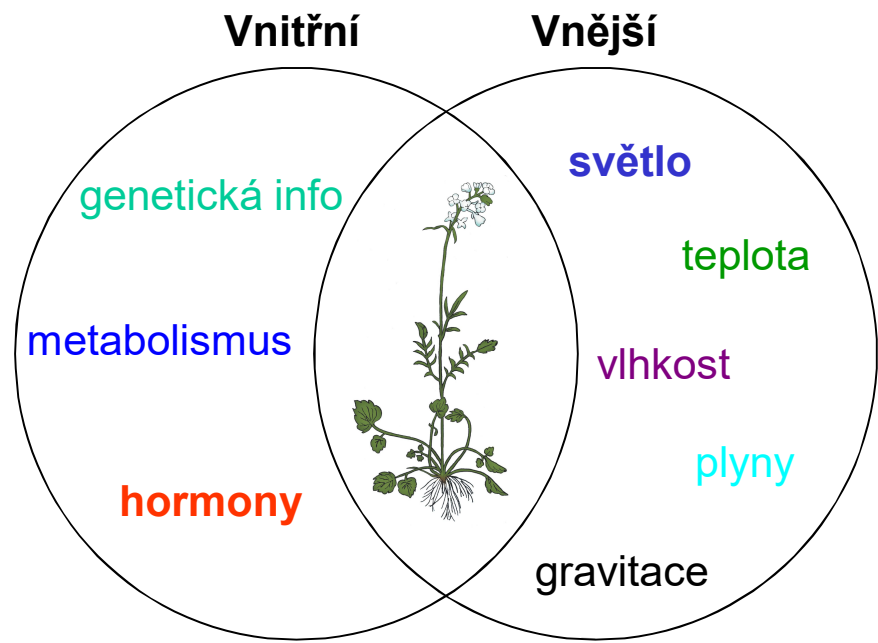


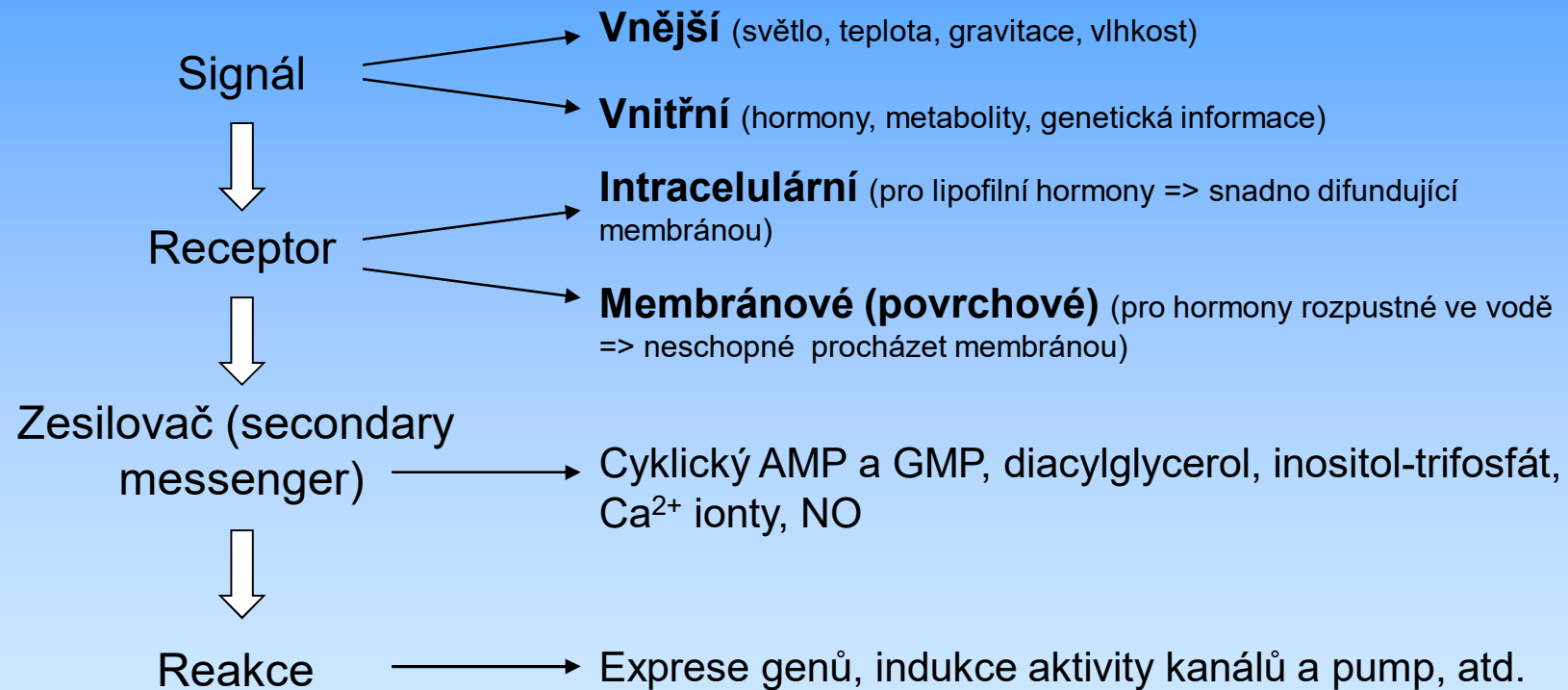
Přenos signálu brasinosteroidů v rostlinách a steroidů u živočichů

- a) **Brasinosteroidy – *Arabidopsis***
- b) **Podobné účinky brasinosteroidů a steroidů**
- c) **Ecdysteroidy – *Drosophila***

Vývoj organismu regulují signály (faktory)



Obecné schéma přenosu signálu



Genetické studie - snaha definovat molekulární mechanismy účinků steroidních hormonů

Brasinosteroidy - *Arabidopsis thaliana* (27 tisíc genů)

Detailní popis biosyntézy **brasinosteroidů**



Znalost signálních drah

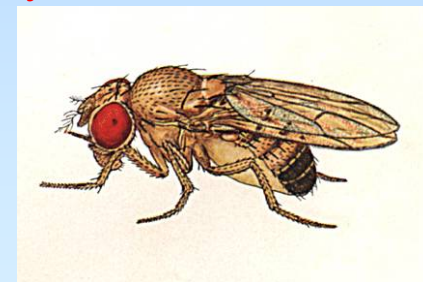


Steroidy – savci, hmyz - *Drosophila melanogaster* (14 tisíc genů)

Detailní popis transkripce genů aktivované **20E hydroxyecdysone**

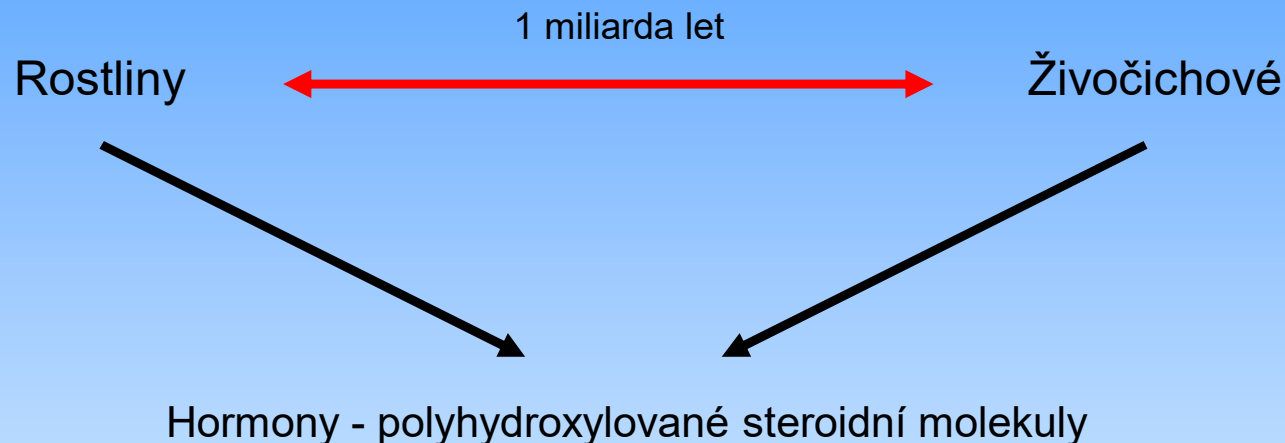


Znalost biosyntézy ecdysteroidu



a) Brasinosteroidy – *Arabidopsis*

Biosyntéza brasinosteroidů (BR) a homeostáza



- BR a steroidy kontrolují:**
- regulaci genové exprese
 - buněčné dělení
 - expanzi buněk
 - diferenciaci buněk
 - PCD
 - homeostázu

Update 2015

Untterholzner SJ et al. (2015) *Plant Cell* 27: 2261-2272

Brassinosteroidy stimulují biosyntézu GAs.

Update 2016

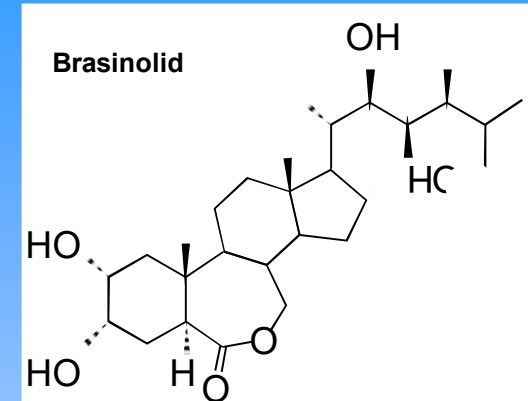
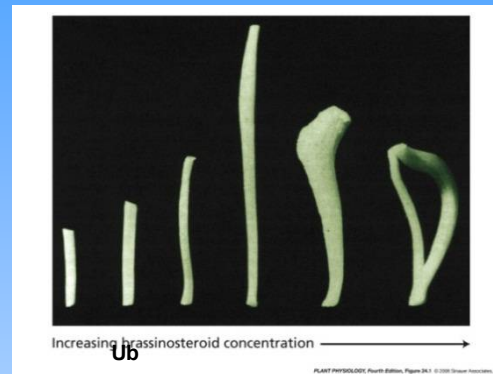
Shahnejat-Bushehri et al. (2016) *Nature Plants* 2: 1-9

Interakce signálních drah brasinosteroidů a GAs;
protein JUB1

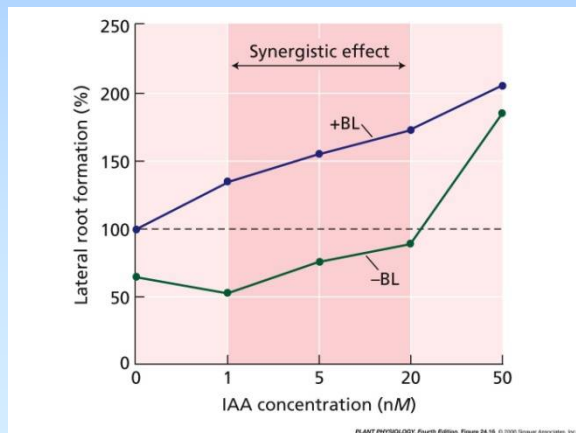
1979 – brassinolid (BL) – koncový produkt biosyntetické dráhy

- stimuluje prodlužování stonku
- stimuluje prodlužování kořene (nízké koncentrace)
- inhibuje prodlužování kořene (vysoké koncentrace)
- stimuluje růst listů
- stimuluje vývoj a klíčení semen
- stimuluje vývoj průduchů
- ovlivňuje zavírání průduchů (?)
- **stimuluje toleranci k chladu**
- změny v expanzi CW při abiotických stresech

Prodlužování 2. internodu stonku fazole



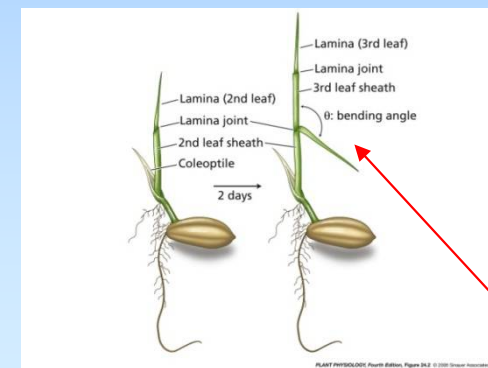
Brassinosteroidy a auxiny mají synergické účinky. Stimulace:



Auxin – rychlý účinek

Brassinolid – pomalý účinek

- tvorby laterálních kořenů
- prodlužování stonku
- růstu pylové láčky
- ohýbání listů a epinastie
- **aktivity protonové pumpy!**
- diferenciaci xylému



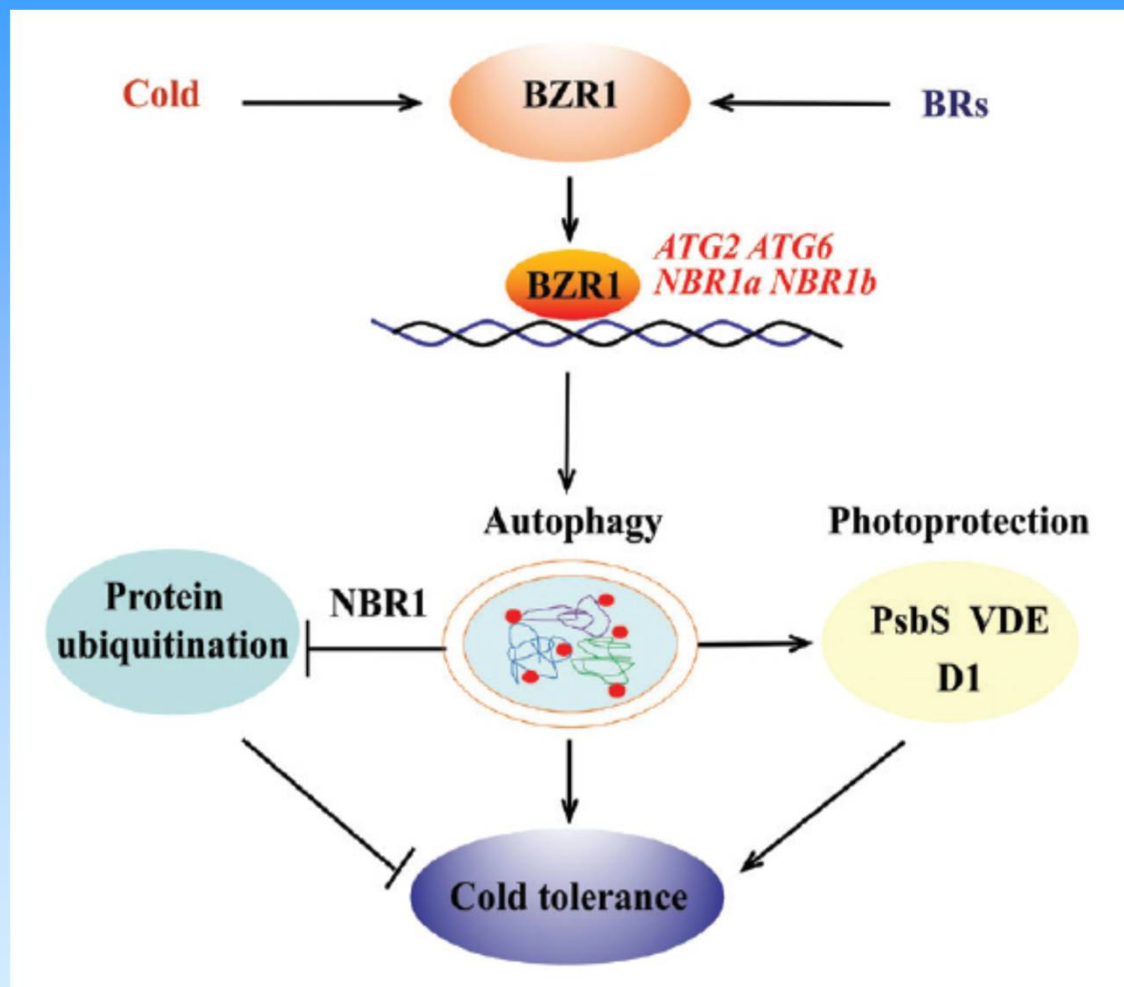
Ohýbání listů

Update 2016

Favero DS et al. (2016) *Plant J*, Nov. 21, doi: 10.1111/tpj.13451

Interakce signálních drah brassinosteroidů, auxinů a světla

Brasinosteroidy indukují autofagii a toleranci k chladu



BZR1 – transkripční faktor

Autofágní geny:

ATG2, ATG6, NBR1A, NBR1b

Fotoprotektivní geny:

PsbS, VDE, D1

Autofágní receptor

NBR1

Update 2020

Chi C et al. (2020) J Exp Botany 71: 1092-1106

Použití brasinosteroidů v zemědělství:

- zvyšování výnosů
- stimulace rezistence ke stresům

Výskyt:

- ve všech testovaných pletivech
- nejvíce v apikálních částech stonků

Brasinosteroidy nejsou pravděpodobně transportovány na dlouhé vzdálenosti

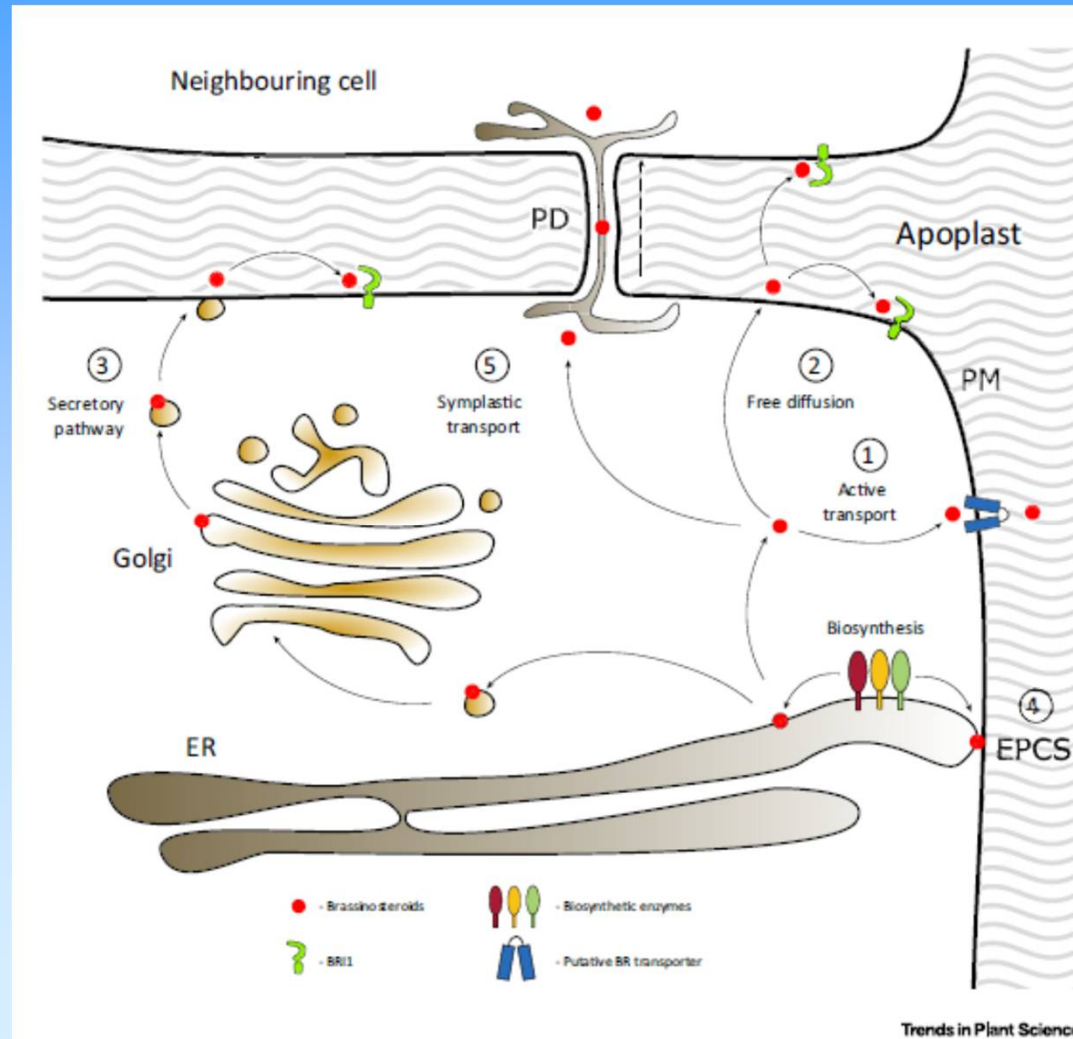
Symons GM et al. (2008) J Exp Botany 59: 17-24
Review o transportu brasinosteroidů



Update 2018

Vukašinovic N and Russinova E (2018) TIPS 23: 285-292

Nejnovější review o transportu brasinosteroidů v rostlinách - BRexit



Existence BR a biologická aktivita – velké množství literatury

Fungování a signální dráhy – objeveny nedávno

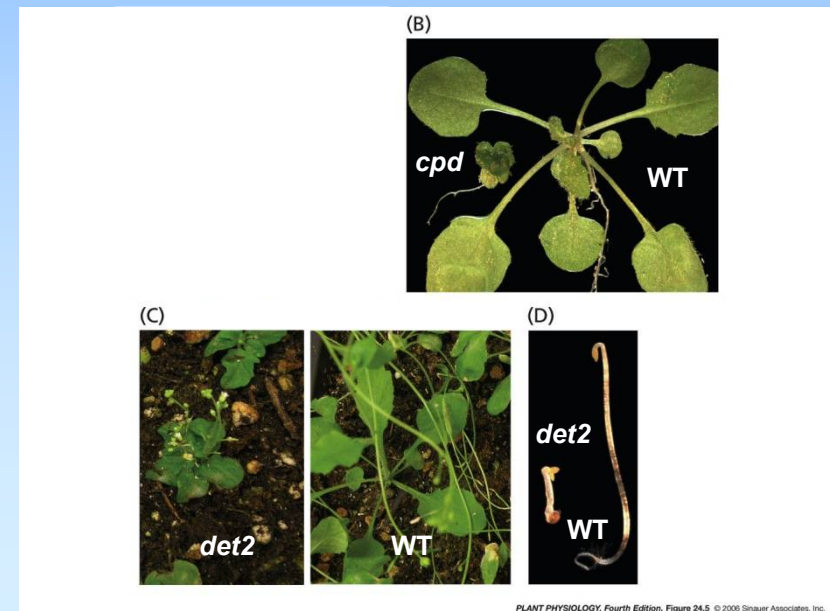
Genetický přístup – fyziologická, biochemická a molekulární charakterizace mutantů

Selekce mutantů s redukovanou biosyntézou BR (rajče, hrách, rýže, *Arabidopsis*)

Výrazný fenotyp mutantů; *Arabidopsis* – pleiotropický efekt mutací

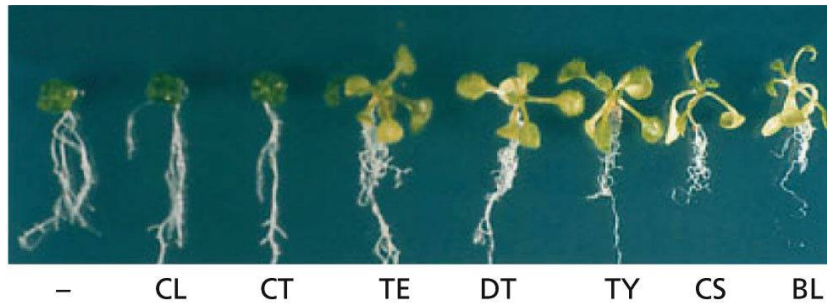
Tma: krátký vzrůst, tlustý hypokotyl, otevřené zvětšené dělohy, přítomnost primárních listových pupenů

Světlo: trpasličí vzrůst, tmavozelená barva, redukováná apikální dominance, pylová sterilita, zpožděná senescence chloroplastů a listů, narušené fotoperiodické reakce, změny v reakci ke světlu.

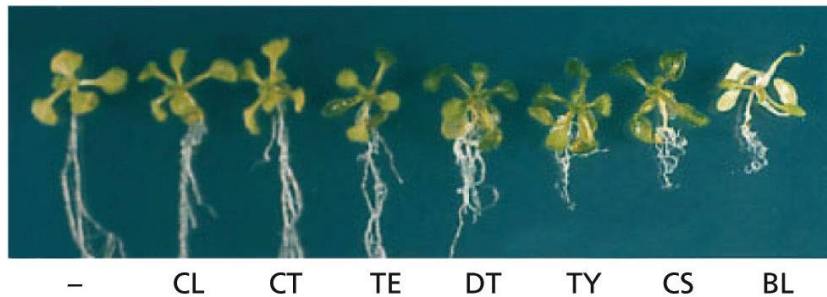


Aplikace exogenních BR vede k normalizaci mutantních fenotypů

(A) *cpd*



(B) Wild-type



CL - campesterol

CT - cathasterone

TE - teasterone

DT - dehydroteasterone

TY - typhasterol

CS - castasterone

BL - brassinolide

Výrazný fenotyp mutanta



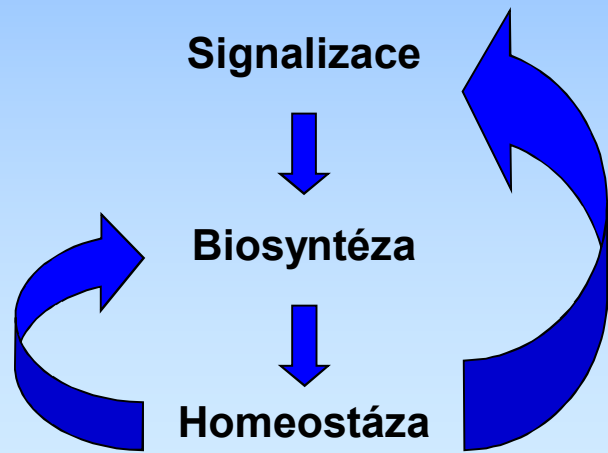
Identifikace genů zapojených v syntéze BR



Porozumění mechanismu homeostázy



Porozumění mechanismu signalizace



Mutanti v signálních drahách mají vyšší hladinu endogenních hormonů

BR-mutanti

Cytokinin-mutanti

Auxin-mutanti

Kontrolní mechanizmy regulující hladinu BR:

- regulace biosyntézy
- inaktivace BR
- zpětná vazba od signální dráhy

Dvě biosyntetické dráhy BR

- ranná C-6 oxidace
- pozdní C-6 oxidace

Rostliny



Živočichové

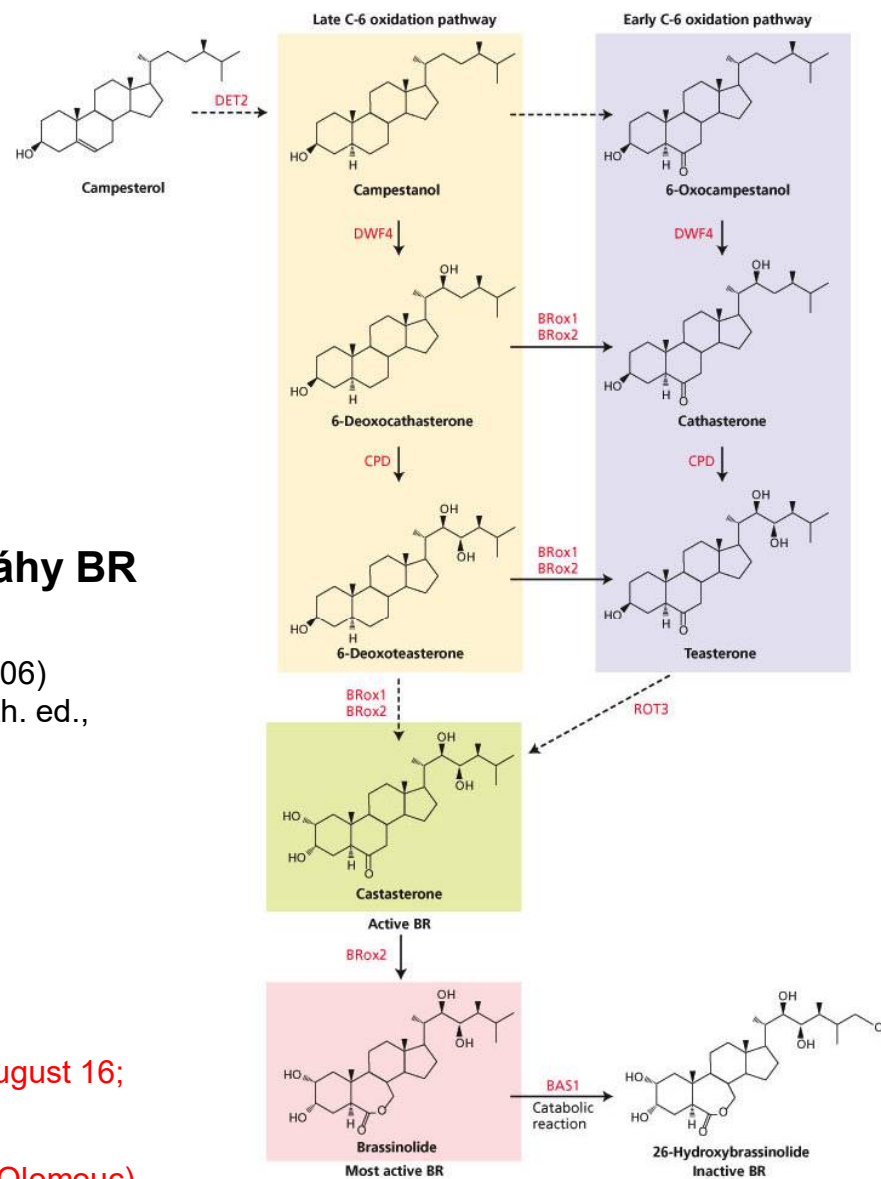


Klíčové kroky syntézy BR a steroidů jsou vysoce konzervované – přítomnost 5 α -reduktázy

Hmyz – přítomnost 5 α -reduktázy nebyla zatím prokázána

Biosyntetické dráhy BR

Taiz L, Zeiger E (2006)
 Plant Physiology, 4th. ed.,
 str. 617 - 634



PLANT PHYSIOLOGY, Fourth Edition, Figure 24.7

Update 2016

Tarkowská D et al. (2016) Anal Bioanal Chem, August 16;
 doi: 10.1007/s00216-016-9807-2

Nová metoda identifikace brasinosteroidů (LRR Olomouc)

Přenos signálu brasinosteroidů

Fyziologické studie  Identifikace BR jako růstových **regulátorů**

Genetické studie  Identifikace BR jako růstových **hormonů**



Identifikace BR receptoru na plazmatické membráně + dalších elementů dráhy



Obrovský nárůst znalostí mol. základů účinků BR
Enormní nárůst publikací o BR

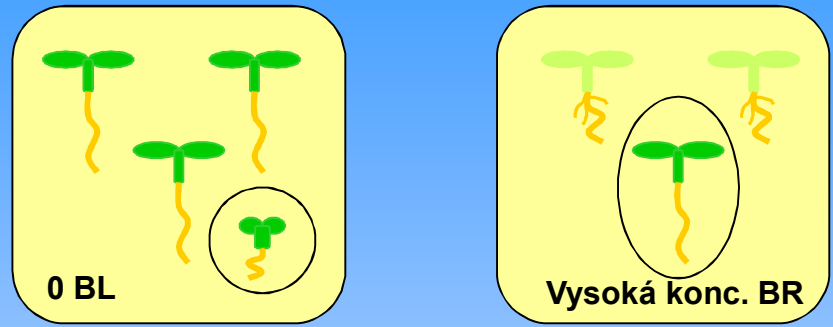
Update 2020

Nolan T et al. (2020) *Plant Cell* 32: 295-318

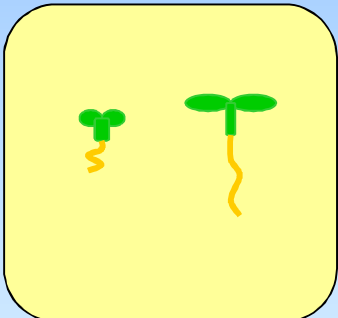
Nejnovější review o signálních drahách brasinosteroidů.

Identifikace BR-insensitivních mutantů

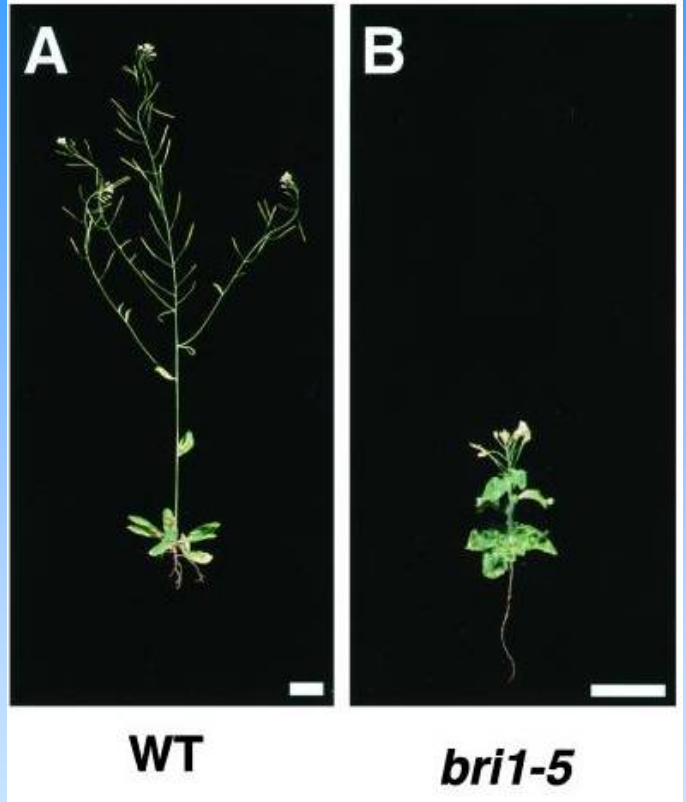
Mutovaná populace rostlin



BR-insensitivní mutanti

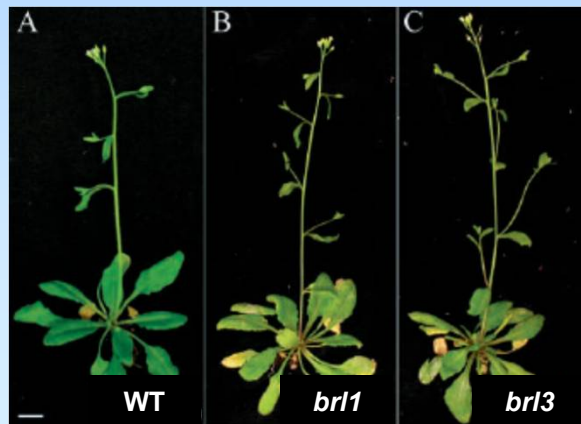


Mutant *bri1*
(*brassinosteroid-insensitive1*)



Wild type a *brd2* mutant rýže

BR-insensitivní mutanti jsou podobní mutantům s defektem v syntéze BR. Jejich fenotyp však nelze změnit exogenními BR.



Laboratoř J. Chory – identifikace dalších trpasličích alel *bri1*



Další geny této skupiny: *BRL1*, *BRL2* a *BRL3*

BRL1 a *BRL3* váží BR. Ektopická exprese těchto genů řízená promotorem *BR1* je schopna zrušit účinek mutace *bri1*.

BRL1 a *BRL3* se specificky exprimují ve vaskulárním systému => mutace *bri1* a *bri3* vedou k abnormálnímu poměru v diferenciaci floému a xylému.

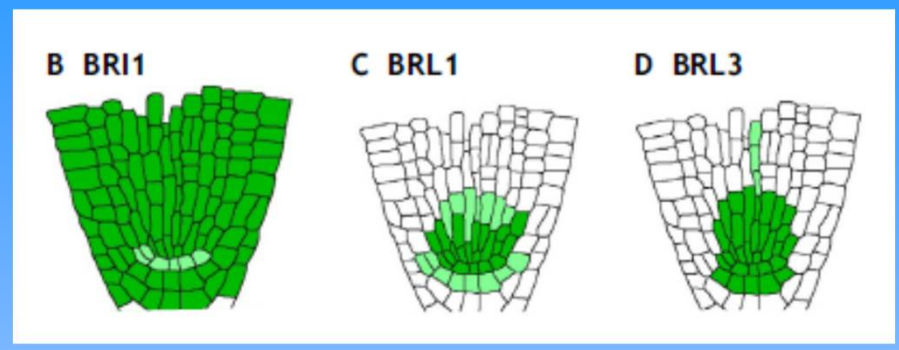
Trojitý mutant *bri1bri1bri3* - zesílený trpasličí vzrůst a vaskulární fenotyp



Vazebné studie: vysoká specifita vazby BL k BRI1 proteinu

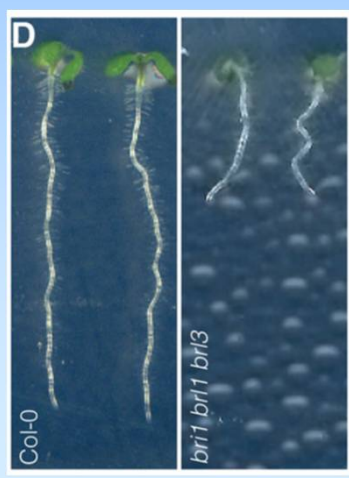
BRI1 je receptorem brasinosteroidů

Specifická exprese receptorů BRI1, BRL1 a BRL3



Update 2019
 Planas-Riverola A et al. (2019) *Development* 146: 151894

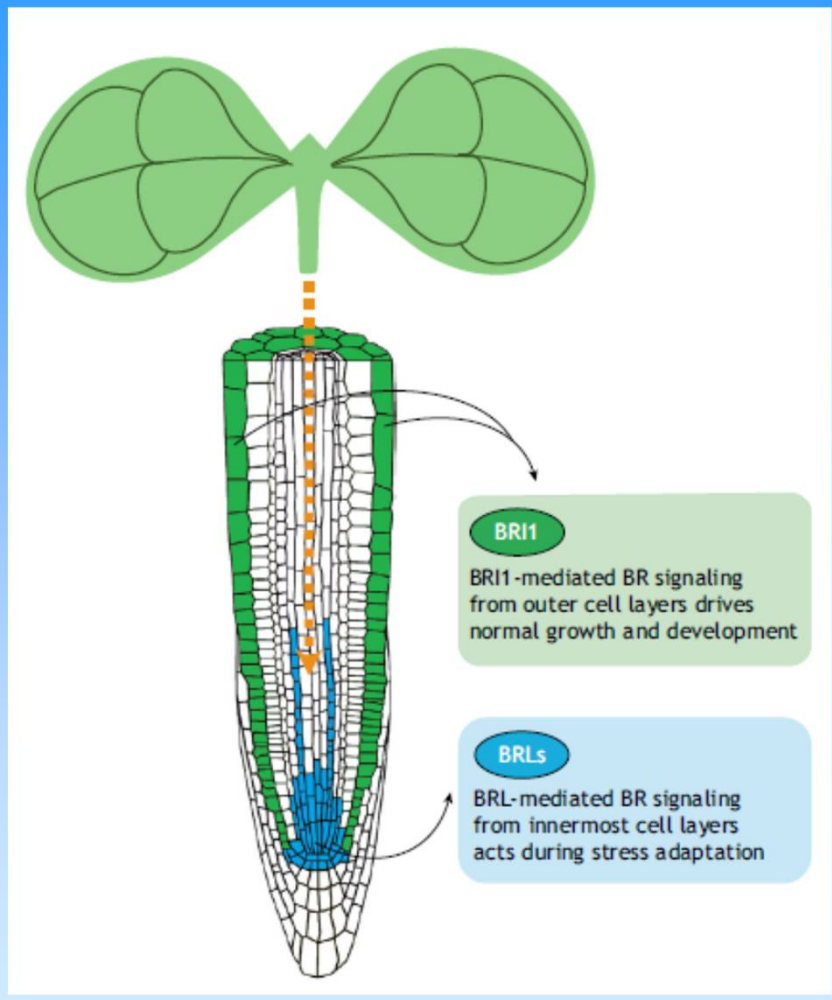
BRI1 – exprese ve všech částech kořene
BRL1 a 3 – exprese v kořenových kmenových buňkách



Triple mutant *bri1bri1bri3*:

- narušená tvorba protofloémových sítkovic
- zkrácený kořen - redukované buněčné prodlužování + asymetrické (formative) buněčné dělení v radiálním směru

Update 2017
 Kang YH et al. (2017) *Development* 144: 272-280



BRI1
 BRI1-mediated BR signaling from outer cell layers drives normal growth and development

BRLs
 BRL-mediated BR signaling from innermost cell layers acts during stress adaptation

BRI1 signalizace – primárně reguluje růst a vývoj za normálních podmínek

BRL signalizace – primárně reguluje růst a vývoj během adaptace ke stresům

Struktura receptoru BRI1

N-terminal signal peptide
Cysteine pair

Putative leucine zipper

Leucine-rich repeats (LRR)

BRI1 kóduje leucin-rich repeat (LRR) transmembránovou receptor-like kinázu (RLK) (LRR-RLK) (poziční klonování)

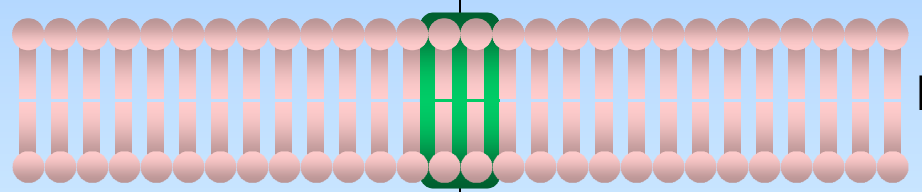
70-amino acid island

BL-binding site

Lokalizace: plazma membrána (exprese BRI1-GFP)

LRR22

Transmembrane region



PM

Ser/Thr kinase domain (KD)

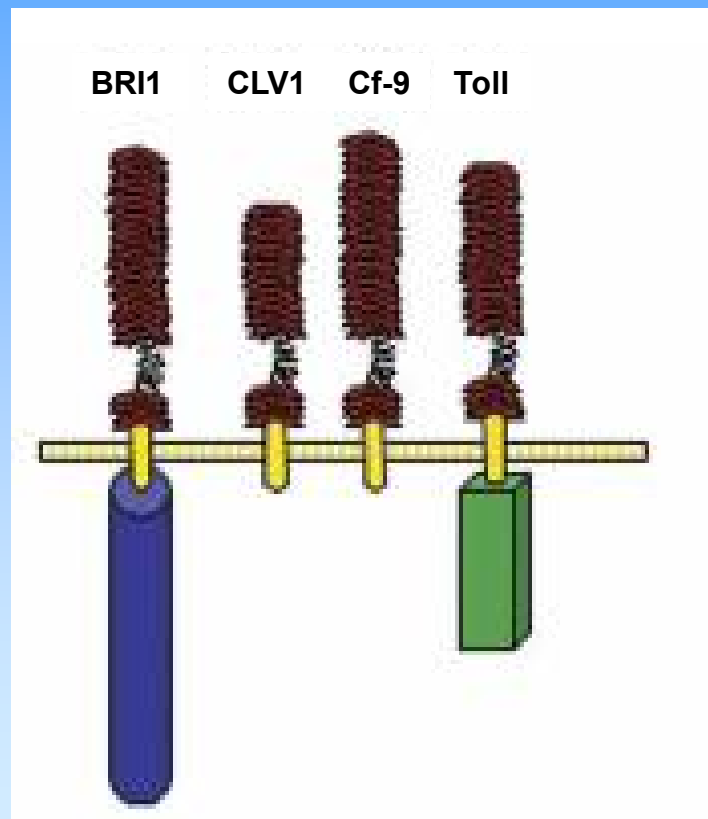
Juxtamembrane domain

C-terminal tail

Cytoplazma

LRR-RLK – největší skupina receptorů v *Arabidopsis* genomu: ~230 členů

70 amino+LRR – obecný proteinový motiv, který se vyskytuje u rodiny proteinů zvaných **LRR-R** (LRR-Receptor-like) s velmi odlišnými funkcemi u všech druhů organizmů.



Unikátní znak BRI1: obsahuje 70 amino acid island a zároveň KD

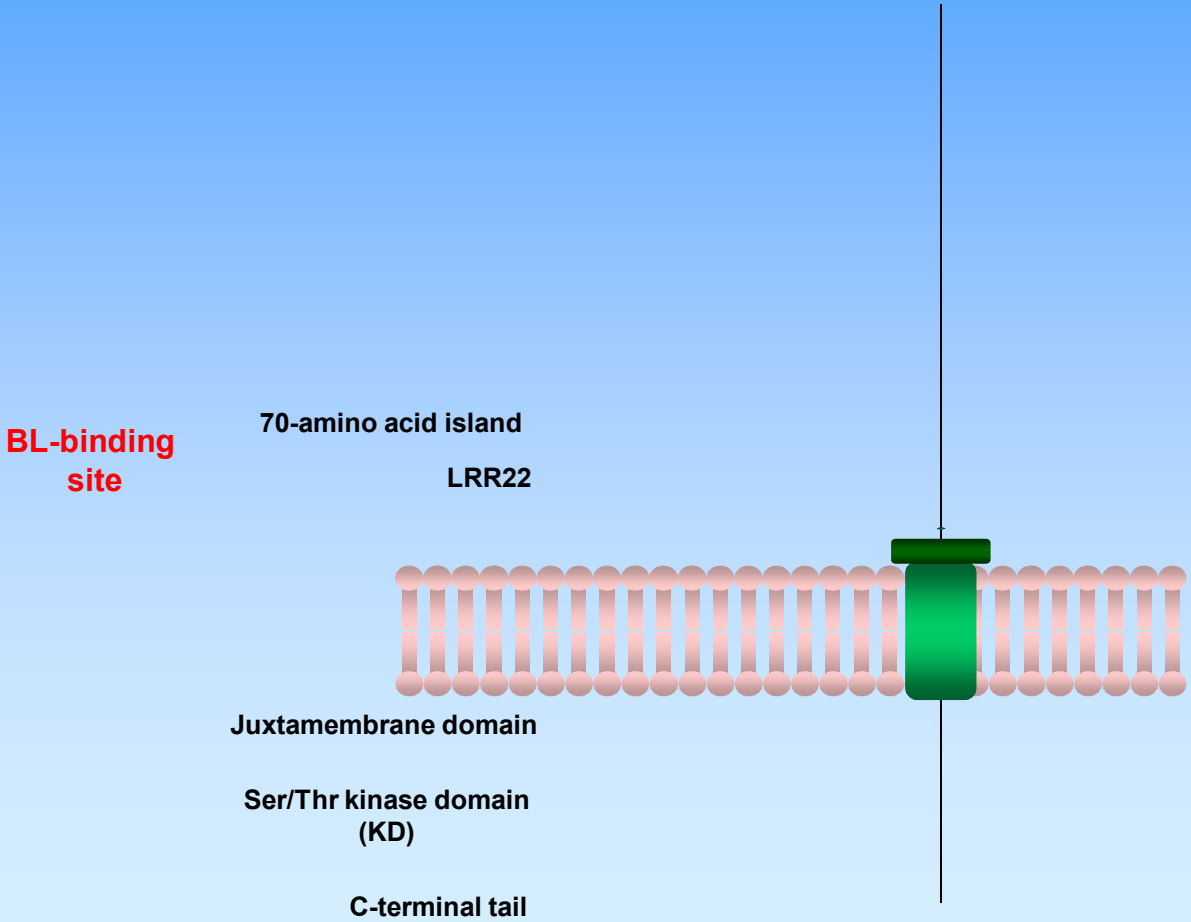
Jiné LRR-R neobsahují KD a přenášejí signál prostřednictvím intracelulární protein-protein interakce (**CLV1**, **Cf-9**).

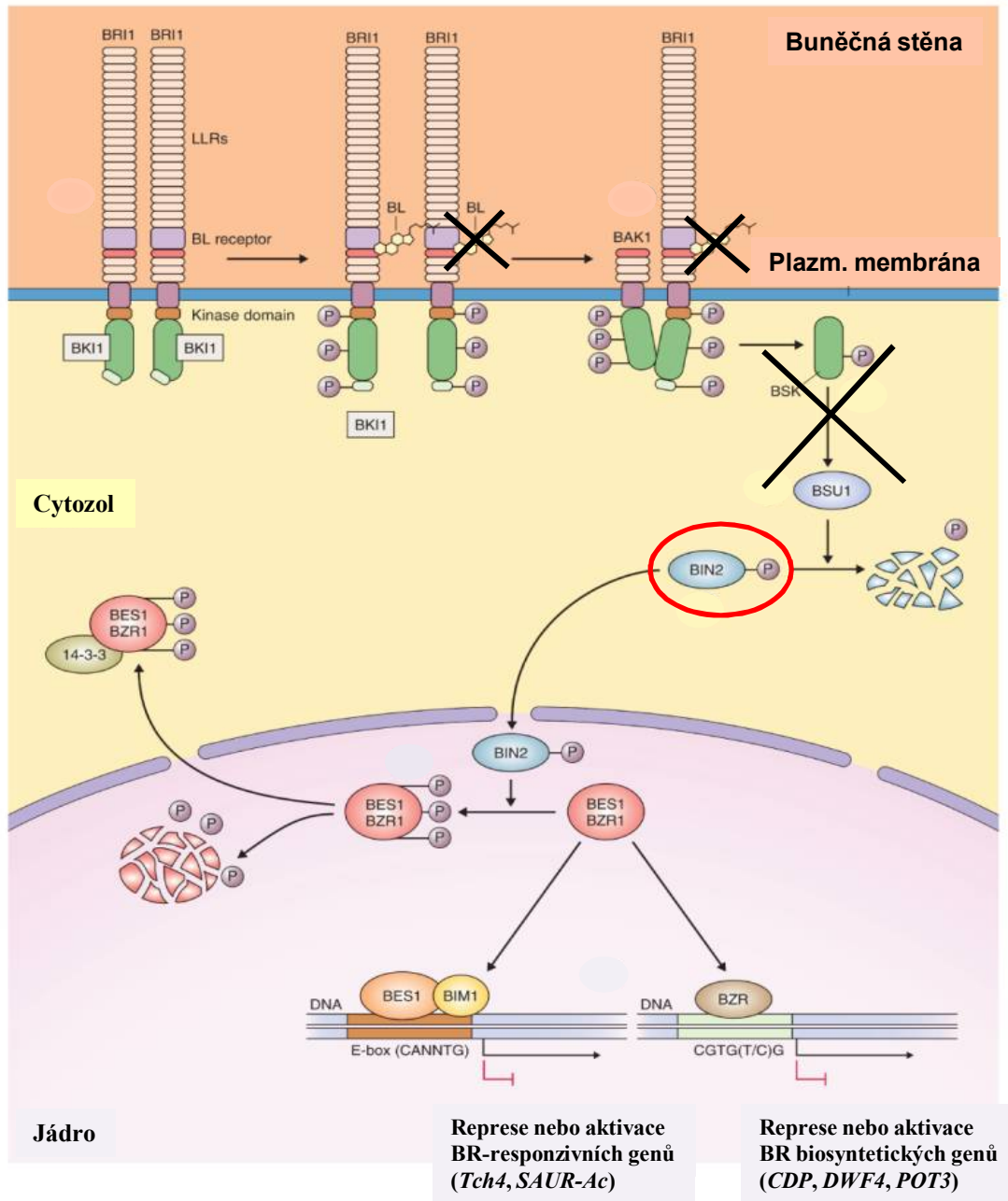
Receptor Xa21 je zapojen v rezistenci k patogenům, má KD, ale neobsahuje 70 amino acid island.

Toll receptor u *Drosophily* obsahuje intracelulární protein (interleucin doménu), který po aktivaci receptoru váže protein podobný KD.

Fosforylace receptoru BRI1

Analýza mutantů s defekty v BRI1 → Identifikace domén nutných pro přenos signálu





Absence BR:

BRI1/BAK1 heterodimer není aktivní



BIN2 (Brassinosteroid-INsensitive2) zůstává fosforylován - aktivní

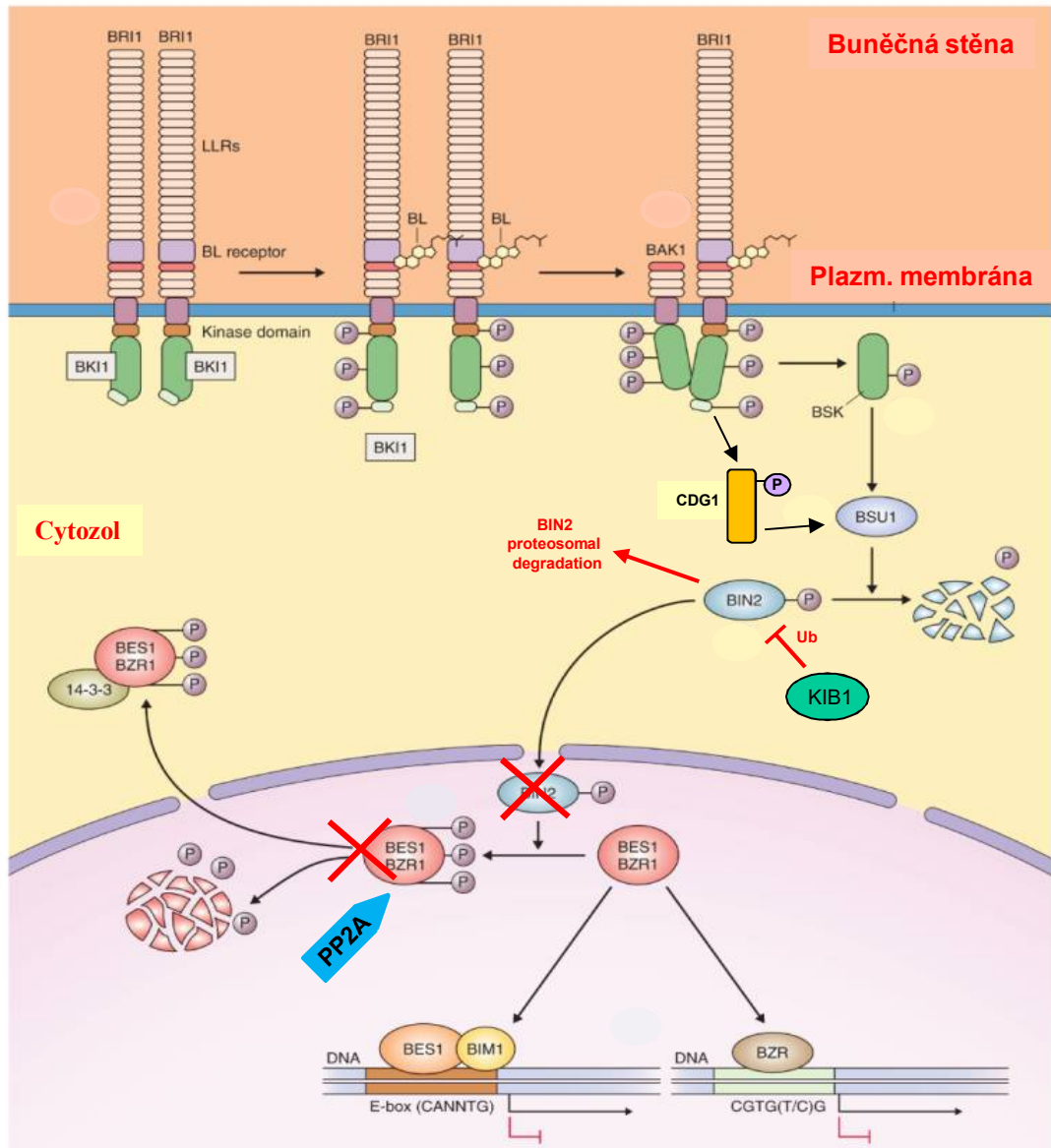


Fosforylace proteinů **BES1** a **BZR1** konstitutivně lokalizovaných v jádře.

Fosforylované BES1 a BZR1 se nemohou vázat k DNA a jsou degradovány



BR-indukované geny nejsou exprimovány



Přítomnost BL = vazba BL k receptoru

Aktivovaný BRI1/BAK1 heterodimer inhibuje aktivitu **BIN2** kinázy prostřednictvím **BSK** (Brassinosteroid-Signaling Kinases) a **BSU1** (bri1 SUPressor 1)

+
Přímá aktivita **BSU1**



Akumulace defosforylované formy BES1 a BZR1 v jádře

BES1 (bri1-EMS-suppressor 1)
BZR1 (brassinazole-resistant 1)

BES1 a BZR1 – transkripční faktory BR-indukovaných genů; krátká životnost; degradace 26S proteasome



Aktivace či potlačení genové exprese

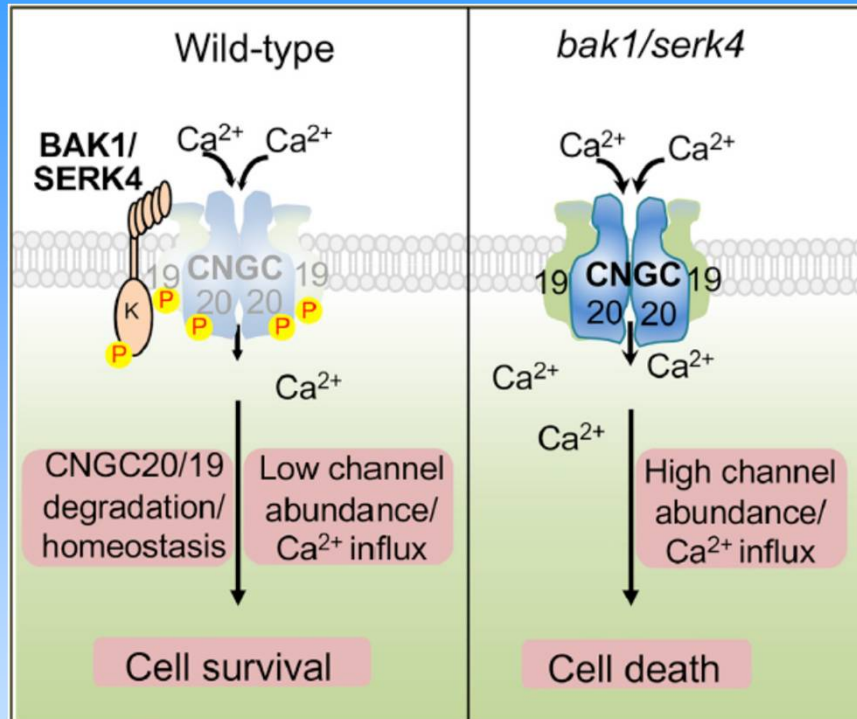
Jádro

Represe nebo aktivace BR-responzivních genů (Tch4, SAUR-Ac)

Represe nebo aktivace BR biosyntetických genů (CDP, DWF4, POT3)

Update 2019

Yu X et al. (2019) Current Biology 29: 1-13



BAK1 (BRI1-Associated Receptor Kinase1) funguje jako ko-receptor BRI1, FLS2 a některých dalších LRR-RLK a reguluje širokou škálu fyziologických reakcí nezávisle na brasinosteroidech.

BAK1 a jeho homolog SERK4 blokuji Ca²⁺ kanál CNGC19 a CNGC20 a tak regulují osud buňky.

Pokud při hyperpolarizaci membrány chybí BAK1/SERK4 (= u mutantu *bak1/serk4*), dochází k aktivaci Ca²⁺ kanálů. Ca²⁺ je transportován dovnitř buňky, tím se hyperpolarizace zmírňuje. Následně dochází k programové smrti.

Duální fyziologická role **BAK1** a **BKK1**

Double mutant *bak1bkk1* – letální:

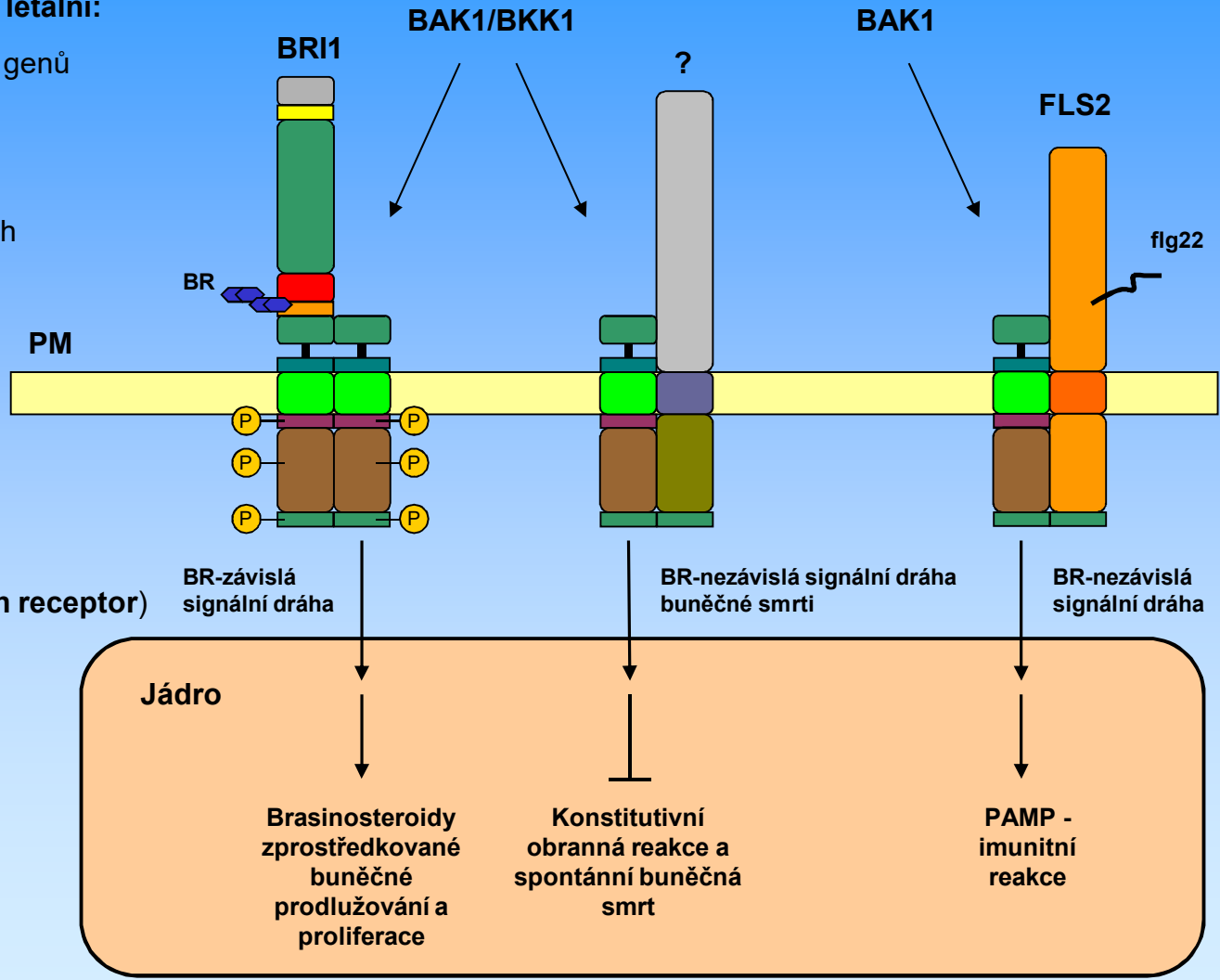
- konstitutivní exprese obr. genů
- ukládání kalózy
- akumulace ROS
- spontánní CD ve sterilních podmínkách

BKK1 = BAK1-like1

FLS2 = flagelin-sensitive

LRR receptor kináza 2 (PRR = pattern-recognition receptor)

PAMP = pathogen-associated molecular pattern



Update 2016

Lozano-Durán R, Zipfel C (2016) TIPS 20: 12-19

Review o úloze BRs v rostlinné imunitě.

Podle He et al. (2007) Current Biology 17: 1109-1115

Regulace genové exprese transkripčními faktory BES1 a BZR1

Sekvenování *Arabidopsis* genomu  metoda exprese genů - mikroarray

Identifikace stovek BR-indukovaných genů 

Up-regulované a down-regulované geny zapojené pravděpodobně v:

- syntéze a modifikaci buněčné stěny
- formaci cytoskeletu
- biosyntéze BR
- signálních drahách
- transportu BR

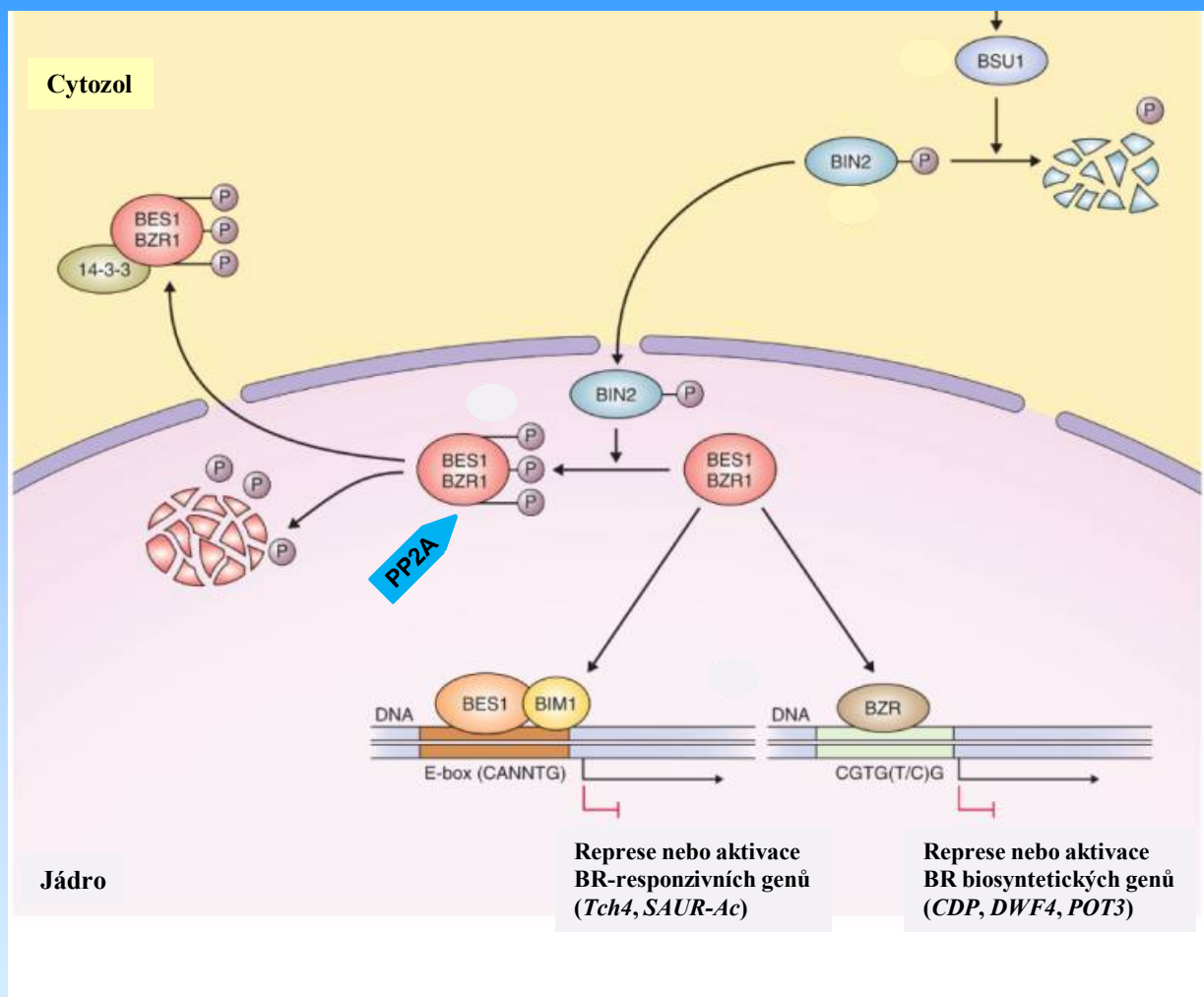
BES1 a BZR1 jsou z 90% identické, ale regulují odlišné skupiny genů.

Update 2017

Wang H et al. (2017) *Molecular Plant* 11: 315-325

ABA inhibuje BR signalizaci tím, že inhibuje ABI1 a ABI2, které defosforylují BIN2. Inhibicí ABI1 a ABI2 nedochází k defosforylaci BIN2 a tím BIN2 může inhibovat BES1.

Identifikace nových transkripčních faktorů interagujících s BES1

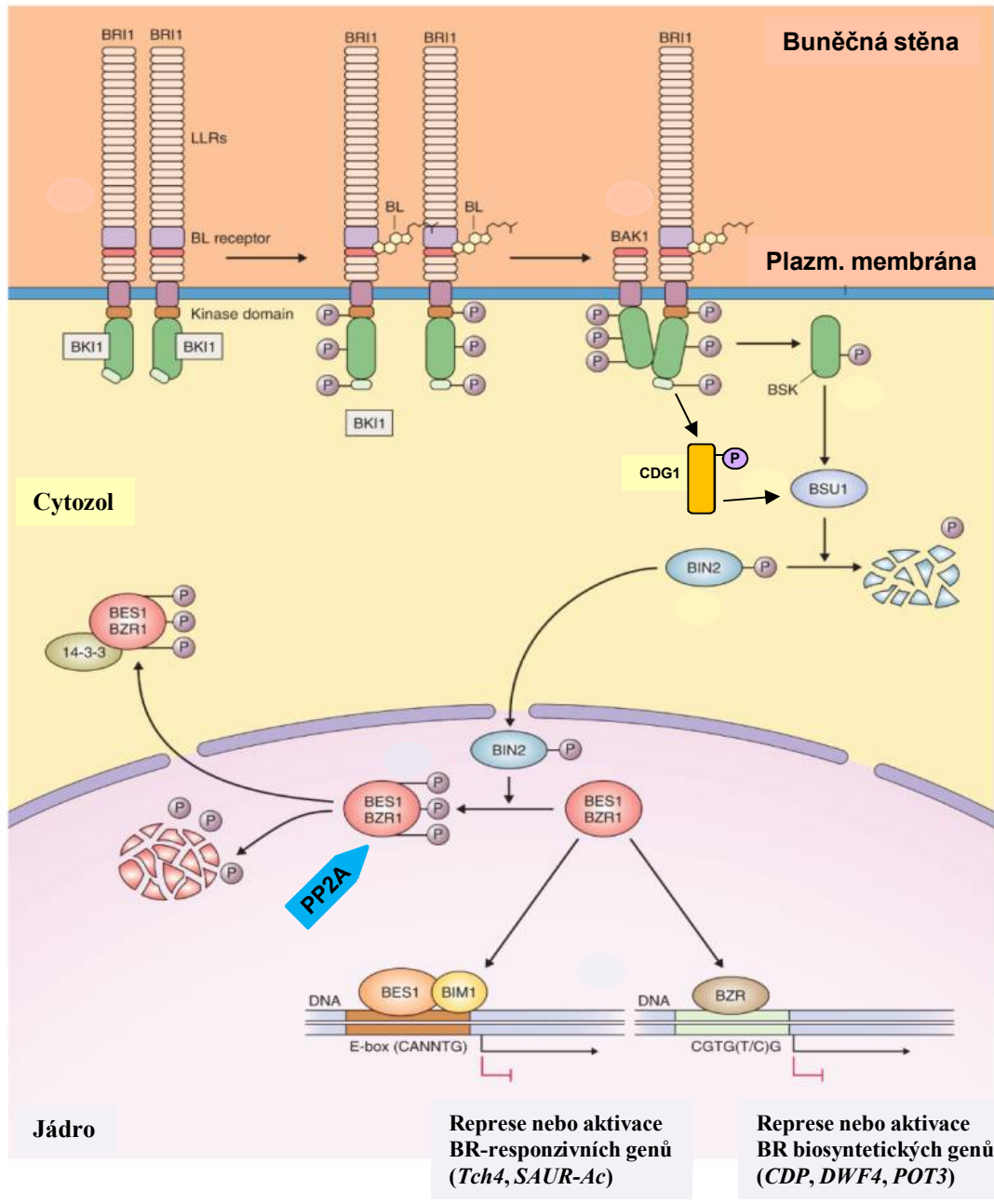


BES1
+
BIM1 (BES1-interacting Myc-like 1)
↓
BES1/BIM1 heterodimer
↓
Aktivace genové exprese vazbou k E-boxu

Update 2017

Chen J et al. (2017) Plant Cell 29: 1425-1439

Transkripční faktory WRKY46,54 a 70 přímo interagují s BES1 s společně regulují expresi terčových genů.



BZR1 – vazba k **BRRE** (**BR-responsive element**)



Inhibice exprese BR-biosyntetických genů

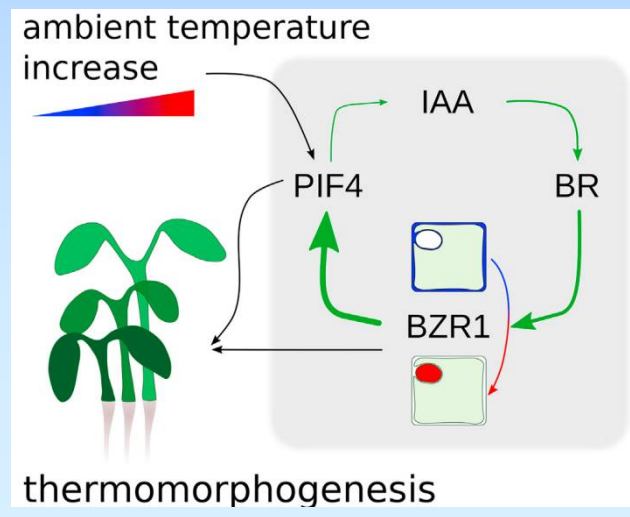


Zpětnovazebná regulace biosyntetické dráhy BR

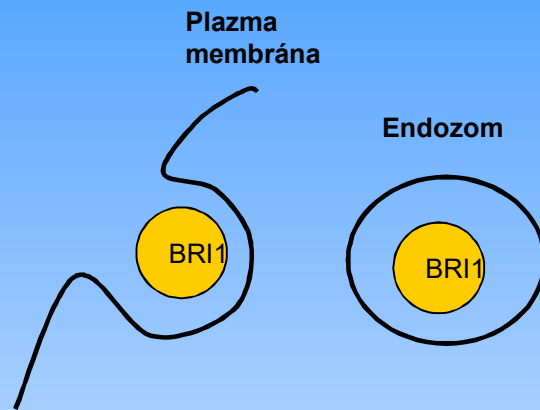
Update 2017

Ibañez C et al. (2017) Current Biology 28: 303-310

BRs a BZR1 hrají důležitou úlohu v termomorfoze.



Endozomální lokalizace BRI1



Endocytóza běžná u živočichů a kvasinek

- inaktivace receptoru (např. BOR1)
- aktivace signálu

Transport k cíli nebo transport do lysozomu a degradace

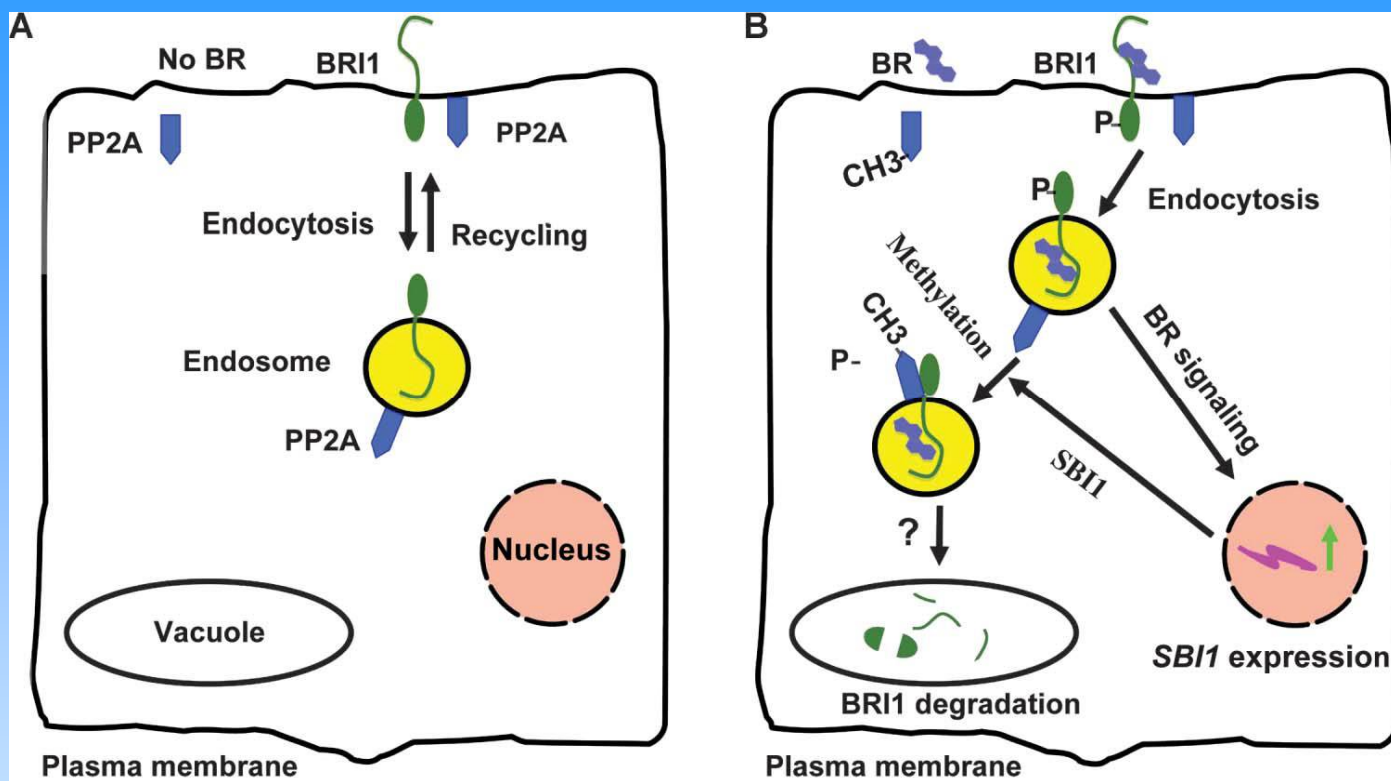
- distribuce BRI1 v PM či endozomech není změněna v BR-deficientních mutantech či po ovlivnění BR => endocytóza není závislá na aktivačním stavu BRI1

- endozomální BRI1 je konstitutivně aktivní

Důvody existence signální dráhy BRI1 prostřednictvím endozomů:

- doplňkový k PM BRI1 (nedostatek místa na PM)
- degradace BRI1 – utlumení signální dráhy

Brasinosteroidy kontrolují vlastní signalizaci.



Receptor BRI1 cykluje mezi membránou a endozomem. Když je BRI1 aktivován = fosforylován, tak v endozomální formě stimuluje expresi **SBI1** (Suppressor of *bri1*). **SBI1** kóduje **leucine carboxymethyltransferázu** (LCMT), a proto metyluje protein fosfatázu PP2A. Tím se usnadňuje asociace PP2A s aktivním BRI1. To vede k defosforylaci a degradaci receptoru BRI1. Tím dochází k inhibici signálu. Brasinosteroidy tak kontrolují vlastní signalizaci.

Update 2017

Zhou J et al. (2017) PNAS February 5, 2018 doi/10.1073/pnas.1712251115

Příjem BR receptorem BRI1 stimuluje ubiquitinaci tohoto BRI1 a asociaci s PUB12 a PUB13 prostřednictvím fosforylace serinu 344. PUB je U-Box E3 ubiquitin ligáza.

Klíčová slova pro příští přednášku

Drosophila

Insect hormone receptor

Ecdysone

Nuclear receptor

Ecdysteroid

Polytene chromosome

Ecdysteroid signaling

20E

EcR/USP

20-hydroxyecdysone

Google: <http://www.google.cz/>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

b) Podobné účinky brasinosteroidů a steroidů

Účinky ecdysteroidu na růst a vývoj hmyzu:

- morfogeneze
- proliferace
- syntéza kutikuly
- vývoj vajíčka
- časování vývoje
- PCD



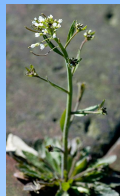
Společné prvky s vývojovými a fyziologickými reakcemi rostlin k BR, které zahrnují:

- regulaci genové exprese
- diferenciaci buněk
- expanzi buněk
- buněčné dělení
- homeostázu
- PCD

1) BR a ecdysteroid regulují změny tvaru buněk spojené s dozráváním

BR: regulace exprese genů kódujících proteiny spojené s buněčnou stěnou a zapojené v expanzi buněk

Ecdysteroid: spouštění morfogeneze struktur dospělců během metamorfózy -
- změna tvaru buněk na úrovni cytoskeletálního aktinu



Rostliny



Přítomnost rigidní buněčné stěny



Regulace tvaru buňky
změnami v hladině proteinů
spojených s buněčnou stěnou



Hmyz



Integrita buňky – interní cytoskelet



Regulace tvaru buňky
změnami cytoskeletu

2) BR a ecdysteroid regulují programovou smrt buňky

Ecdysteroid: spouští masivní smrt tkání larev během ranných fází metamorfózy

Ecdysteroid **20E** (slinné žlázy larev během regulace)

Indukce tkáňově specifických genů klíčových pro PCD



Např. geny: *E93*

reaper

hid

ark

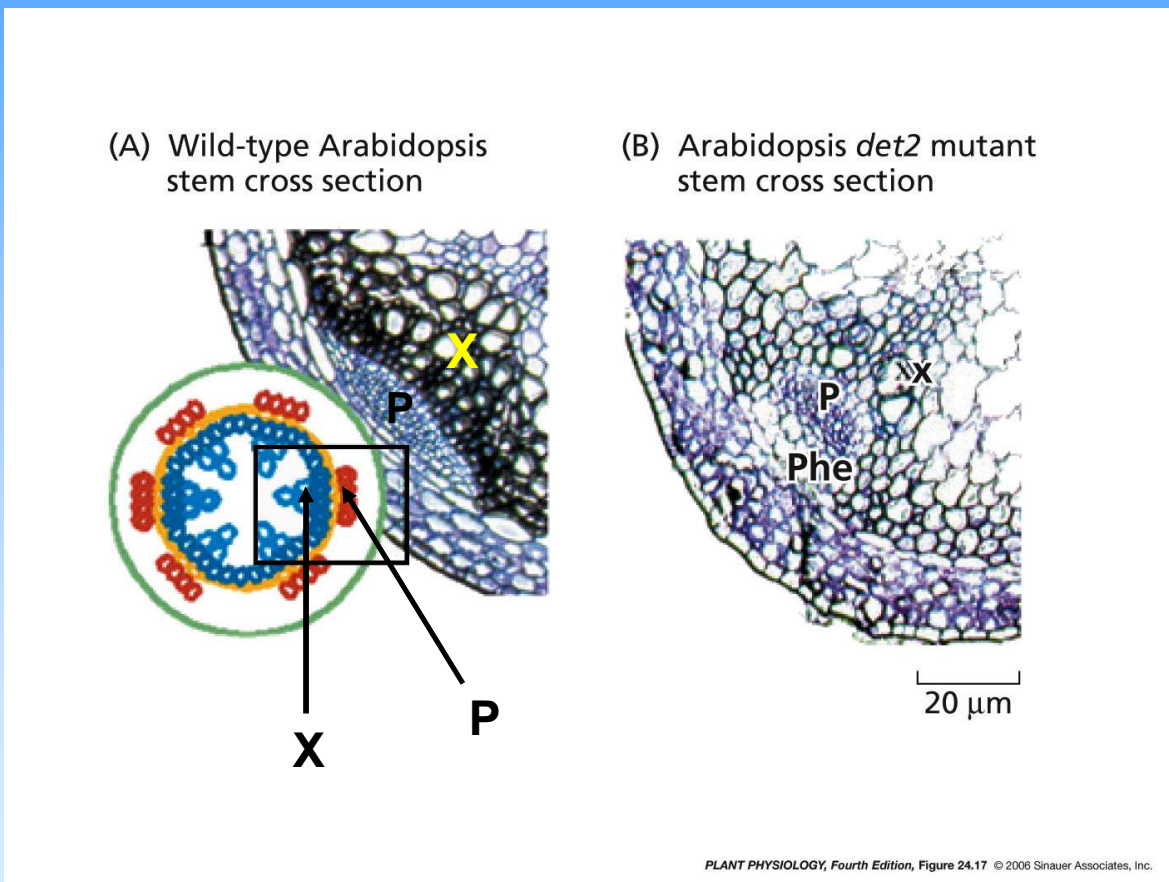
dronc

croquemort

Ecdysone = prekurzor 20E

(periferní tkáň)

BR: indukují PCD → vznik **tracheálních elementů**
(xylém – transport vody rostlinami)



BR-deficientní mutant *det2*



Abnormální xylém

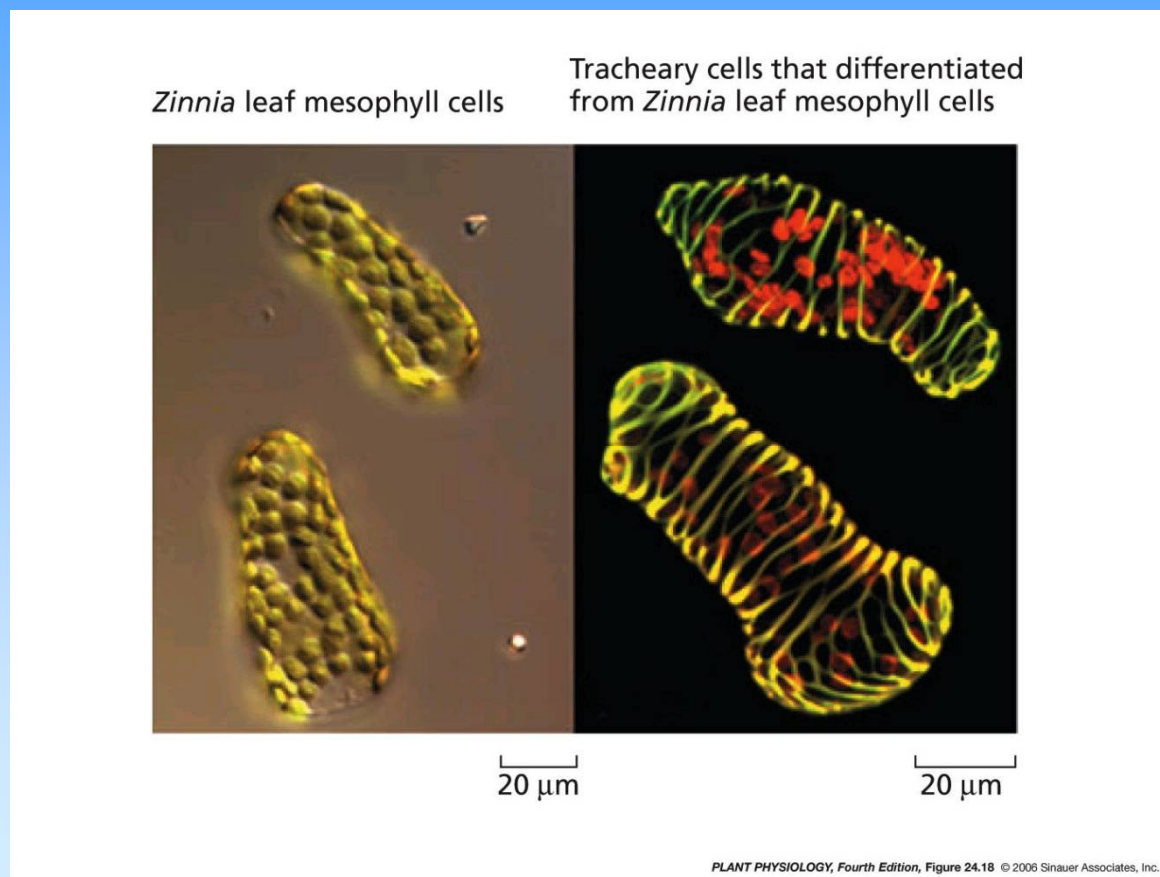


BR jsou zapojeny v tvorbě xylému

Xylém je tvořen tracheidy

BR stimulují diferenciaci tracheid - modelový systém zinia (*Zinnia elegans*)

Mezofylové buňky diferencují v tracheální elementy vlivem auxinů, GA a BR.



Mezofylové buňky inkubované
2 - 3 dny v médiu s BR

Uniconazol (inhibitor BR)



Chrání buňky před diferenciací

BR překonává ochranu

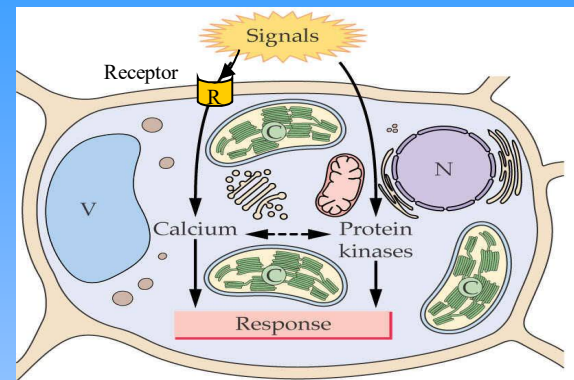


BR iniciuje poslední krok
cytodiferenceciace = PCD

Molekulární mechanismus
není znám

c) Ecdysteroidy - *Drosophila*

Klasická signální dráha



Signální dráha s receptorem uvnitř buňky (jaderný receptor)

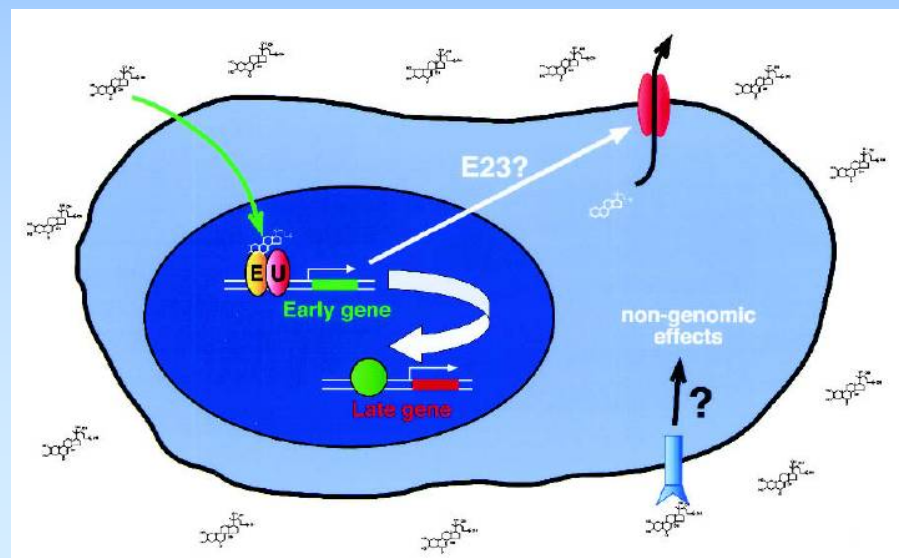


V jednom kroku:

- příjem signálu
- reakce k signálu

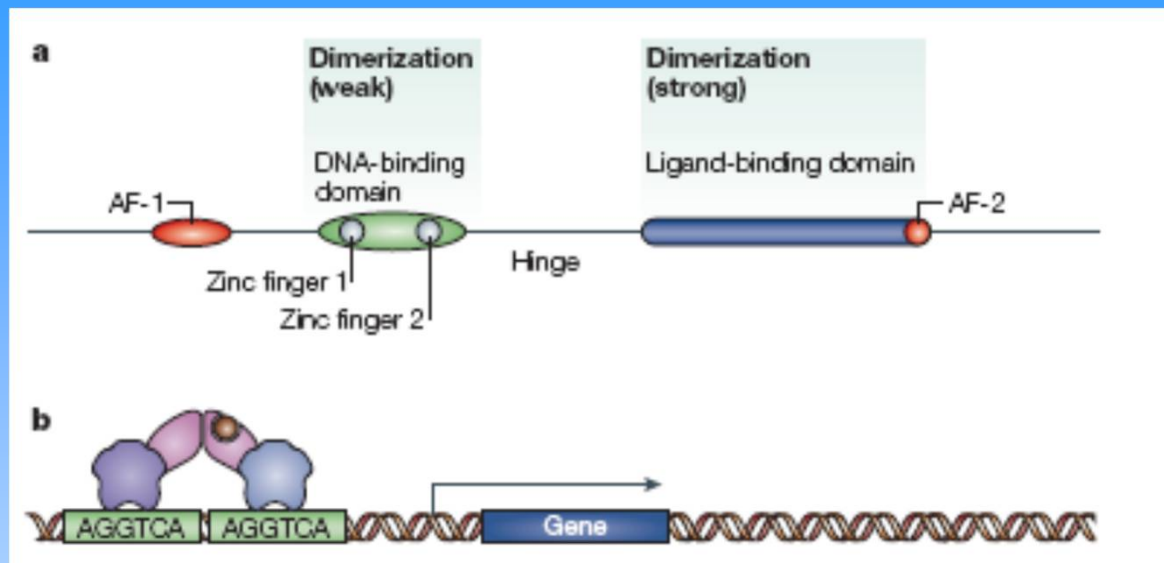


Unikátní struktura jaderného receptoru



Unikátní struktura jaderného receptoru

Jaderné receptory –
vývojově velice staré



Ligand-binding doména (LBD) – méně konzervovaná C-terminální

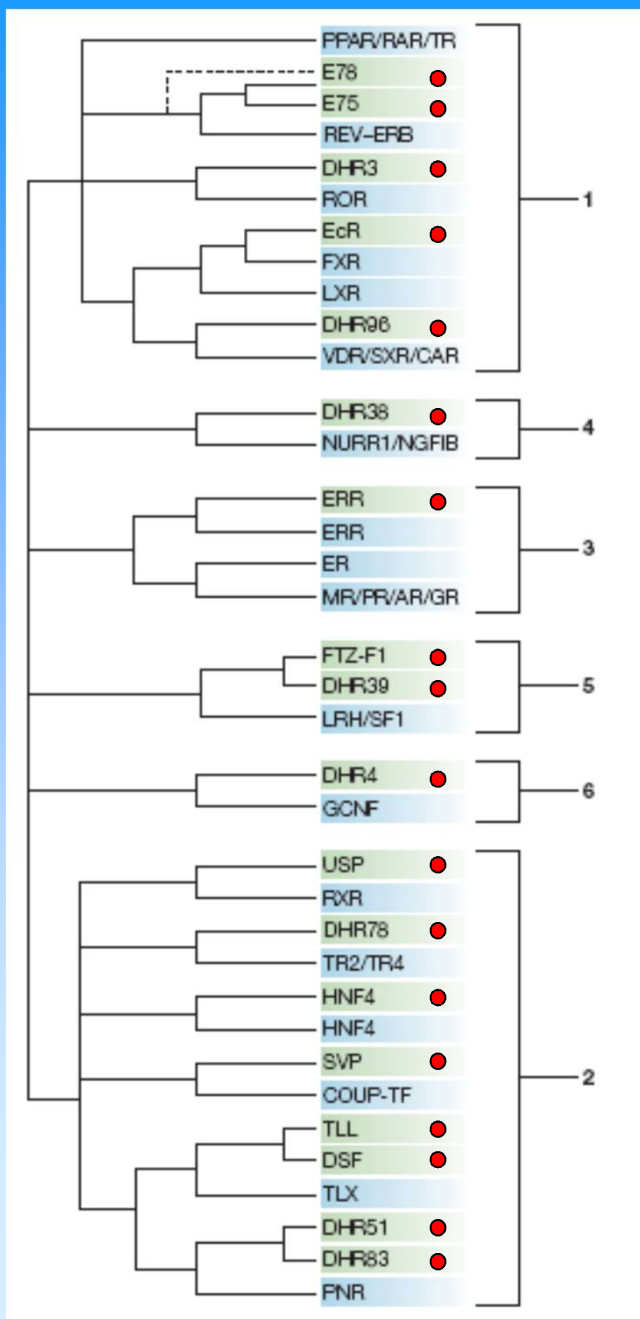
DNA-binding doména (DBD) – vysoce konzervovaná

AF-1, AF-2 – domény s Aktivační Funkcí pro transkripci

Drosophila – 2 fyziologicky aktivní lipofilní hormony (20E, JH); genom obsahuje pouze 18 genů pro jaderné receptory (člověk 48 genů)

Drosophila – jednoduché signální dráhy – modelový systém





6 odlišných podskupin jaderných receptorů se společnou konzervovanou doménou mezi DBD a LBD.

- 18 jaderných receptorů u *Drosophily* (+ 3 pouze s DBD)

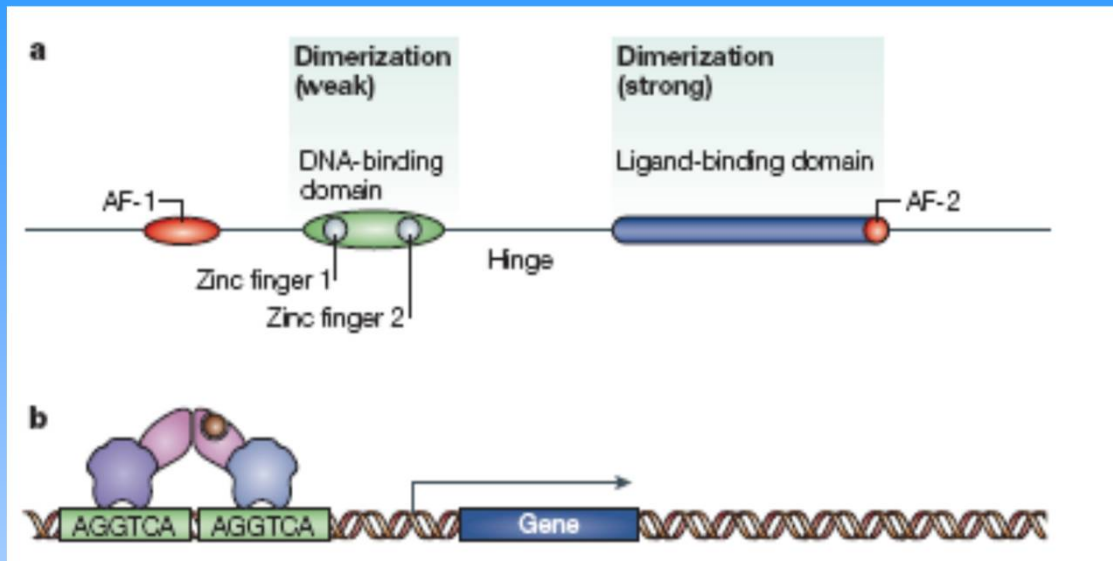
Známé jaderné receptory obratlovců pro:

- estrogen (ER)
- glukokortikoid (GR)
- thyrodní hormon (TR)
- retionovou kyselinu (RAR)
- retinoid X (RXR)

Ligandy jaderných receptorů = lipofilní molekuly

Orfan receptor – jaderný receptor bez známého přirozeného ligandu; mohou fungovat nezávisle na ligandu

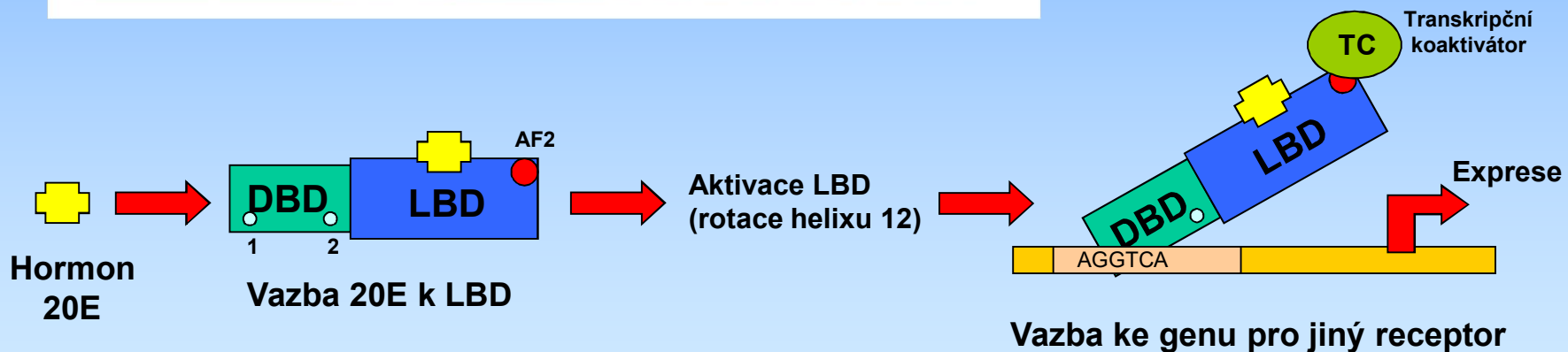
Princip fungování jaderného receptoru



DBD – 2 zinc fingers:

1. Poskytuje DNA-binding specificitu prostřednictvím P-boxu (5 aminokyselin)
2. Dovoluje dimerizaci DBD oblastí

LBD – tvořena 11-13 α -helixy, které formují vazebné místo pro ligand

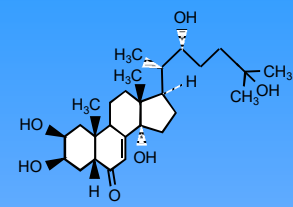
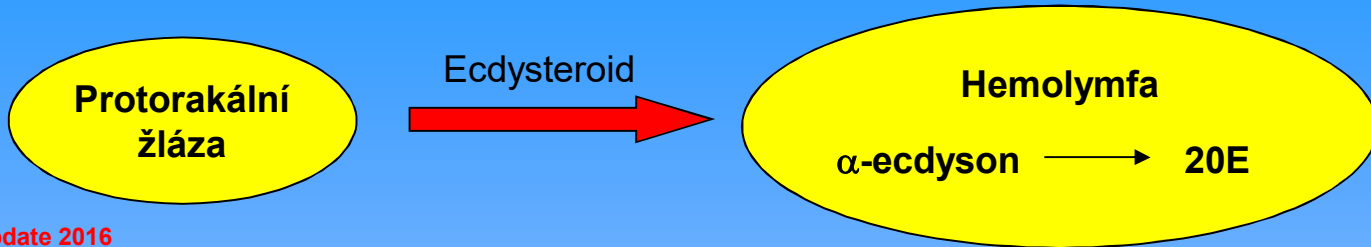


Při aktivaci genů prostřednictvím jaderných receptorů dochází ke změnám v organizaci chromatinu.



NURF - NUcleosome REmodeling FAcTOR – transkripční koaktivátor; ATP-dependent chromatin remodeling enzym; váže se na LBD v závislosti na koncentraci 20E.

Regulační kaskády 20-hydroxyecdysonu

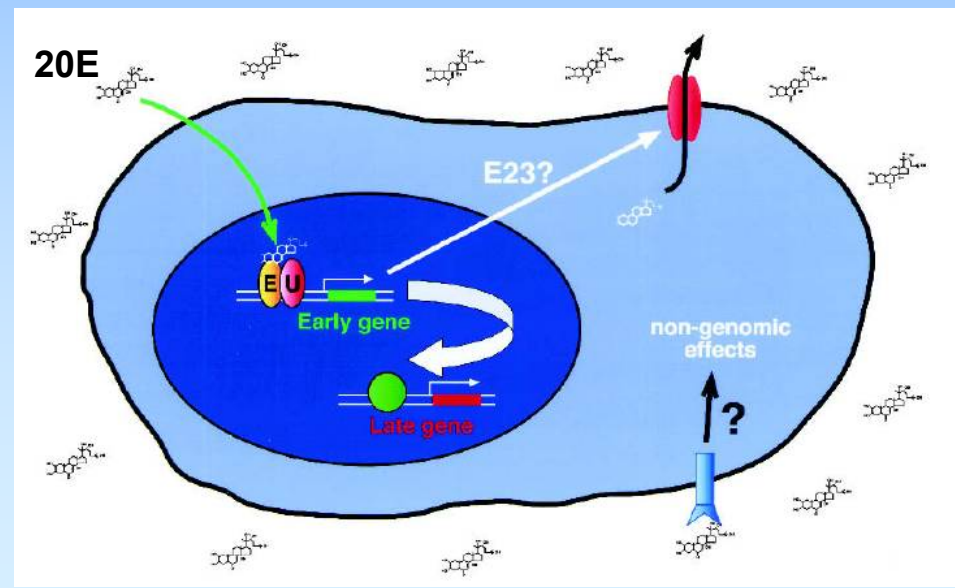


Update 2016
 Mansilla A (2020) Cell Death and Differentiation 23: 405-416

V období před metamorfózou protorakální žláza neprodukuje ecdysteroid a pro svoje přežití vyžaduje aktivitu receptorů EcR a USP. Pokud by EcR a USP nebyly aktivní, docházelo by programové smrti buněk a zániku této žlázy. V udržování protorakální žlázy aktivitou EcR a USP není hormon 20E zapotřebí.

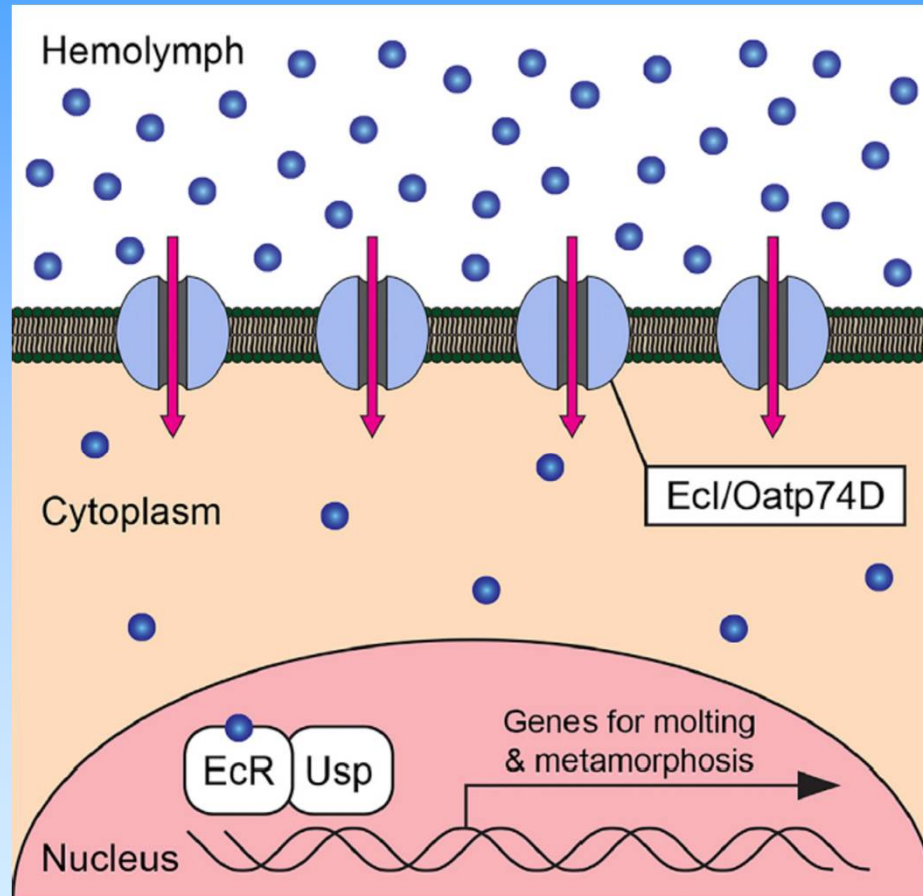
Produkce ecdysteroidů v protorakální žláze je ovlivňována výživou – serotonergické neurony propojují protorakální žlázu s nervovým systémem trávicího traktu (vnějším prostředím)

- Nukleární receptor hormonu 20E:
- Heterodimer EU
- EcR – receptor pro 20E
- USP – ultraspiracle



Transport ecdysonu

Steroidní hormony – lipofilní hormony => transport přes membránu volnou difúzí



Update 2018

Okamoto N et al. (2018) *Developmental Cell* 47: 294-305

20E však vyžaduje pro svůj transport z hemolymfy do buňky proteinový transportér.

Identifikace a charakterizace transportéru pro ecdyson:

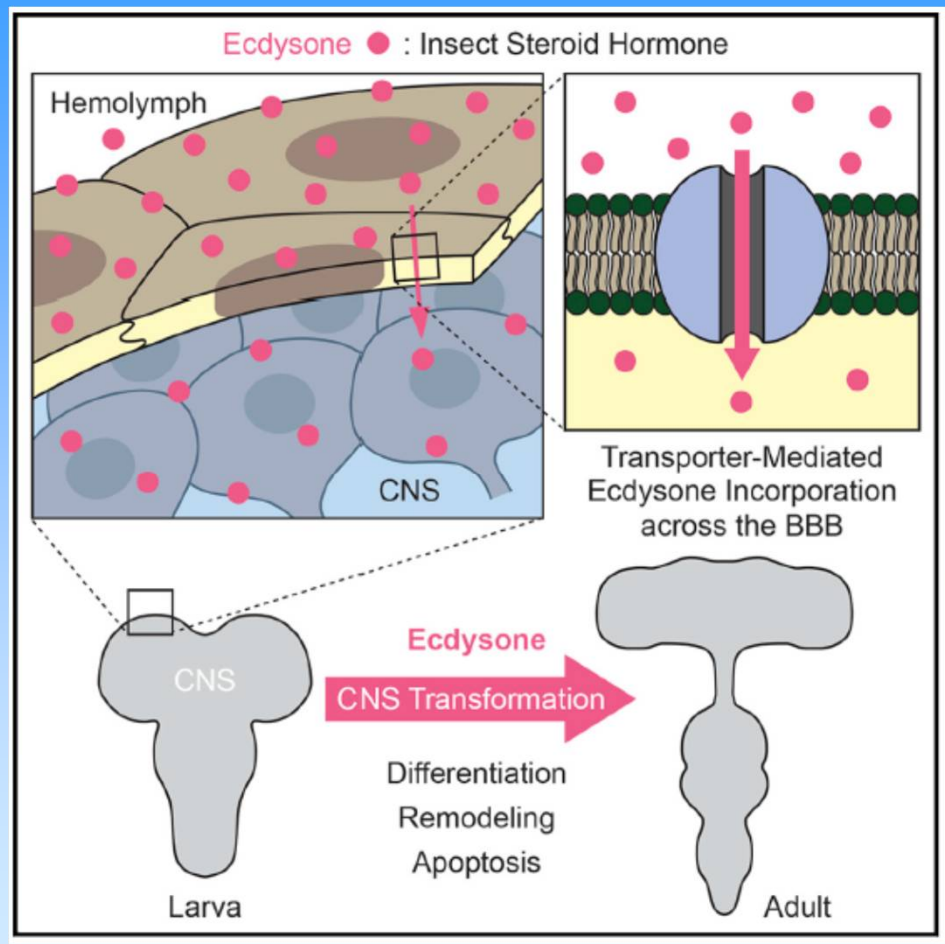
Eci = Ecdysone Importer

Gen **Eci** kóduje polypeptid nazvaný OATP (Organic Anion Transporting Polypeptide), konkrétně **Oatp74D**

Eci – vysoce konzervovaný polypeptid u hmyzu a jiných živočichů, kteří využívají jako hormon ecdyson. Patří do skupiny velké evolučně konzervované rodiny proteinů **SLCO** (SoLute Carrier Organic anion)

Eci – lokalizovaný na plazmatické membráně buněk v tkáních, které ecdyson přijímají.

Ecdyson 20E je transportován z hemolymfy pomocí transportéru **Ecl** i do mozku (CNS)



20E je nejprve sekretován do hemolymfy a pak teprve do mozku.



Jak se dostává 20E z hemolymfy do mozku (tj. přes **BBB = blood-brain barrier**)?

Ecl – vysoce exprimován v gliových buňkách, které tvoří bariéru BBB.

Vypnutí genu **Ecl** – potlačení ecdysonové signalizace v CNS a blokáce ecdysonem zprostředkovaných neuronových událostí během vývoje.



Ecl – nezbytný pro vývoj CNS

Update 2020

Okamoto N and Yamanaka N (2020) Current Biology 30: 1-8

Konec embryogeneze

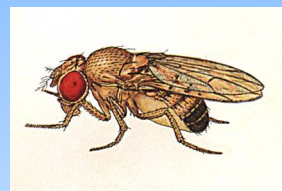


3 larvální stádia

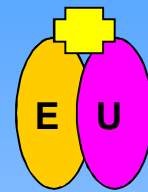


Metamorfogeneze

Proces dospívání



Pulzy produkce 20E



Molekulární a genetické studie *Drosophily*



20E je klíčový hormon v determinaci časování vývoje hmyzu

k vnějšímu prostředí (dimorfismus)

Reakce:

morfogenetické

apoptické

fyziologické

reproduktivní

chování

Absence 20E: EcR působí jako represor diferenciacce sensorických neuronů v křídlech *Drosophily*

Přítomnost 20E: Vazba 20E k EcR - uvolnění represe

- Další funkce 20E:
- nezbytný regulátor dlouhodobé paměti - reguluje formování neuronů
 - nezbytný regulátor spánku (spolu s juvenilním hormonem JH)
 - regulátor imunitních reakcí embrya *Drosophily*
 - zapojen do procesu ovulace (spolu s receptorem EcRB2)



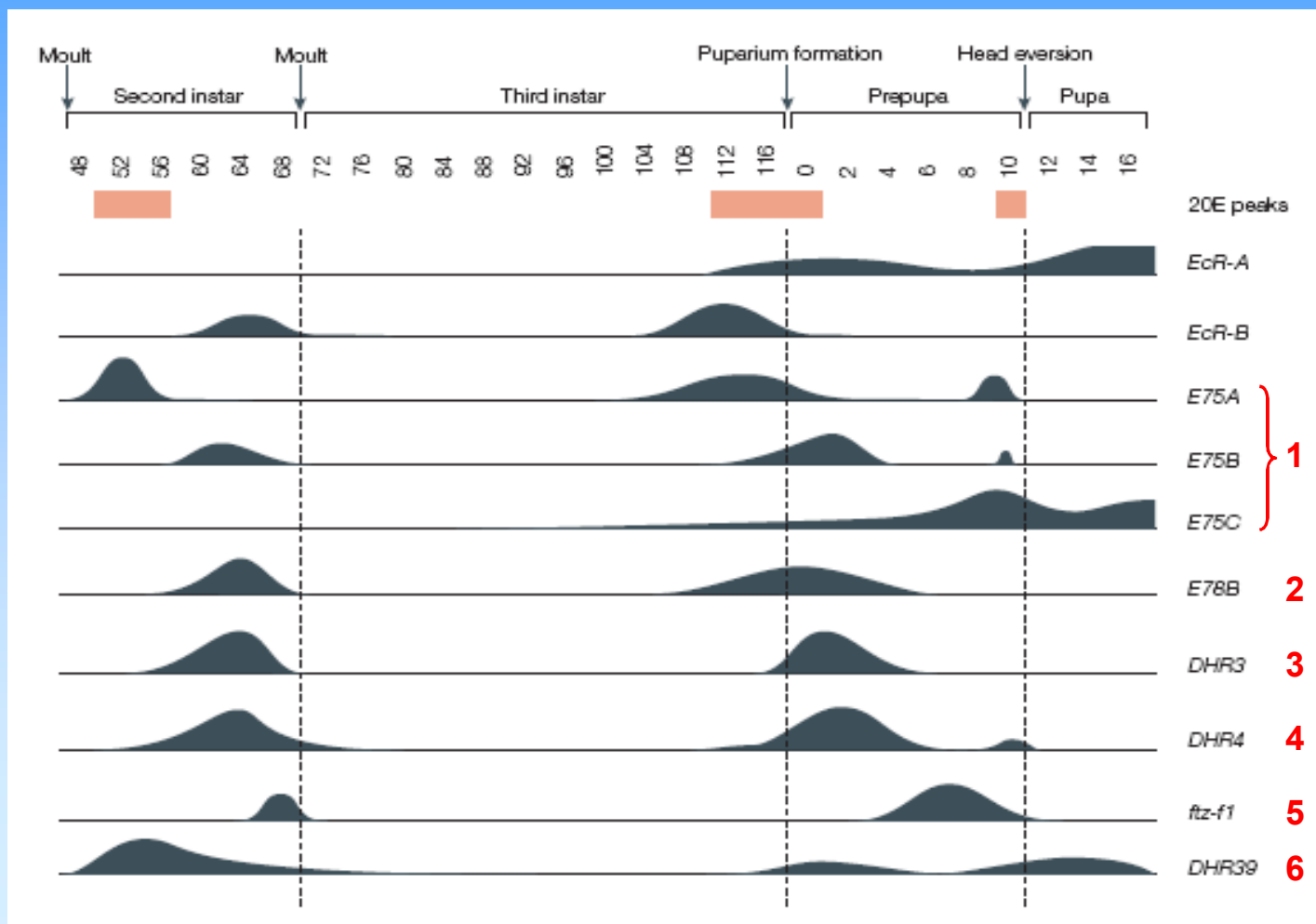
Spodoptera litura

Update 2015
Huang L-X et al. (2015) *Insect Science* 22: 95–105

Existují izoformy EU: EcRA/USP2
EcRB1/USP1

20E reguluje transkripčně EcR + **6 dalších genů** pro jaderné receptory

Množství mRNA těchto genů se mění synchronně s pulzy ecdysteroidů

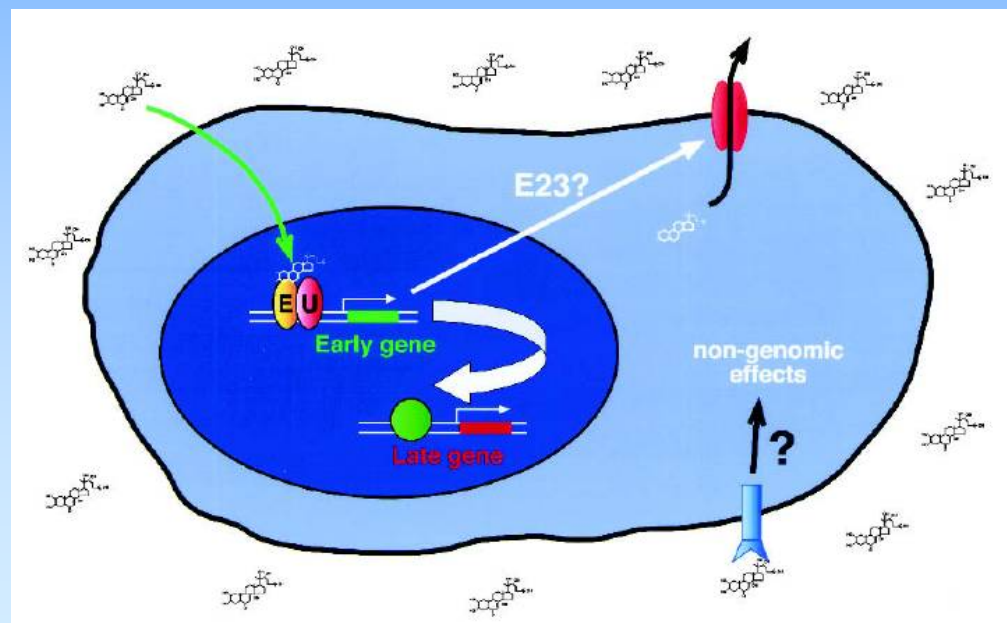
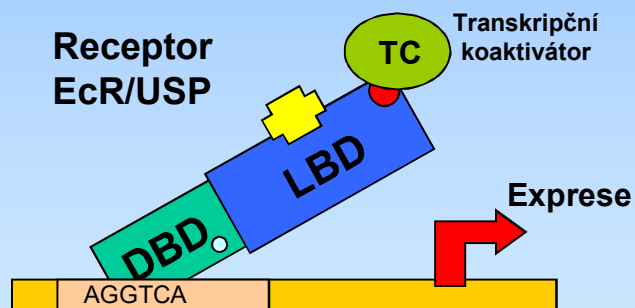


20E reguluje signální dráhy exprese genů pro jaderné receptory, a to prostřednictvím vazby na receptorový komplex heterodimeru EcR/USP.

Geny pro jaderné receptory:

- E75
- E78
- DHR3
- DHR4
- DHR39
- ftz-f1

DHR = Drosophila Hormone Receptor
ftz-f1 = fushi tarazu transcription factor1



Geny *E75* a *E78* jako cíle komplexu 20E-EcR/USP

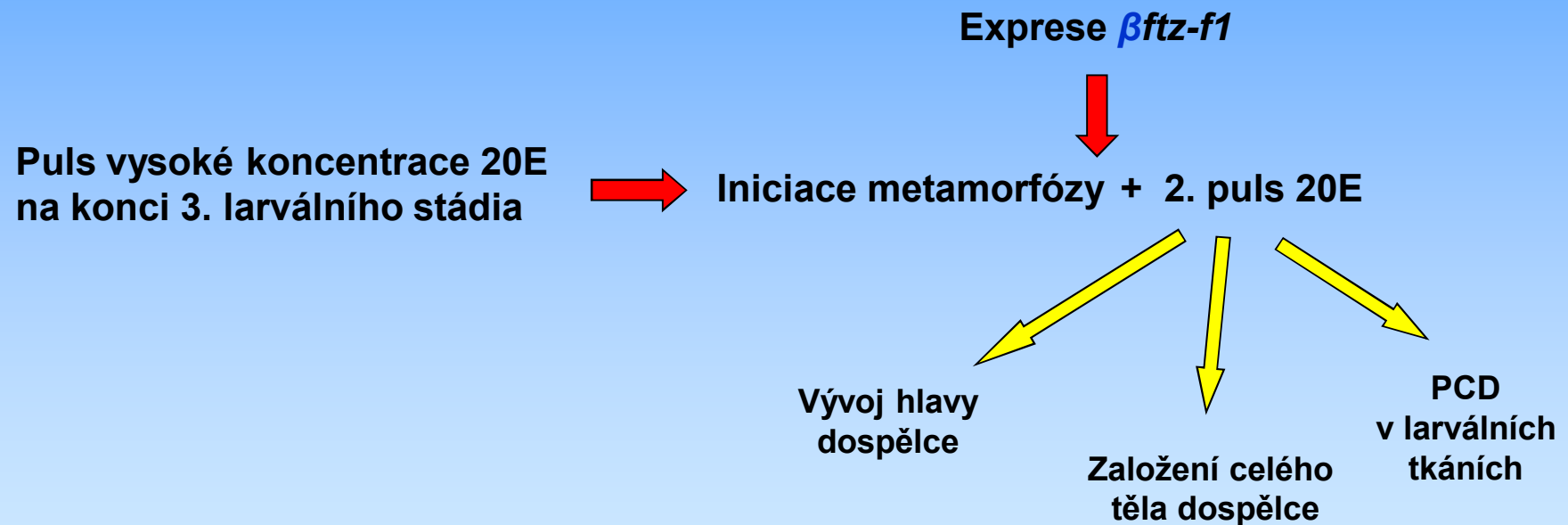
- ❑ *E75* a *E78* jsou orfan receptory – nemají známé ligandy; *E75* nepostradatelný pro samičí fertilitu
- ❑ Receptor *E75* má hemovou skupinu na LBD => možnost vazby NO (oxid dusnatý) a CO (oxid uhelnatý) => NO a CO modulují aktivitu *E75*

Geny *DHR3* a *DHR4* jako cíle komplexu 20E-EcR/USP

- ❑ *DHR3* a *DHR4* – orfan receptory; *DHR3* nezbytná funkce během embryogeneze; *DHR4* nezbytný pro načasování zakuklování

Geny *ftz-f1* a *DHR39* jako cíle komplexu 20E-EcR/USP

- λ *ftz-f1* – raná fáze embryogeneze; β *ftz-f1* – pozdní stádia vývoje, zapojen do syntézy ecdysteroidu, nezbytná úloha v pozdní fázi vývoje larvy a kukly; oba geny nutné pro životaschopnost



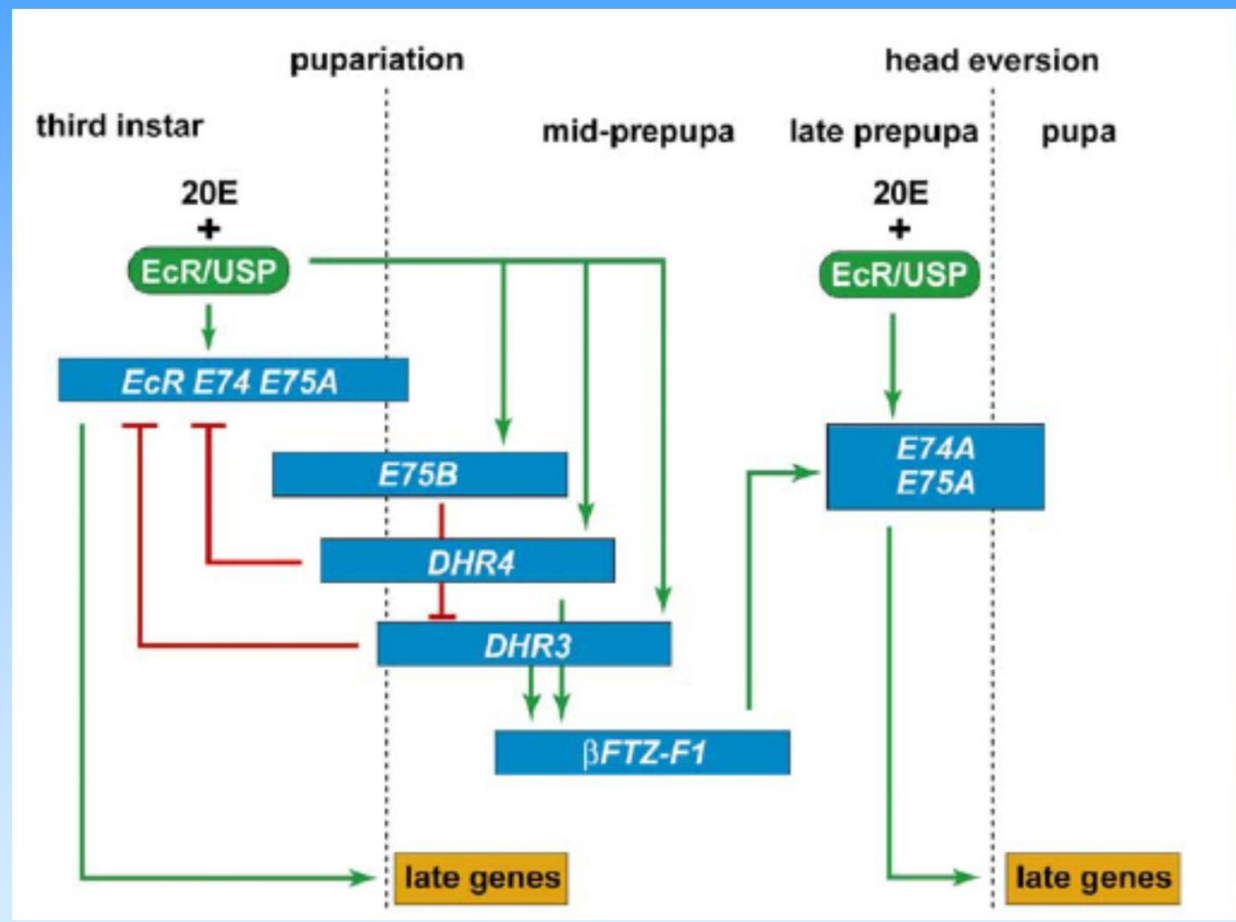
- *DHR39* – sekvenčně podobný s *ftz-f1*; předchází expresi β *ftz-f1*; *DHR39* je downregulován, když hladina β *ftz-f1* je maximální

Přehled všech 18 jaderných receptorů u *Drosophila*

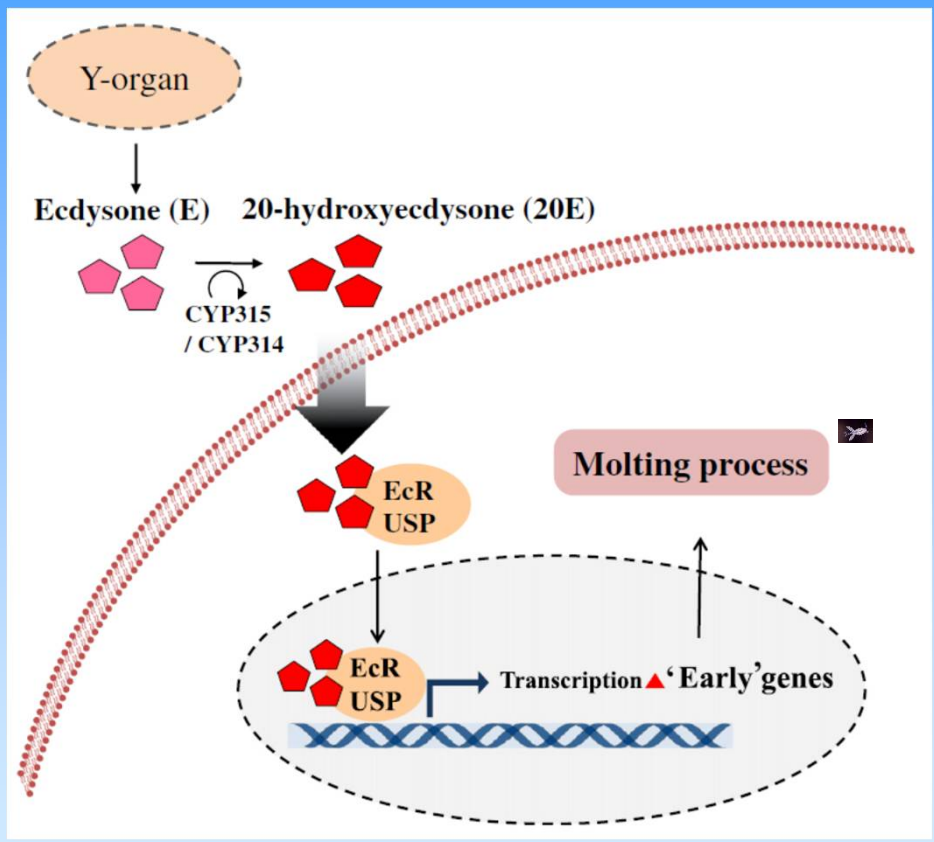
Table 1 | *Drosophila melanogaster* nuclear receptors

<i>D. melanogaster</i> receptor (ligand)	Subfamily	Nomenclature	20E-regulated	No. of isoforms (PR/PP/RNA)	Human orthologue (ligand)	DBD/LDB identity
E75	1D/E	NR1D3	+	3/4/4	*REV-ERBA	80/25
E78	1D/E	NR1E1	+	2/3/2	*REV-ERBA	69/23
DHR3	1F	NR1F4	+	1/3/3	*RORB (all trans retinoic acid)	76/35
EcR (20-hydroxyecdysone)	1H	NR1H1	+	3/3/5	FXR (chenodeoxycholic acid) *LXR (22(R)-hydroxycholesterol)	72/28 64/37
DHR96	1J	NR1J1	(+)	1/1/2 ^s	*VDR (1 α , 25-dihydroxyvitamin D ₃)	55/20
HNF4	2A	NR2A4	?	1/3/3	*HNF4A	89/61
USP	2B	NR2B4	-	1/1/1	RXRA (9-cis-retinoic acid)	84/43
DHR78	2C/D	NR2D1	(+)	1/2/4 ^t	*TR2	67/23
Tailless	2E	NR2E2	?	1/1/1	TLX	80/34
Dissatisfaction	2E	NR2E4	?	1/1/1	TLX	74/35
DHR83/CG10206	2E	NR2E5	?	0/1/1	PNR	60/20
DHR51/CG16801	2E	NR2E3	?	0/2 ^t /2 ^t	PNR	70/47
Seven up	2F	NR2F3	?	1/3/3	*COUP-TF1	89/92
ERR	3B	NR3B4	?	0/2/2	*ERRb (diethylstilbestrol)	88/34
DHR38	4A	NR4A4	-	2/2/2	*NURR1	93/59
FTZ-F1	5A	NR5A3	+	2/2/3 ^s	LRH-1 (phospholipid) SF-1 (phospholipid)	89/35 88/28
DHR39	5A	NR5B1	+	2/2/2	LRH-1 (phospholipid) SF-1 (phospholipid)	62/25 60/26
DHR4	6A	NR6A2	+	1/2 ^t /2 ^s	GCNF	61/21

Schéma regulace genů pro jaderné receptory komplexem 20E-EcR/USP během metamorfózy



Identifikace, molekulární charakteristika a exprese jaderných receptorů EcR a USP v *Paracyclopsina nana*



Paracyclopsina nana Smirnov, 1935

Hlady mRNA EcR a USP jsou vývojově specifické pro post-embryonická stádia.

Znečištění vody (WAFs 40 až 80%) způsobuje změny v expresi EcR a USP:

USP – down-regulace v 1. larválním stádiu; up-regulace u dospělců



EcR a USP jako možné biomarkery znečištění vody

Update 2017

Puthumana J et al. (2017) Comp Biochem Physiol, part C 192: 7-15

Studie zvětšování polytenních chromozomů ve slinných žlázách larev



Znalost molekulárních mechanismů účinků ecdysteroidů

<http://en.wikipedia.org/wiki/Drosophila>

Becker (1959)

Clever a Karlson (1960)



Ashburner (1974) – kultivace slinných žláz v přítomnosti 20E



Charakterizace nafukovacích reakcí chromozomů (puffing)



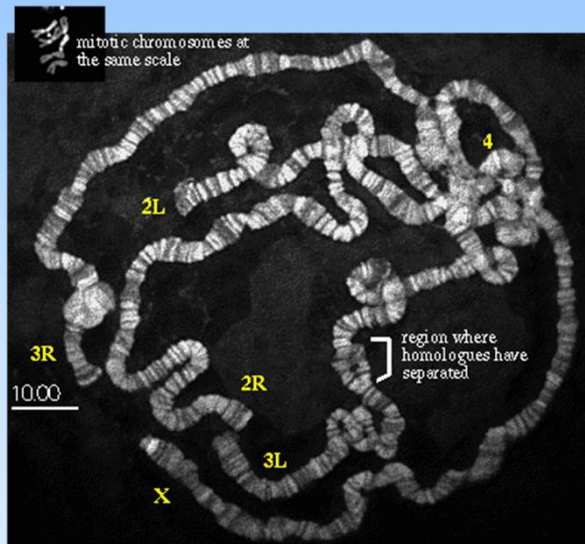
Důkazy: genetická reakce k ecdysteroidu zahrnuje > 100 puffů



Postulace steroidy-indukované regulační kaskády:

20E přímo indukuje malé skupiny ranných regulačních genů reprezentujících asi 6 puffů na polytenních chromozomech.

Proteiny ranných genů jsou lokalizovány v místech puffů a mají pravděpodobně **2 opačné funkce:**



http://www.ucsf.edu/sedat/polytene_chrom.html

- 1) Potlačují svoji vlastní expresi – samo-zeslabující funkce
- 2) Indukují expresi velké řady genů zapojených v sekundárních reakcích; pozdější geny kontrolují biologické reakce k ecdysteroidům

Molekulární studie v posledních letech => potvrzení Ashburnerova modelu fungování ecdysteroidu

Genetické reakce k brasinosteroidům a steroidům - podobnosti a rozdíly

Microarray výsledky: *Arabidopsis*: 8000 testovaných genů => 50 regulovaných BR

Drosophila: 31% ze 465 testovaných EST ukazuje silnou indukci ecdysteroidy (až 3x silnější)

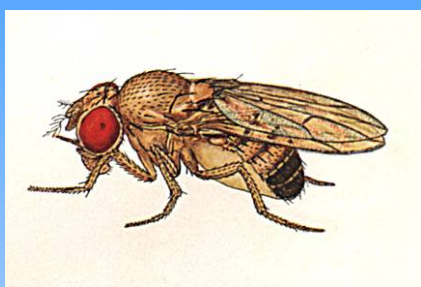
Arabidopsis: 27 tisíc genů

Drosophila: 14 tisíc genů

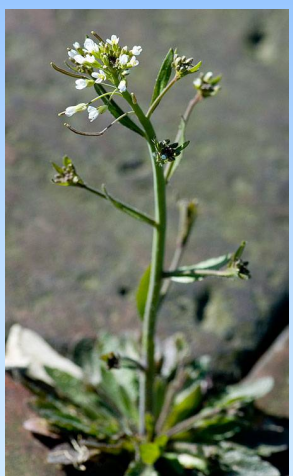
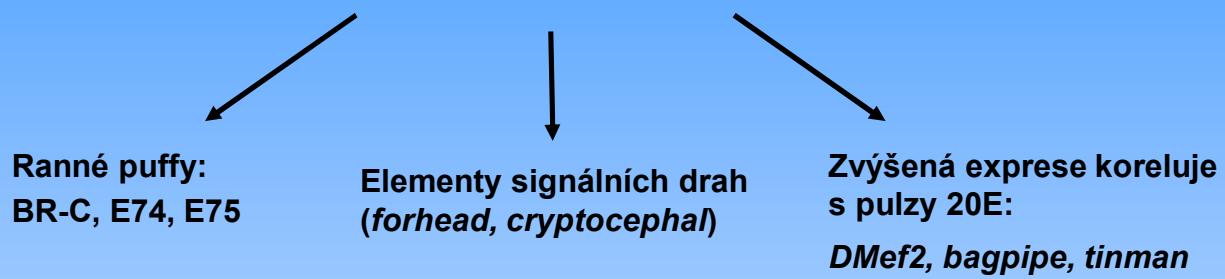


- 1) Genetické reakce u *Drosophily* jsou složitější než u *Arabidopsis*

Počet steroidy indukovaných genů kódujících transkripční faktory: *Drosophila* > *Arabidopsis*



~ 12 genů kódujících transkripční faktory indukovaných 20E



Arabidopsis: BR indukují relativně malé změny v genové aktivitě (2-4x); silněji indukované geny nebyly identifikovány

Drosophila: 20E indukuje velmi silné změny v aktivitě ranných genů (>>4x)

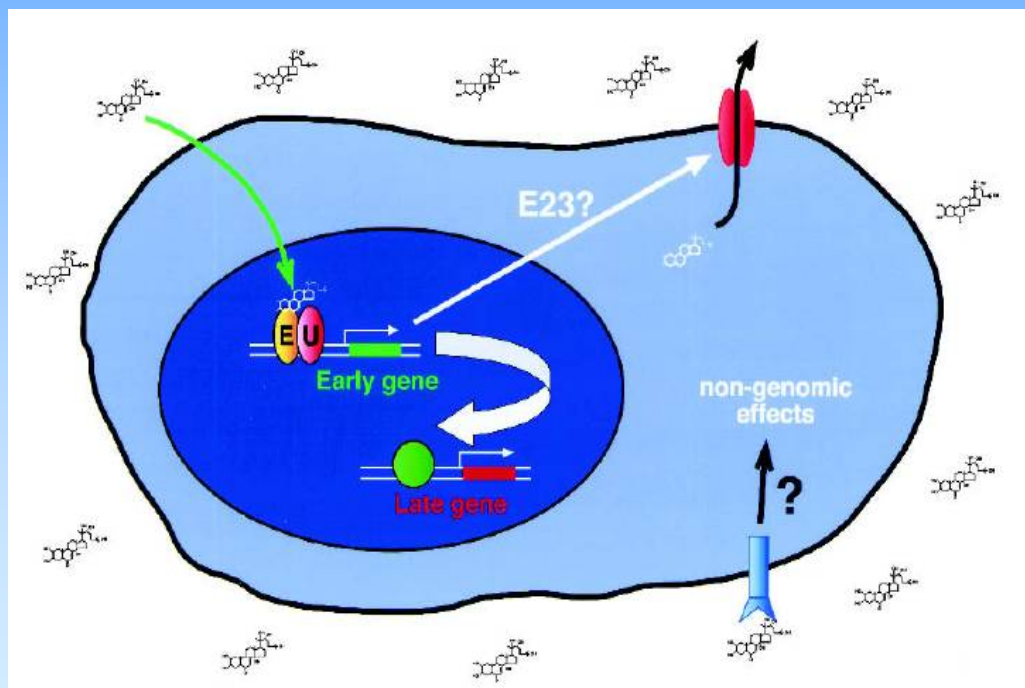


2) Genetické reakce k ecdysteroidům u *Drosophily* jsou řádově silnější než reakce genů u *Arabidopsis* indukovaných BR

Hmyzí metamorfóza – rychlá a masivní změna plánu → Složitější indukce genové aktivity

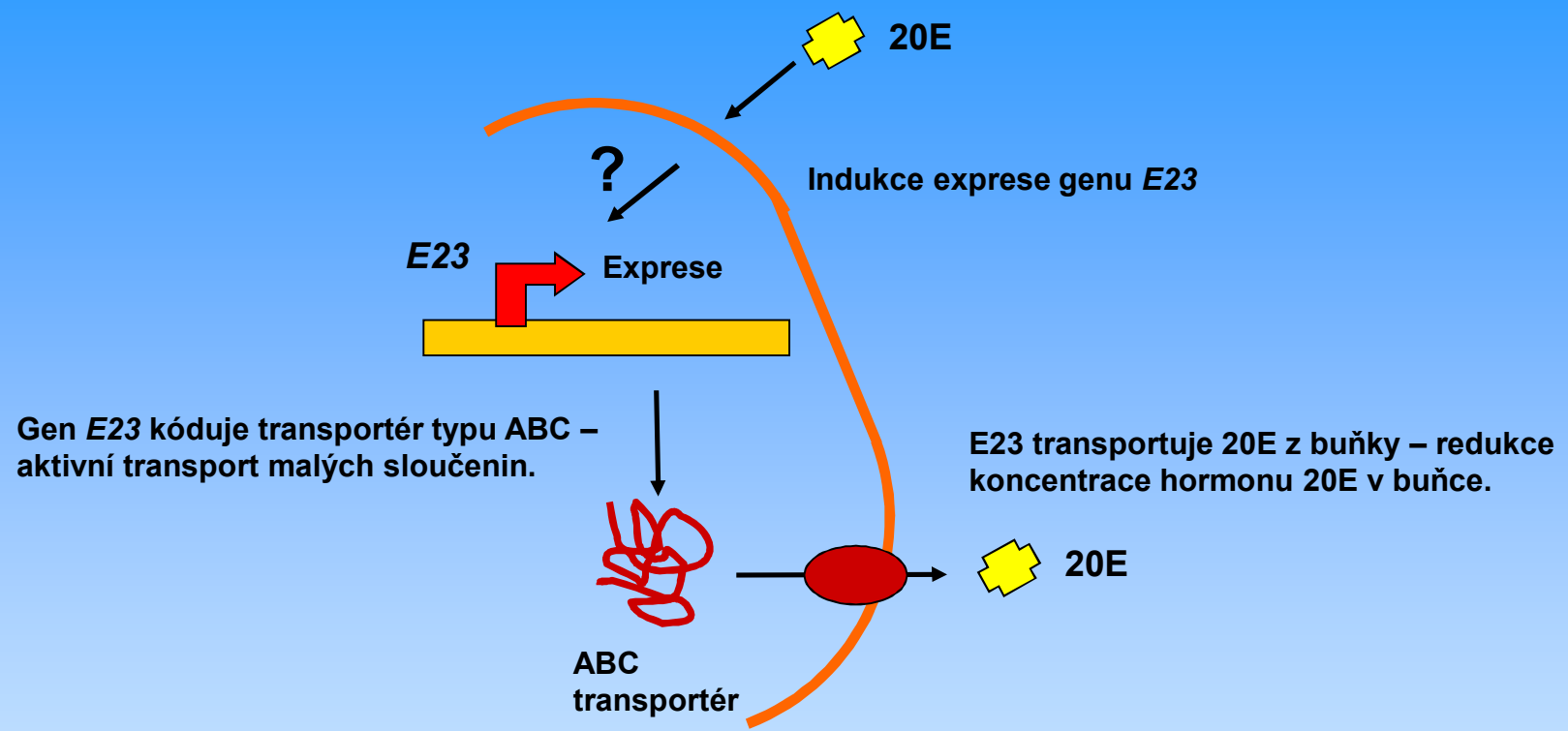
Mimojaderná regulace ecdysteroidních signálních drah

Důkazy pro regulaci signální dráhy v cytoplazmě \neq Fosforylační kaskáda spouštěná BR



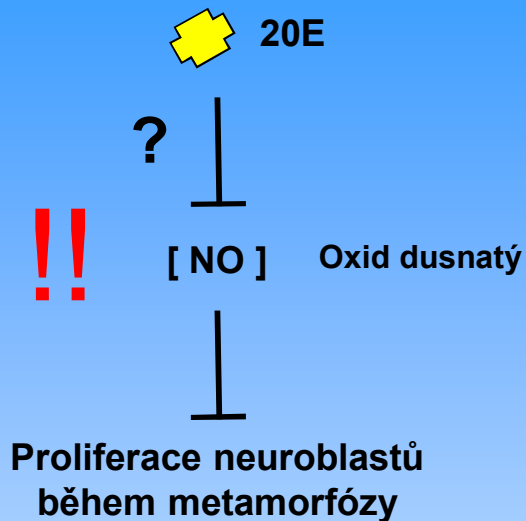
4 úrovně mimojaderné regulace signálních drah:

- 1) Binding aktivita EcR/USP vyžaduje interakci s chaperony; chaperony se však vyskytují v cytoplazmě
- 2) Metabolická inaktivace hormonu; (existuje i u brasinosteroidů); enzymy P450 inaktivují 20E
- 3) Modulace hladiny ecdysteroidů – gen E23 indukovaný hormonem 20E moduluje hladinu hormonu 20E (tj. sám sebe) v buňce



Studie gain-of-function: E23 funguje jako obecný negativní regulátor signální dráhy – tlumí expresi genů indukovaných 20E.

4) Hormon 20E má přímé a rychlé účinky nezávisle na expresi jaderných genů



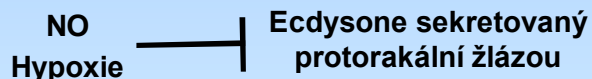
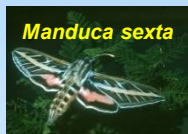
< 15 minut => bez transkripce a syntézy proteinů

Existuje receptor pro hormon 20E na plazmatické membráně či v cytoplasmě?



Update 2015

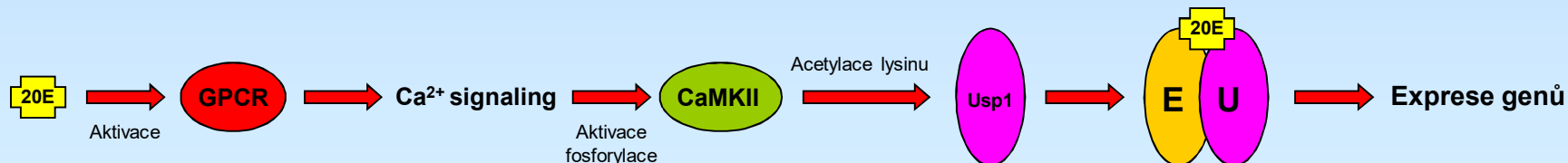
DeLalio LJ et al. (2015) Journal of Insect Physiology, March (2015)



Update 2014, 2015

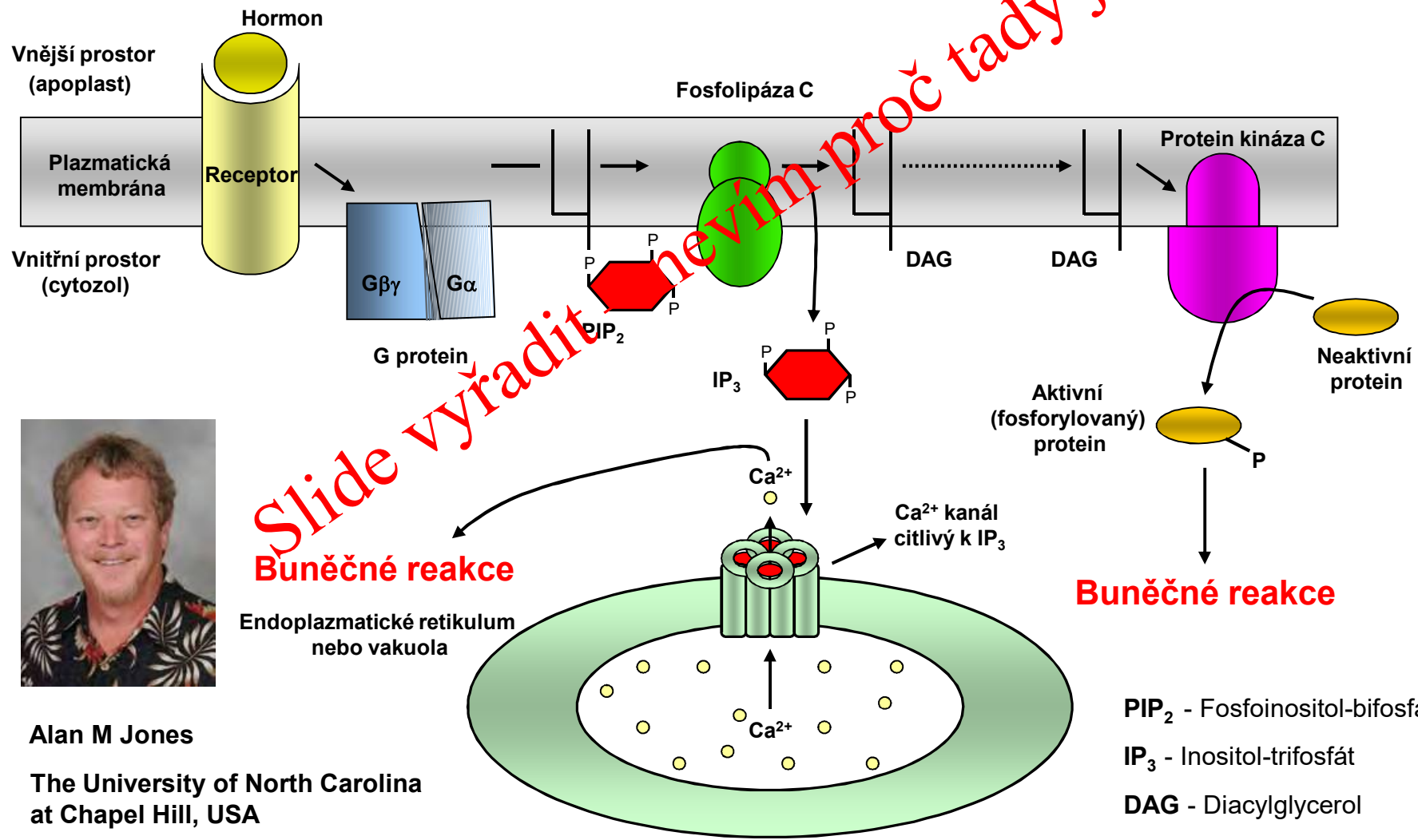
Ren J et al. (2014) J Ster Biochem 144: 313-323

Jing Y-P et al. (2015) J Biol Chem 290: 8469-81



CaMKII = Ca²⁺/Calmodulin-dependentní protein kináza

Obečné schéma inositol-lipidové signální dráhy



Slide vyřadit, nevim proč tady je.

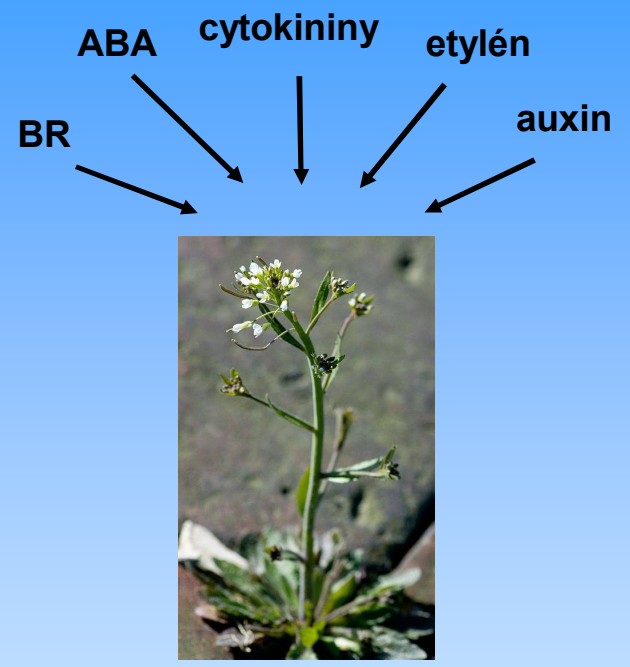


Alan M Jones

The University of North Carolina at Chapel Hill, USA

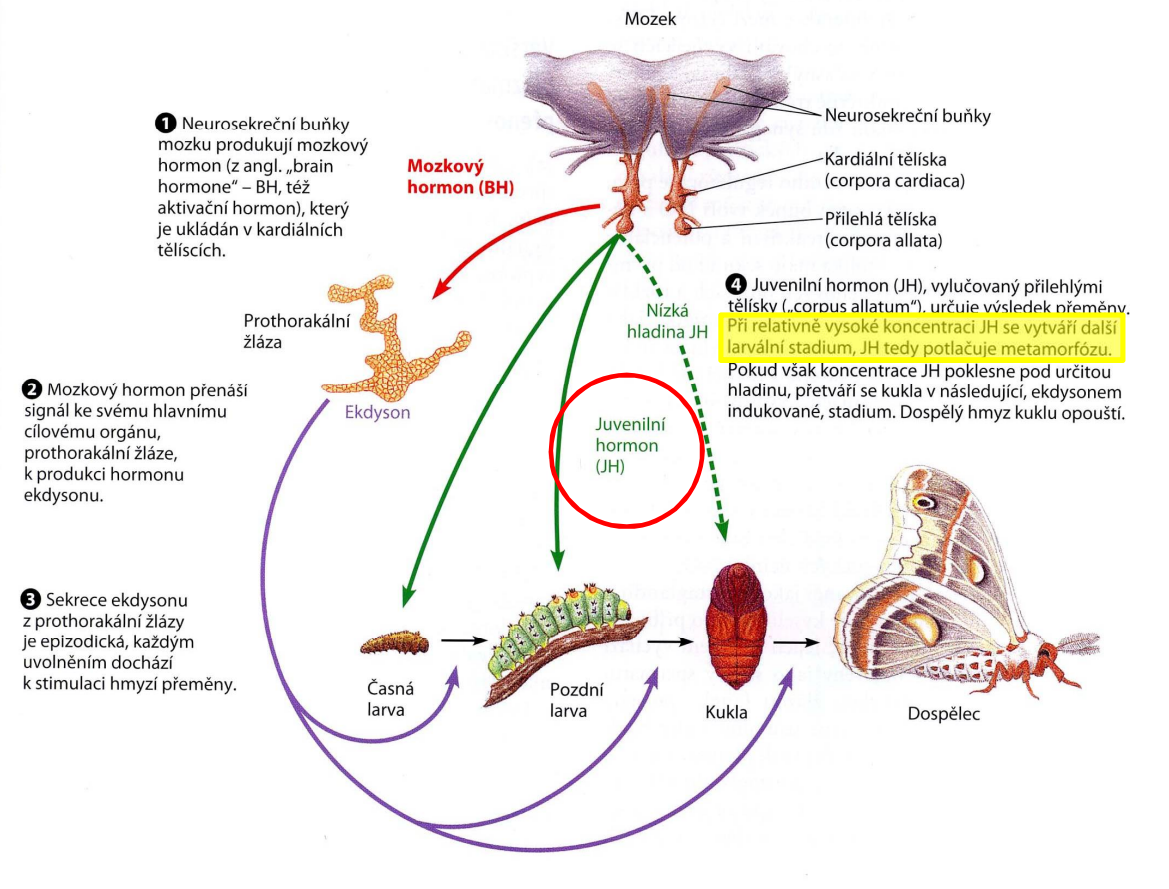
Podle Taiz L and Zeiger E (2006) Plant Physiology, 4th ed.

Neznámé hmyzí hormonální receptory – souvislost s rostlinami

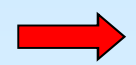


antagonisticky, synergisticky

Obrázek 45.2 – Hormonální regulace vývoje hmyzu. Většina hmyzu prochází sérií larválních stadií, kdy každé svlékání vede (současně s odkládáním staré vnější kostry, exoskeletu) k větší larvě. Metamorfózou konečného larválního stadia vzniká kukla (pupa), která se přeměňuje v dospělou formu hmyzu. Jak je znázorněno, jednotlivá vývojová stadia jsou kontrolována hormony.

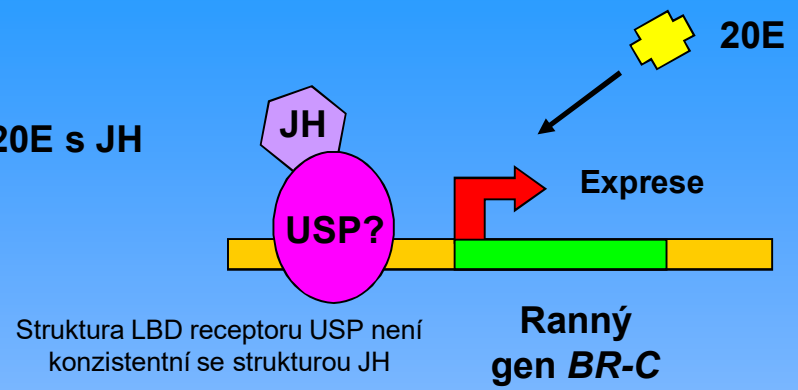


Diptera (Drosophila) – není pozorována modifikace účinků ectysteroidů **juvelním hormonem JH** při procesu svlékání

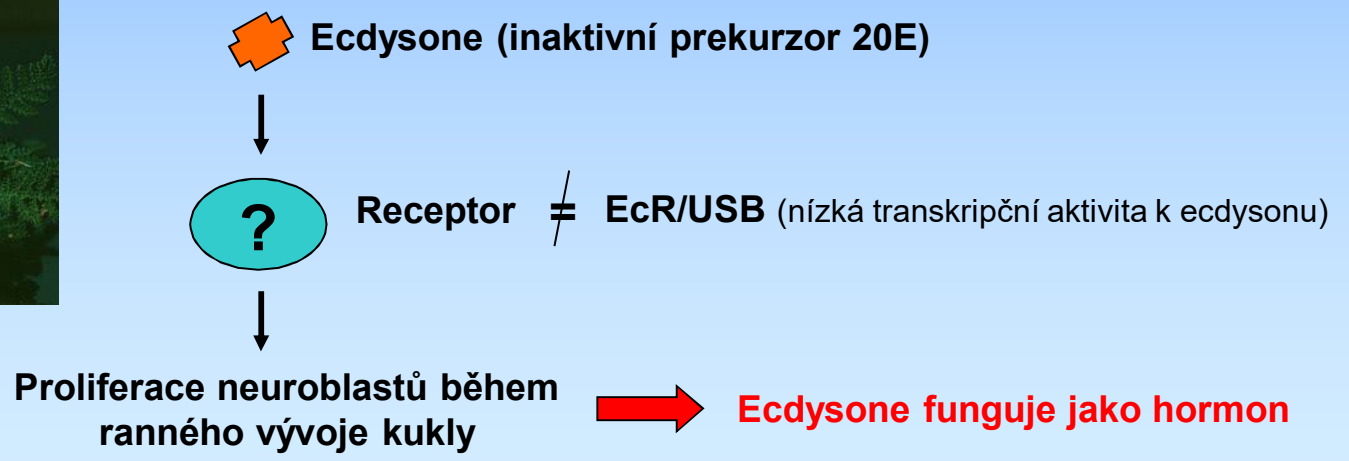


Málo známo o molekulárních mechanismech účinků JH v interakci s ecdysteroidy

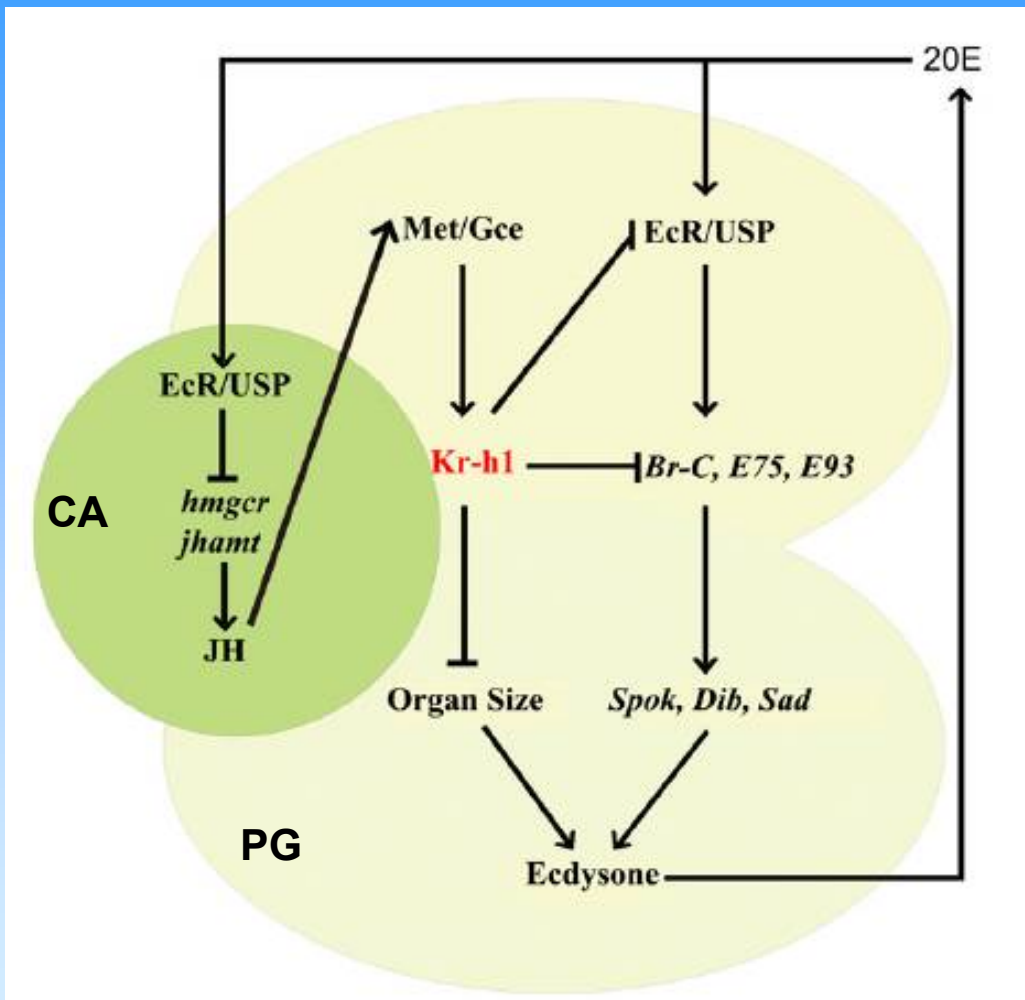
Kukla *Drosophily*: interakce 20E s JH



Existují hormonální signální dráhy paralelně s 20E nebo ve spojení s 20E.



Antagonistická aktivita hormonů v RG určuje metamorfózu Drozofily.



CA - přilehlá tělíska (CA) - produkují JH

PG - protorakální žláza (PG) - produkuje ecdysone.

CA a PG = části RG (prstencová žláza)

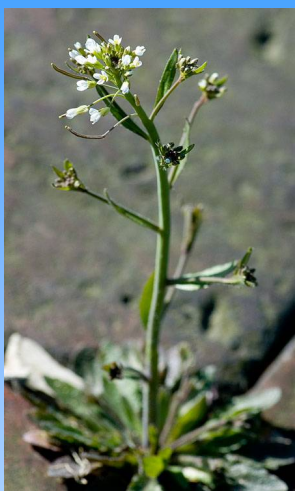
JH signalizace prostřednictvím **Kr-h1** (Krüppel-like transkripční faktor) inhibuje biosyntézu ecdysonu v PG a tím brání metamorfóze.

20E signalizace brání biosyntéze JH v CA a tím umožňuje metamorfózu.

Update 2018

Liu S et al. (2018) PNAS 115: 139-144

Koevoluce rostlin a hmyzu: fytosteroidy



Rostliny produkují ecdysteroidy s aktivitou u hmyzu = **fytoecdysteroidy** (jsou ligandy pro EcR)

5 – 6% testovaných druhů rostlin

Hladina fytoecdysteroidů je závislá na:

- druhu rostliny
- části rostliny
- ročním obdobím
- habitu
- vývojovém stádiu

Fytoecdysteroidy: 20E
 ponasteron
 makisteron A
 cyasteron
 ecdyson

} Účinné u hmyzu

Syntetická dráha fytoecdysteroidů není objasněna

**Fytoecdysteroidy - nechutenství u hmyzu
(prostřednictvím chuťových receptorů)**



Obrana rostlin proti hmyzu

ecdyson

20E

ponasteron



Způsobují vývojové změny:

- Inhibice růstu
- Zvýšení larválních stádií
- Předčasné kuklení

Hmyz si vytváří rezistenci k fytoecdysteroidům, které konzumuje.



Důkaz existence metabolických drah, které detoxifikují fytoecdysteroidy.

Ecdysteroidy nemají škodlivé účinky na savce



**Možnost využití ecdysteroidů v
zemědělství jako insekticidů**

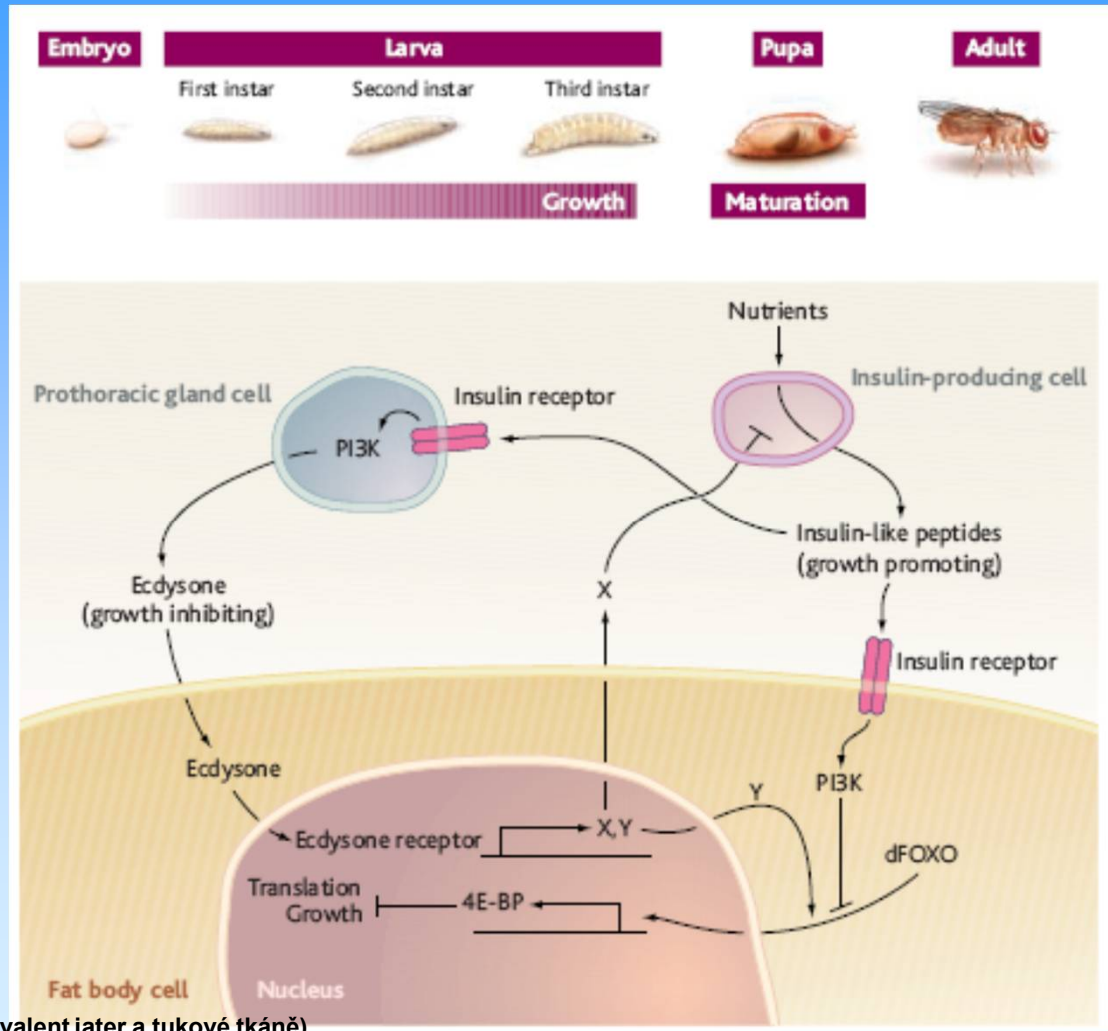
Update 2012

Zhu JQ et al. (2012) PLoS ONE 7: e38572



Larvy *H. armigera* (Černopáska bavlníková) krměná listy transgenního tabáku exprimujícího EcR dsRNA, měly velice nízkou hladinu EcR mRNA. To způsobovalo úmrtí larev a defekty ve vytváření zátoček. => Důkaz, že transgenní rostliny exprimující dsRNA zaměřující se na geny hmyzu, mohou zvyšovat svoji rezistenci ke škodlivému hmyzu.

Interakce signální dráhy 20E a inzulinu – regulace finální velikosti těla hmyzu



(ekvivalent jater a tukové tkáně)

Colombani J et al. (2005) Science 310: 667-670

King-Jones, Thummel (2005) Science 310: 630-631

X – neznámý faktor

Y – neznámý faktor

dFOXO – transkripční faktor

PI3K – fosfatidyl inositol 3-kináza

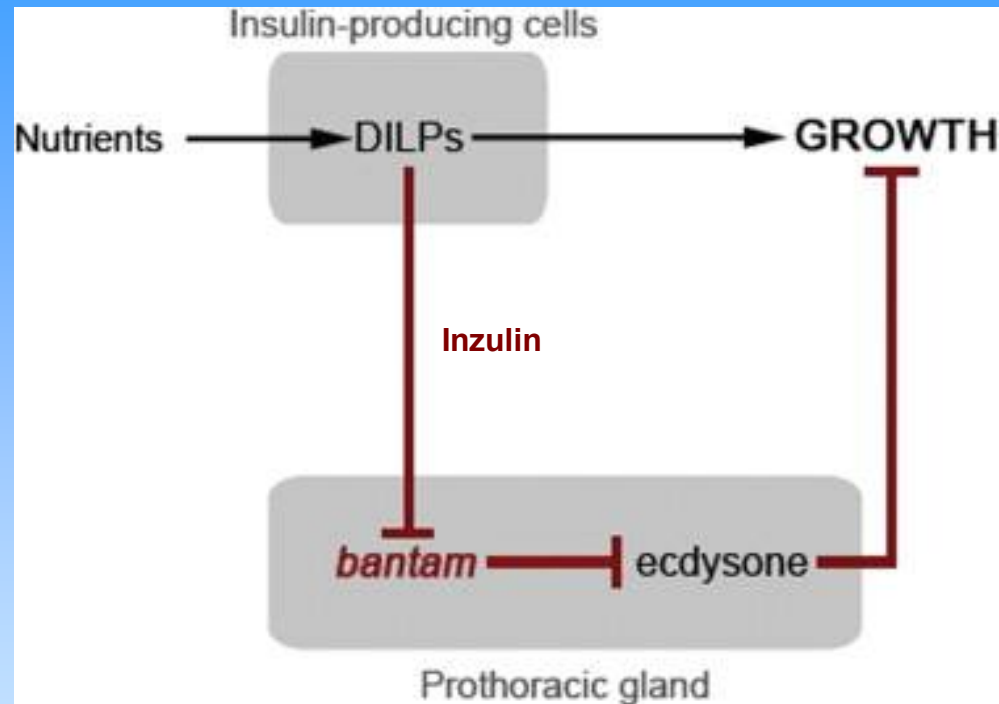
Insulin receptor - citlivý k teplotě

Juvenilní hormon a insulin-like peptide regulují expresi Vg

Vg (vitellogenin) = glycoliprotein, prekurzor lipoproteinů a fosfoproteinů, základních součástí žloutku

Update 2013

Boulan L et al. (2013) Current Biology 23: 473–478



Ecdyson má duální funkci:

- 1) Maximální sekrece stimuluje vývojové změny a dospívání
- 2) Základní produkce ecdysonu vede k potlačení růstu

Růst těla *Drosophily* je kontrolován nově objevenou microRNA *bantam*. *Bantam* v buňkách prothorakální žlázy stimuluje růst tím, že potlačuje akumulaci ecdysonu.

Inzulin prostřednictvím *bantam* kontroluje hladinu ecdysonu a tím růst jedince.

Kdo jsou?

66



Thomas Altmann
University of Potsdam, Golm



Steven D Clouse
North Carolina State University, Raleigh



Joanne Chory
The Salk Institute, La Jolla

Bishop Gerard J
University of Wales Aberystwyth, Aberystwyth

Müssig C
University of Potsdam, Golm



Sally M Assmann
Pennsylvania State University,



Peter McCourt
University of Toronto, Toronto



Kirst King-Jones
University of Utah, Salt Lake City



Carl S Thummel
University of Utah, Salt Lake City



Anthony Bishopp
University of Helsinki, Helsinki

Klíčová slova pro příští přednášku

Ubiquitination

E3 ubiquitin ligase

Constitutive photomorphogenic 1

Mammalian COP1

Photomorphogenesis

Tumorigenesis

Google: <http://www.google.cz/>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>