

TRANSPORT MALIH MOLEKUL

Pasivni transport

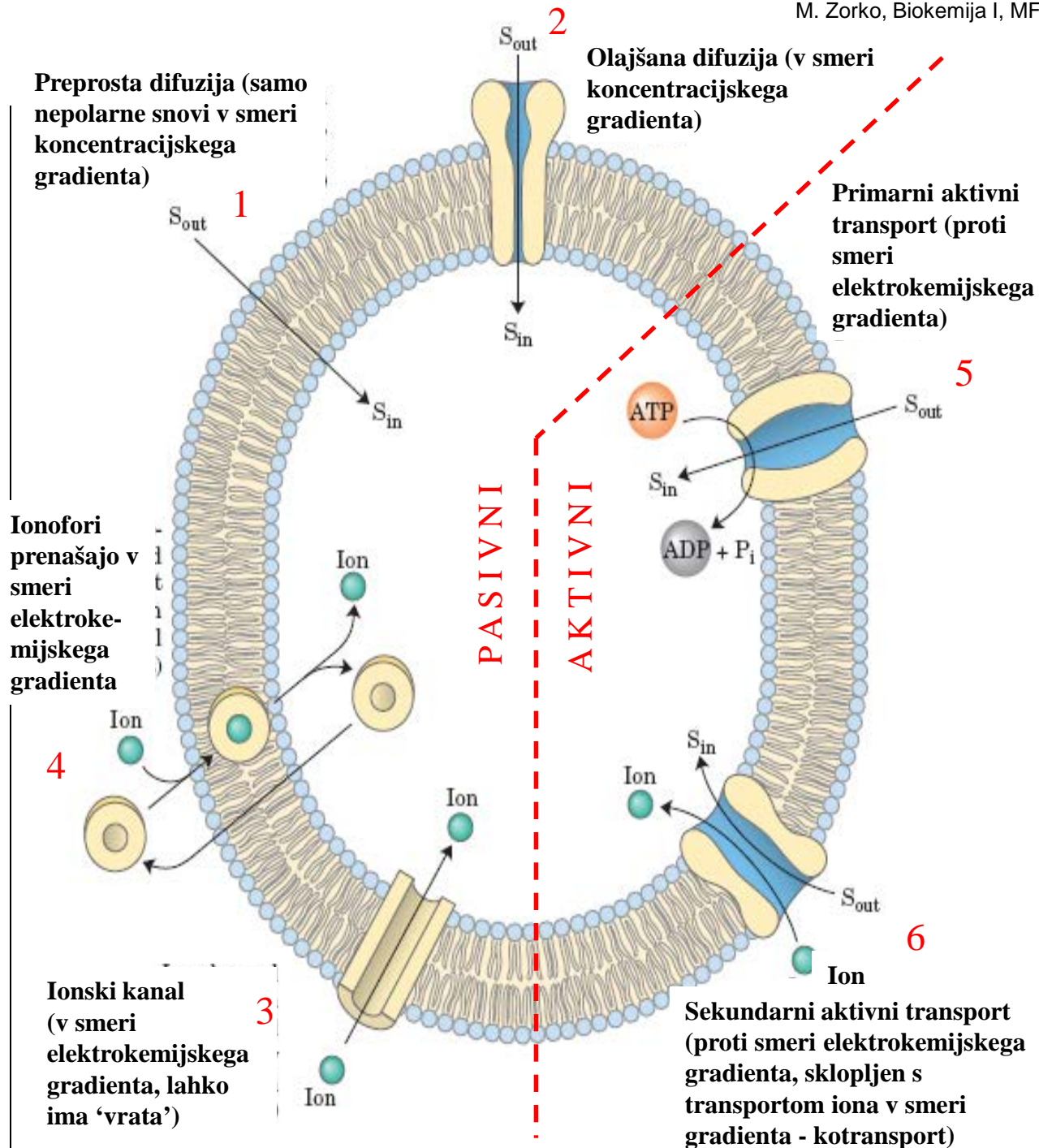
(v smeri koncentracijskega gradienta: $C_1 \rightarrow C_2$; $C_1 > C_2$)

1. Preprosta difuzija
2. Olajšana difuzija
3. Ionski kanali
4. Ionofori

Aktivni transport

(proti smeri koncentracijskega gradienta: $C_2 \rightarrow C_1$; $C_1 > C_2$)

5. Primarni aktivni transport
6. Sekundarni aktivni transport = kotransport



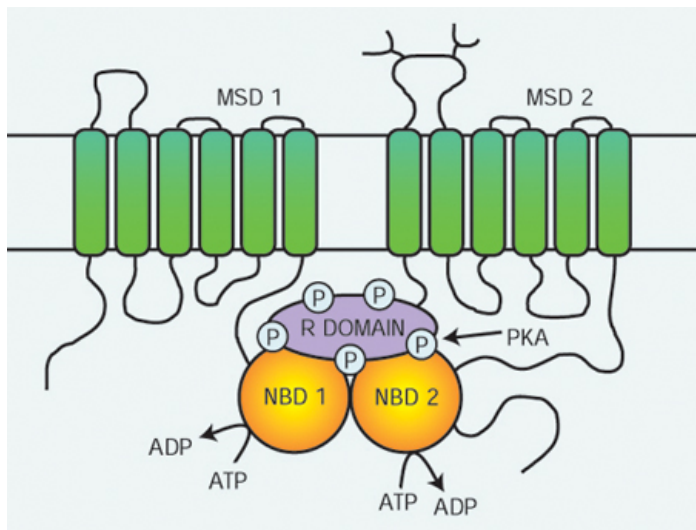
Bolezni zaradi napak v kanalčkih (oz. njihovih genih)

TABLE 11–7 Some Diseases Resulting from Ion Channel Defects

Ion channel	Affected gene	Disease
Na ⁺ (voltage-gated, skeletal muscle)	<i>SCN4A</i>	Hyperkalemic periodic paralysis (or paramyotonia congenita)
Na ⁺ (voltage-gated, neuronal)	<i>SCN1A</i>	Generalized epilepsy with febrile seizures
Na ⁺ (voltage-gated, cardiac muscle)	<i>SCN5A</i>	Long QT syndrome 3
Ca ²⁺ (neuronal)	<i>CACNA1A</i>	Familial hemiplegic migraine
Ca ²⁺ (voltage-gated, retina)	<i>CACNA1F</i>	Congenital stationary night blindness
Ca ²⁺ (polycystin-1)	<i>PKD1</i>	Polycystic kidney disease
K ⁺ (neuronal)	<i>KCNQ4</i>	Dominant deafness
K ⁺ (voltage-gated, neuronal)	<i>KCNQ2</i>	Benign familial neonatal convulsions
Nonspecific cation (cGMP-gated, retinal)	<i>CNCG1</i>	Retinitis pigmentosa
Acetylcholine receptor (skeletal muscle)	<i>CHRNA1</i>	Congenital myasthenic syndrome
Cl ⁻	<i>CFTR</i>	Cystic fibrosis

Cistična fibroza – okvarjen kanalček CFTR za prenos Cl-

- Cistična fibroza – okvarjen kanalček za Cl⁻, Cl⁻ se ne transportira iz celic, temu ne sledi voda; v dihalnih poteh pregosta sluz, težave z dihanje, pogoste infekcije
- avtosomna recesivna, 5% belcev je prenašalcev
- Odkrita 1989 - mutacija v genu za protein CFRT (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), ki je kanalček za transport kloridnih ionov
- Homozigoti dočakajo največ 30 let. Prizadeta predvsem gastrointestinalni in respiratorni trakt;
- Znanih že več kot 1700 mutacij tega gena!!



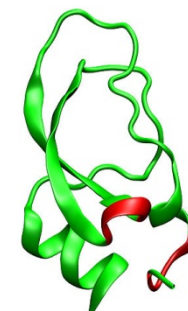
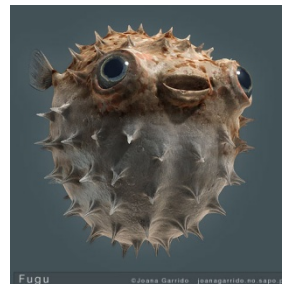
Zaradi sluzi pogoste bakterijske okužbe dihalnega trakta



Kanalček odprt, ko sta vezani molekuli ATP;
zaprt, ko 1 ATP hidrolizira v ADP in Pi

Naravni strupi, ki delujejo na ionske kanalčke, vplivajo na prenos živčnega impulza

- Tetrodotoksin (riba fugu) in saksitoksin (dinoflagelati- školjke) se vežeta na Na^+ kanalčke in preprečita prenos impulza
- Dendrotoksin (črna mamba) inhibira K^+ kanalčke
- Kalcikludin (zelena mamba) inhibira Ca^{2+} kanalčke
- Tubokurarin, (aktivni del strupa kurare, s katerim so ob Amazonki zastrupljevali puščice, $K_d \approx 10^{-7}$ M), kobratoksin in bungarotoksin (kobra, kreit; $K_d \approx 10^{-15}$ M) se vežejo na ACh receptor

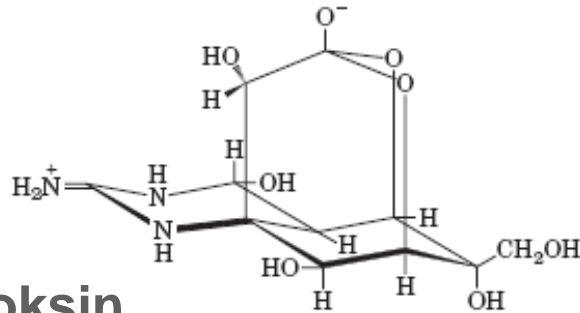


Dendrotoksin

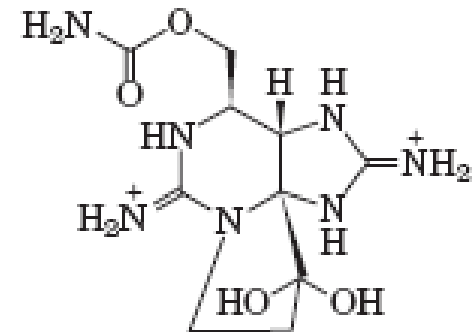


Chondrodendron tomentosum

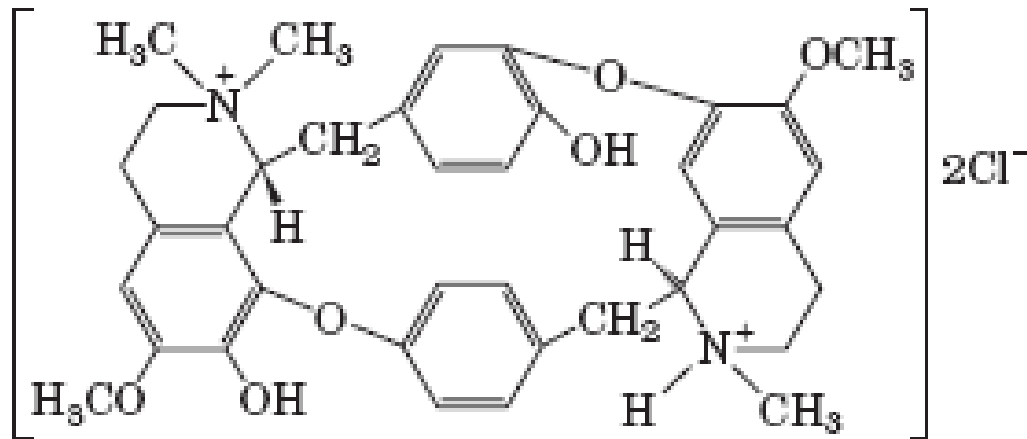
Strukture nekaterih naravnih strupov, ki inhibirajo ionske kanalčke



Tetrodotoksin



Saxitoxin



D-Tubocurarine chloride

Transport čez membrano - prenašalci

- Prenos polarnih molekul in ionov čez membrano potrebuje prenašalne proteine
- Molekule in ioni se lahko prenašajo vzdolž konc. gradienta ali proti gradientu
- GLUT prenašalci glukoze so uniporterji, ki prenašajo glukozo vzdolž gradienta
- Simporterji omogočajo simultani prenos dveh snovi v isto smer (prenos glukoze skupaj z Na^+ v prebavnem traktu)
- Antiporterji prenašajo dve snovi v nasprotno smer (prenos $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$; $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPaza}$)
- $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPaza}$ plazemske membrane in Ca^{2+} prenašalci sarkoplazemskega retikuluma (SERCA) so primeri ATPaz tipa P- (reverzibilna fosforilacija med katalitičnim ciklom)
- ATPaze tipa F so protenske črpalke (ATP sintaze), ki so ključne za ohranjanje energije mitohondrijev in kloroplastov oziroma celice v celoti.
- ABC transporterji (aktivni transport) odnašajo iz celic različne snovi, tudi zdravila
- Ionofori so lipidotopne molekule, ki vežejo ione, jih pasivno prenesejo čez membrano in tako porušijo elektrokemijski gradient
- Voda čez membrane prehaja prek akvaporinov (nekateri prenašajo tudi glicerol, ureo)

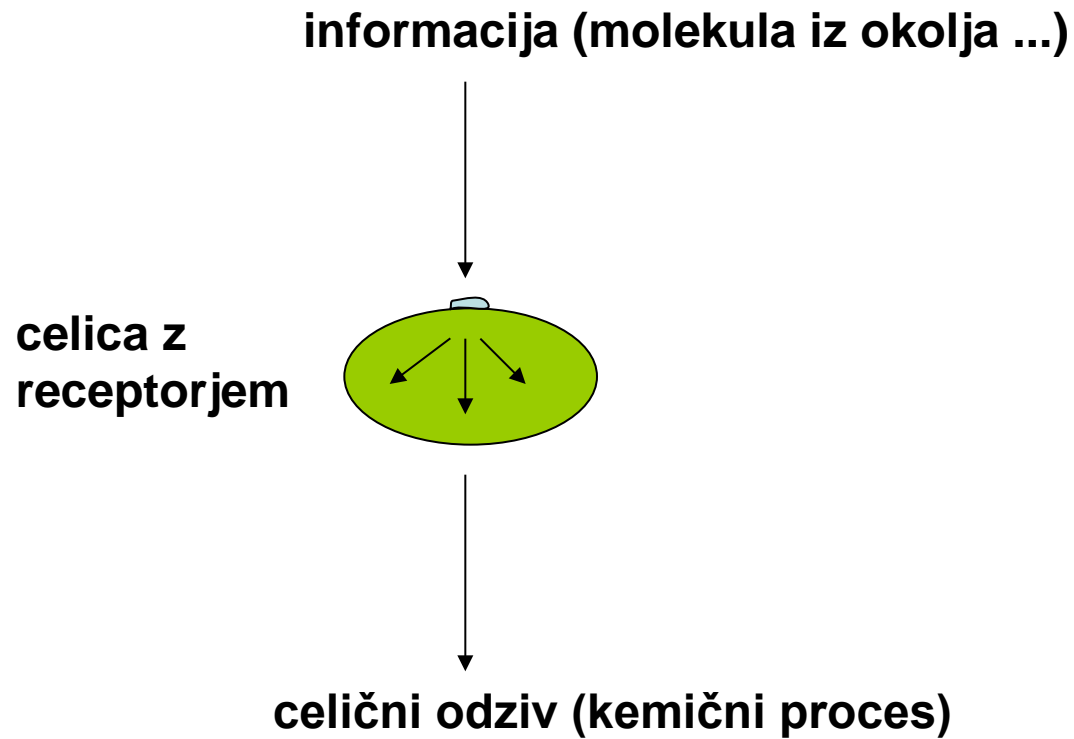
Transport čez membrano - kanalčki

- Ionski kanalčki tvorijo hidrofilne pore skozi katere lahko difundirajo ioni vzdolž električnega ali kemijskega gradienta
- Ionski kanalčki se večinoma ne morejo nasititi (saturirati), so večinoma specifični za eno vrsto ionov
- Večina ionskih kanalčkov je uravnavana z napetostjo (Na^+ kanalček živčnih celic) ali z ligandom (acetilholinski receptor)

Funkcije proteinov

- Oporna funkcija (strukturni proteini, npr keratini, kolagen ...)
- Transport/skladiščenje določenih molekul (ligandov, npr. Hb, Mb)
- Uravnavanje procesov (DNA-vezavni proteini)
- Obramba pred tujki/invazivnimi organizmi (Imunoglobulini)
- Lipoproteini, potrebni za transport lipidov po telesu
- Kontraktilni proteini
- Membranski proteini, vključeni v transport molekul/ionov preko membrane
- **Proteini, vključeni v prenos signala (receptorji, G-proteini, kinaze ...)**
- Kataliza biokemijskih reakcij (encimi)

Biosignaliziranje/prenos signala ("signal transduction")

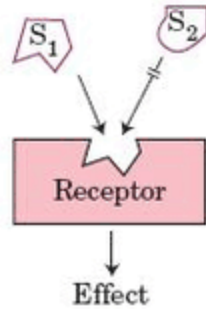


Biosignaliziranje

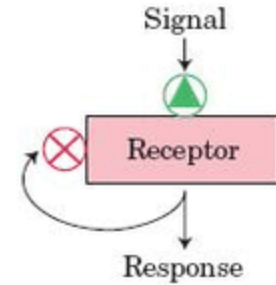
- Biološki signali so zelo raznoliki (nekaj primerov: antigeni, oligosaharidi, signali razvoja, komponente EM, rastni faktorji, hormoni, svetloba, mehanski dotik, nevrottransmitterji, hranila, dišeče molekule, feromoni ...)
- Celični odgovori so različni
- Celice imajo le nekaj mehanizmov prenosa in spreminjanja signalov (signal transduction)
- Mehanizmi signaliziranja so evolucijsko ohranjeni
- Primeri signaliziranja
 - prenos živčnih signalov
 - odziv na hormone in rastne faktorje
 - zaznava slike (vid), vonja (voh), okusa
 - uravnavanje celičnega cikla

Glavne značilnosti prenosa signala

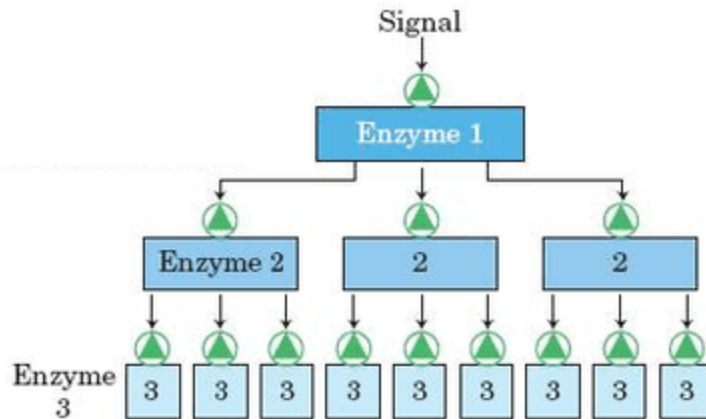
Specifičnost



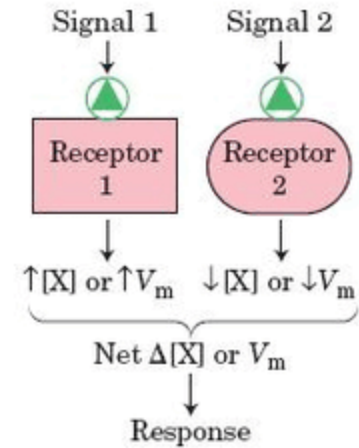
Adaptacija



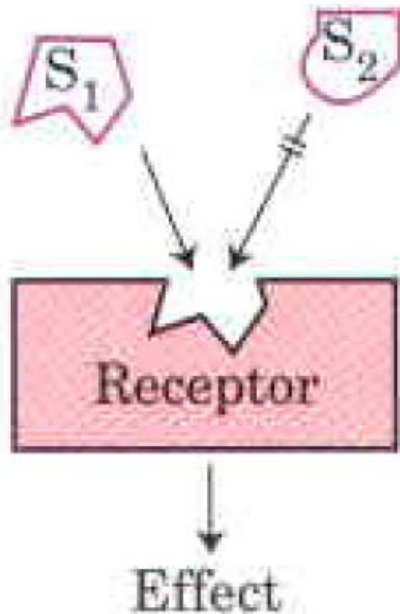
Ojačanje



Združevanje (integracija)



Specifičnost interakcije signalne molekule z receptorjem



Specifičnost vezave:

- signalna molekula in vezavno mesto na receptorju sta komplementarna
- selektivna vezava
- visoka afiniteta → $K_d < 10^{-9}$ M

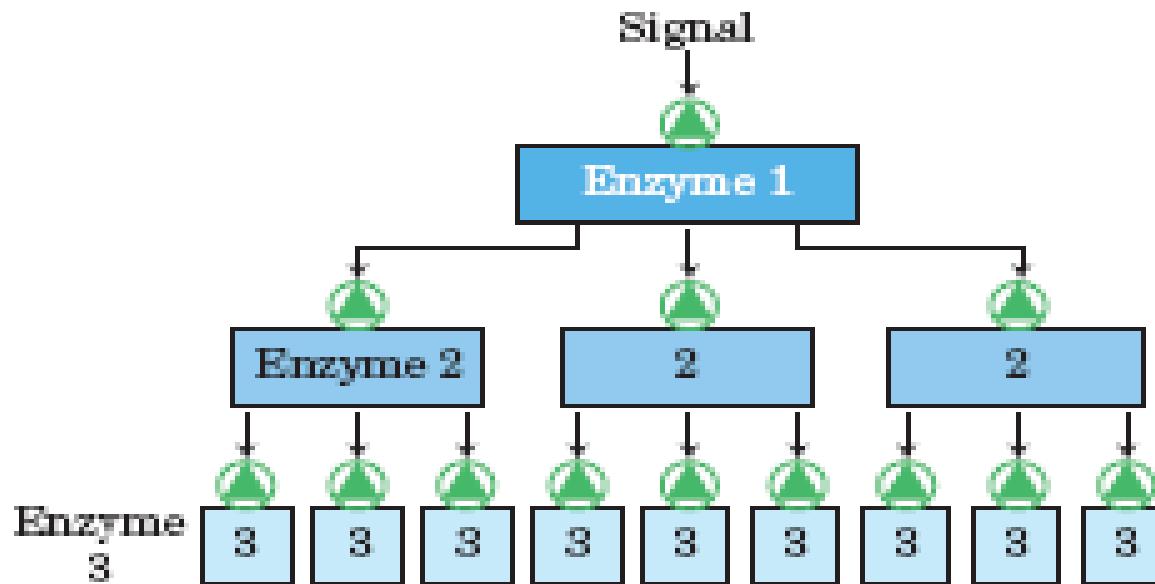


$$K_{d1} \ll K_{d2}$$

S₁ – molekula, komplementarna z vezavnim mestom receptorja

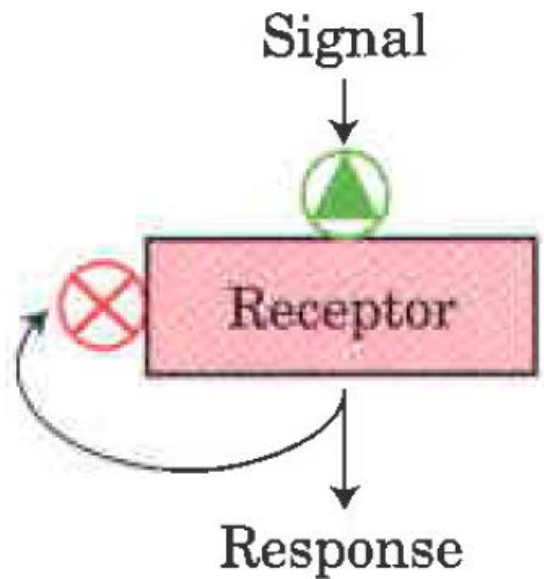
S₂ – molekula, ki ni komplementarna z vezavnim mestom

Ojačenje signala: encimska kaskada



Ojačenje signala za nekaj redov velikosti lahko poteče v msek

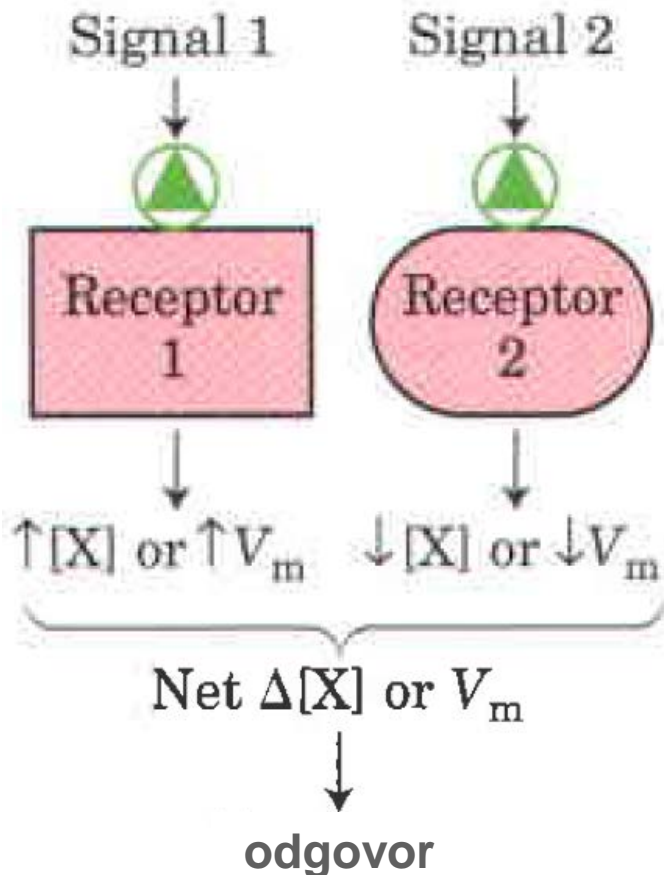
Izguba občutljivosti/prilagoditev (“desenzitisation/adaptation”)



Aktivacija receptorja sproži povratni odgovor, ki “zapre” receptor ali ga odstrani s celične površine (endocitoza)

Praviloma se to zgodi, ko je signal tako močan, da celico izčrpava.

Seštevanje (integration) signalov

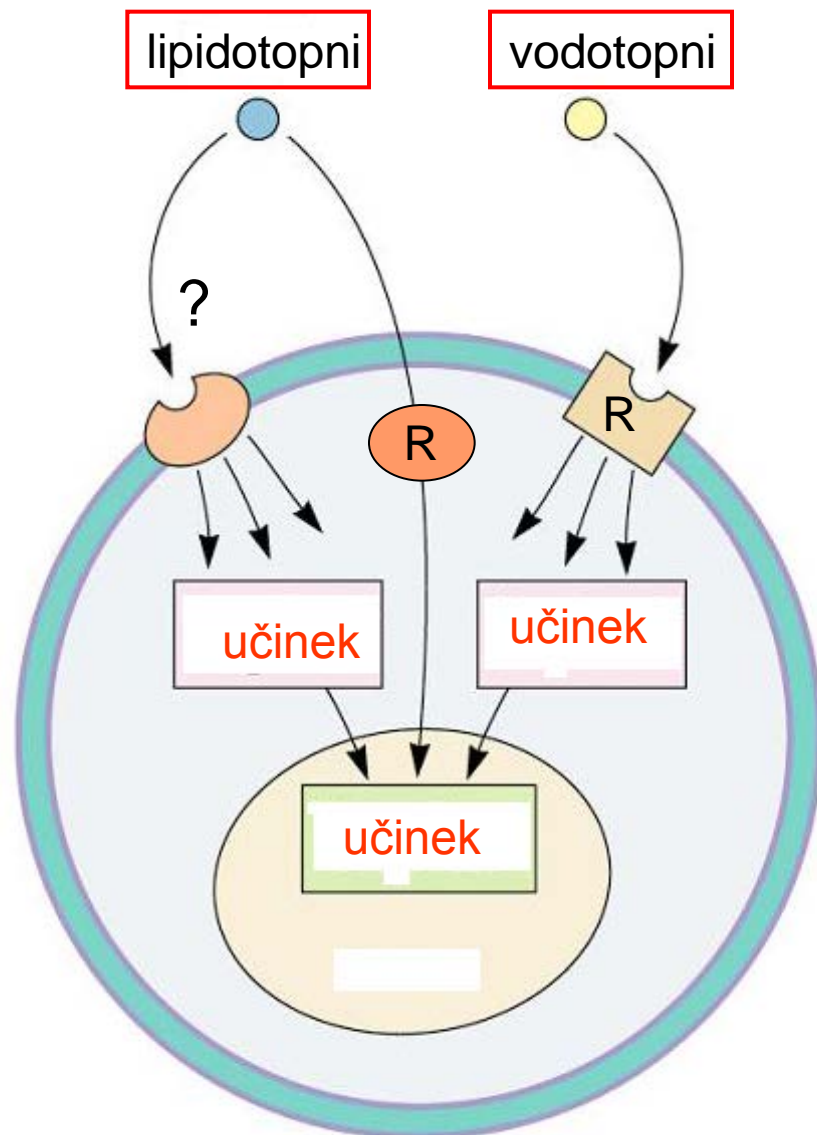


Če imata dva dražljaja neodvisen (npr. nasprotni) učinek na metabolične karakteristike, npr. koncentracija sekundarnega obveščevalca $[X]$ ali membranski potencial V_m , je končni učinek (odziv) vsota obeh dražljajev na receptor 1 in receptor 2.

Prenos signala s hormoni

Vodotopni (npr. peptidni) hormoni ne morejo v celico – receptorji na membrani.

Lipidotopni (npr. **steroidi**) lahko pridejo v celico – receptorji v citoplazmi (in na membrani).

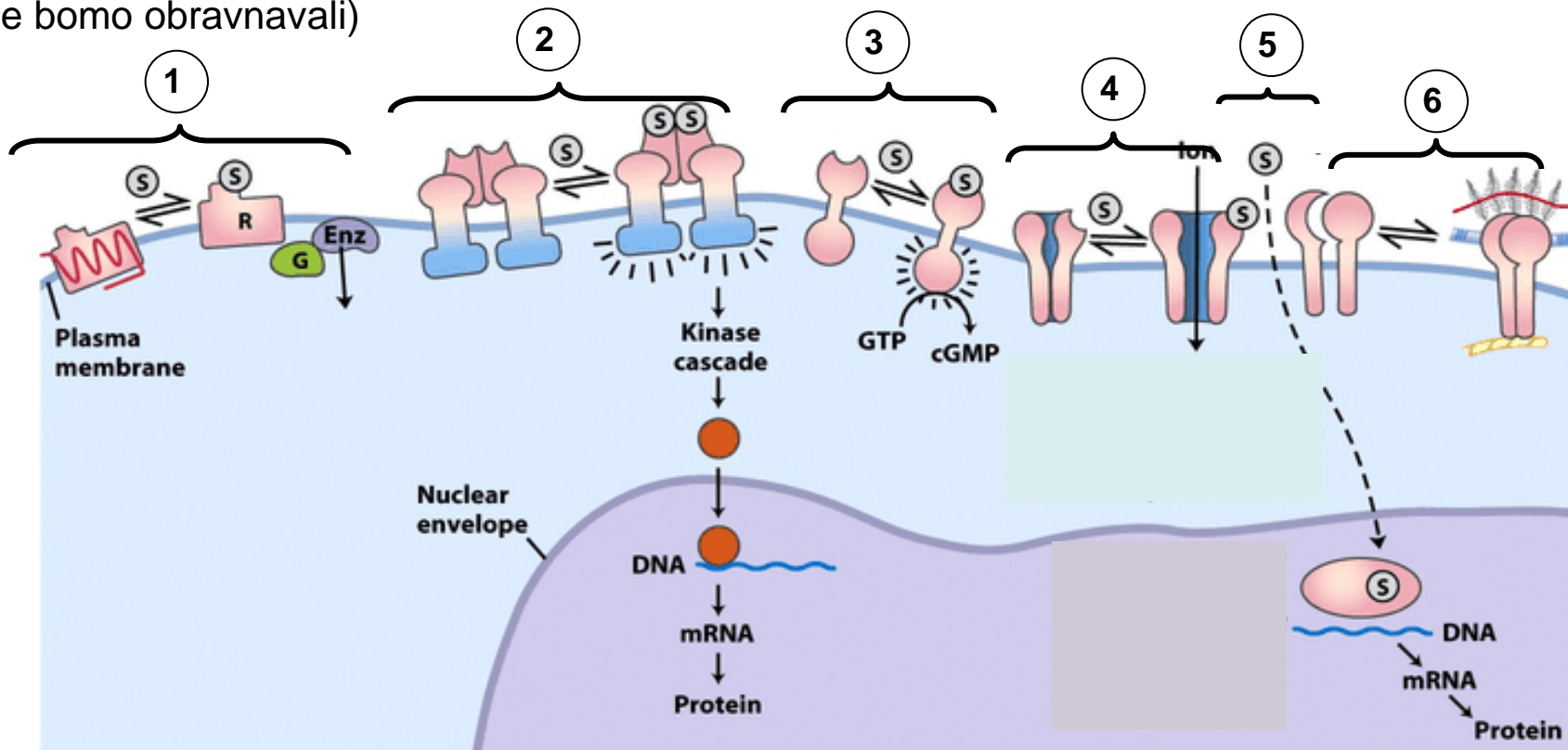


Hormoni, ki neposredno aktivirajo encime, delujejo hitro.

Hormoni, ki aktivirajo sintezo proteinov, pa se v jedru vežejo na DNA in delujejo počasi.

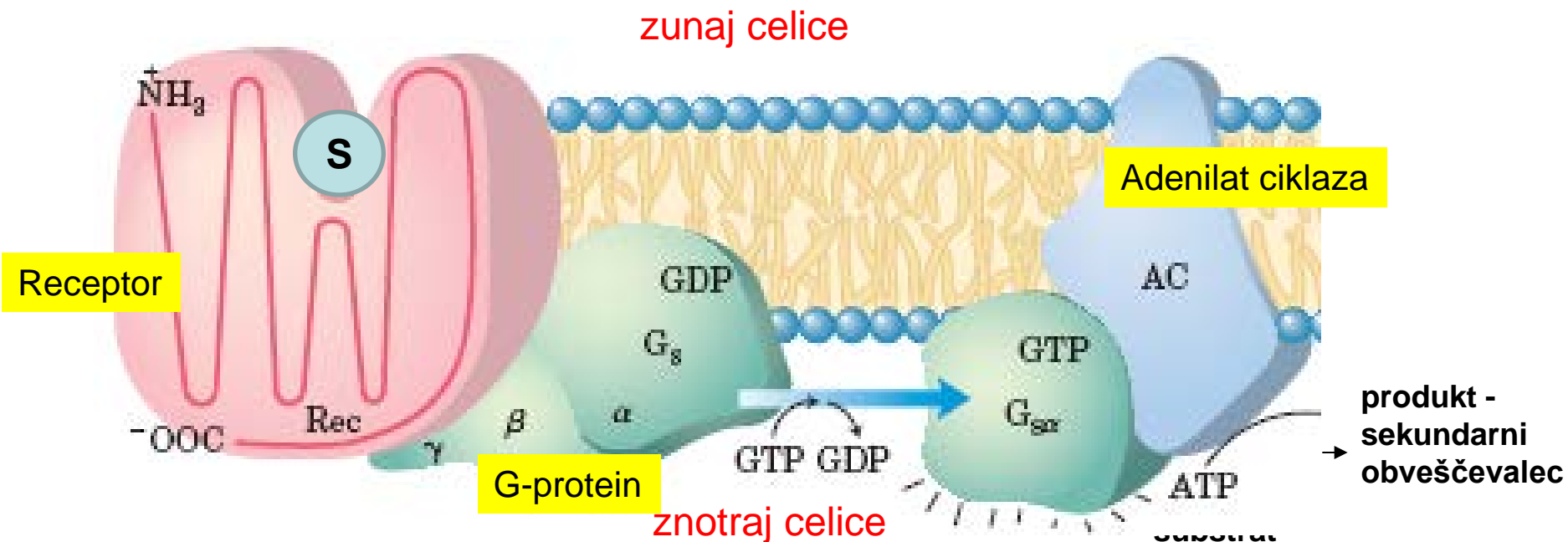
Evkariontske celice: 6 mehanizmov prenosa signala

1. **Membranski receptorji, povezani z G proteini** (npr. adrenergični receptor)
2. **Receptorji s tirozinkinazno aktivnostjo** (npr. insulinski receptor)
3. **Receptorji z gvanilatciklazno aktivnostjo**
4. **Ionski kanalčki z zaporo** (npr. acetilholinski receptor)
5. **Jedrni receptorji**, ki vežejo steroidne hormone (AR, ER, PR etc.), tiroidne hormone (TR), vitamin A (RAR, RXR), vitamin D (VDR)
6. **Adhezijski receptorji**, ki posredujejo informacijo med ekstracelul. matriksom in citoskeletom (ne bomo obravnavali)



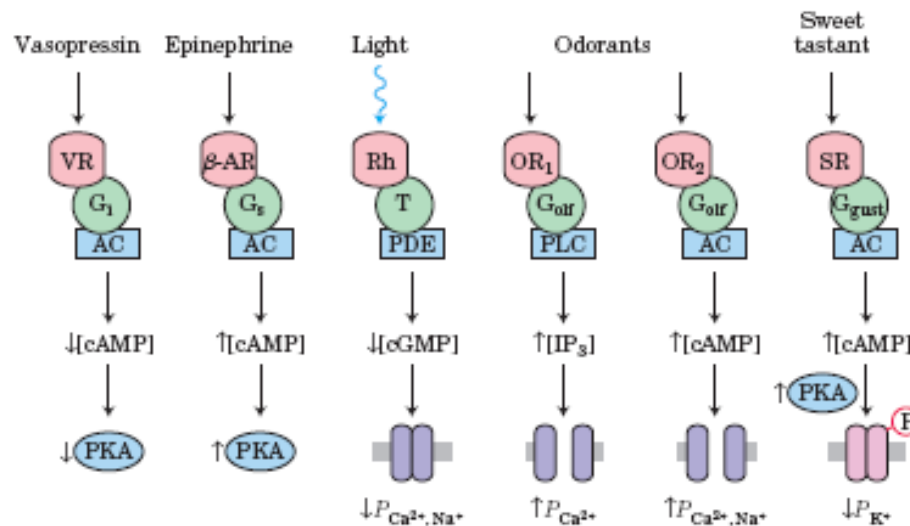
Membranski receptorji, sklopljeni z G proteini (GPCR) – trikomponentni sistem

- **Receptor s 7 transmembranskimi α -vijačnicami** veže signalno molekulo **S**
- Protein, ki veže gvanozinski nukleotid - heterotrimerni **G protein** (podenote $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$)
- **Encim v membrani, ki katalizira reakcijo nastanka sekundarnega obveščevalca:**
 - adenilat ciklaza (AC) \rightarrow cAMP,
 - fosfolipaza C (PLC) \rightarrow IP_3



Nekatere skupne značilnosti signalnih poti, ki vključujejo sekundarni obveščevalec - odziv na hormone, svetlobo, vonj in okus

- Vezava signalne molekule na receptor v plazemski membrani sproži interakcije protein-protein znotraj celice (sodelujoči proteini so receptorji, G-proteini, adaptorji, encimi (kinaze) →).
- → nastanek majhne molekule v celici – sekundarnega obveščevalca (“second messenger”):
 - hidrofilni sekundarni obveščevalci: cAMP, cGMP, IP₃, Ca²⁺
 - hidrofobni sekundarni obveščevalec: diacilglicerol
- → aktivacija določene signalne poti – biološki odgovor celice
- Kaskadne reakcije (ojačanje signala) znotraj celice po vezavi signalne molekule na receptor v membrani



Z G-proteini povezani receptorji in sekundarni obveščevalci

Trikomponentni GPCR sistem vsebuje: **(1)** sedem-transmembranski receptor na plazemski membrani, ki je povezan z **(2)** G-proteinom, ter **(3)** plazemski efektorski encim, ki po aktivaciji preko podenote G proteina sintetizira molekule sekundarnega obveščevalca.

Signal se prek 7-transmembranskega proteina (konformacijske spremembe!) prenese na G-protein (sestavljen iz podenot α , β , γ), ki ima na α podenoti vezan GDP. GDP se zamenja z GTP, podenota α se odcepi in potuje do efektorske molekule (adenilat ciklaza). Spet pride do konformacijske spremembe - aktivira se adenilat ciklaza, ki iz ATP tvori sekundarni obveščevalec cAMP.

Sekundarni obveščevalci:

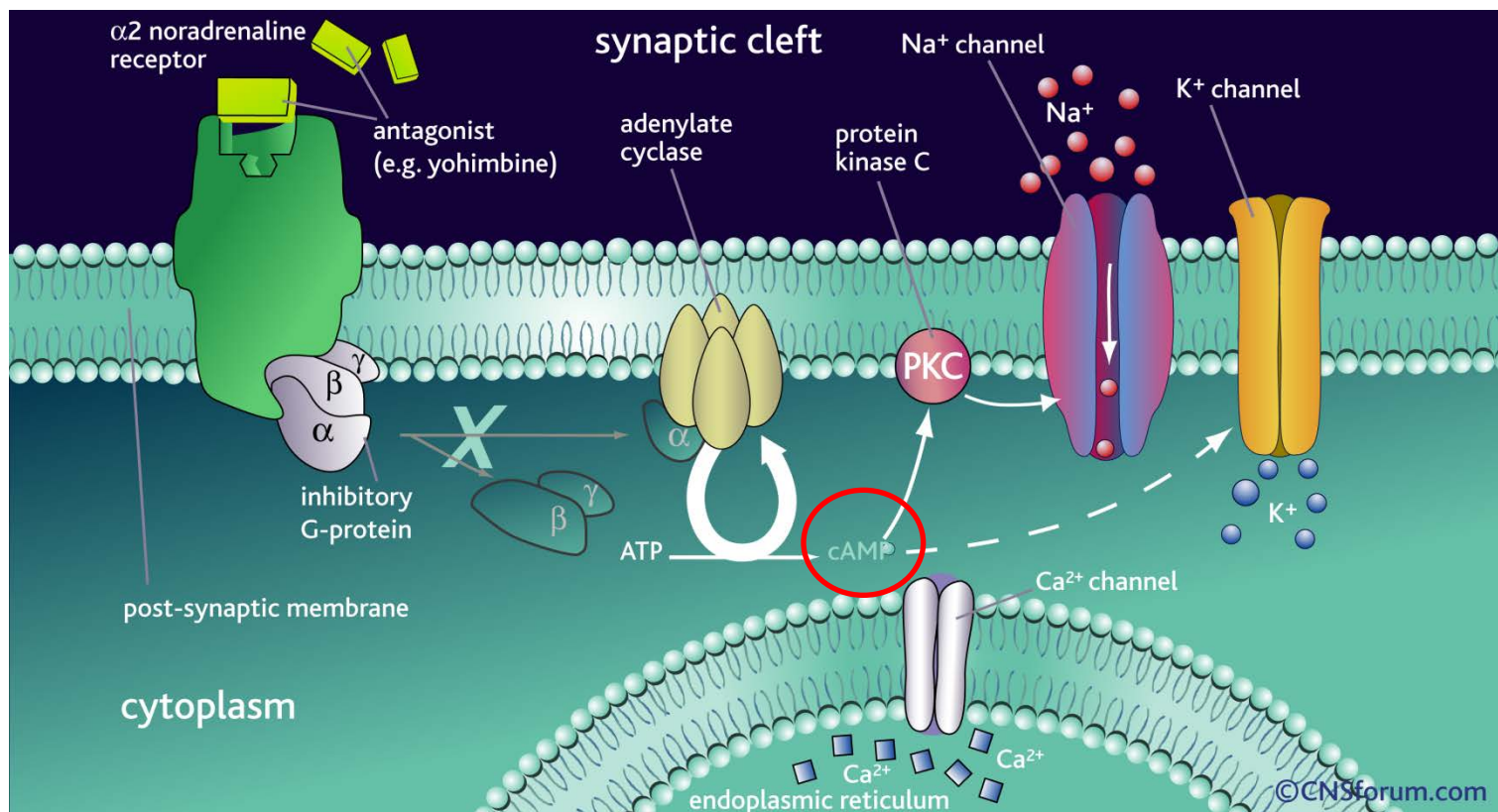
- **cAMP, cGMP**
 - delovanje nekaterih hormonov, npr. adrenalin
 - delovanje svetlobe (molekulske osnove vida)
 - delovanje dišečih molekul (molekulske osnove vonja)
 - delovanje okusnih molekul (molekulske osnove okusa)
- **diacilglicerol (DAG), inozitol-3-fosfat (IP₃) in Ca²⁺**

Človeški genom vsebuje približno 350 z G-proteini povezanih receptorjev

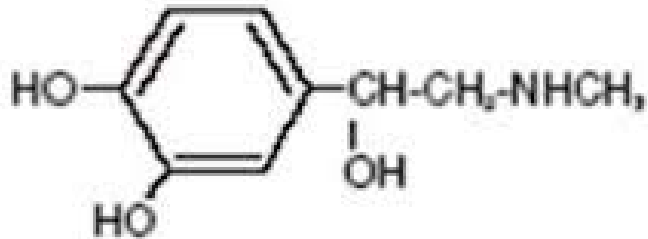
- Zaznavanje hormonov, rastnih faktorjev, različnih endogenih ligandov, zaznavanje vonja in okusa
- Motnje v GPCR signaliziranju so povezane s številnimi obolenji, kot alergije depresija, slepota, daibetes, kardiovaskularne bolezni itd.
- Skoraj polovica zdravil na trgu cilja enega od GPCR receptorskih sistemov (npr. beta dušilci (beta blockers) – slabijo delovanje adrenergičnega receptorja in se uporabljajo pri zdravljenju hipertenzij, srčnih aritmij, migrene, itd.
- Približno 150 GPCR receptorjev pri človeku je še vedno “sirot” – ne poznamo njihovih notranjih (endogenih) ligandov!
- Delovanje beta-adrenergičnega receptorja je dobro raziskano – služi kot prototip za razumevanje delovanja sistemov GPCR

Primer signaliziranja preko G proteinov: adrenergični receptor - signalna molekula je adrenalin

β -adrenergični receptor veže adrenalin \rightarrow cAMP \rightarrow aktivirana proteinske kinaze \rightarrow aktivirana metabolična pot (razgradnja glikogena) kot celični odgovor



Adrenergični receptor lahko veže ligand adrenalin (epinefrin), kot tudi njegove agoniste ali antagoniste

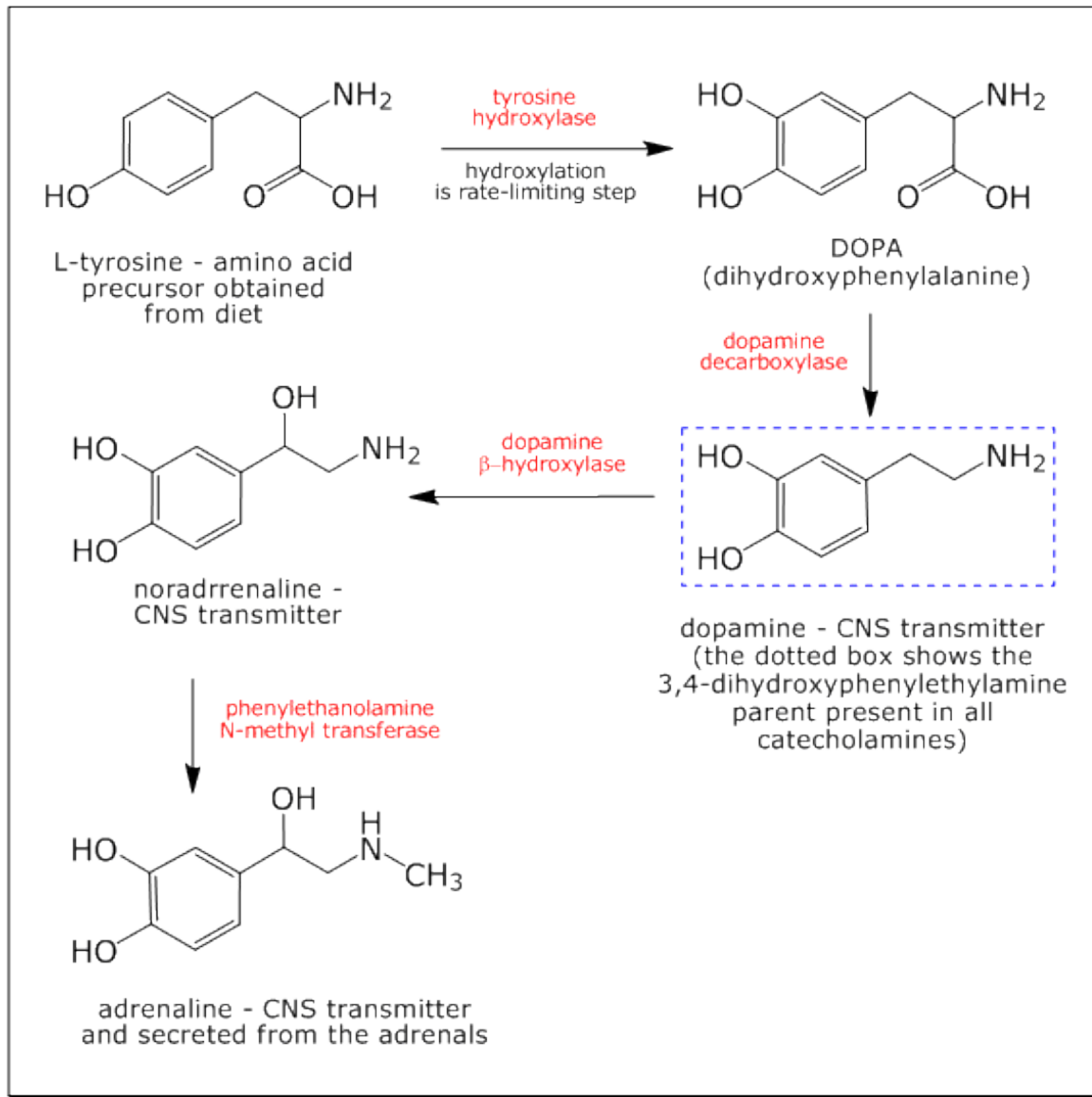


Adrenalin je peptidni hormon, biogeni amin, derivat tirozina

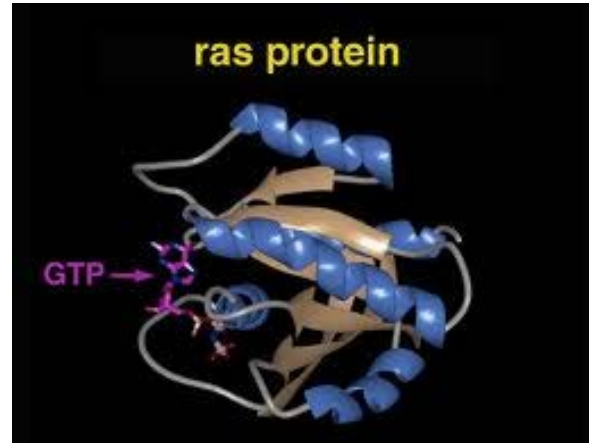
- Agonisti so strukturno podobni ligandu in posnemajo njegove lastnosti signaliziranja
- Antagonisti so lahko tudi strukturno podobni ligandu, na receptor se vežejo lahko tudi z večjo afiniteto, a ne sprožijo signalizacije

Adrenalin nastane iz aminokisljine tirozin

s hidroksilacijo, dekarboksilacijo in metilacijo



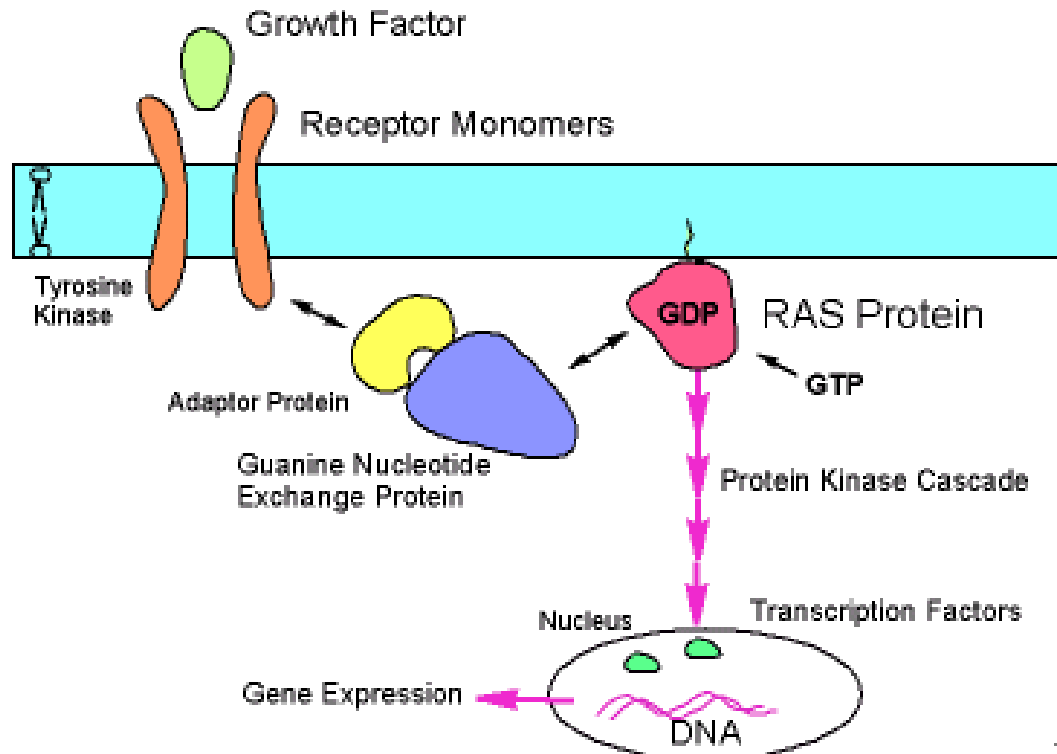
G-proteini (proteini, ki vežejo gvanozinske nukleotide) so drugi člen sistema GPCR



- Vsi G proteini imajo enako osnovno strukturo (podenote α , β , γ).
- Imajo enak mehanizem prehoda iz neaktivne oblike (vezan GDP) v aktivno obliko (vezan GTP)
- Imajo GTP-azno aktivnost (sami se iz aktivne oblike pretvorijo nazaj v neaktivno, da lahko pride do naslednjega prenosa signala)

G-proteini in bolezni

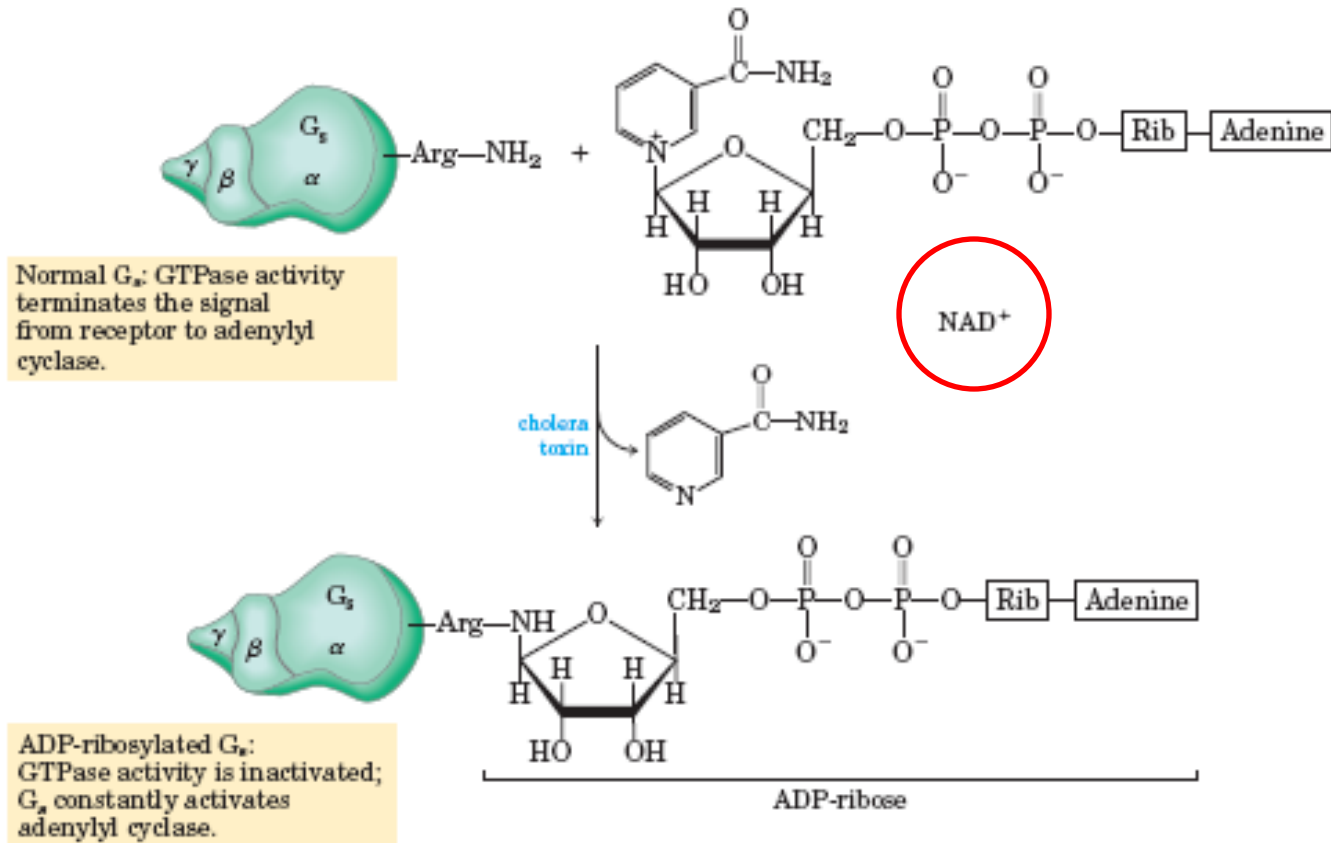
- Prototip G proteina je protein Ras – pri cca 25% vseh vrst rakov je ta protein mutiran. Pride do konstitutivne aktivacije Ras signalne poti, celice se nekontrolirano delijo.



Signalizacija
prek Ras
proteinov je
porušena zaradi
mutacij gena ali
zaradi toksinov

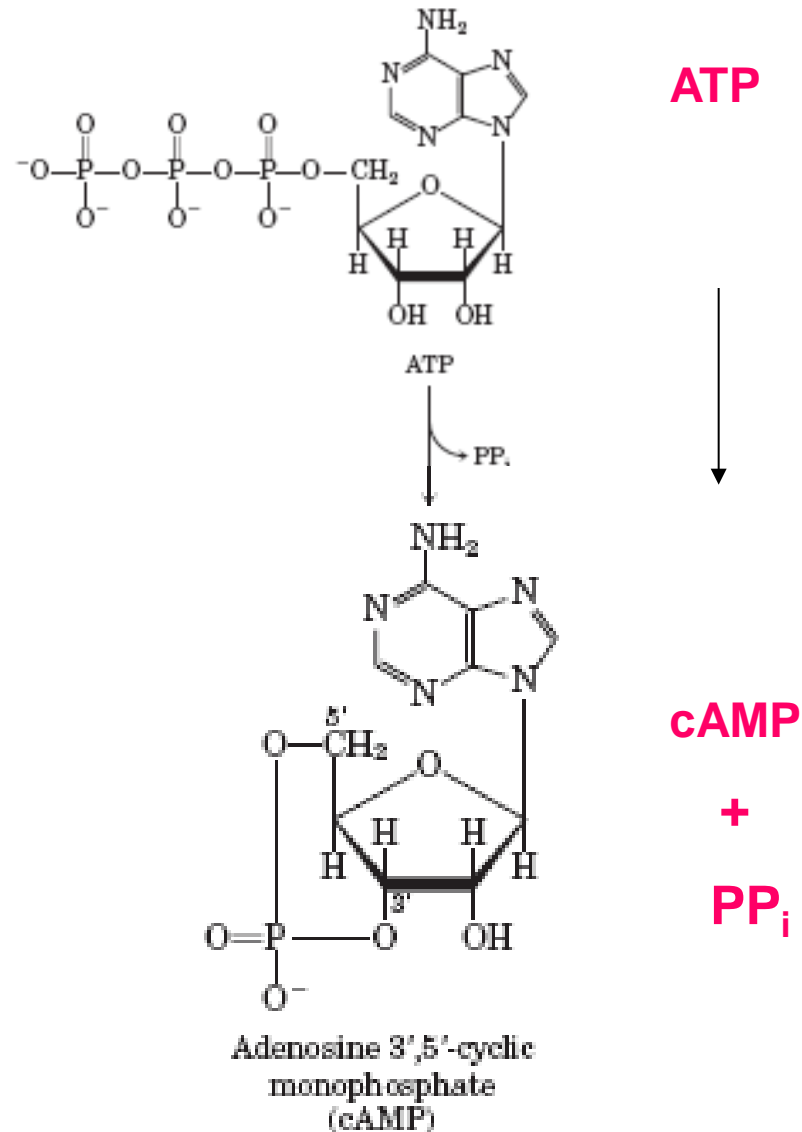
TL

Bakterije imajo toksine, ki vplivajo na človeške G proteine in porušijo normalno signalizacijo: kolera toksin, pertussi toksin



Bakterijski toksini – encimi, ki katalizirajo ADP-ribozilacijo G proteinov – povzročijo oslovski kašelj (Pertussis toxin) in kolero (Cholera toxin)

Efektorski encim adenilat ciklaza po aktivaciji prek G proteina sintetizira sekundarni obveščevalec cAMP



Primer signalne kaskade GPRC: Adrenalin preko adenilat ciklaze in cAMP aktivira protein kinazo A

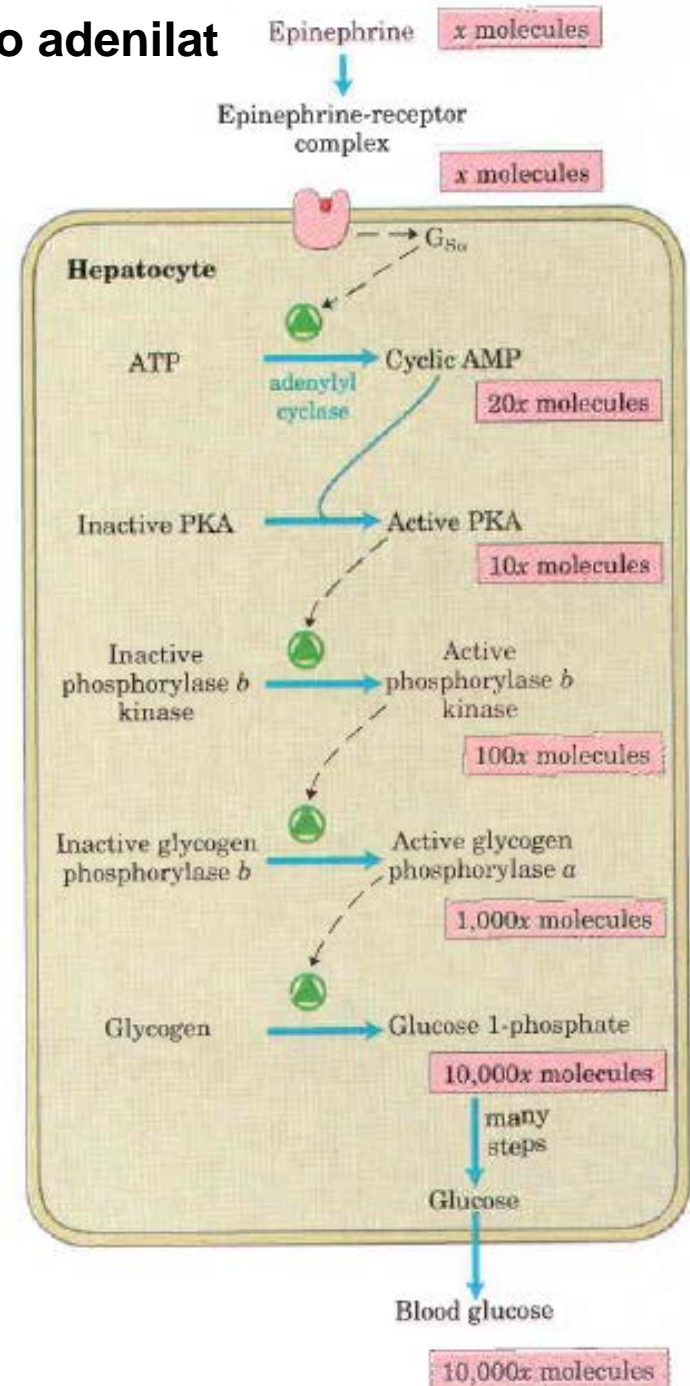
(Ena od končnih posledic te kaskade je povečana koncentracija krvne glukoze)

Adrenalin se veže na adrenergični receptor, aktivira se protein G, ki aktivira adenilat ciklazo, tako da nastane več cAMP. cAMP aktivira protein kinazo.

Aktivacija protein kinaze A ima številne učinke, katerih glavni namen je zagotoviti organizmu energijo za akcijo („beži ali bori se“ učinek).

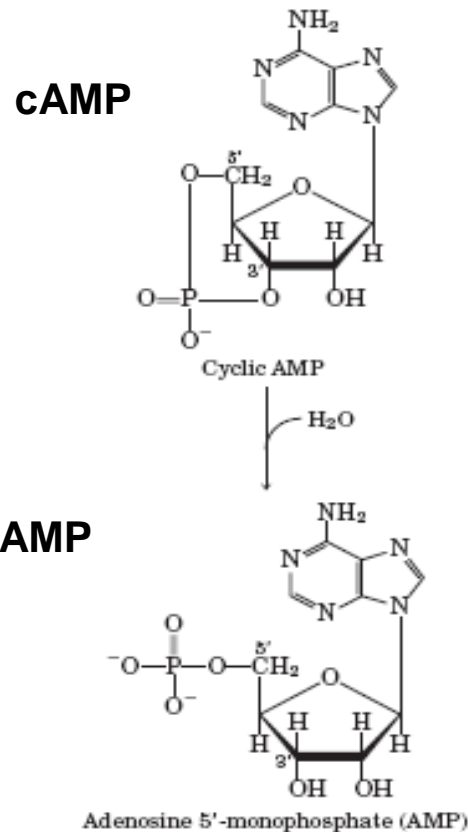
Eden od učinkov aktivacije protein kinaze A je aktivacija glikogen fosforilaze, ki povzroči zvišano koncentracijo glukoze v krvi.

Večstopenjski proces (kaskada) omogoča ojačitev signala – prikazana 10.000-kratna ojačitev je verjetno močno podcenjena.

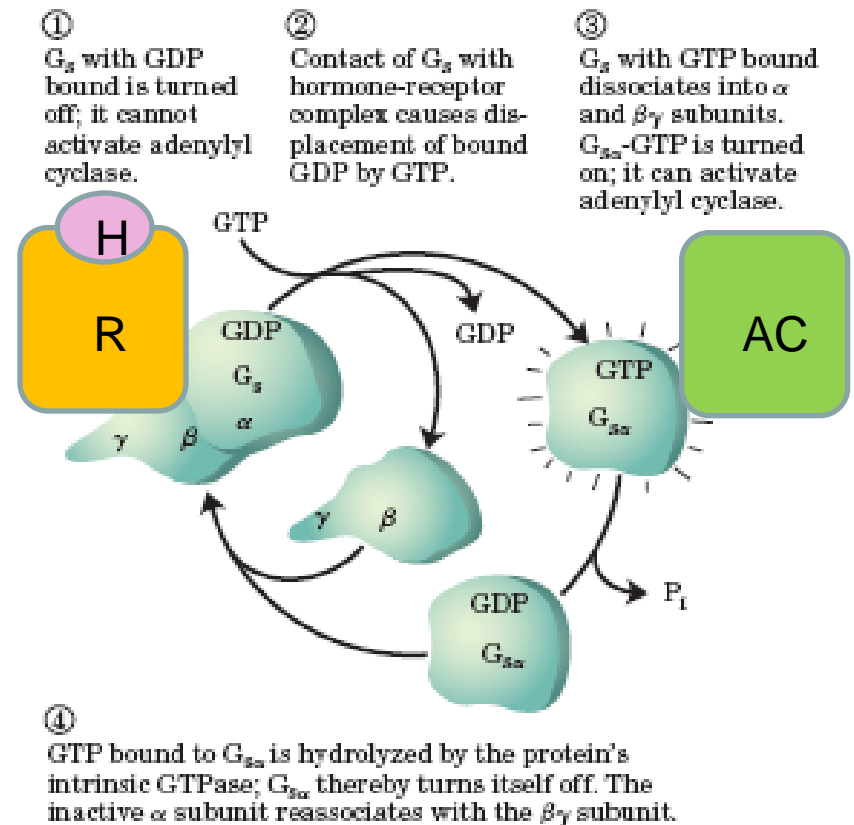


Obstaja več mehanizmov za utišanje signala, ki ga je sprožil adrenalin

1. hidroliza cAMP s fosfodiesterazo: nastane AMP, ki ni signalna molekula

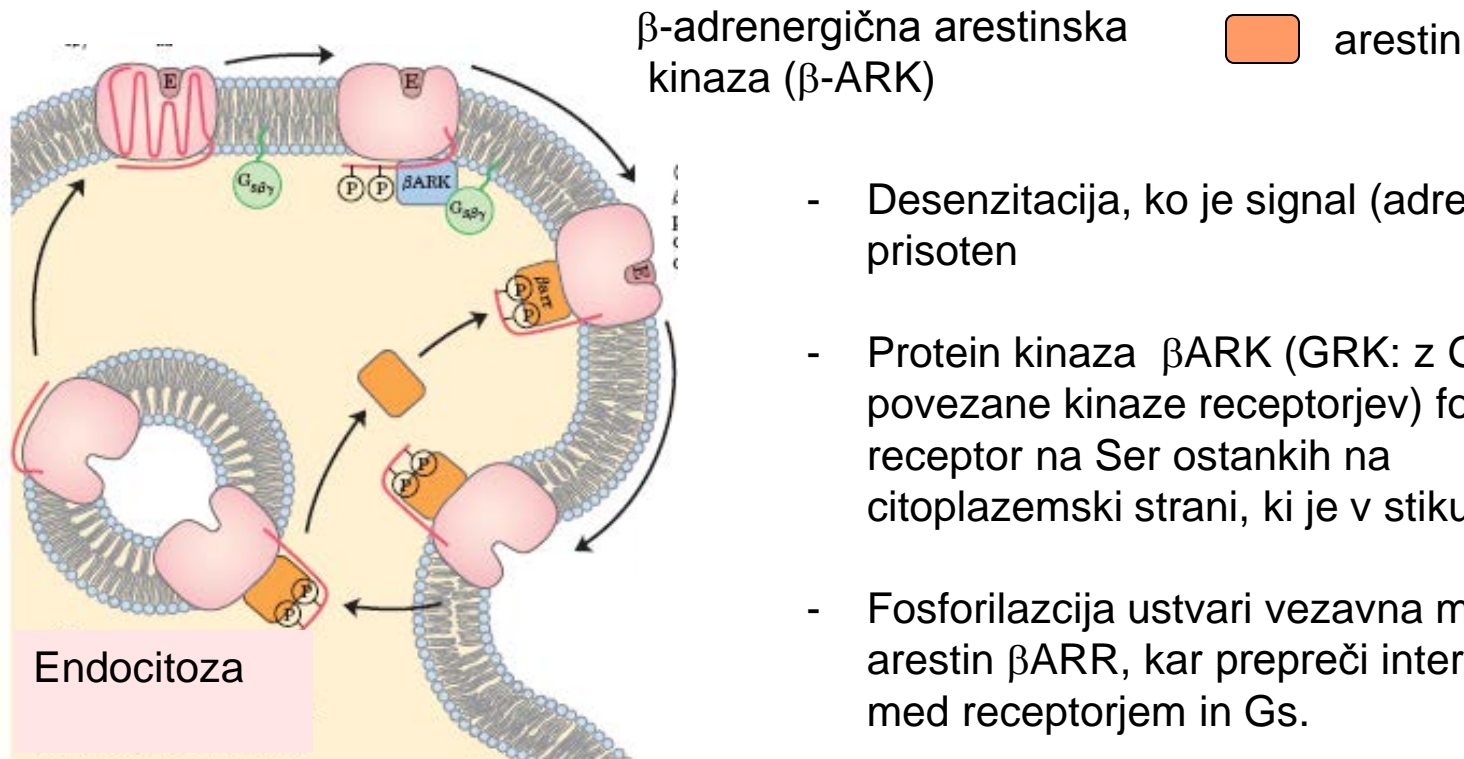


2. Hidroliza GTP z endogeno GTPazno aktivnostjo G_α podenote



3. Ko je koncentracija adrenalina pod K_d , se ne veže več na receptor – signalizacije ni.

Možna je tudi desenzitizacija signaliziranja β -adrenergičnega receptorja s fosforilacijo in povezavo z arestinom



- Desenzitacija, ko je signal (adrenalin) še prisoten
- Protein kinaza β ARK (GRK: z G-proteini povezane kinaze receptorjev) fosforilira receptor na Ser ostankih na citoplazemski strani, ki je v stiku z Gs
- Fosforilacija ustvari vezavna mesta za arestin β ARR, kar prepreči interakcijo med receptorjem in Gs.
- Receptorske molekule se odstranijo površja membrane, občutljivost za adrenalin se zmanjša.

Signaliziranje preko sistema GPRC in G proteinov

Dražljaji, ki se prenašajo prek protein kinaze A in 2nd obveščevalca cAMP

SIGNALNE MOLEKULE:

Kortikotropin (ACTH)
Kortikotropin sproščujoči hormon (CRH)
Dopamin (D1, D2)
Adrenalin (epinefrin, beta-adrenergični signal)
Folikle stimulirajoči hormon (FSH)
Glukagon
Histamin
Lutenizirajoči hormon (LH)
Melanocitni stimulirajoči hormon (MSH)
Dišeče molekule
Paratiroidni hormon
Prostaglandini (PGE1, PGE2)
Serotonin
Somatostatin
Molekule okusa (sladko, grenko)
Tiroidni stimulirajoči hormon (TSH)

Dražljaji, ki se prenašajo prek fofsolipaze C in 2nd obveščevalcev IP3 in DAG

SIGNALNE MOLEKULE

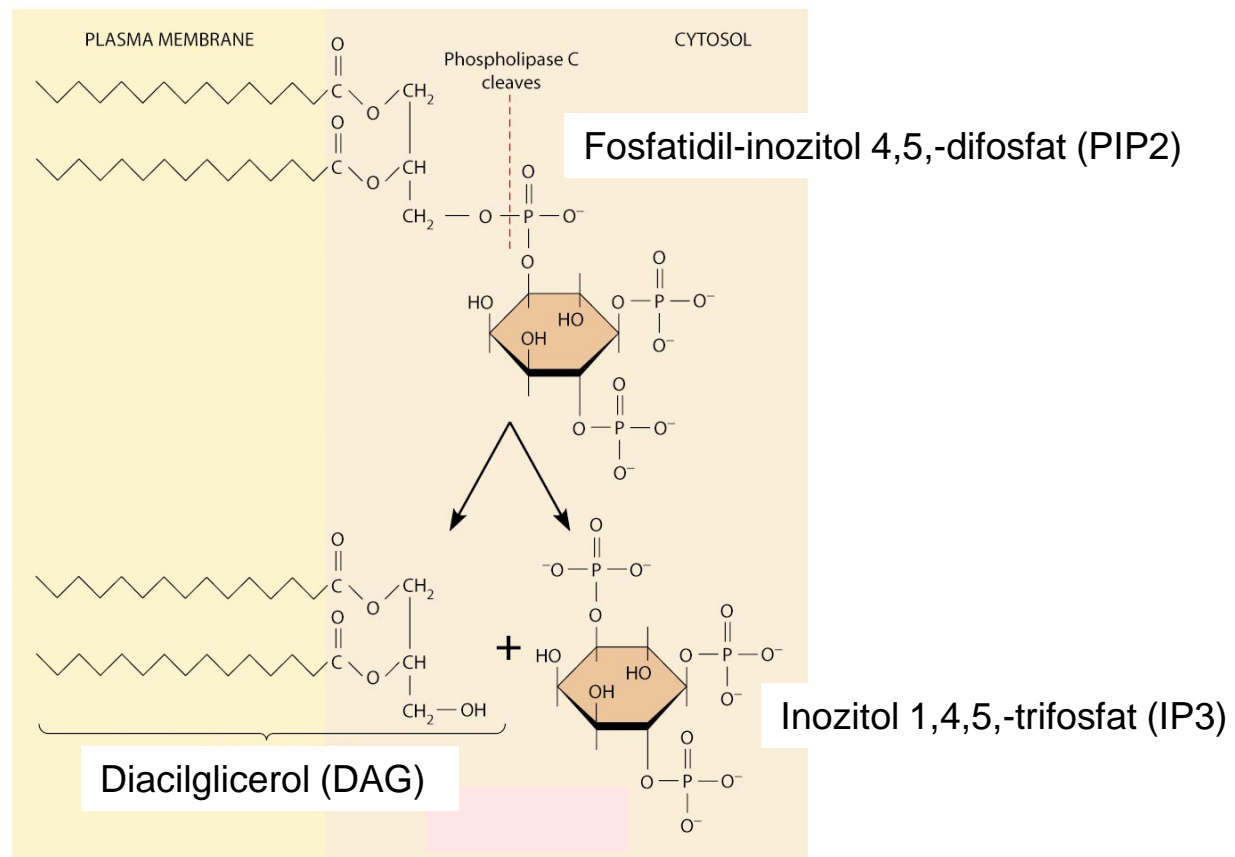
Acetilholin (miskarinski M1 receptor)
Angiotensin II
Auksin
Gastrin sproščujoči peptid
Glutamat
Gonadotropin sproščujoči hormon (GRH)
Histamin H1
Svetloba (vinska mušica *Drosophila*)
Oksitocin
Rastni faktor trombocitov (PDGF)
Serotonin
Tirotropin sproščujoči hormon (TRH)
Vazopresin

2nd obveščevalca sta tudi Ca²⁺ in cGMP

Signaliziranje preko G proteinov in sekundarnih obveščevalcev diacilglicerola, inozitol-3-fosfata (IP₃) in Ca₂₊

Druga velika skupina GPCR je preko G-proteinov povezana s fosfolipazo C (PLC).

Z G proteini povezan protein Gq zamenja GDP za GTP in se aktivira. Poveže se s PLC, ki iz membranskega fosfolipida fosfatidil-inozitol 4,5,-difosfata (PIP₂) naredi dva sekundarna obveščevalca: diacilglicerol (DAG) in inozitol 1,4,5,-trifosfat (IP₃).



Signaliziranja preko G proteinov, DAG in IP₃

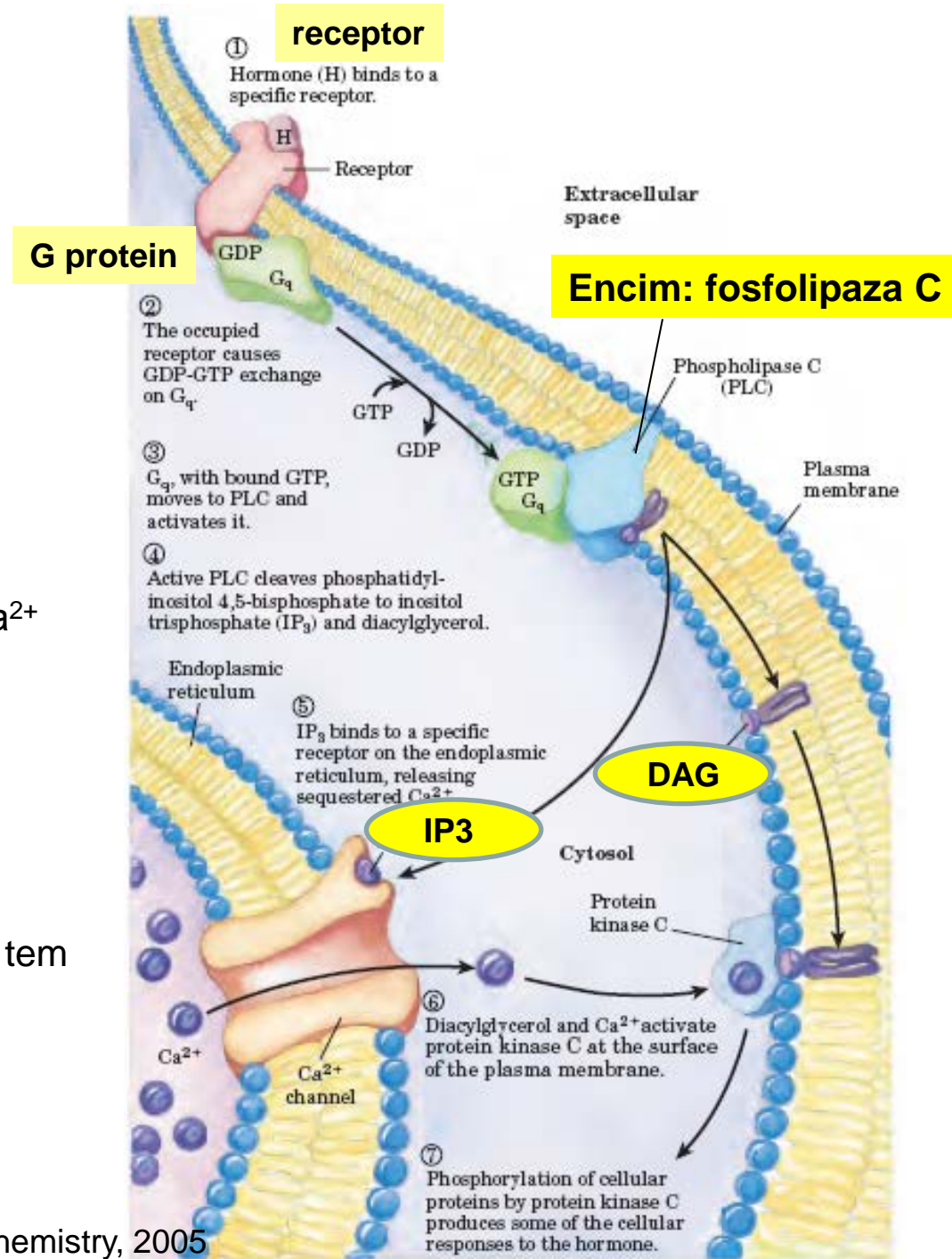
Inozitol-3-fosfat (IP₃) in DAG kot sekundarna obveščevalca

Aktiviranje fosfolipaze C (PLC) z diacil glicerolom (DAG)

In

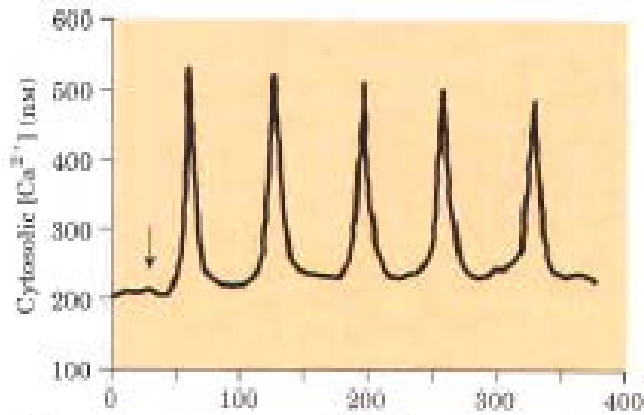
Delovanje IP₃ na ionske kanalčke za Ca²⁺ v membrani endoplazemskega retikuluma

Primer: Histamin (vazodilator, širi žile) deluje preko G-proteinov inhibitorno na fosfolipazo C –zmanjša sintezo IP₃ in s tem uravnava sproščanje Ca²⁺ iz sarkoplazemskega retikuluma in s tem relaksira mišice, ki krčijo žile.



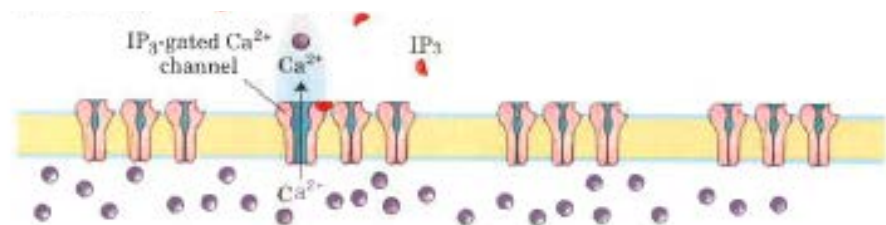
Ca²⁺ ioni so sekundarni obveščevalci, katerih koncentracija se spreminja v prostoru in času

Spremembe znotrajcelične koncentracija Ca²⁺ zazna kalmodulin, ki se ob vezavi ionov konformacijsko spremeni. Kalmodulin je povezan s troponinom – krčenje progastih mišic.

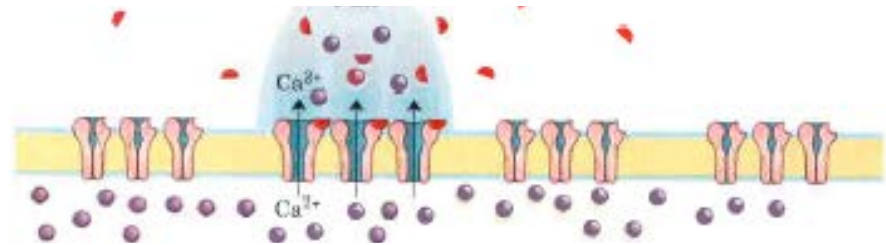


Zunanji signali sprožijo oscilacije v koncentraciji Ca²⁺ ionov

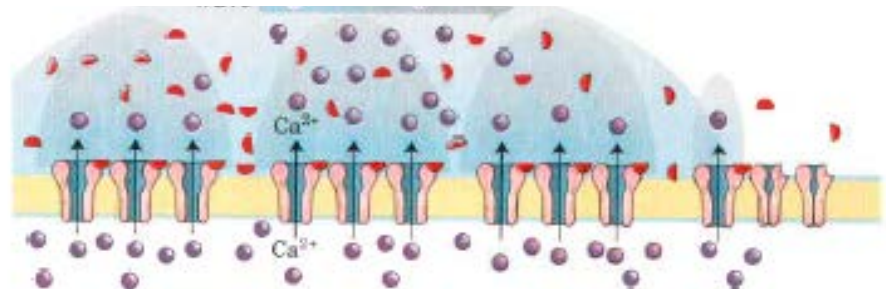
Šibek signal povzroči majhno povečanje IP₃. Posamezni Ca²⁺ kanalčki se prehodno odprejo ("blip")



Močnejši signal povzroči močnejše povečanje IP₃. Vsi Ca²⁺ kanalčki v gruči se odprejo ("puff" - oblak)



Če je oblak dovolj velik, to povzroči odprtje sosednjih gruč Ca²⁺ kanalčkov – val Ca²⁺, ki se premika vzdolž membrane ER



Proteini, uravnavani s Ca^{2+} ioni in kalmodulinom

Od Ca^{2+} - kalmodulina odvisne kinaze I – IV

Od Ca^{2+} odvisni + Na^+ kanalčki (Paramecij)

Ca^{2+} -sproščujoči kanalčki sarkoplazemskega retikuluma

Kalcineurin (fosfoprotein fosfataza 2B)

cAMP fosfodiesteraza

cAMP-nadzorovani kanal vonja

cGMP nadzorovani kanali Na^+ in Ca^{2+} (paličnice in čepki)

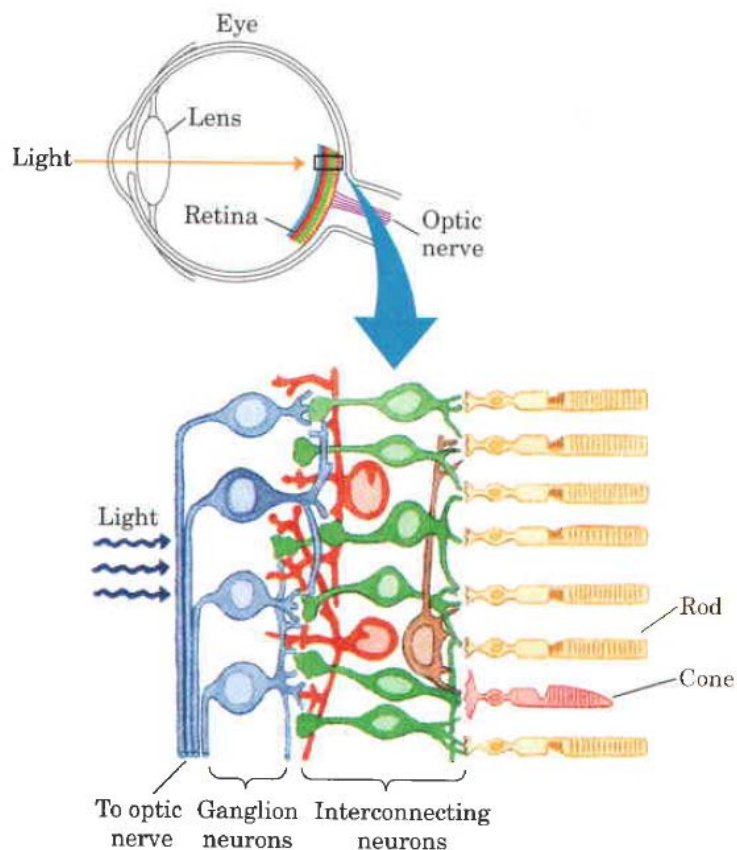
Glutamatna dekarboksilaza

Kinaze miozinskih lahkoh verig

NAD^+ kinaze

NO sintaza

Sprejem svetlobe v očesu vretenčarjev poteka s signaliziranjem preko G proteina transducina in 2nd obveščevalca cGMP



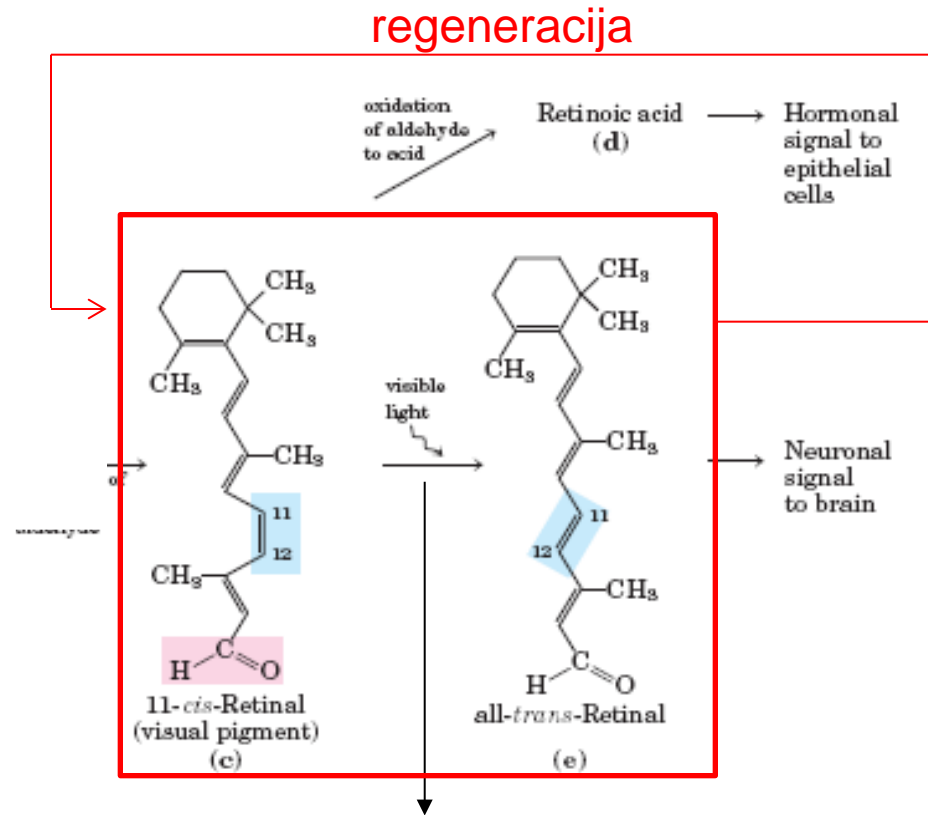
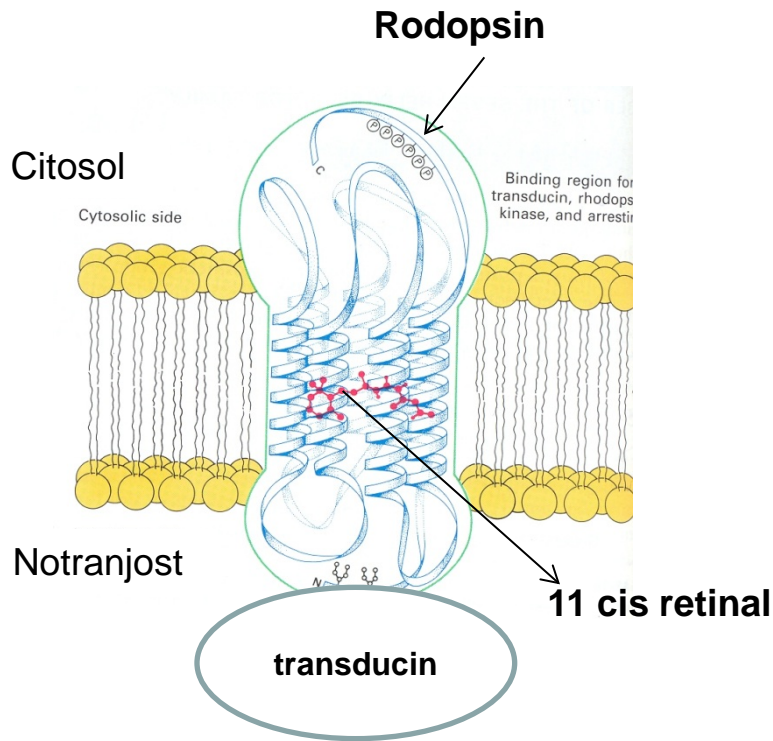
Paličnica, za svetlobo občutljiva čutna celica v mrežnici

Čepki - fotoreceptorske celice (cone)

V paličnicah (rod) je 7-transmembranski protein rodopsin, na katerega je vezan derivat vitamina A, 11-cis retinal.

Rodopsin je na citoplazemski strani v stiku s transducinom.

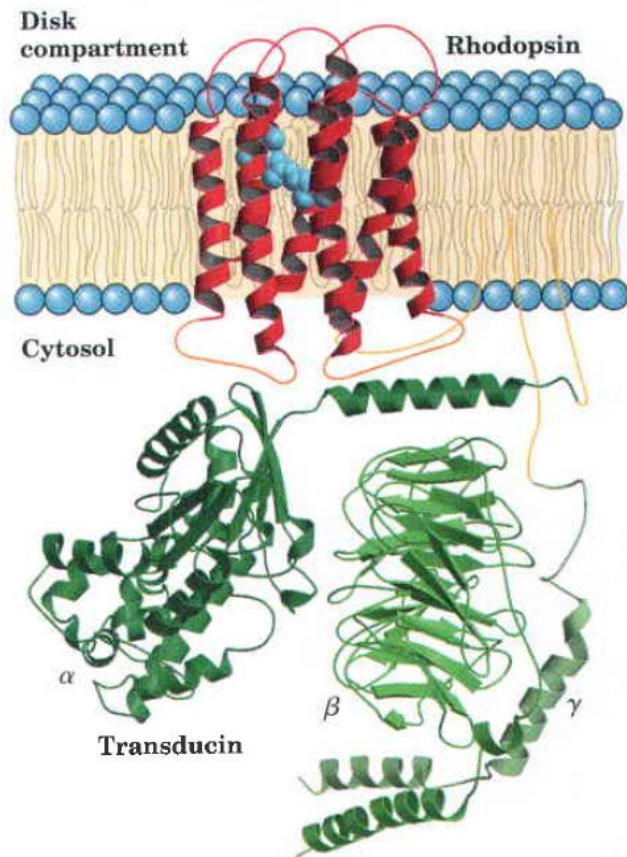
Energija svetlobe povzroči pretvorbo 11-cis retinala v vse-trans retinal



Izomerizacija 11-cis-retinala v trans retinal pod vplivom svetlobe - prvi v zaporedju dogodkov v vidnem ciklu. Energija svetlobe je potrebna za cepitev vezi.

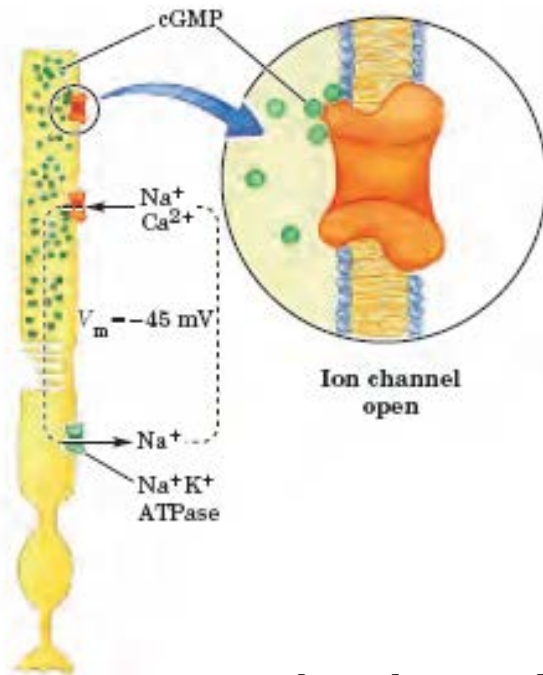
Sprememba konfiguracije vitamina A povzroči konformacijsko spremembo proteina rodopsina.

Interakcija med rodopsinom (receptor za svetlobo) in transducinom (G protein) sproži živčni impulz (zaznavanje svetlobe)

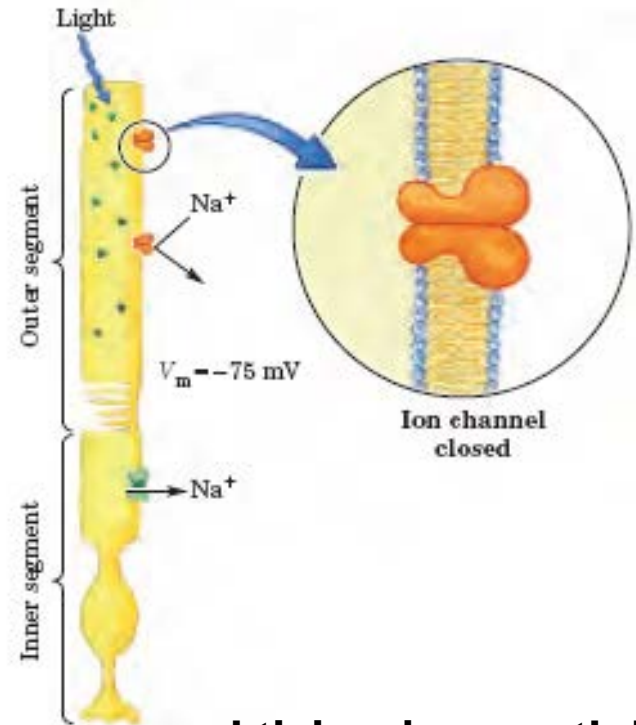


- Svetloba spremeni konfiguracijo retinala
- Konformacijska sprememba rodopsina
- konformacijska sprememba transducina
- Vezava GTP in aktivacija transducina
- Aktivirani transducin aktivira fosfodiesterazo, ki razgradi cGMP (**sekundarni obveščevalec!**) v GMP
- Padec cGMP zapre kanalčke za Na⁺
- Posledična hiperpolarizacija membrane sproži živčni impulz

Hiperpolarizacije paličnic s svetlobo → → → razgradnja cGMP → zaprtje ionskih kanalčkov

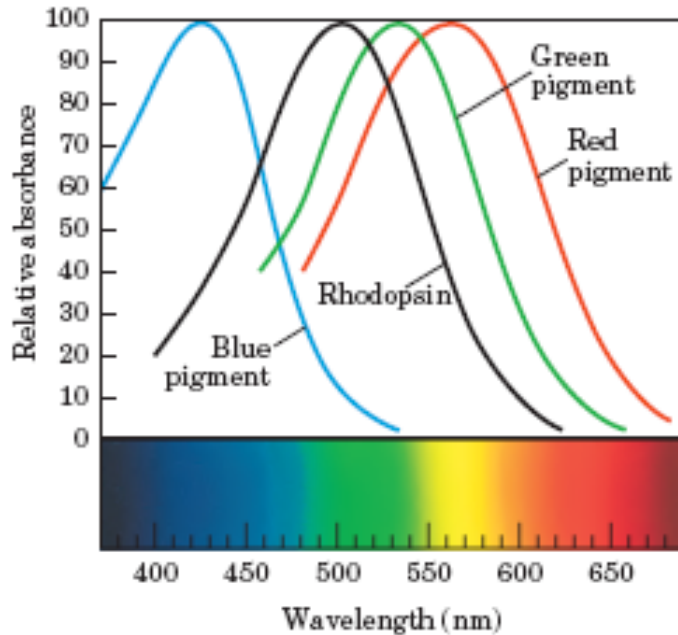


stanje mirovanja



aktiviranje s svetlobo

Absorpcijski spektri rodopsina in rdečih, zelenih in modrih receptorjev celic čepkov



John Dalton ni razlikoval barv. Po njegovi smrti 1844 so konzervirali njegove oči in leta 1990 analizirali DNA – primerjava nukleotidnih zaporedij različnih opsinov. Ugotovitev: ni bilo gena za absorpcijo svetlobe zelene barve

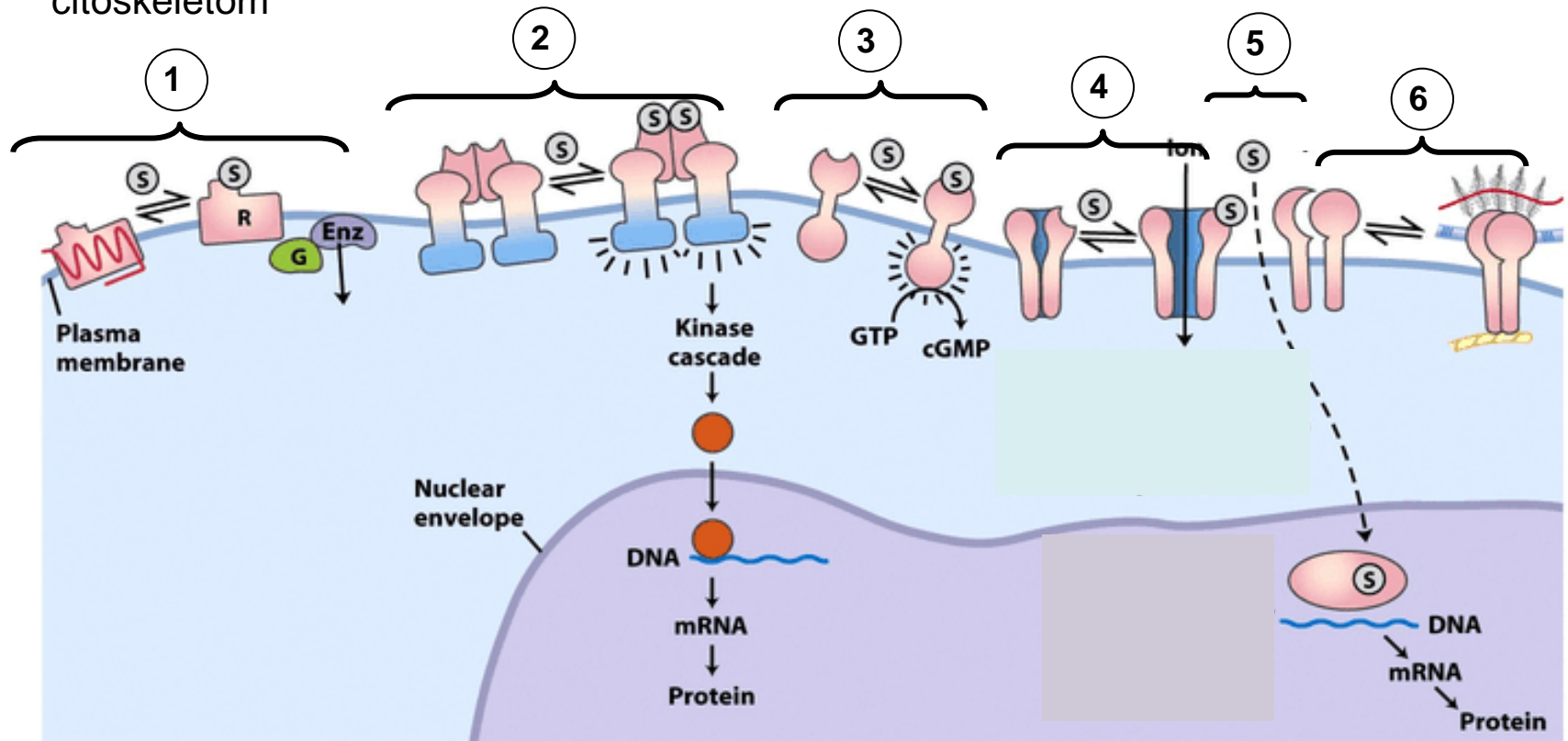
GPRC in sekundarni obveščevalci

- GPRC delujejo preko heterotrimernih G proteinov. Po vezavi liganda katalizirajo zamenjavo GDP za GTP na podenoti G proteina in tako spremenijo aktivnost efektorskega proteina, ki sintetizira sekundarne obveščevalce.
- Beta adrenergični receptor aktivira Gs podenoto proteina G in aktivira adenilat ciklazo, da tvori več sekundarnega obveščevalca cAMP, ta pa stimulira protein kinazo A, ki nadalje fosforilira tarčne proteine (kaskada, ojačitev signala)
- Ojačitvi signala po določenem času sledi dušenje signala (več mehanizmov)
- Nekateri GPRC delujejo preko v membrani vezane fosfolipaze C, ki cepi PIP2 v DAG in IP3. IP3 z vezavo na Ca²⁺ kanalčke v ER poveča citoplazemsko koncentracijo kalcijevih ionov. DAG in Ca²⁺ delujeta skupaj – aktivirata protein kinazo C, ki nadalje fosforilira tarčne proteine.
- Znotrajcelična koncentracija Ca²⁺ uravnava (pogosto preko kalmodulina) mnoge druge encime in proteine, ki so vključeni v izločanje snovi, gibanje citoskeleta in mišično kontrakcijo.
- Sekundarni obveščevalec v vidnem ciklu je cGMP.

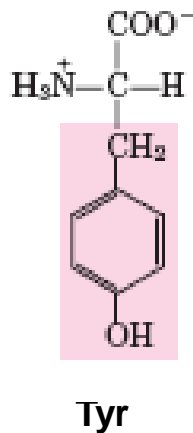
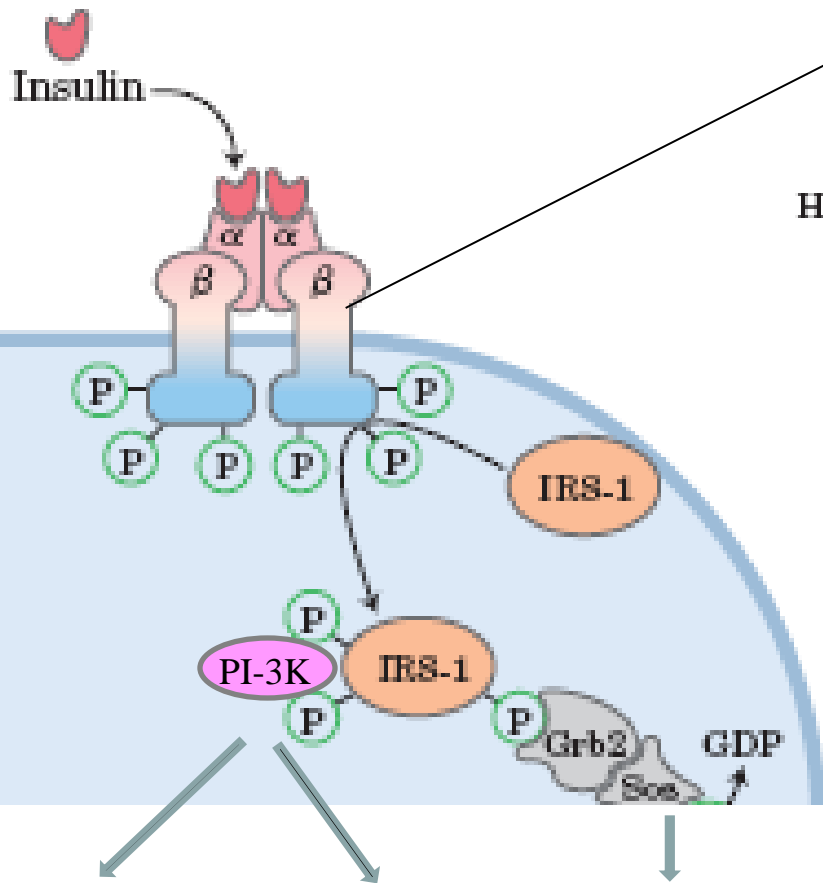
Evkariontske celice: 6 vrst mehanizmov prenosa signala

(Lehninger 2008)

1. Membranski receptorji, povezani z G proteini
2. Membranski receptorski encimi - **receptorji s tirozinkinazno aktivnostjo (insulinski receptor)**
3. Receptorji z gvanilatciklazno aktivnostjo
4. Ionski kanalčki z zaporo
5. Jedrni receptorji, ki vežejo steroidne hormone, tiroidne hormone in vitamin D
6. Adhezijski receptorji, ki posredujejo informacijo med ekstracelul. matriksom in citoskeletom



2. membranski receptorski encimi – receptor za inzulin



Inzulinski receptor – tetramer 2 α , 2 β

Zunajcelični del α – 2 vezavni mesti za 2 inzulina

Znotrajcelični del β – kinazna encimska aktivnost

Vezava inzulina povzroči konformacijsko spremembo, ki omogoča avtofosforilacijo inzulinskega receptorja na Tyr β -podenote znotraj celice, sledi fosforilacija subatrata IRS in nadaljnje interakcije med proteini.

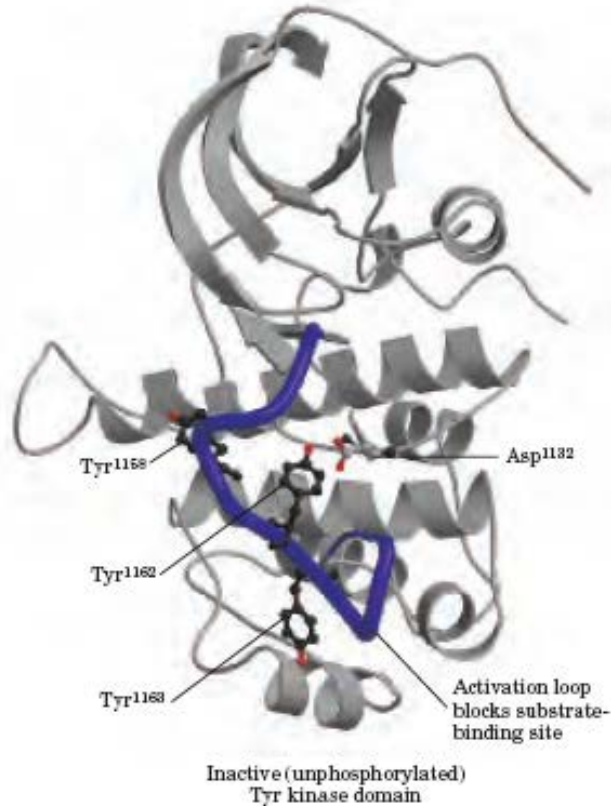
premik transporterja za glukoza

aktivacija encimov

aktivacija genov (sinteza proteinov)

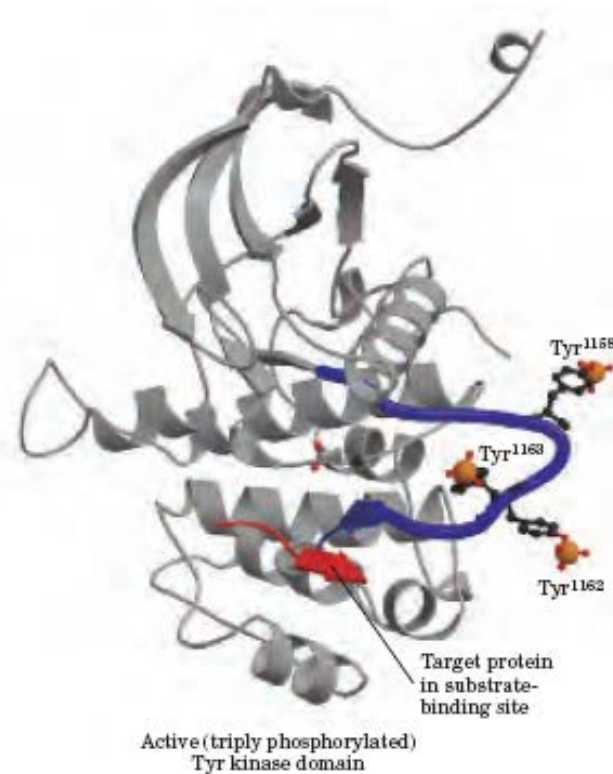
Aktiviranje inzulinskega receptorja – tirozinske kinaze z avtofosforilacijo → sprememba konformacije

Neaktivna domena tirozinske kinaze



Tyr zaščit

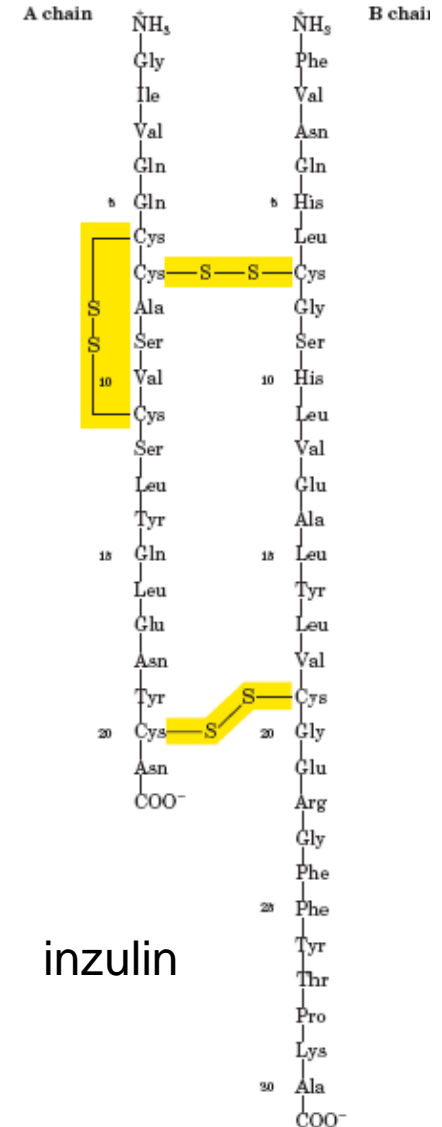
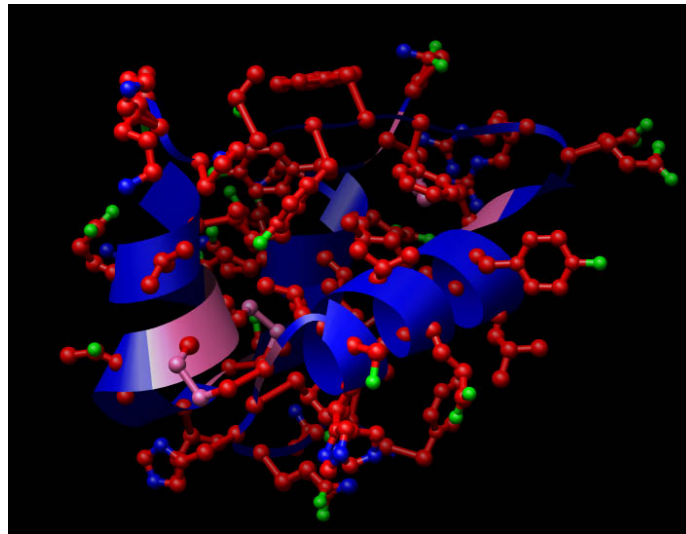
Aktivna domena – 3 tyr ostanki fosforilirani



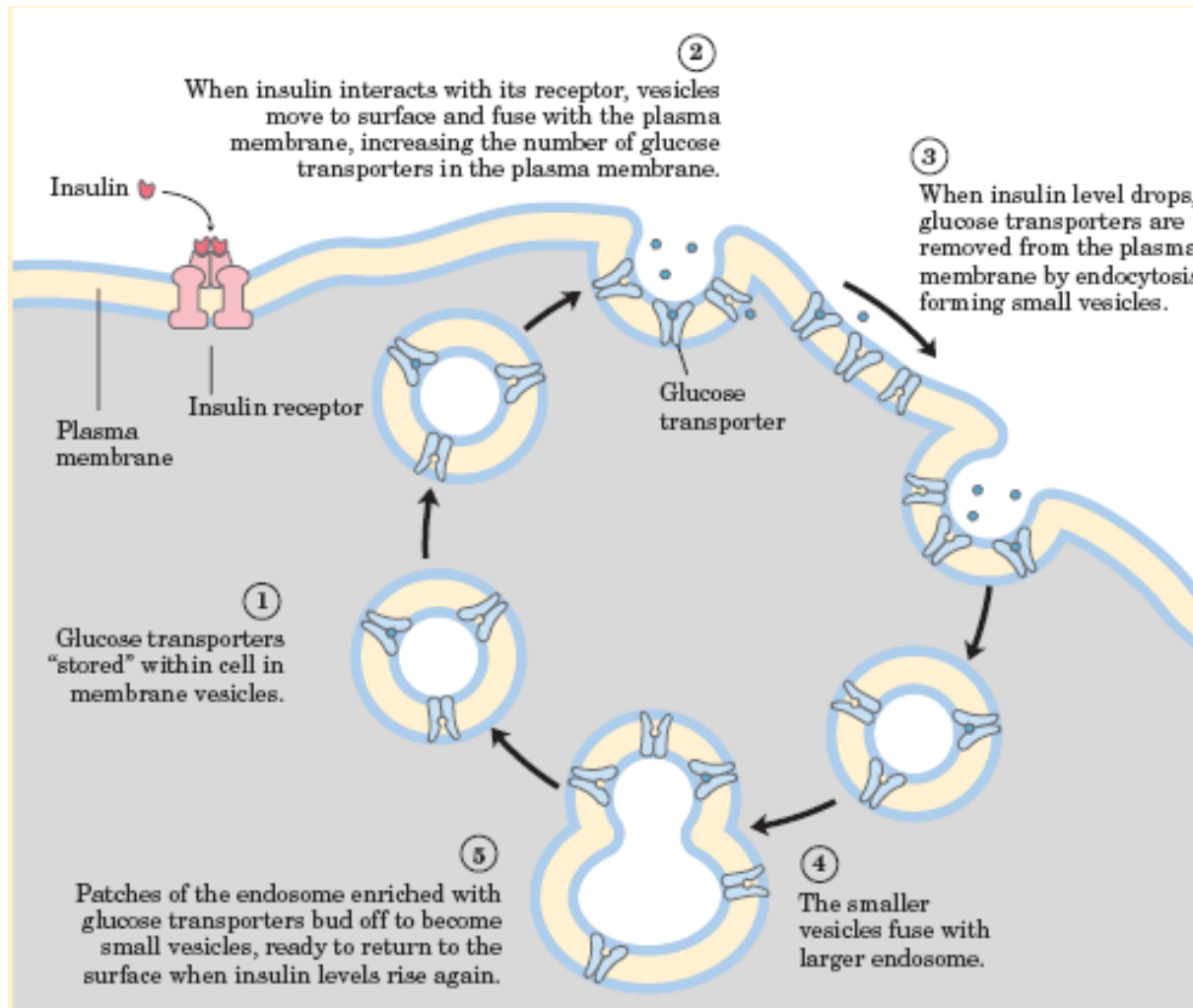
Tyr prost - fosforilacija

Osnovni učinki inzulina

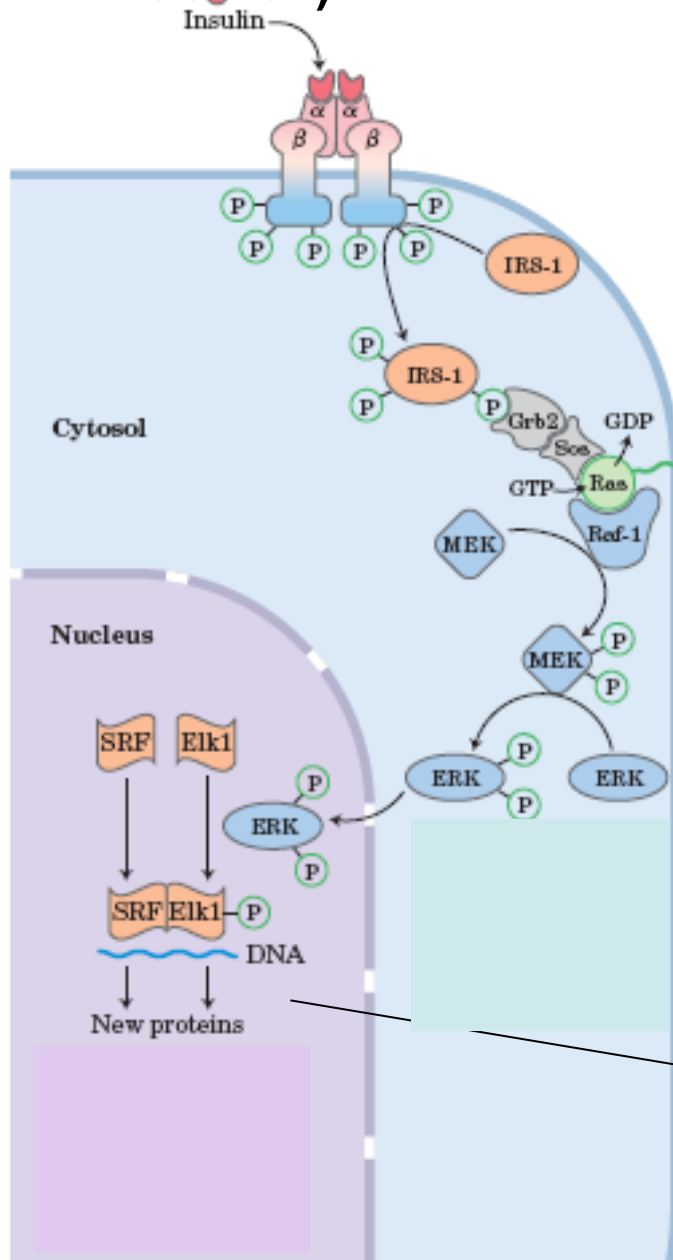
- Hitri (sekunde): pospešen transport glukoze, AK in K^+ v celice, občutljive na inzulin
- Srednje hitri (minute):
 - stimulacija sinteze, inhibicija razgradnje glikogena
 - stimulacija sinteze, inhibicija razgradnje proteinov
 - stimulacija razgradnje, inhibicija sinteze glukoze
- Kasnejši (ure): povišana koncentracija encimov, ki sintetizirajo lipide



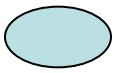
Inzulin uravnava prenos prenašalca glukoze v miocitu (hitri učinek inzulina)



Urnvananje izražanja genov z inzulinom (počasni učinek)



 **IRS-1 insulin receptor substrat**

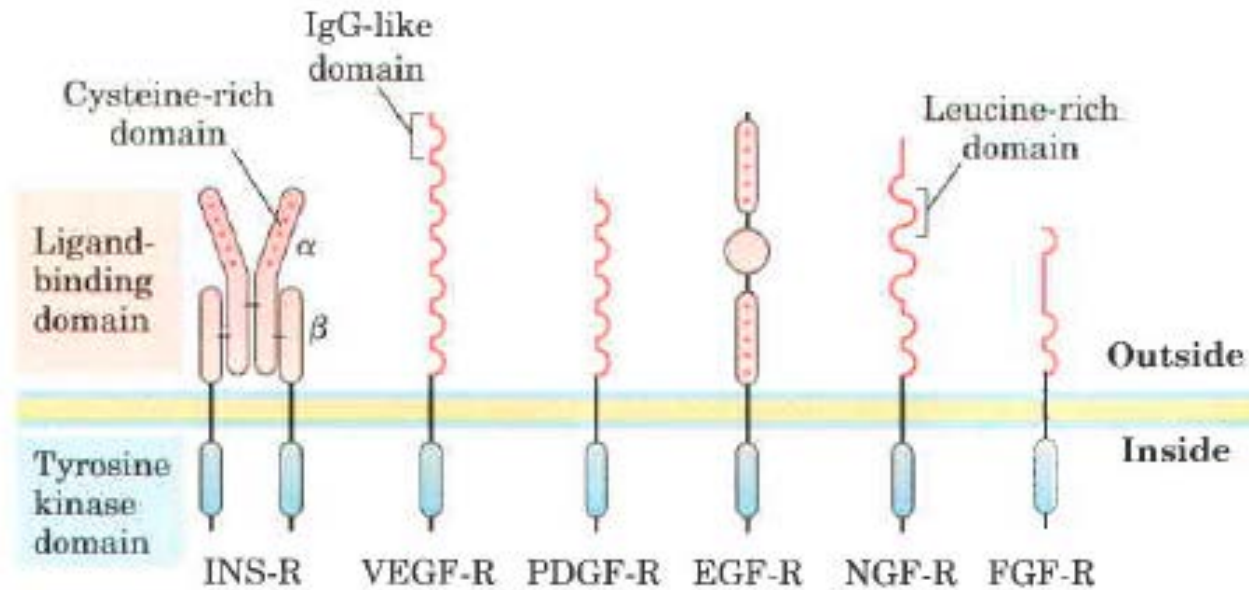
 **kinaze**
inzulinski receptor
Raf
MEK
ERK

 **Ras G protein**

 **transkripcijski faktor**

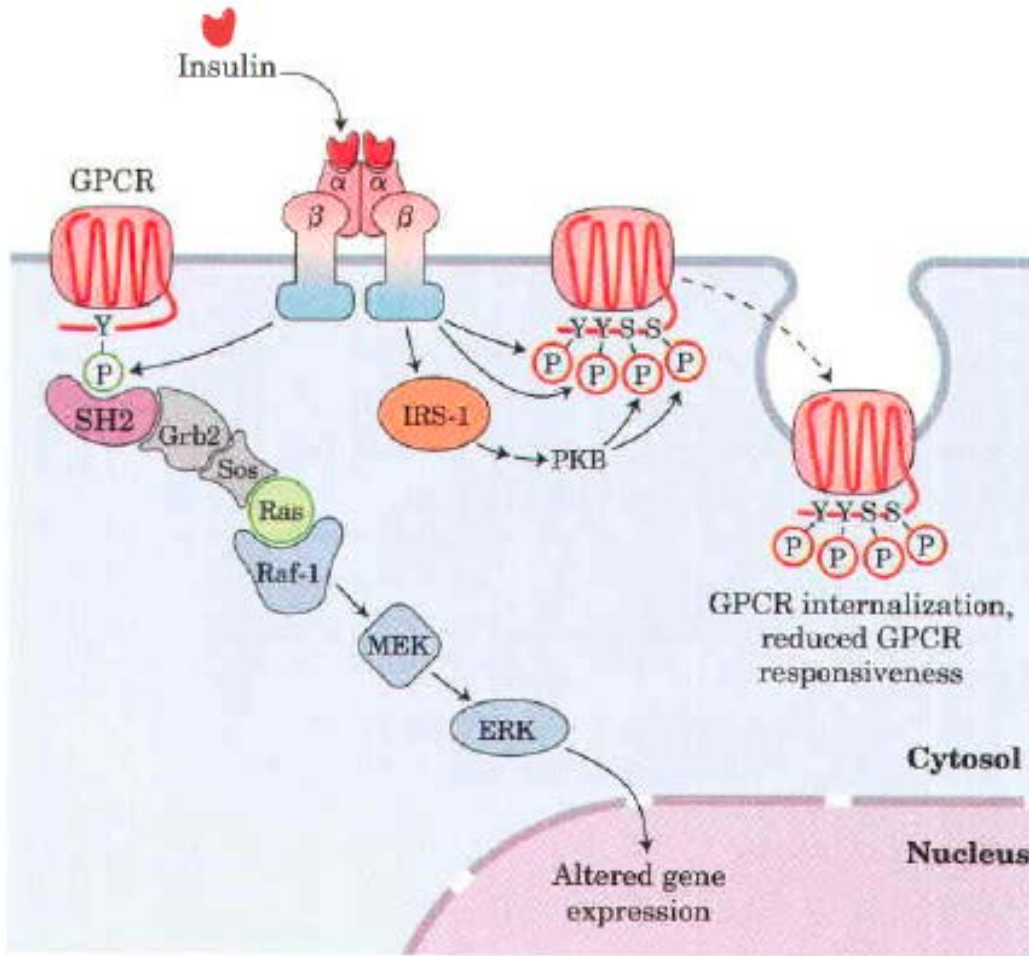
Prepisovanje genov, ki kodirajo encime, vključene v metabolizem glukoze

Poleg inzulinskega receptorja so še drugi receptorji s tirozinkinazno aktivnostjo



Ob vezavi liganda na receptorsko mesto pride do avtofosforilacije na tirozinkinazni domeni. Tirozinska kinaza potem fosforilira še druge proteine v signalni kaskadi.

Različne signalne poti se med seboj prepletajo in sodelujejo – primer sodelovanja insulinskega receptorja in beta-adrenergičnega receptorja

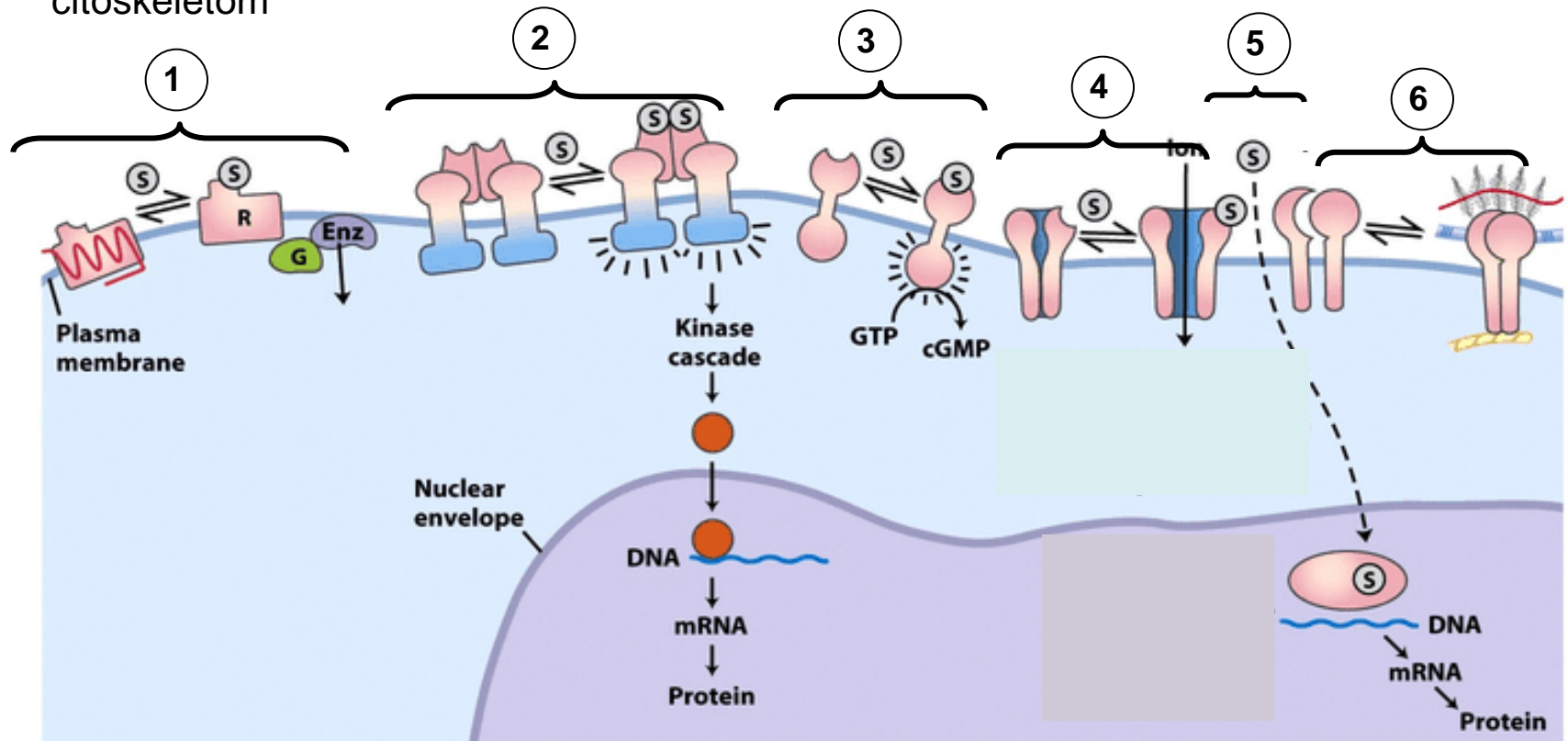


- Insulin je signal, ki preko fosforilacije adrenergičnega receptorja povzroči :
- 1) zmanjšanje odzivnosti na adrenalin;
 - 2) Spremenjeno izražanje genov preko Ras signalne poti.

Evkariontske celice: 6 vrst mehanizmov prenosa signala

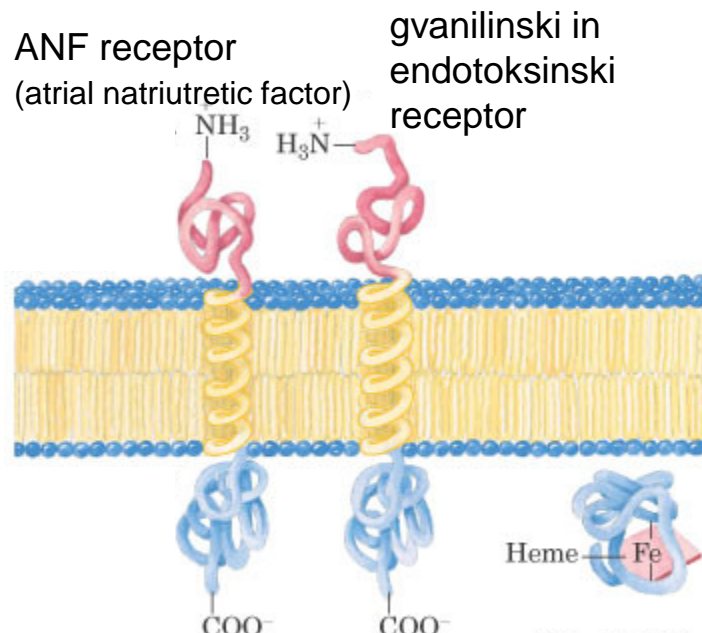
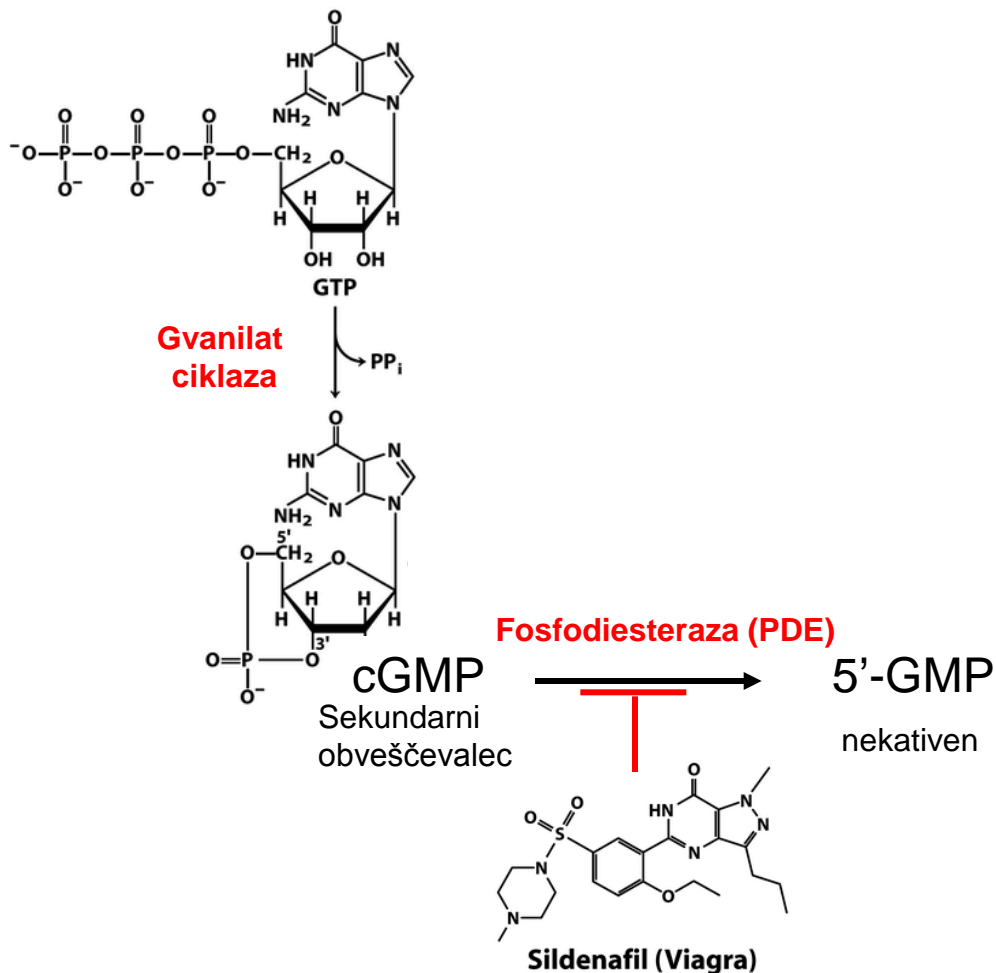
(Lehninger 2008)

1. Membranski receptorji, povezani z G proteini
2. Membranski receptorski encimi - receptorji s tirozinkinazno aktivnostjo (insulinski receptor)
3. Receptorji z gvanilatciklazno aktivnostjo
4. Ionski kanalčki z zaporo
5. Jedrni receptorji, ki vežejo steroidne hormone, tiroidne hormone in vitamin D
6. Adhezijski receptorji, ki posredujejo informacijo med ekstracelul. matriksom in citoskeletom



3. Receptorji z gvanilatciklazno aktivnostjo in signalizacija preko cGMP

- Signalna molekula se veže in konformacijsko spremeni receptor
- Gvanilatciklaza na notranji strani receptorja se aktivira
- Nastane sekundarni obveščevalec cGMP;
- Aktivacija s cGMP-odvisno protein kinazo;
- Fosforilacija encimskih tarč



z NO aktivirana
gvanilat ciklaza
(topna!!)

Medicinska uporaba:

- NO spodbudi relaksacijo srčne mišice (ublaži angina pectoris)
- Viagra – inhibira fosfodiesterazo krvnih žil penisa: koncentracija cGMP ostane povišana

4. Ionski kanalčki z zaporo

Ionski kanalčki so osnova za električno signaliziranje vzdražnih celic

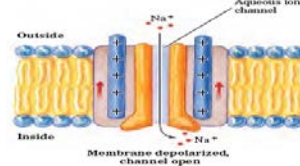
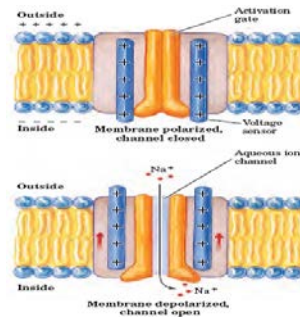
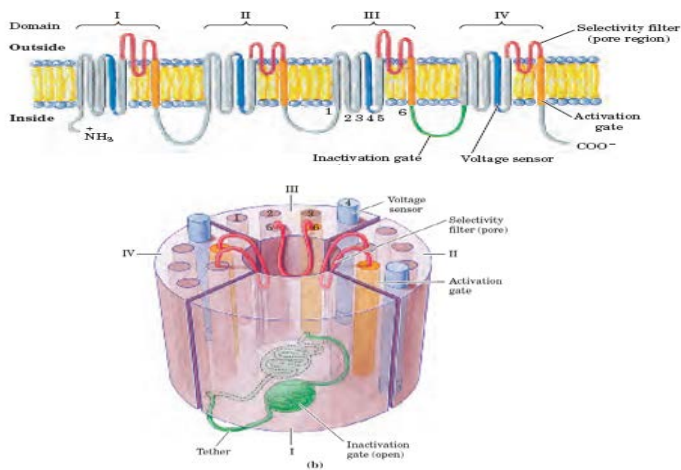
- **ionski kanalčki, odvisni od napetosti**

primer: Na^+ kanalček v živčnih in v živčno-mišičnih sinapsah

- **ionski kanalčki, odvisni od liganda**

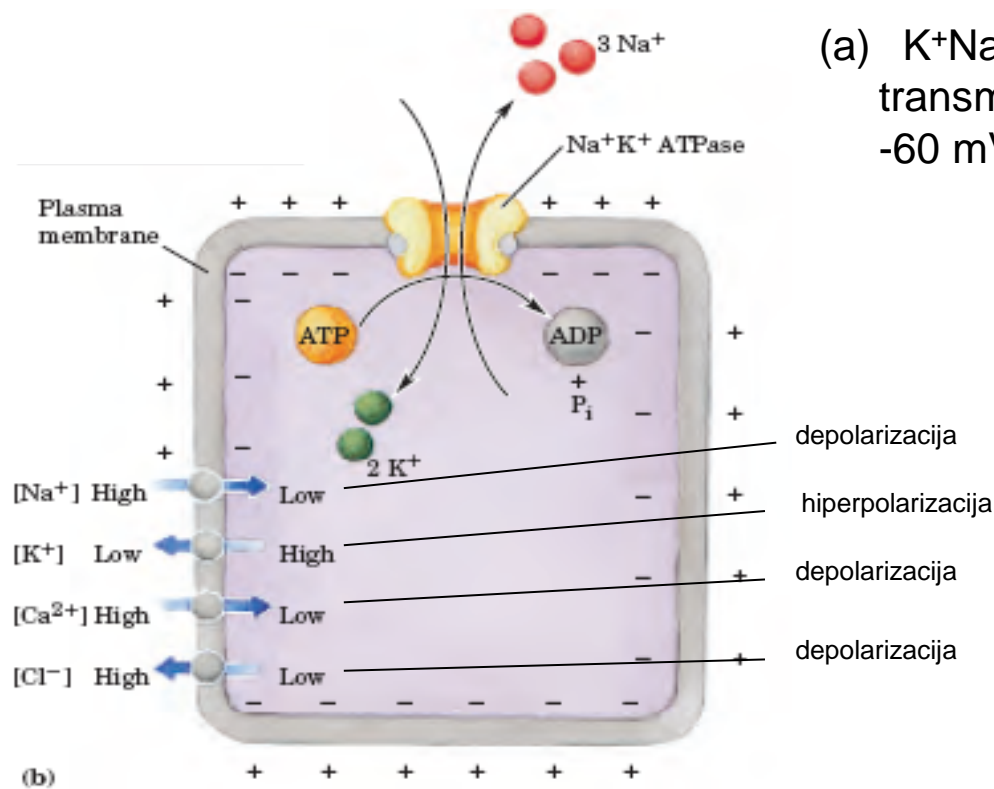
primer: acetilholinski receptor

Na^+ kanalček



- Na^+ kanalčki so selektivni (K^+ in Ca^{2+} 100 x slabše prehajata)
- Hitrost pretoka $> 10^7$ ionov/sek
- Kanalčki se odprejo kot odziv na zmanjšanje membranskega potenciala (“voltage-gated”)
- Hitro se inaktivirajo
- Kanalček sestavlja membranski protein (1 840 Amino kislinski ostanki)

Prehod ionov skozi kanalčke, ki so odvisni od napetosti, spreminja transmembranski potencial



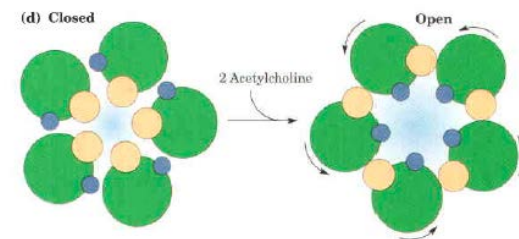
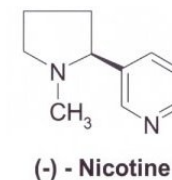
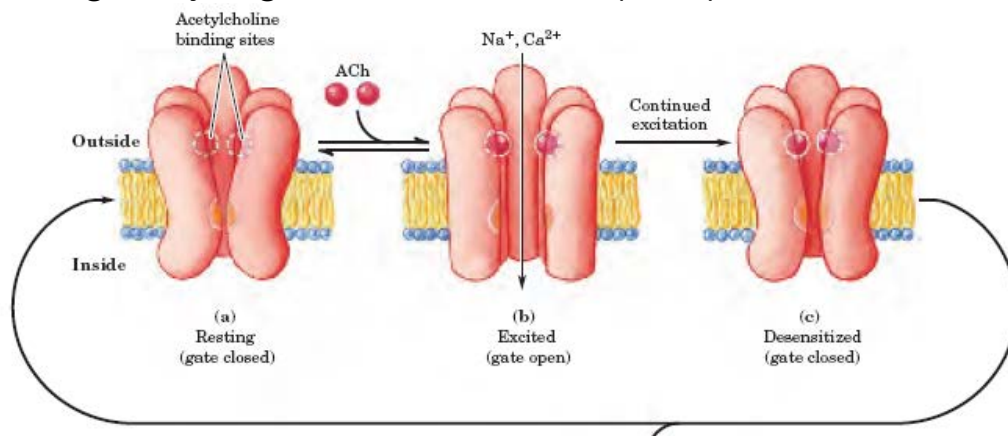
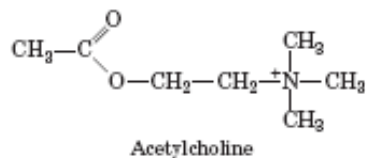
(a) K^+Na^+ ATPaza ustvarja transmembranski potencial -60 mV

Če se kanalčki odprejo – sprememba v membranskem potencialu!!

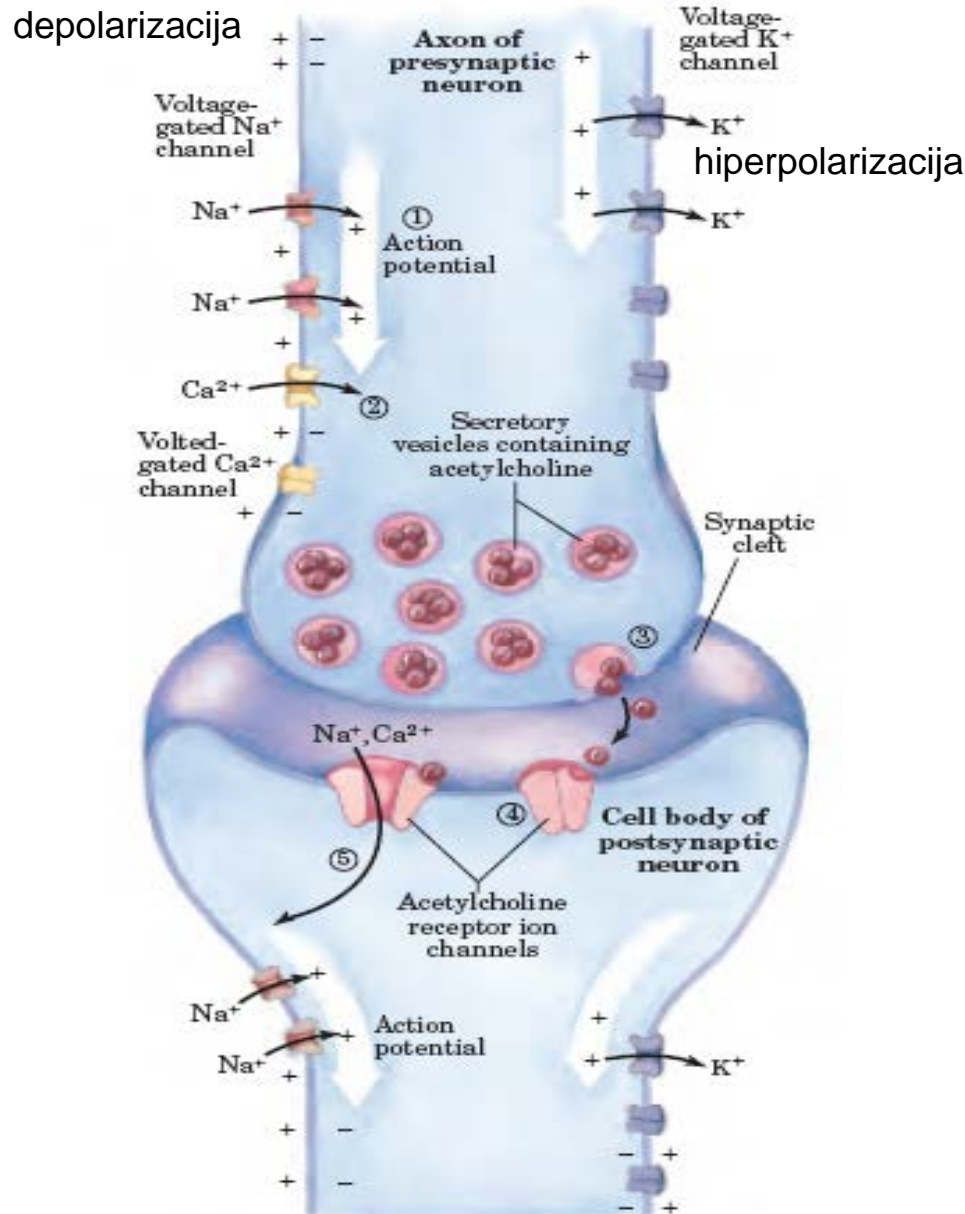
(b) Ioni težijo h gibanju v smeri elektrokemijskega gradienta skozi polarizirano membrano – spremembe transmembranskega potenciala

Acetilholinski receptor (nikotinski tip) je primer ionskega kanalčka, ki je odvisen od liganda

- Receptor je bistvena komponenta signala, ki se prenese od motoričnega nevrona do mišičnega vlakna (v živčno-mišični sinapsi)
- Naravni ligand – acetiholin (ACh) (ligand je tudi nikotin)
- Vezava ACh na receptor povzroči konformacijsko spremembo → odpre se kanalček
- Kationi prehajajo v notranjost celice → depolarizacija membrana
- Ionski kanalček je prepusten za Na^+ , Ca^{2+} in K^+
- Na^+ prehaja v smeri nižje konc. (2×10^7 ionov/s)
- Utišanje signala: razgradnja liganda acetilholina (ACh) z encimom acetilholin-esterazo



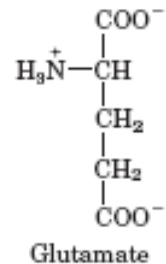
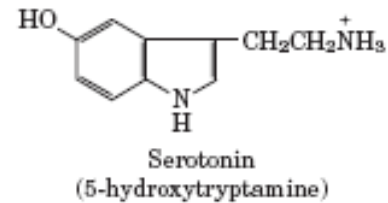
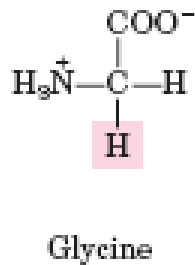
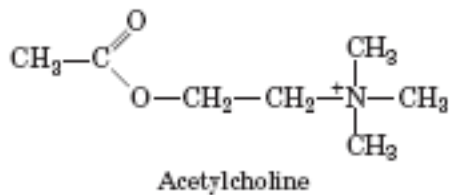
Ionski kanalčki za zaporo so ključni pri prenosu živčnega impulza



- Električni impulz (akcijski potencial) potuje od živčne celice po aksonu preko sinaps do naslednje celice
- Tri vrste ionskih kanalčkov, odvisnih od napetosti: Na⁺, K⁺ in Ca²⁺ kanalčki
- Na⁺ in K⁺ kanalčki se zaporedno odpirajo - enosmerna depolarizacija membrane
- Ca²⁺ kanalčki se odprejo, Ca²⁺ sproži eksocitozo ACh
- ACh se sprosti v sinaptično režo, aktivira Na⁺ / Ca²⁺ kanalčke na postsinapričnem nevronu ...
- acetilholin-esteraza (AChE) katalizira hidrolizo ACh → utišanje signala

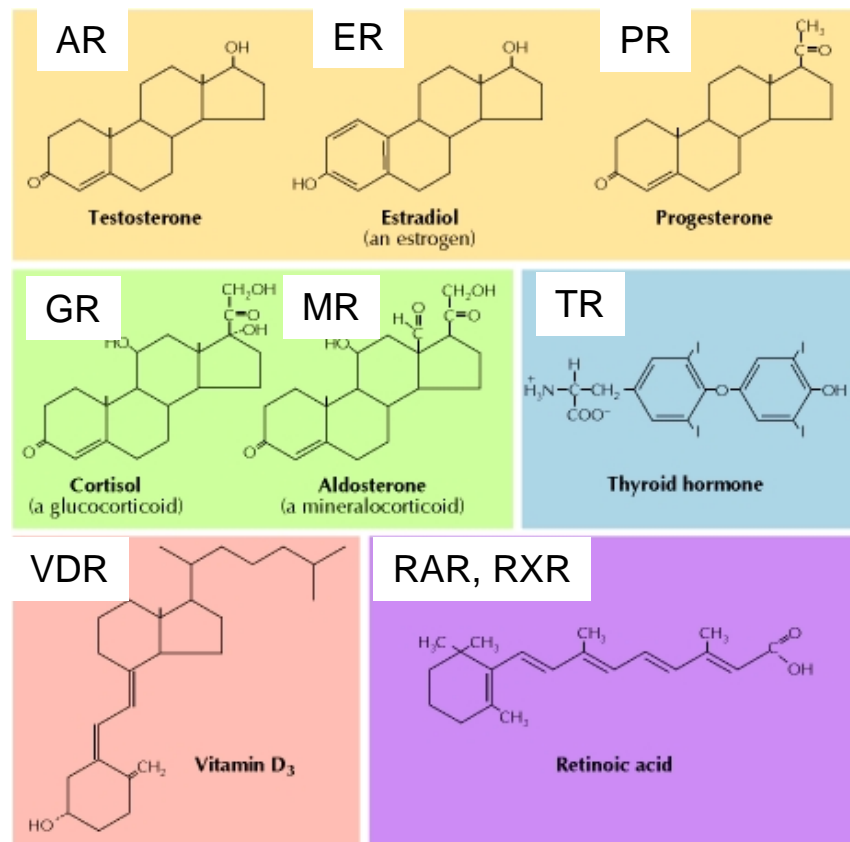
Nevroni vsebujejo ionske kanalčke (receptorje), ki se odzivajo na različne neurotransmiterje

neurotransmitter	ionski kanalček
ACh	Na ⁺ , Ca ²⁺
glicin	Cl ⁻
serotonin	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺
glutamat	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺



5. Signaliziranje preko jedrnih receptorjev

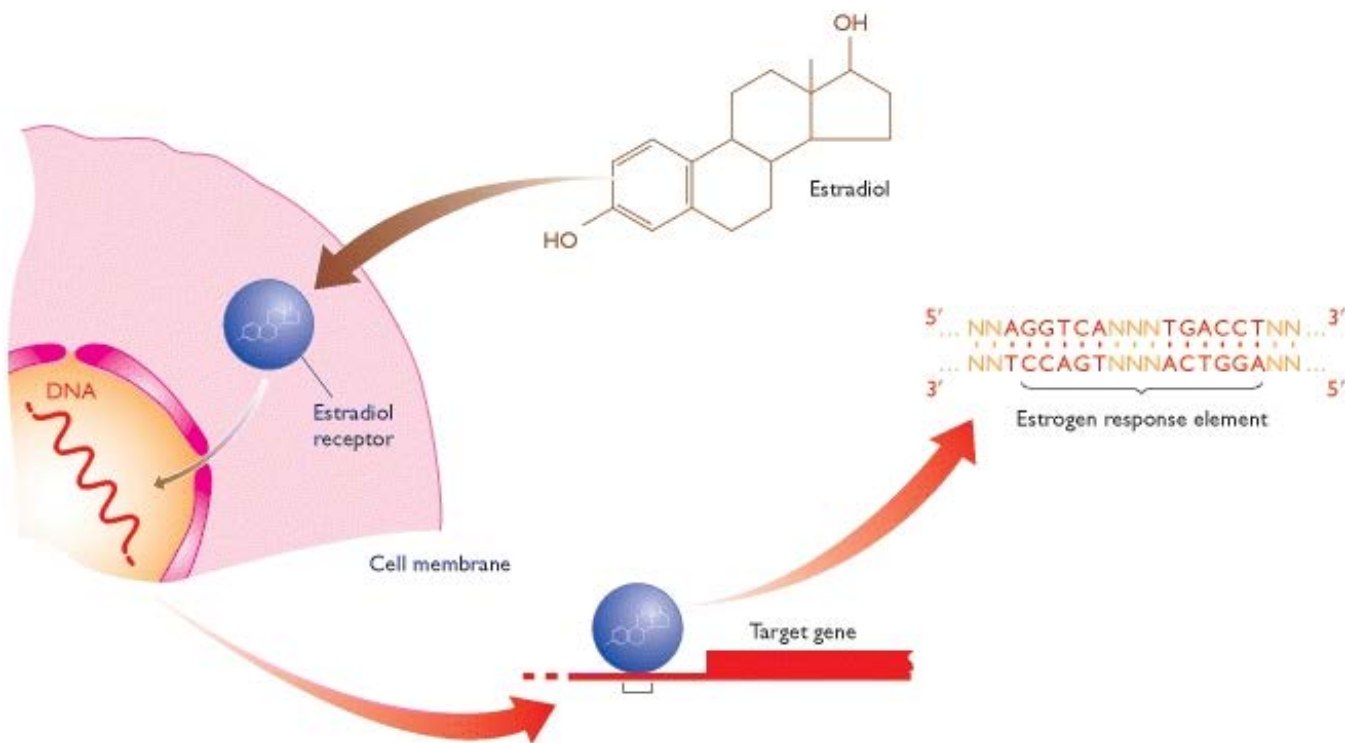
- **Lipidotopni hormon** sproži biološki odgovor v odzivnih tkivih, ki vsebujejo jedrne receptorje za hormon
- Hormon se veže na receptor z visoko afiniteto ($K_d \approx 10^{-9}$ M) in specifičnostjo v kompleks hormon-receptor
H + R = H-R
- Ob vezavi hormona se receptor konformacijsko spremeni, odkrije se vezavno mesto za DNA, kompleks se veže na specifična mesta na DNA in s tem uravnava (aktivira) prepisovanje določenih genov; s hormonom aktivirani receptor deluje kot transkripcijski faktor, RNA-polimeraza sintetizira mRNA
- Informacija se prenese do ribosomov, kjer se sintetizira določen protein kot odgovor na signal - hormon



Vsaka skupina lipidotopnih hormonov ima svojo vrsto jedrnih receptorjev!!

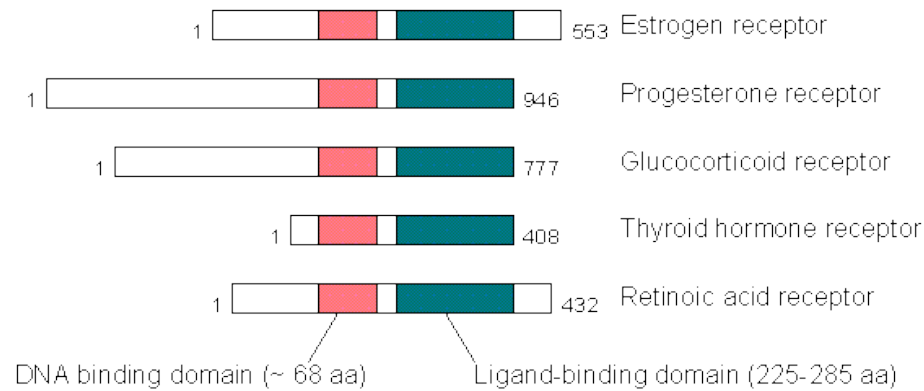
Lipidotopni hormoni lahko delujejo tudi preko receptorjev na plezmemki membrani.

Jedrni receptorji, ki vežejo steroidne in tiroidne hormone, vitamin D, retinoide – enak mehanizem delovanja

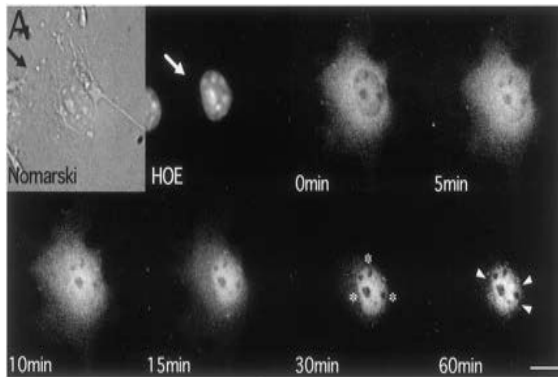


Primer delovanja estrogenskega receptorja po jedrnem mehanizmu (počasen odgovor).

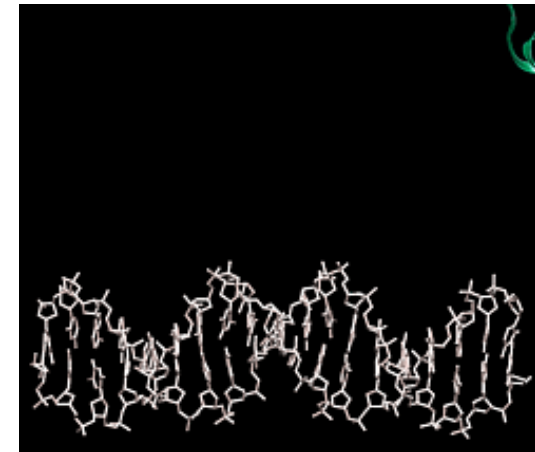
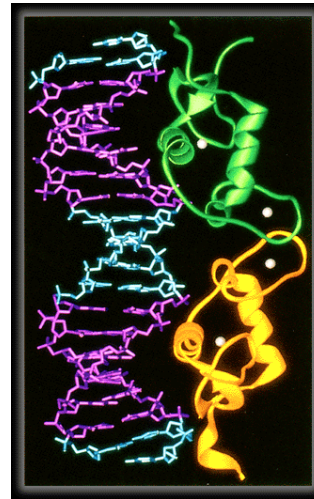
Jedrni receptorji so DNA vezavni proteini, ki vsebujejo DNA vezavno domeno Zn prstov



Cys-X(2)-Cys-(X13)- Cys-(X2)- Cys

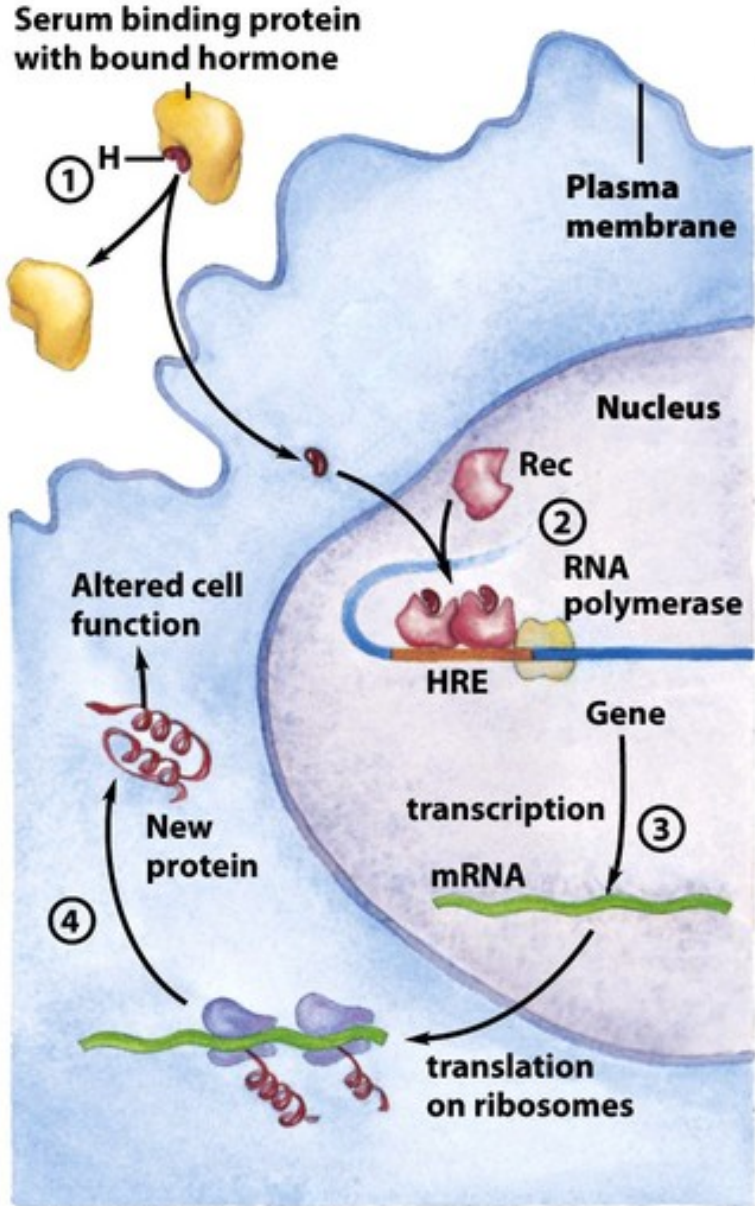


Ligand (kortikosteron) sproži prehod MR v jedro



Ligand (estradiol) sproži prehod ER v jedro in vezavo na promotorske regije tarčnih genov

Uravnavanje izražanja genov s steroidnimi in tiroidnimi hormoni, retinoidi in vitaminom D



Biosignaliziranje in bolezni: motnje v biosignaliziranju lahko sprožijo onk

Protoonkogeni se lahko pretvorijo v onkogene zaradi zunanjih dejavnikov

- Virusna infekcija
- Prerazporeditev kromosomov
- Kemične učinkovine
- UV sevanje
- Mutacija, ki privede do onkogenov je dominantna

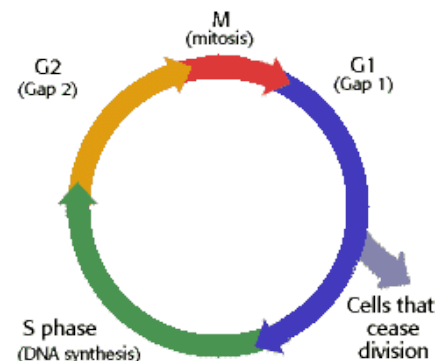
Napake v onkogenih ali tumor zaviralnih genih lahko tudi podedujemo.

Onkogeni kodirajo

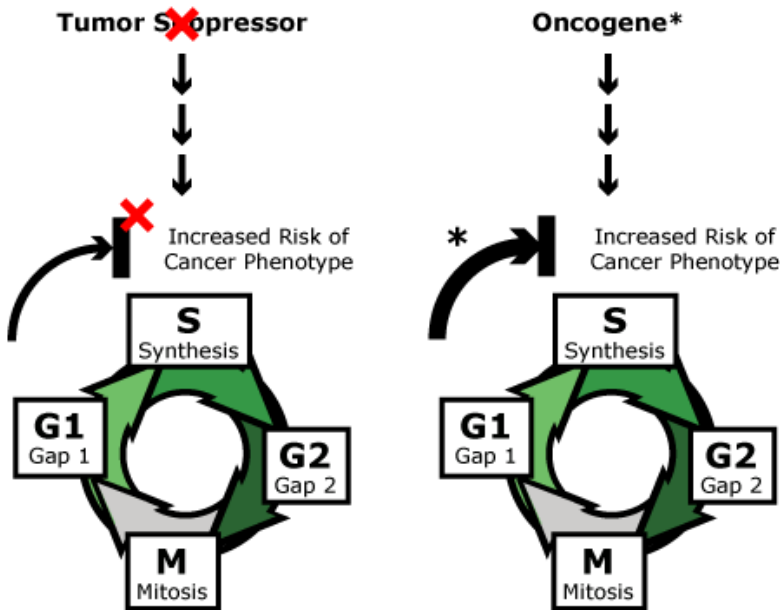
- Rastne faktorje
- Membranske proteine - **receptorje za rastne faktorje**
- Citoplazemske proteine
 - **G proteine (Ras)**
 - **Proteinske kinaze**
 - **Jedrne transkripcijske faktorje**, ki so ključnega pomena za delitev celice

Rakave celice

- Povišana hitrost mitoze
- Izguba diferenciacije
- Rakava celica ne prepozna normalnih omejitev – razraščanje
- Razseje se po organizmu – metastaze
- Ne odziva se na normalne mitotske stimuluse
- Je nesmrtna – ni podvržena normalnemu staranju celic in apoptozi
- Maligna rast je lahko dedna – spremembe v celičnem genomu



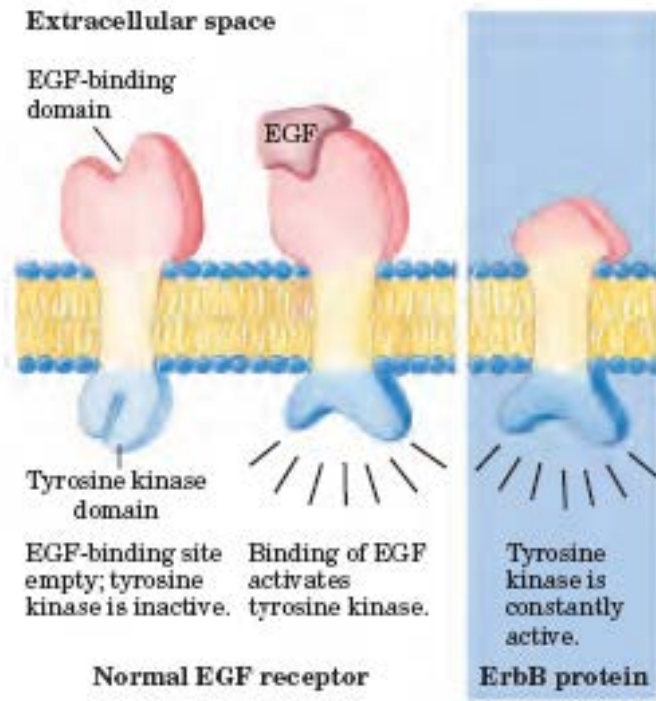
Mutacije v onkogenih in tumor zaviralnih genih in onkogeneza



missinglink.ucsf.edu/lm/cell

- Onkogeni so mutirane oblike genov, ki kodirajo okvarjene proteine, ki uravnavajo celični cikel.
- Onkoproteini so tako spremenjeni signalni proteini, da stalno oddajajo signal za celično delitev in s tem povzročajo tumorje.
- Onkogeni so genetsko dominantni.
- Onkogeni lahko kodirajo defektne receptorje, rastne faktorje, G-proteine, proteinske kinaze ali proteine, ki uravnavajo prepisovanje.
- Tumor zaviralni geni kodirajo proteine, ki zavirajo celično delitev. Mutacije v teh genih so recesivne, a tudi lahko privedejo do nastanka tumorjev

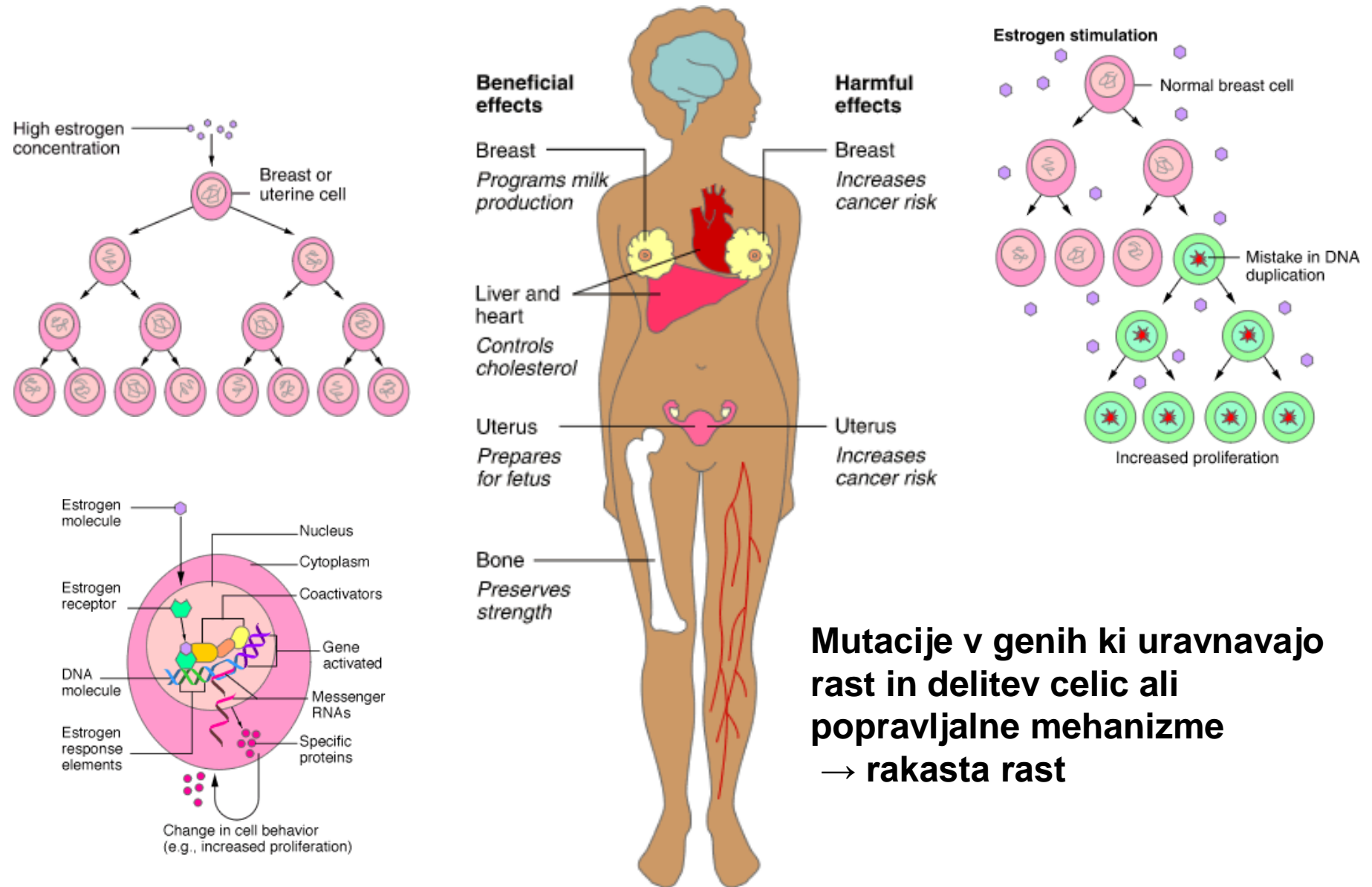
**Onkogen, ki kodira okrnjen receptor za epidermalni rastni faktor (EGF)
– motnja v odzivu na zunanji stimulus - stalno aktivirana signalna pot**



onkogeni EGF receptor

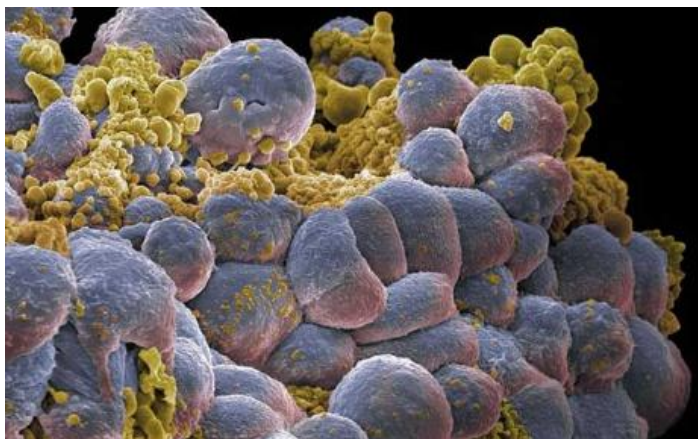
Stalen signal za delitev povzroči, da se celica nekontrolirano deli!

Estrogeni stimulirajo delitev celic

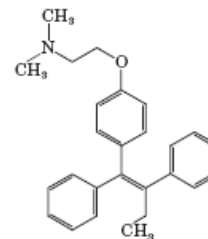


Mutacije v genih ki uravnavajo rast in delitev celic ali popravljalne mehanizme → rakasta rast

Struktura antagonistov estrogenov



A cluster of breast cancer cells showing visual evidence of programmed cell death in yellow Photo: ANNIE CAVANAGH



Tamoksifen, antagonist estrogenov, se uporablja pri zdravljenju raka dojke

Breast cancer superdrug could soon be even better after secrets unlocked

12 Nov 2008 (Telegraph, UK)

A cancer superdrug which is used to treat thousands of women with breast cancer could soon be made even more effective after scientists unlocked the secret of its power. Researchers have identified for the first time the "chemical mechanism" by which tamoxifen works on tumour cells and the vital gene that has to be inactivated for a successful outcome.

Tamoxifen is given to most women for five years after they are first diagnosed with breast cancer to help prevent it from returning. But some patients develop resistance to the drug.