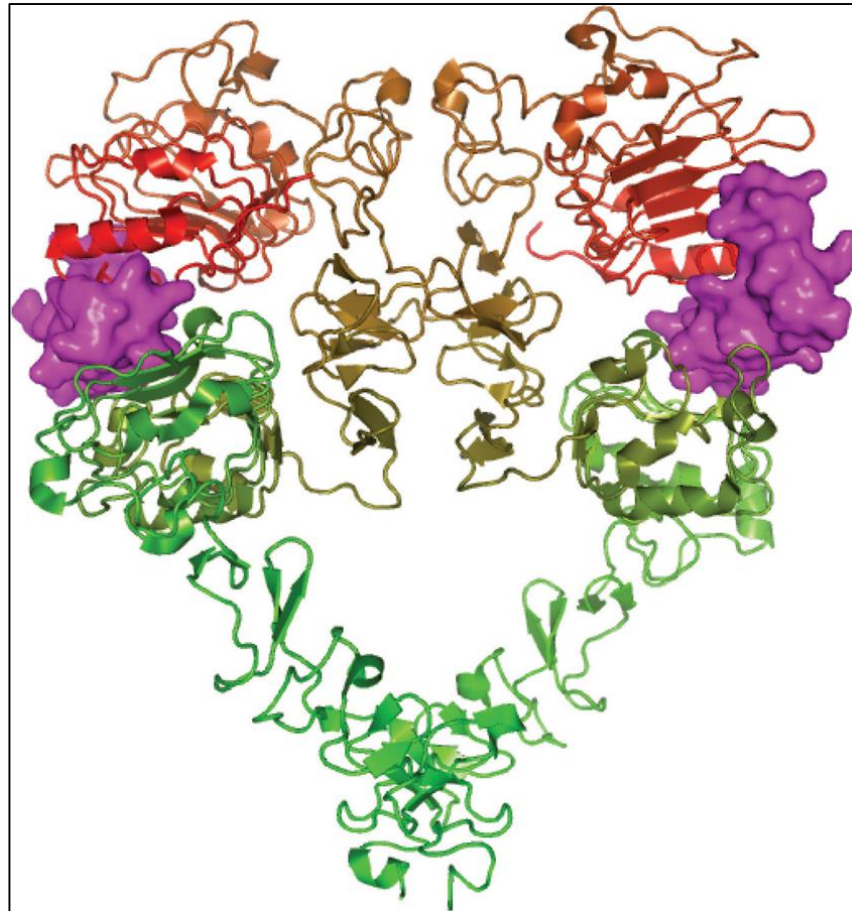


# SIGNALNE POTI, KI REGULIRAJO IZRAŽANJE GENOV



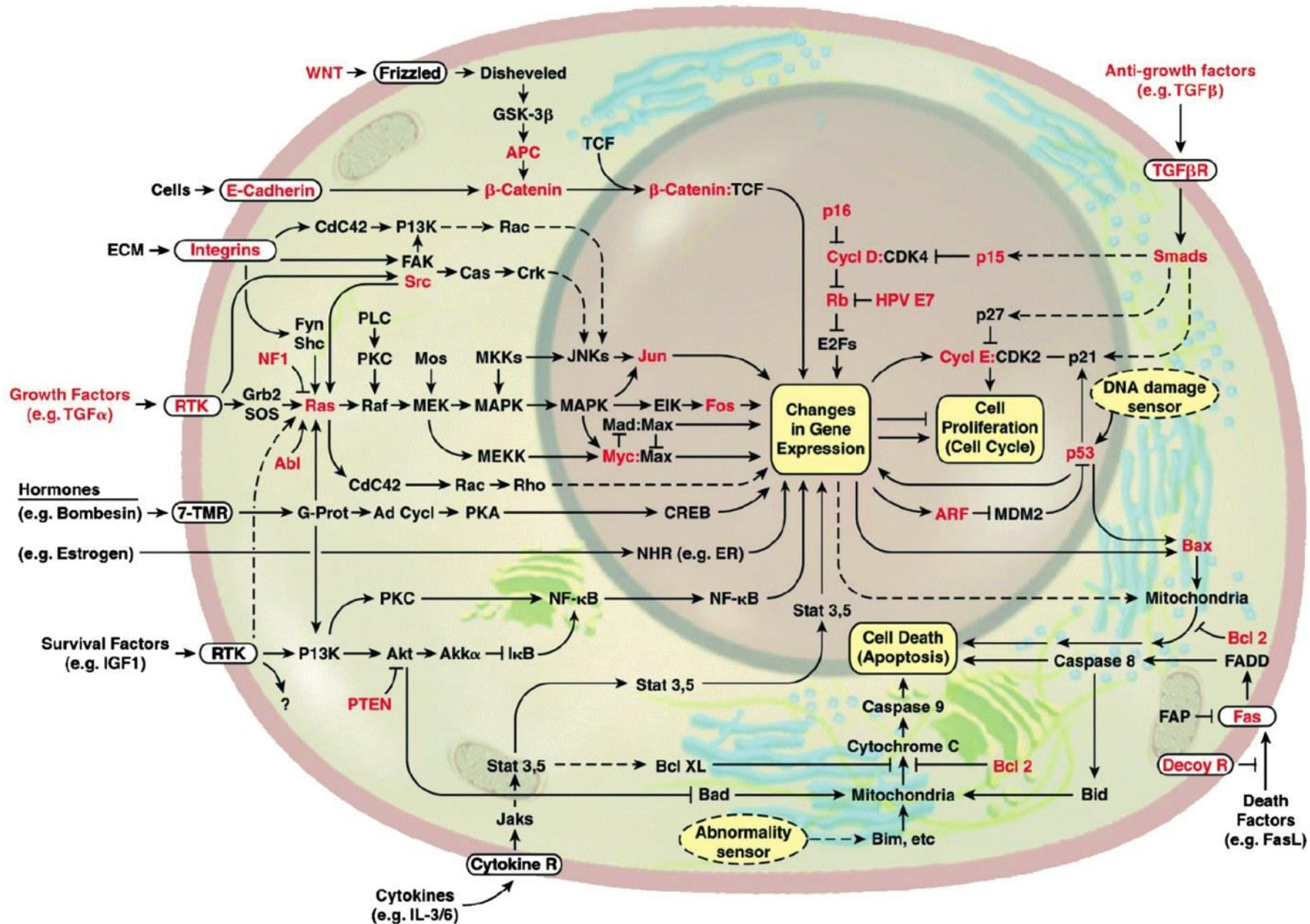


Figure 17.25 Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

Literatura za temo Signalne poti, ki regulirajo izražanje genov:



Lodish • Berk • Kaiser • Krieger • scott • Bretscher • Ploegh • Matsudaira

# MOLECULAR CELL BIOLOGY

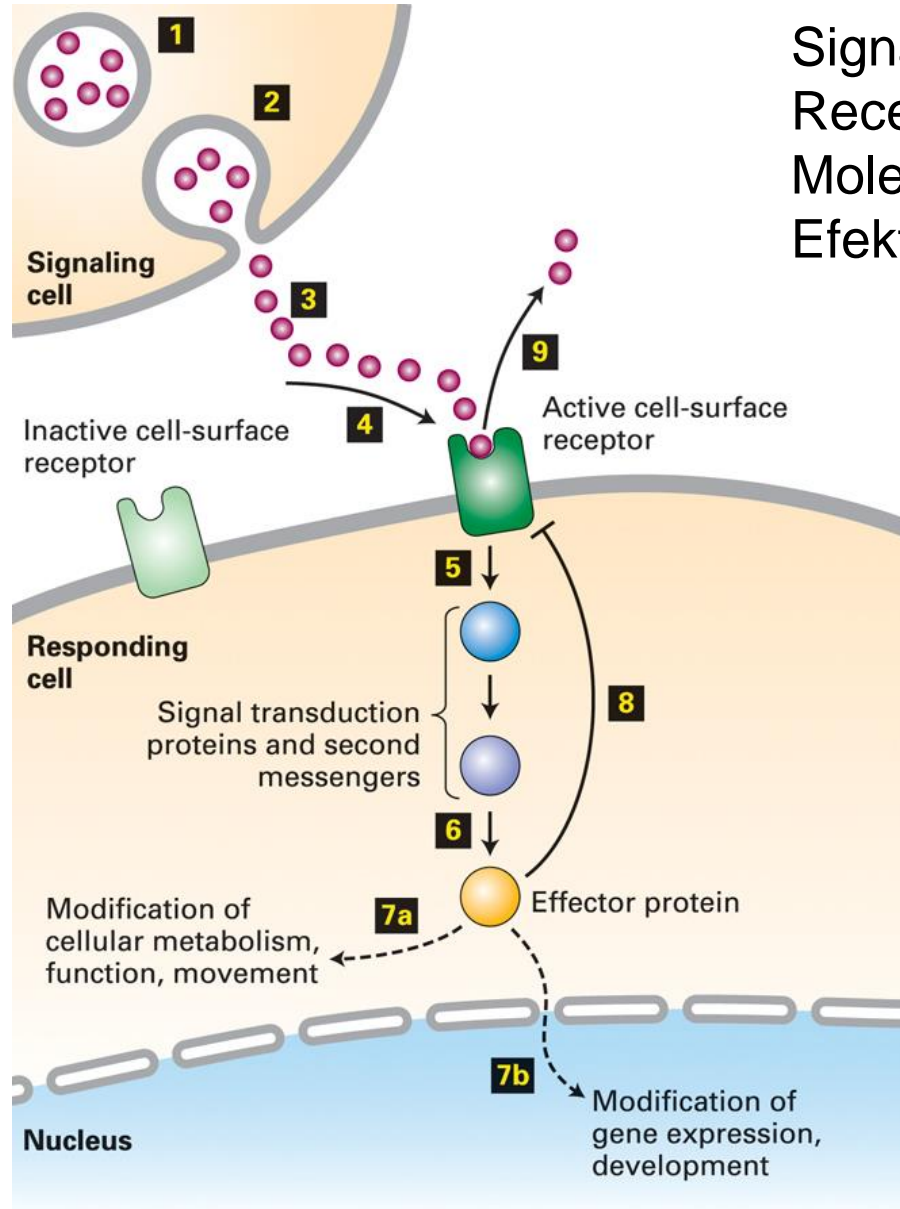
## SEVENTH EDITION

16. poglavje

15. poglavje (GPCR)

7. poglavje (jedrni receptorji, od 323. strani dalje)

# Prenos signala

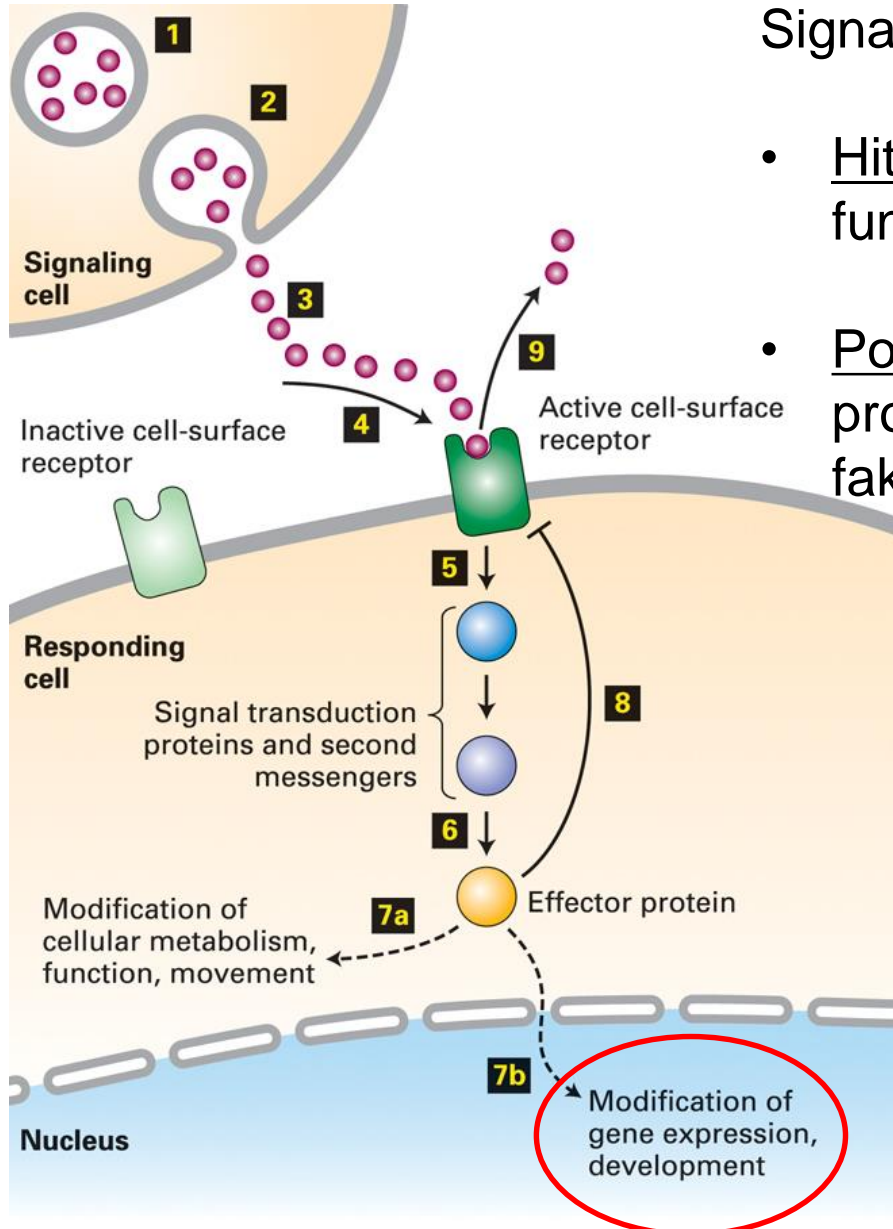


Signalne molekule  
Receptorji  
Molekule za prenos informacij  
Efektorski proteini

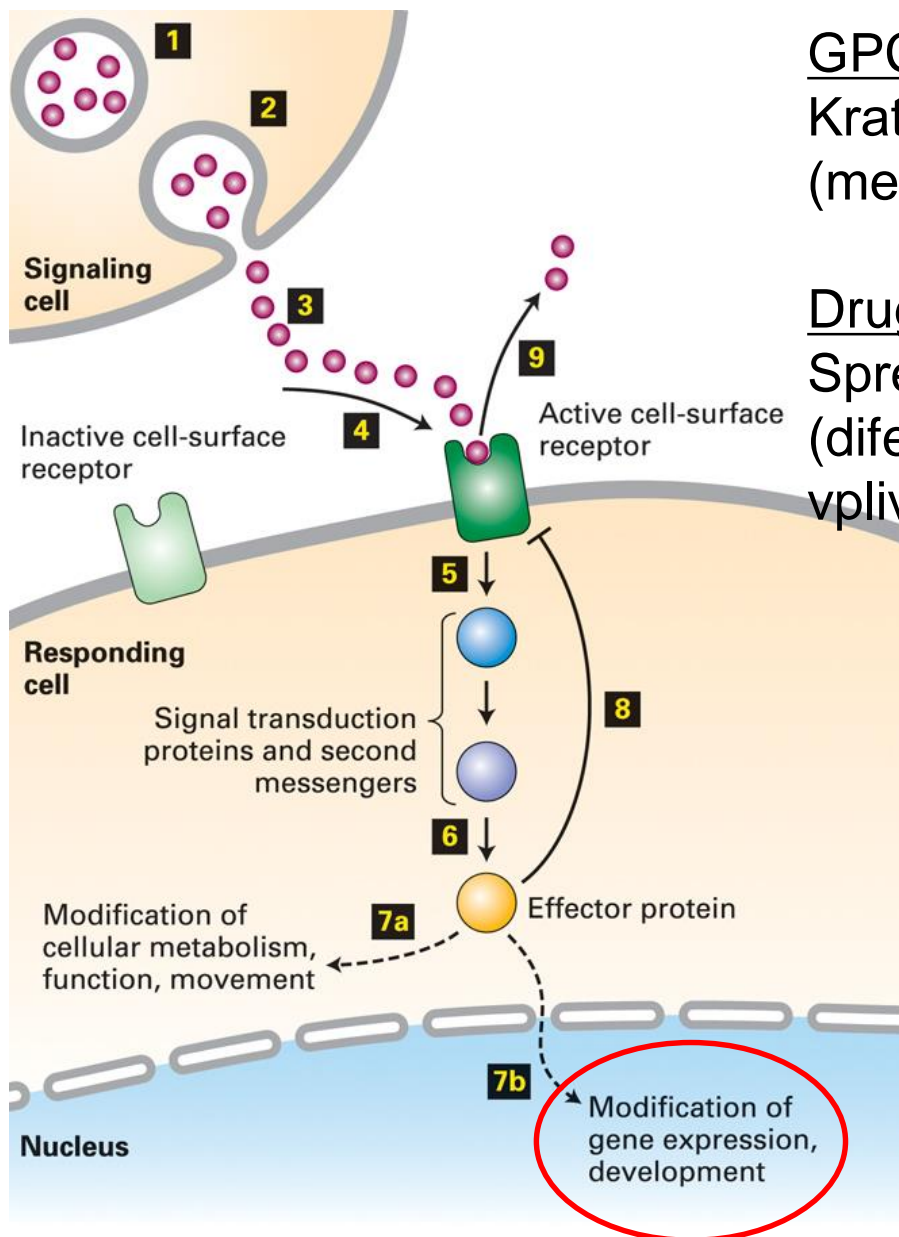
# Prenos signala

Signalna molekula se veže na receptor:

- Hitri odziv: sprememba v aktivnosti ali funkciji celičnih proteinov
- Počasnejši odziv: spremembe v količini proteinov (preko transkripcijskih faktorjev)



# Prenos signala - receptorji



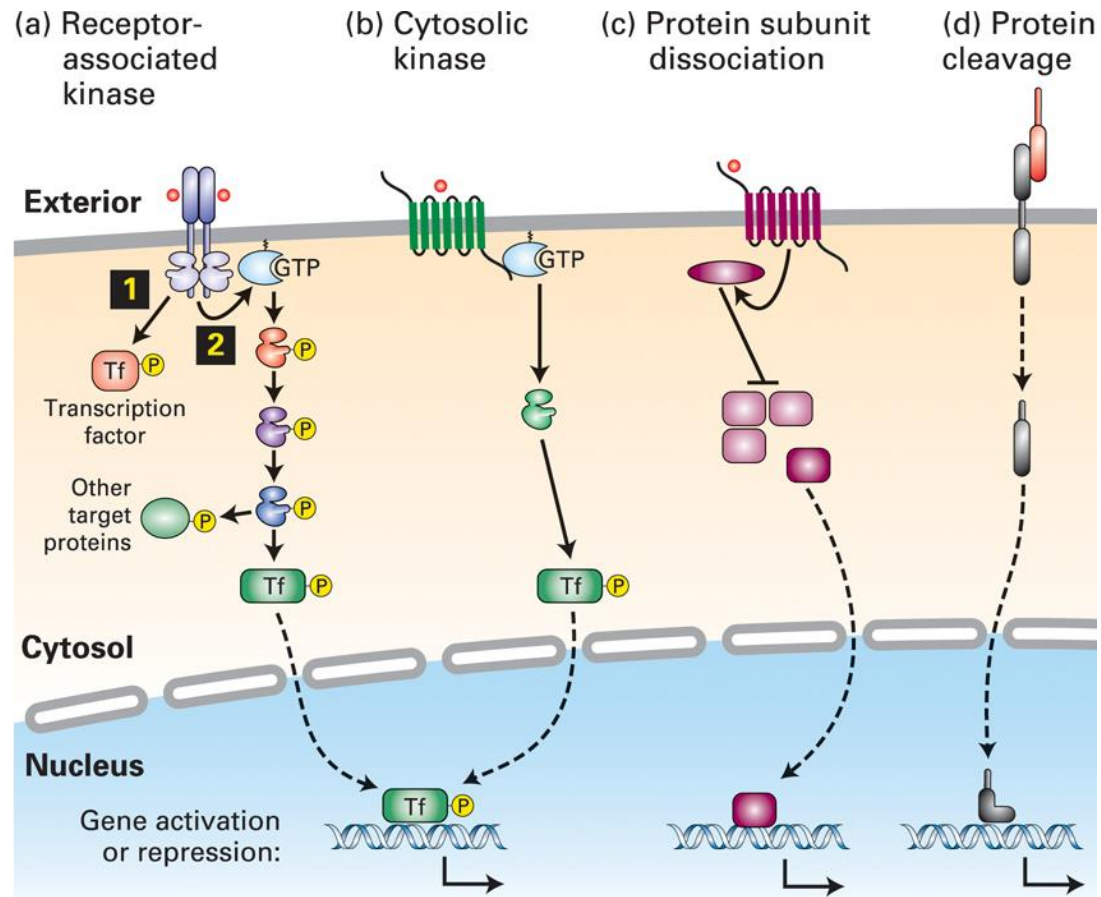
GPCR – 900:

Kratkotrajne spremembe v celični funkciji  
(metabolizem, gibanje...)

Drugi receptorji:

Spremembe v izražanju genov  
(diferenciacija, delitev celic, dolgotrajni vpliv)

# Prenos signala preko štirih tipičnih receptorjev celične membrane



**Representative receptors and pathways**

RTKs  
 TGF- $\beta$  receptors  
 Cytokine receptors  
 JAK-STAT  
 Ras/MAP Kinase

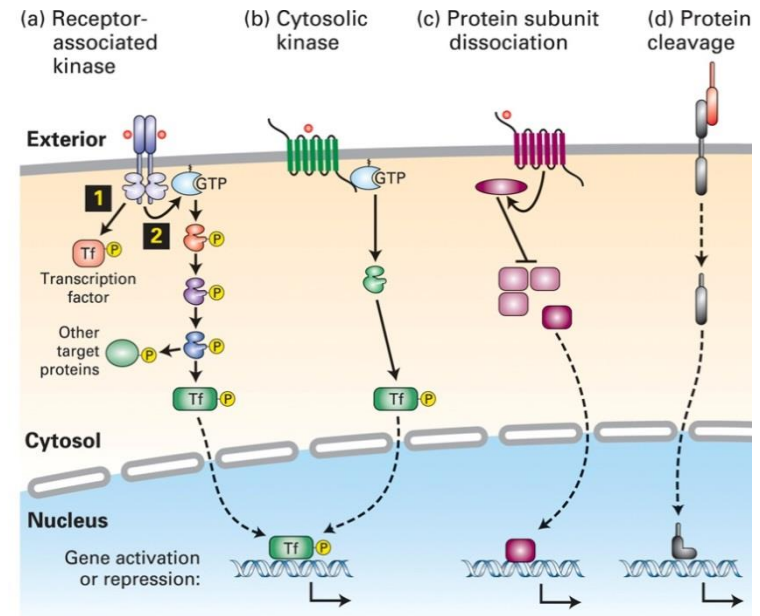
GPCRs  
 cAMP/PKA/CREB

Wnt  
 Hedgehog  
 NF-kB

Notch/Delta

# Signalne kaskade

- GPCR/CREB
- Protein-tirozin-kinaze
- Serinska kinaza/Smad
- Ubikvitinacija (Wnt, Hh, NT- $\kappa$ B)
- Proteoliza (Notch/Delta, SREBP)
- Jedrni receptorji



**Representative receptors and pathways**

- RTKs
- TGF- $\beta$  receptors
- Cytokine receptors
- JAK-STAT
- Ras/MAP Kinase

GPCRs  
cAMP/PKA/CREB

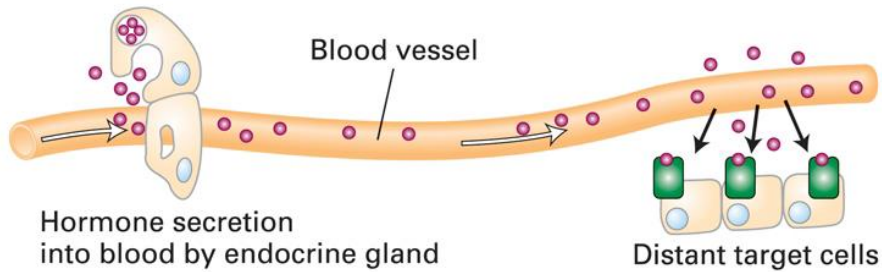
Wnt  
Hedgehog  
NF- $\kappa$ B

Notch/Delta

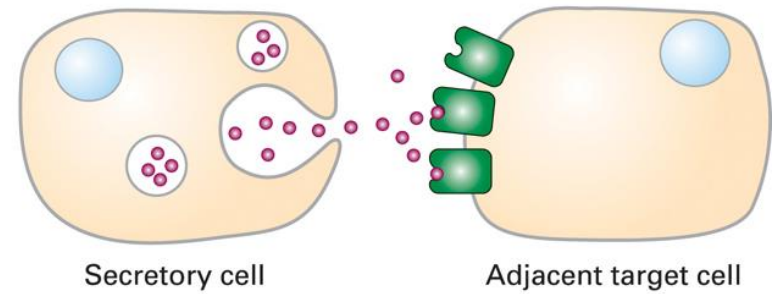


# Delovanje signalnih molekul na receptorske celice

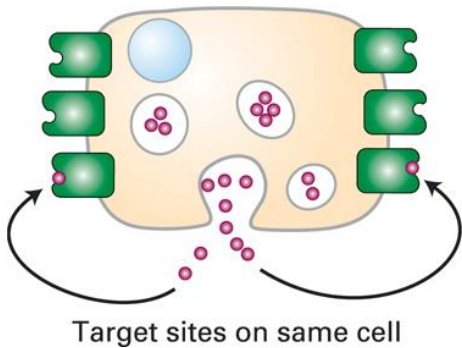
(a) Endocrine signaling



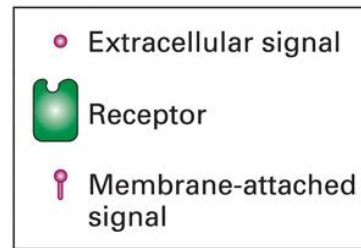
(b) Paracrine signaling



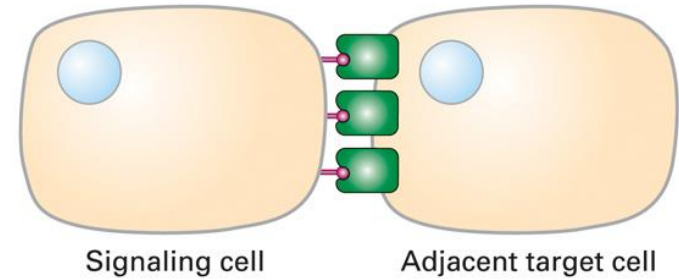
(c) Autocrine signaling



Key:



(d) Signaling by plasma-membrane-attached proteins



# Vezava rastnega hormona na receptor

8 od 28 ak, ki so v stiku z receptorjem

(a) Residues essential to tight binding with receptor

Growth hormone

Residues essential to tight binding with hormone

Esencialna 2 triptofana

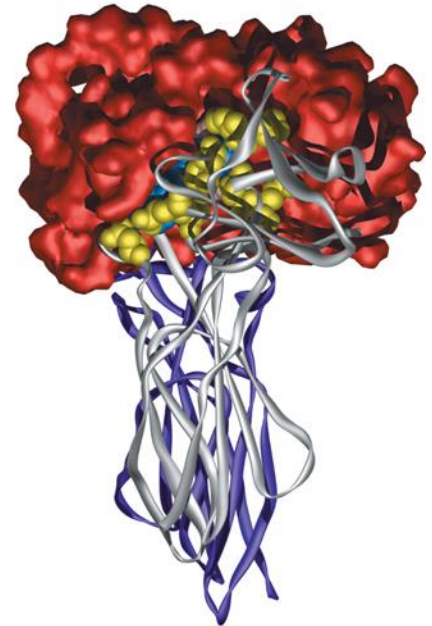
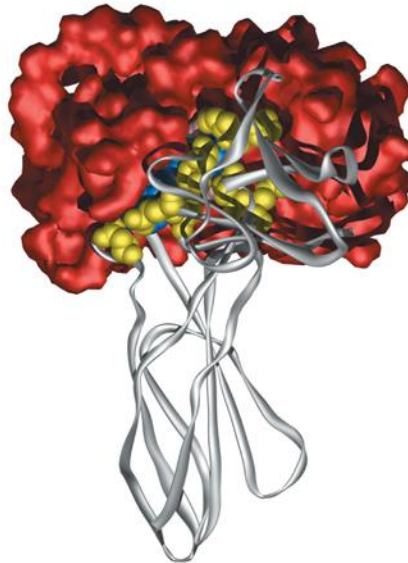
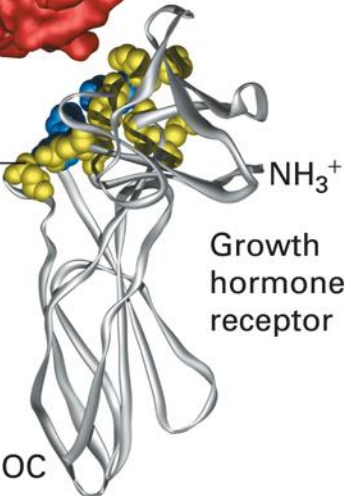
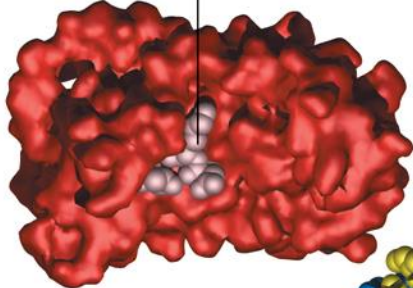
Growth hormone receptor

$^{-}OOC$

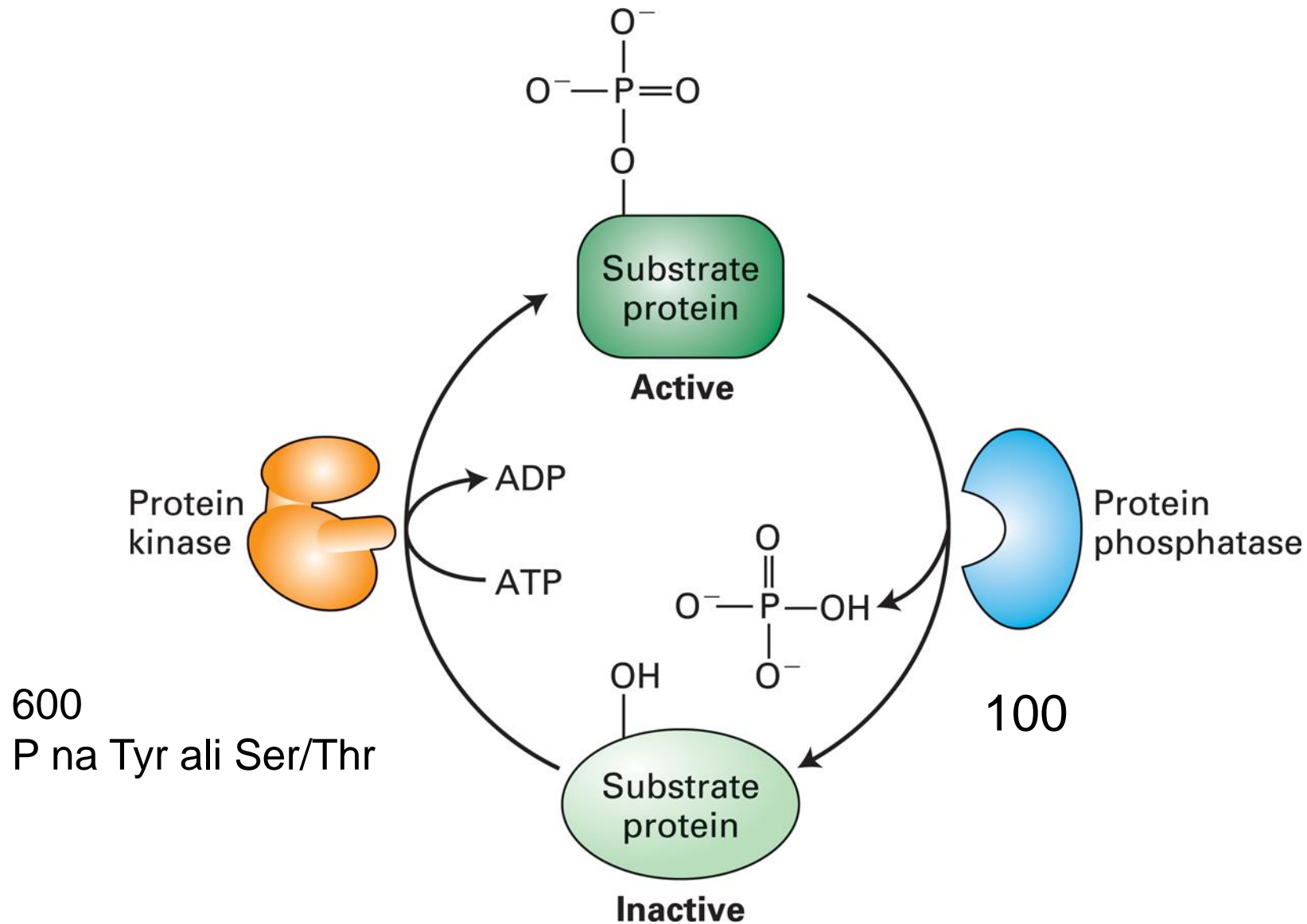
(b)

(c)

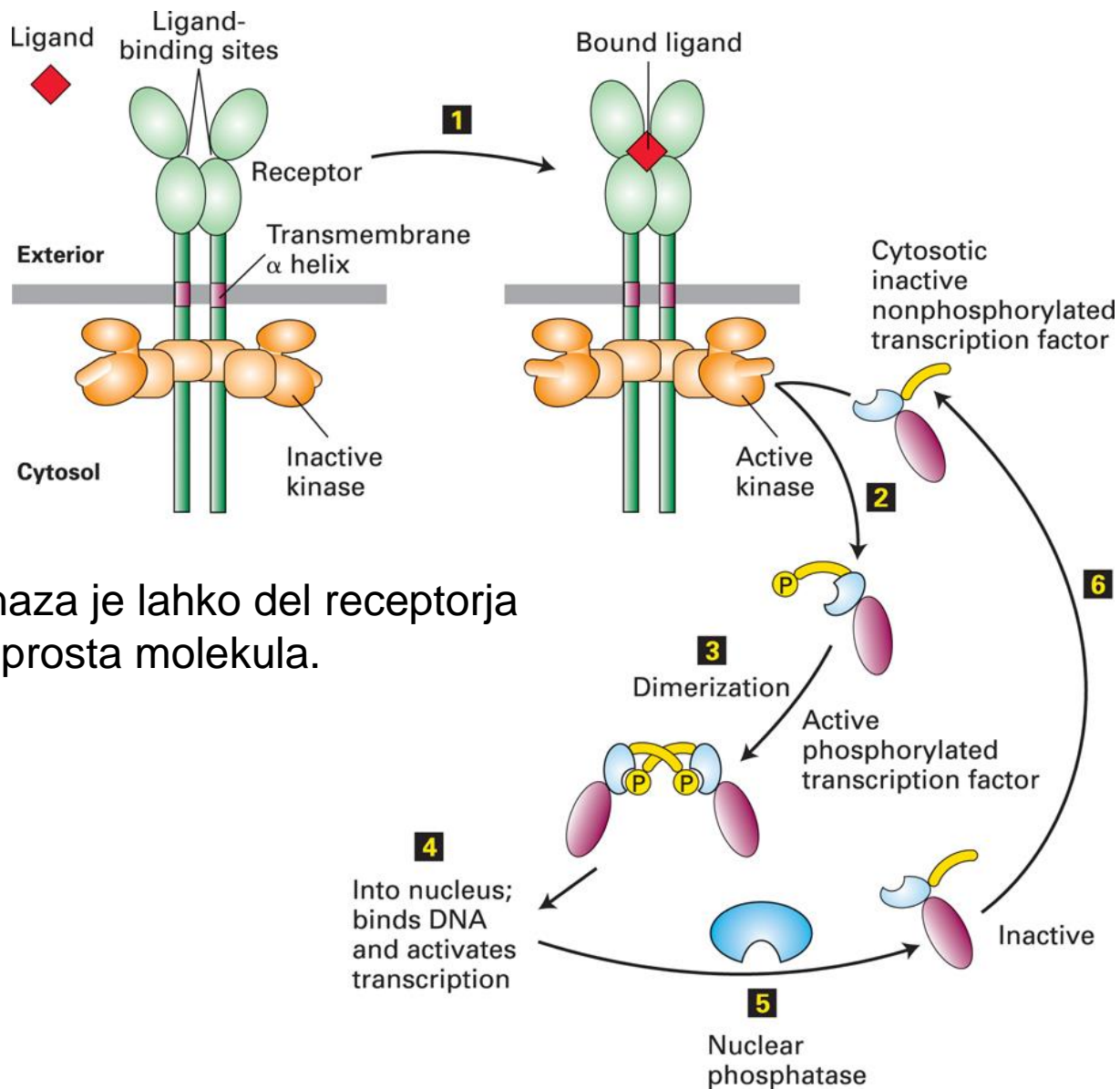
Dimerizacija receptorja po vezavi rastnega faktorja



# Regulacija aktivnosti proteinov s kinazami/fosfatazami

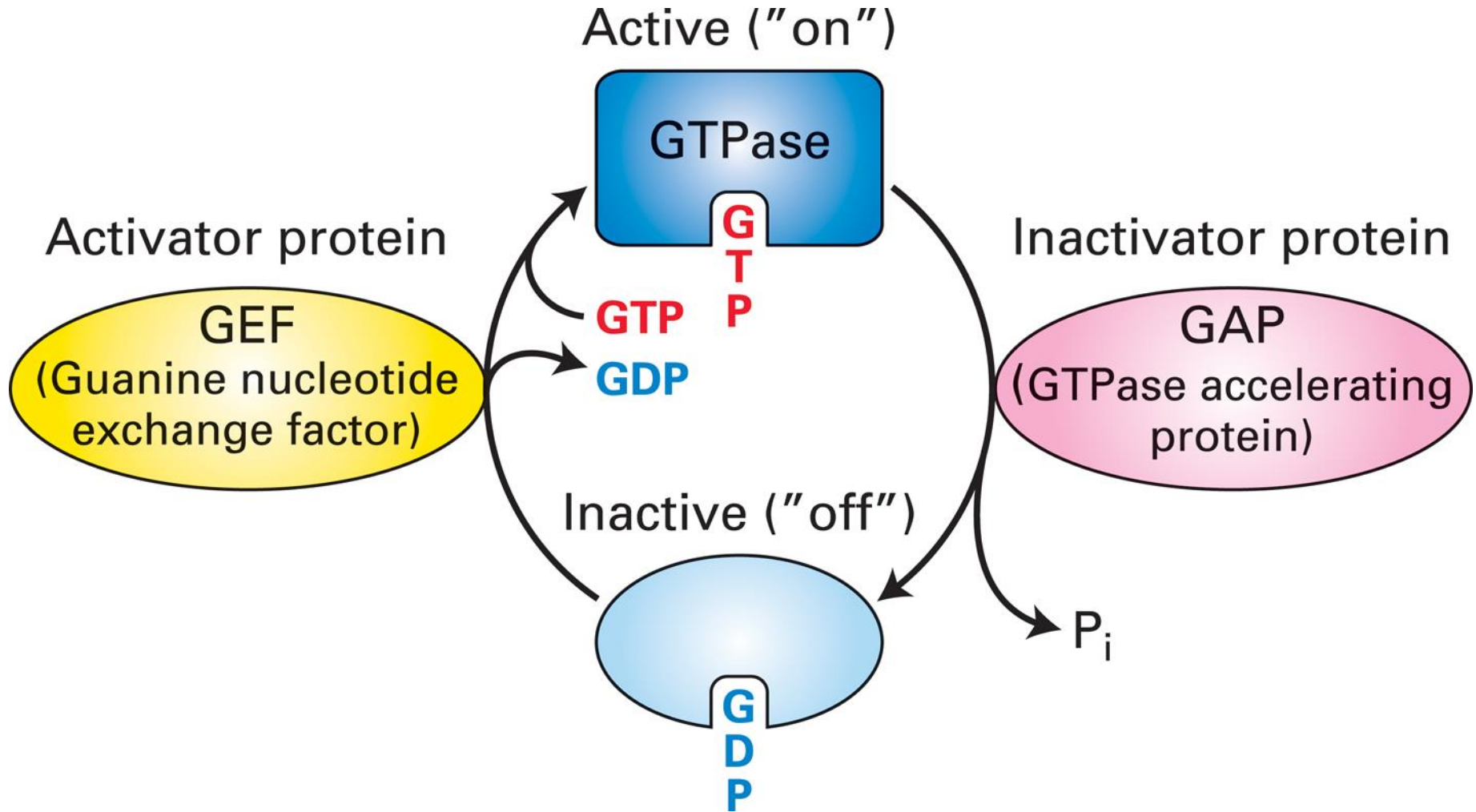


# Prenos signala preko receptorja in kinaze do tarčnega proteina

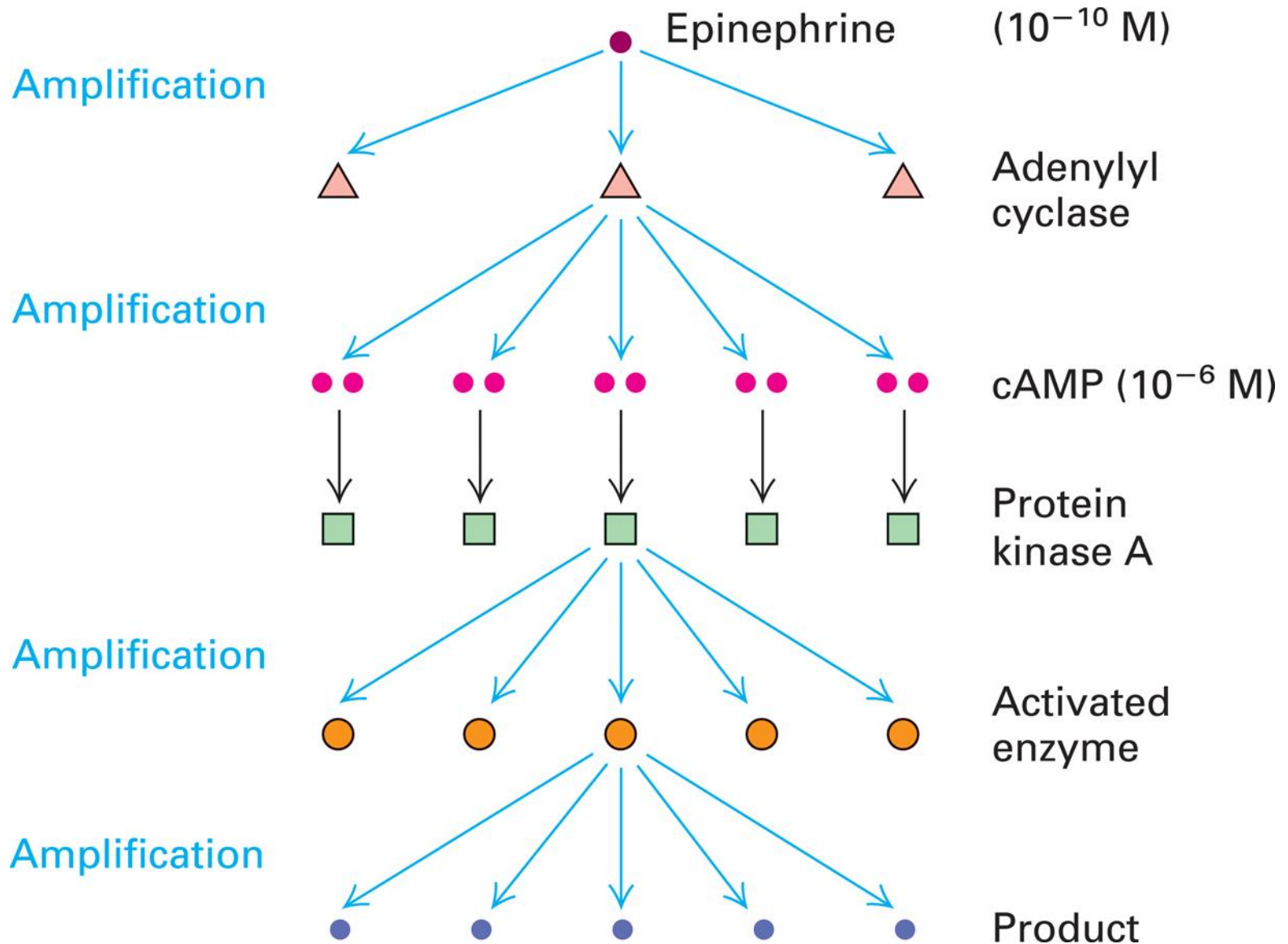


Kinaza je lahko del receptorja ali prosta molekula.

# GTPase so pogosto stikala

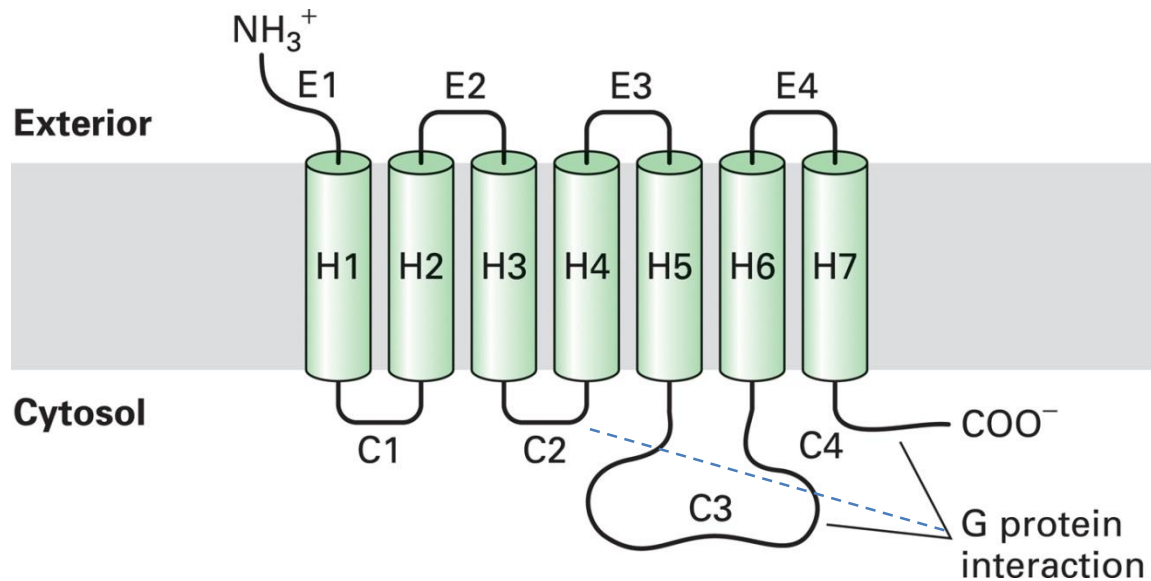


# Ojačanje signala

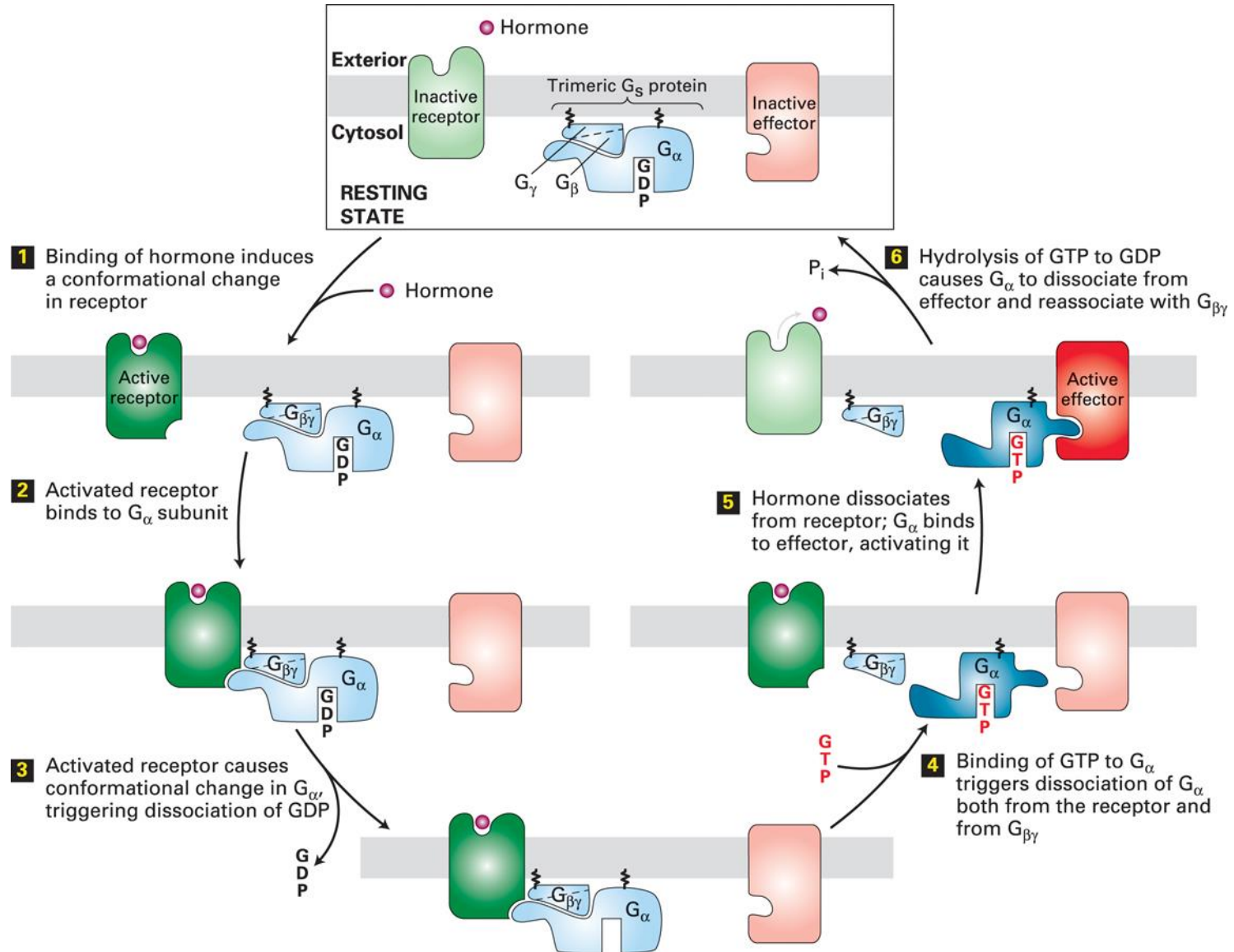


# 1. cAMP in PKA preko CREB aktivirata transkripcijo

Z G-proteini povezani receptorji (800)



# Splošen mehanizem aktivacije preko z G-proteini povezanimi receptorji





**TABLE 15-1** Major Classes of Mammalian Trimeric G Proteins and Their Effectors\*

G <sub>α</sub> Class	Associated Effector	2nd Messenger	Receptor Examples
G <sub>αs</sub>	Adenylyl cyclase	cAMP (increased)	β-Adrenergic (epinephrine) receptor; receptors for glucagon, serotonin, vasopressin
G <sub>αi</sub>	Adenylyl cyclase K <sup>+</sup> channel (G <sub>βγ</sub> activates effector)	cAMP (decreased) Change in membrane potential	α <sub>2</sub> -Adrenergic receptor Muscarinic acetylcholine receptor
G <sub>αolf</sub>	Adenylyl cyclase	cAMP (increased)	Odorant receptors in nose
G <sub>αq</sub>	Phospholipase C	IP <sub>3</sub> , DAG (increased)	α <sub>1</sub> -Adrenergic receptor
G <sub>αo</sub>	Phospholipase C	IP <sub>3</sub> , DAG (increased)	Acetylcholine receptor in endothelial cells
G <sub>αt</sub>	cGMP phosphodiesterase	cGMP (decreased)	Rhodopsin (light receptor) in rod cells

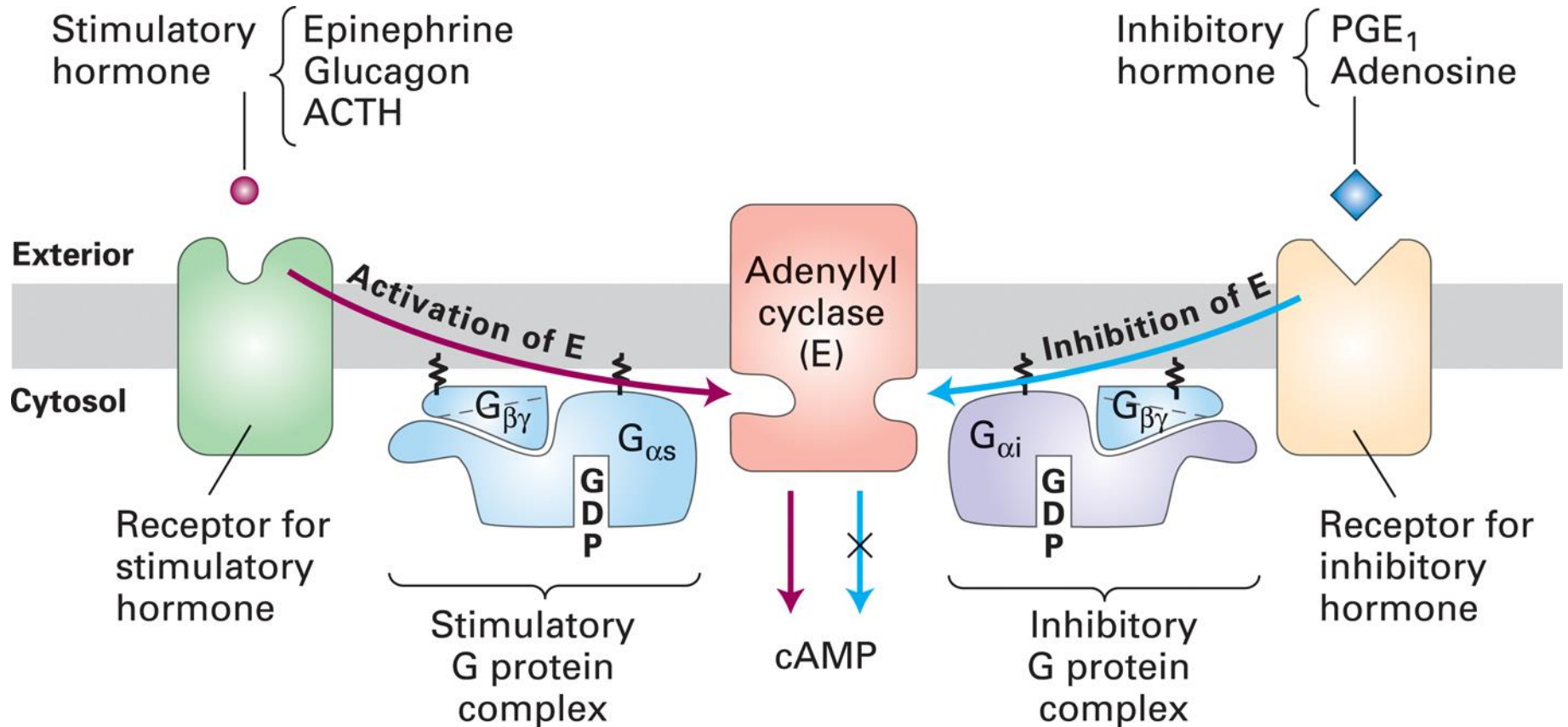
\*A given G<sub>α</sub> subclass may be associated with more than one effector protein. To date, only one major G<sub>αs</sub> has been identified, but multiple G<sub>αq</sub> and G<sub>αi</sub> proteins have been described. Effector proteins commonly are regulated by G<sub>α</sub> but in some cases by G<sub>βγ</sub> or the combined action of G<sub>α</sub> and G<sub>βγ</sub>. IP<sub>3</sub> = inositol 1,4,5-trisphosphate; DAG = 1,2-diacylglycerol.

SOURCES: See L. Birnbaumer, 1992, *Cell* 71:1069; Z. Farfel et al., 1999, *New Eng. J. Med.* 340:1012; and K. Pierce et al., 2002, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3:639.

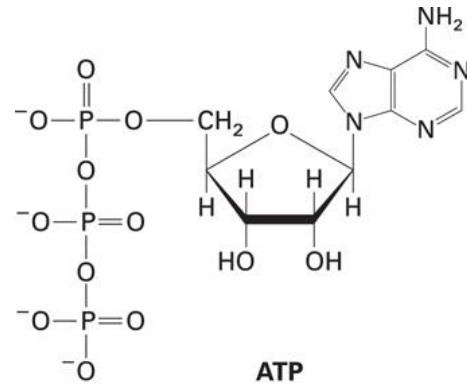
Bakterije (*V. cholera*, *E. coli*) aktivirajo adenil ciklazo (G-protein je konstantno aktiven, GTP ne more v GDP).

Visok nivo znotrajceličnega cAMP vodi do izločanja elektrolitov in vode v lumen prebavil – posledica driska.

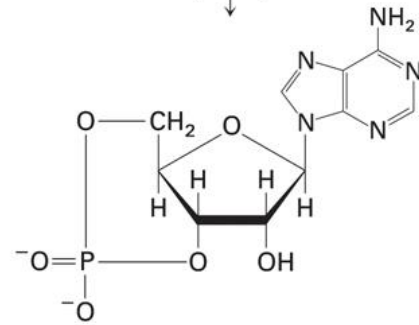
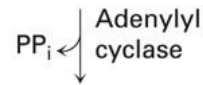
# Hormoni v maščobnih celicah lahko aktivirajo ali inhibirajo adenilil ciklazo



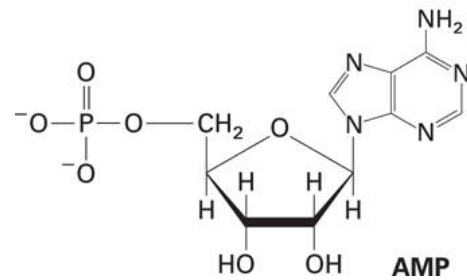
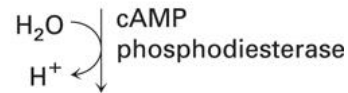
# Adenilil ciklaza sentetizira cAMP



**ATP**

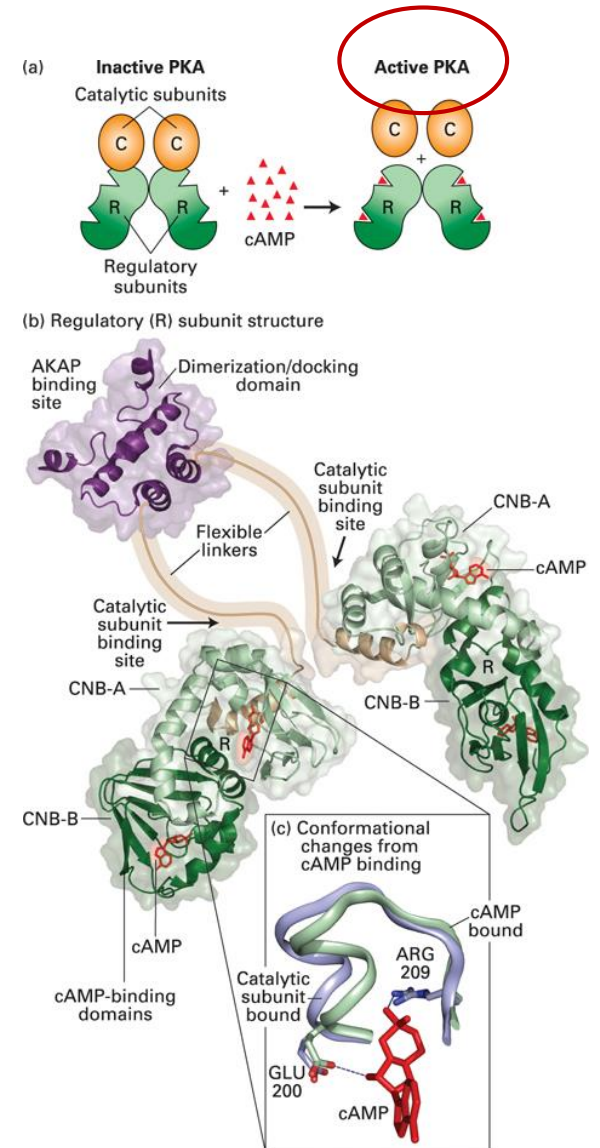
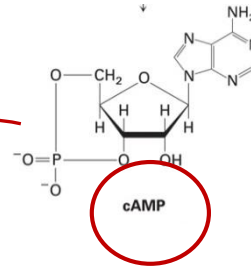
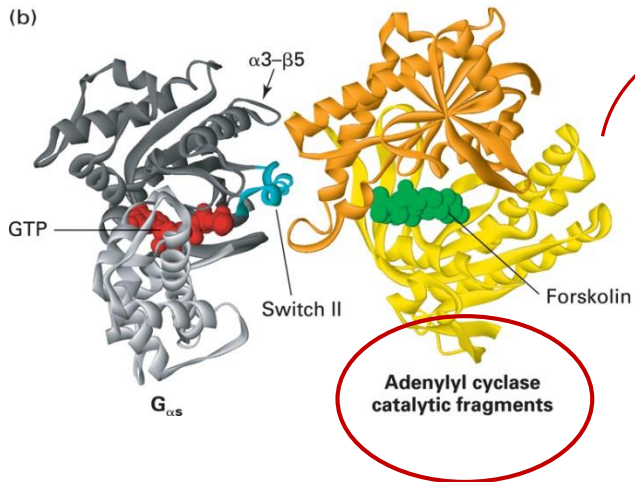
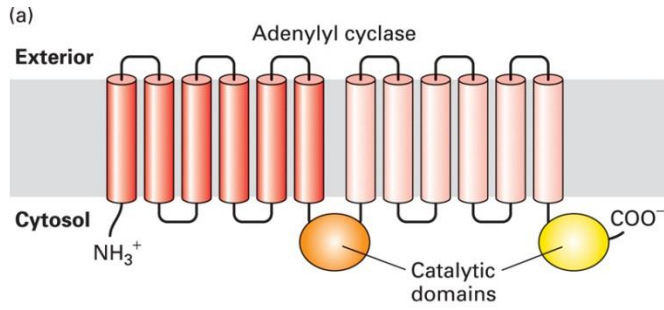


**cAMP**



**AMP**

# Adenilil ciklaza se veže na Gas podenoto, sintetizira se cAMP, ki aktivira protein-kinazo A (PKA)

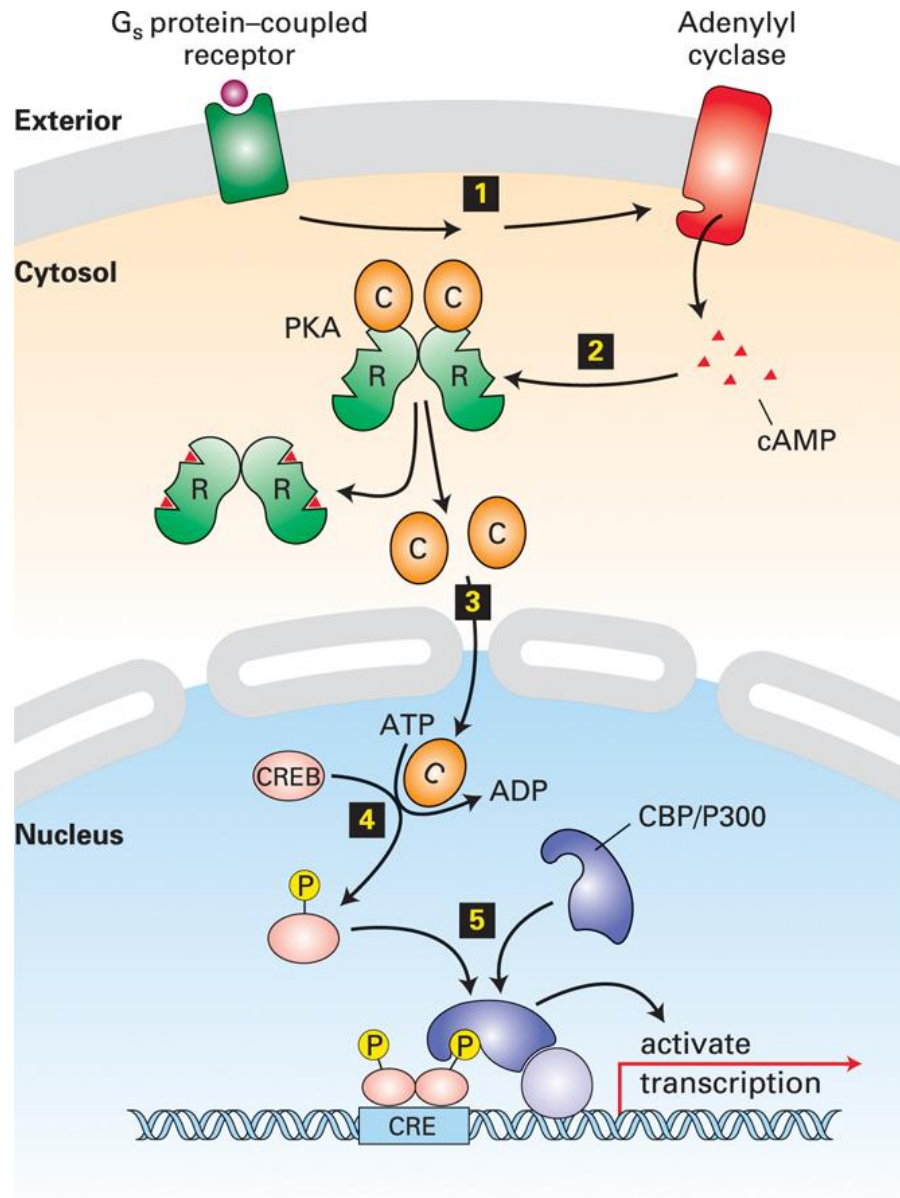


**TABLE 15-2** Cellular Responses to Hormone-Induced Rise in cAMP in Various Tissues\*

Tissue	Hormone Inducing Rise in cAMP	Cellular Response
Adipose	Epinephrine; ACTH; glucagon	Increase in hydrolysis of triglyceride; decrease in amino acid uptake
Liver	Epinephrine; norepinephrine; glucagon	Increase in conversion of glycogen to glucose; inhibition of glycogen synthesis; increase in amino acid uptake; increase in gluconeogenesis (synthesis of glucose from amino acids)
Ovarian follicle	FSH; LH	Increase in synthesis of estrogen, progesterone
Adrenal cortex	ACTH	Increase in synthesis of aldosterone, cortisol
Cardiac muscle	Epinephrine	Increase in contraction rate
Thyroid gland	TSH	Secretion of thyroxine
Bone	Parathyroid hormone	Increase in resorption of calcium from bone
Skeletal muscle	Epinephrine	Conversion of glycogen to glucose-1-phosphate
Intestine	Epinephrine	Fluid secretion
Kidney	Vasopressin	Resorption of water
Blood platelets	Prostaglandin I	Inhibition of aggregation and secretion

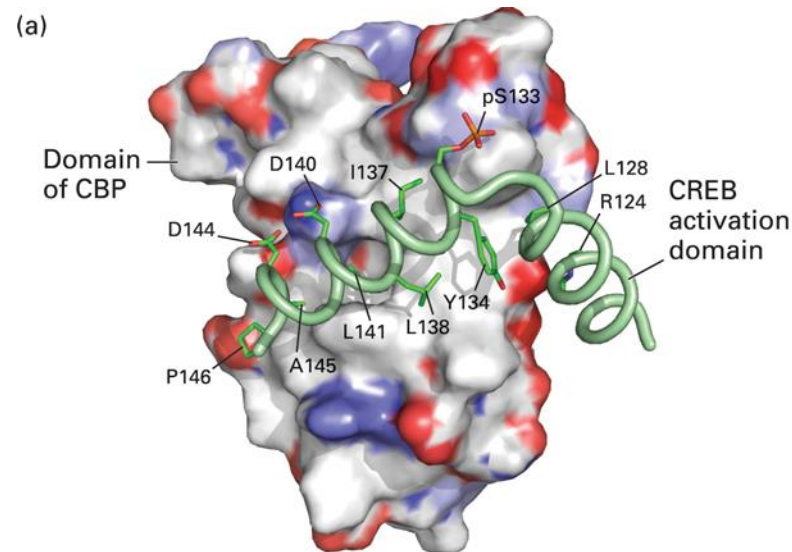
\*Nearly all the effects of cAMP are mediated through protein kinase A (PKA), which is activated by binding of cAMP.  
SOURCE: E. W. Sutherland, 1972, *Science* 177:401.

# Aktivacija CREB transkripcijskega faktorja

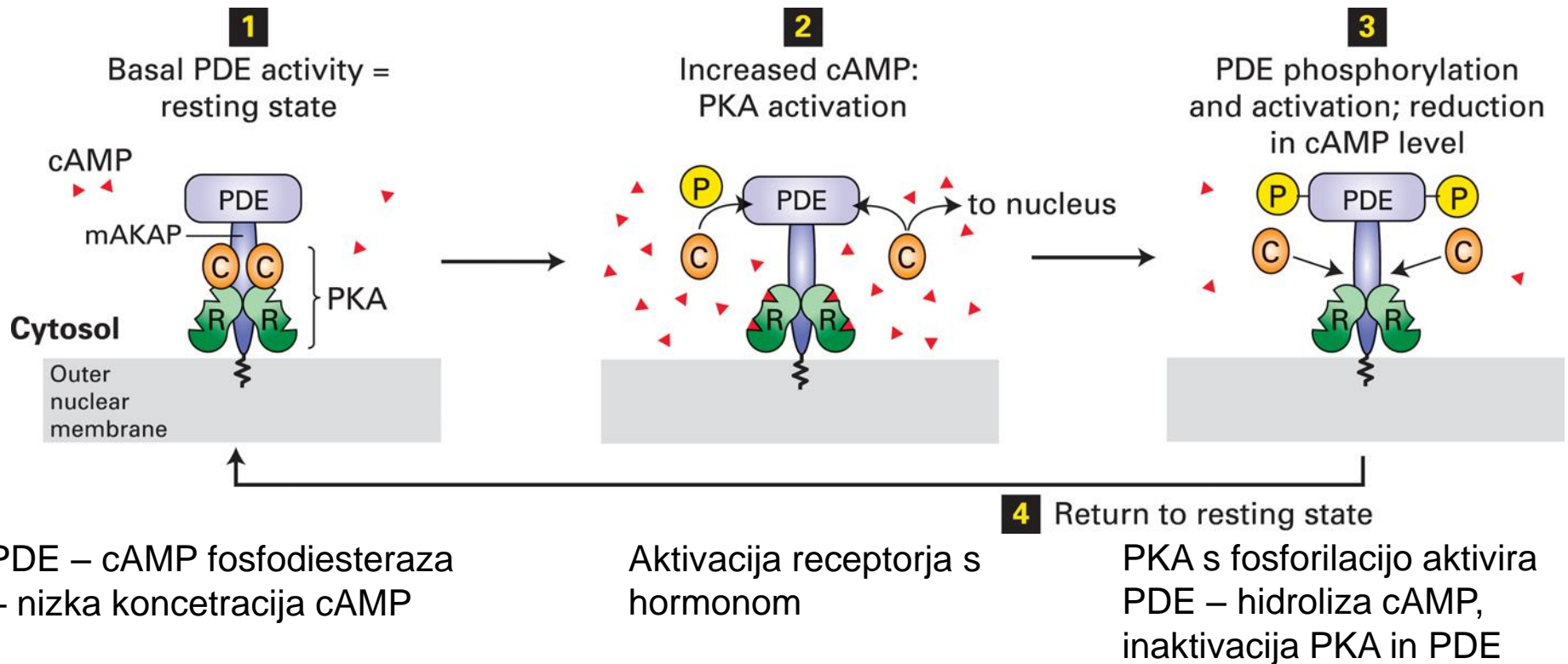


# CREB

- CREB je aktiviran s fosforilacijo Ser 123
- Aktivacijska domena nima strukture (random coil)
- Ko se veže na koaktivator CBP, se zvije v 2 heliksa



# Subcelularna lokalizacija PKA na jedrno membrano z AKAP (A-kinase-associated protein) - regulacija

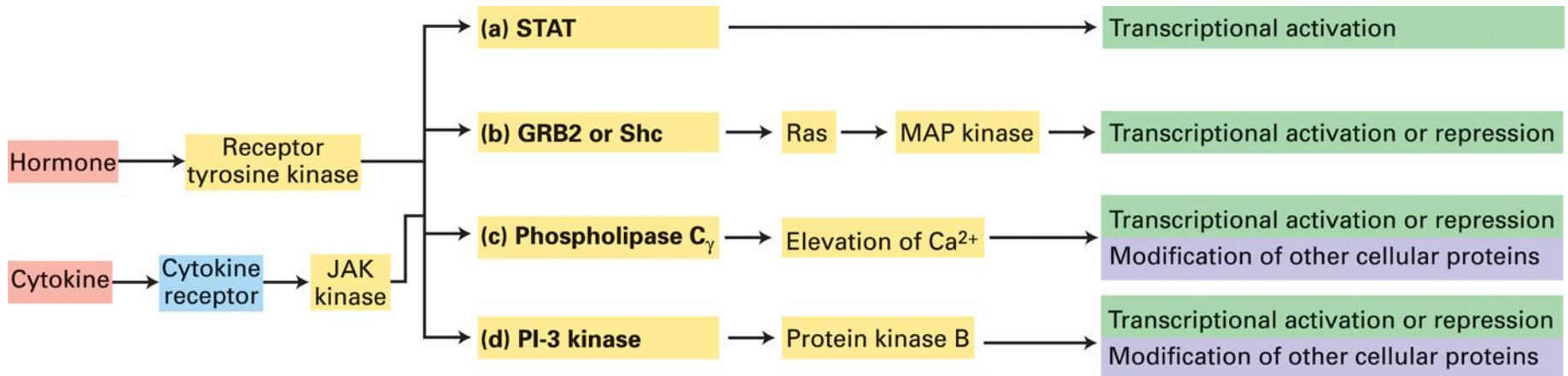




## 2. signalna pot preko protein-tirozin-kinaze

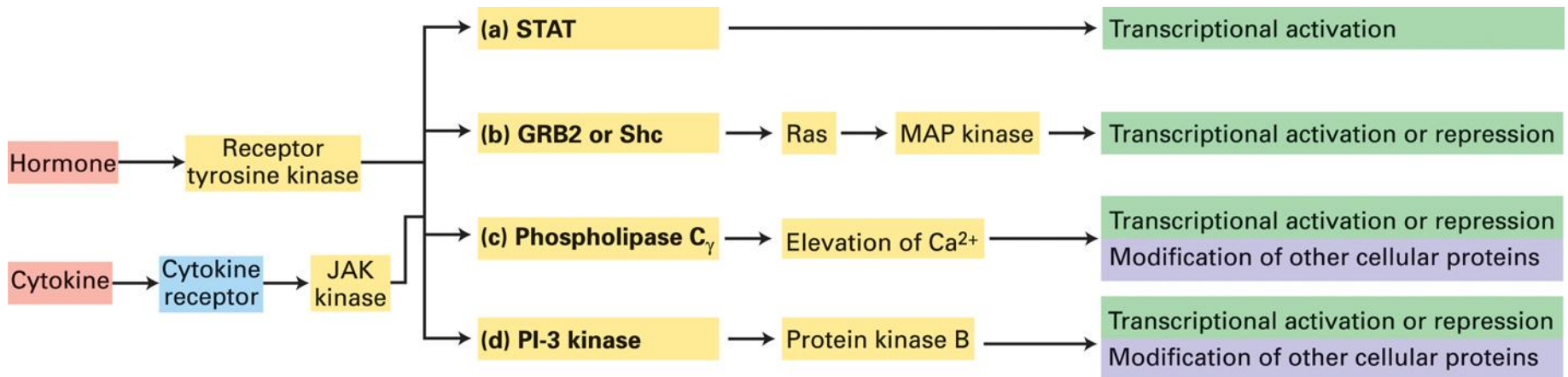
# Receptorji, ki aktivirajo protein-tirozin-kinazo

- 90 PTK pri človeku
- Fosforilacija tirozinov v tarčnih proteinih
- Regulacija proliferacije, diferenciacije, preživetja in metabolizma celic
- Dve vrsti receptorjev:
  - tirozin kinaza je del receptorja (RTK – tirozin-kinazni receptorji)
  - receptorji citokinov; samostojna gena za receptor in kinazo, proteina sta močno vezana), JAK kinaza



# Signalne poti preko RTK in citokinskih receptorjev

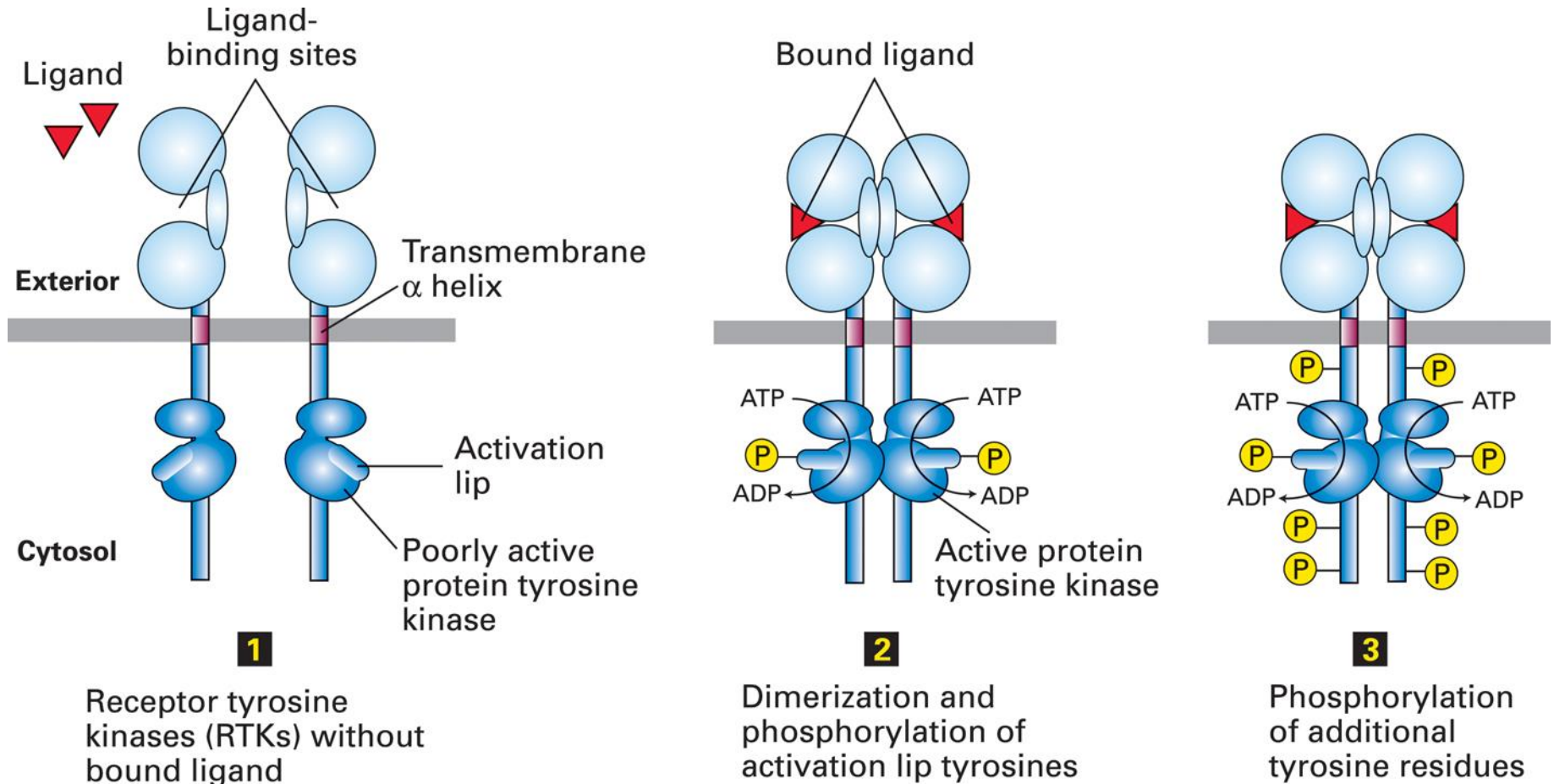
- Direktna aktivacija STAT TF
- Pot z Ras/MAP kinazo
- Pot s  $\text{PLC}\gamma$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  sekundarni prenašalec
- Pot s PI-3 kinazo, PKB



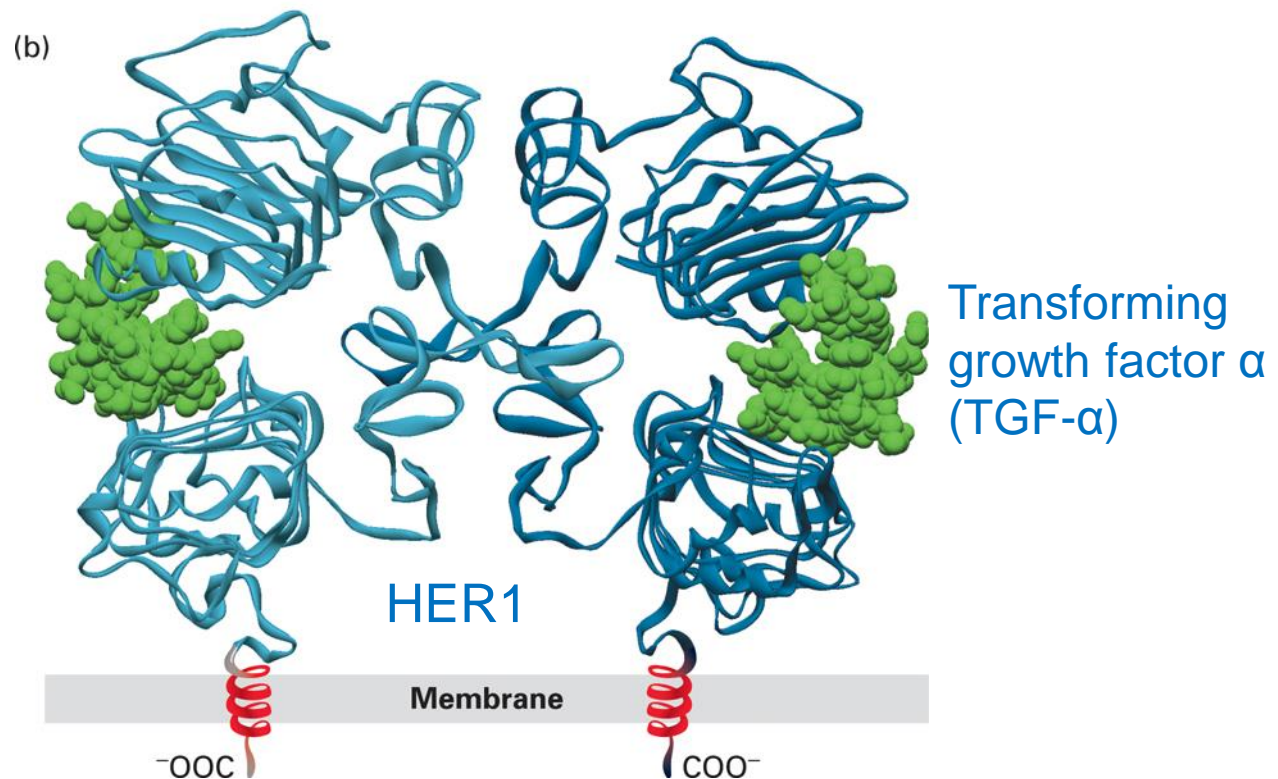
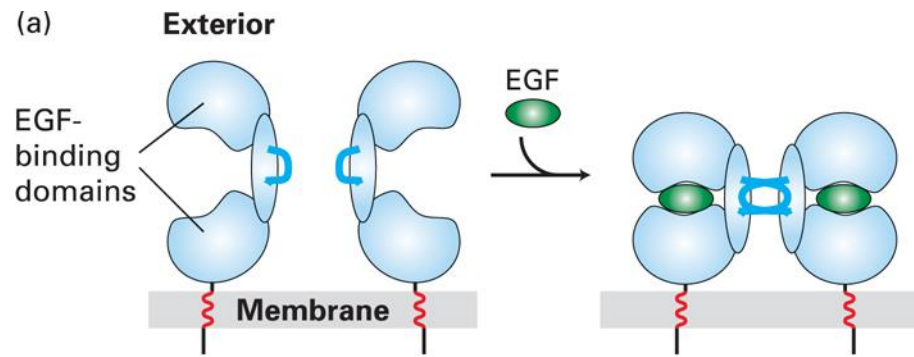
# Receptorji tirozin-kinaz

Ligandi so topni ali vezani na membrano.

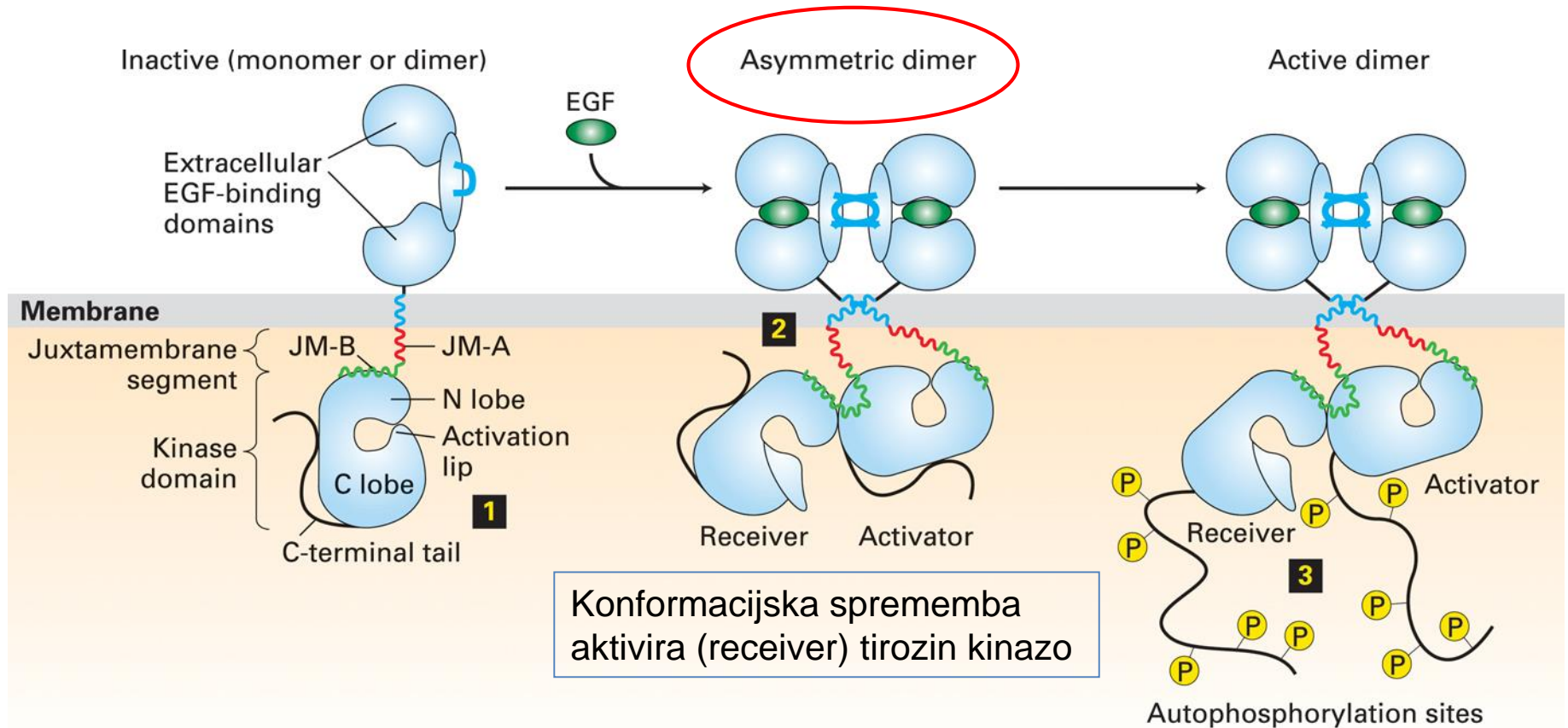
Hormoni (rastni faktorji) – živčni (NGF), PDGI (platelet derived GF), FGH (fibroblast GF), epidermalni (EGF),



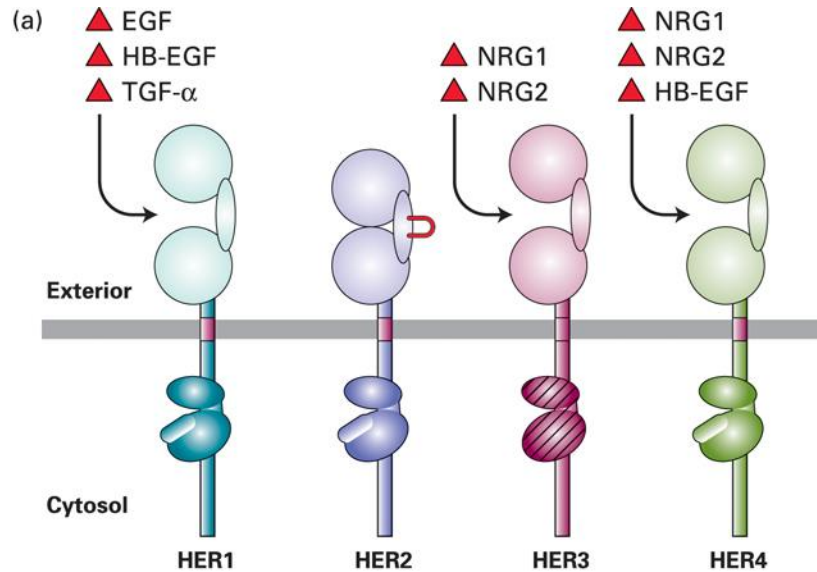
# Dimerizacija HER1, človeškega receptorja za epidermalni rastni faktor (EGF)



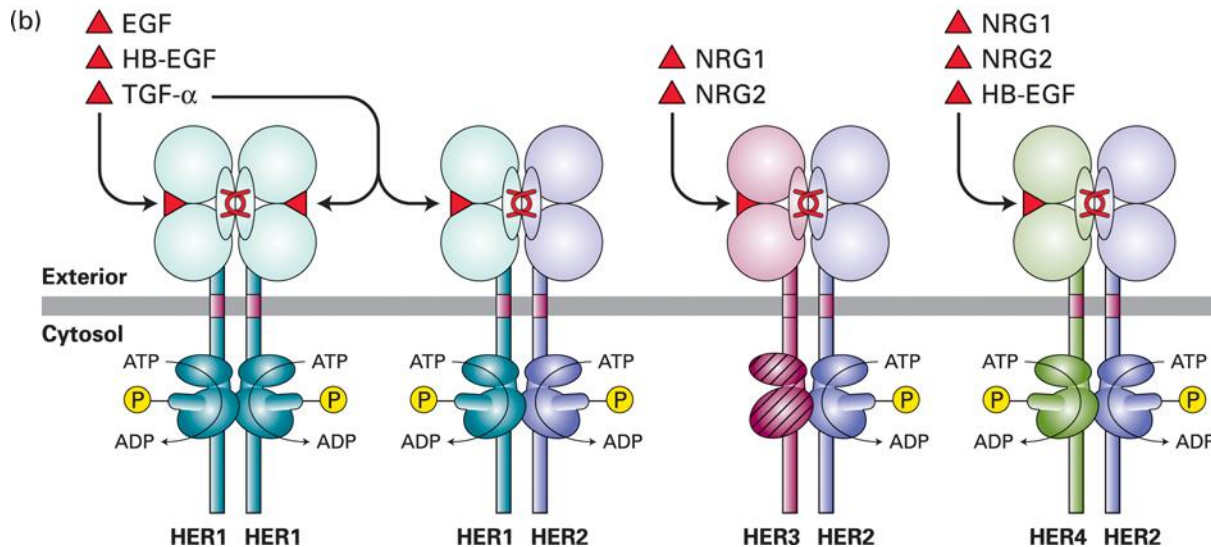
# Aktivacija EGF receptorja z EGF



# Družina človeških HER in njihovih ligandov

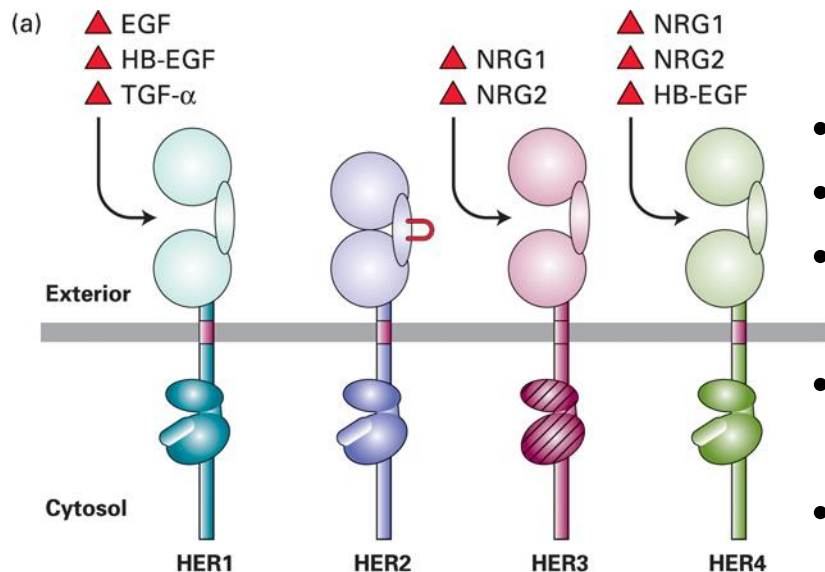


- 4
- homo in heterodimeri
- HER2 ne veže liganda
- HER2 je vedno heterodimer
- HER3 je šibko katalitično aktiven

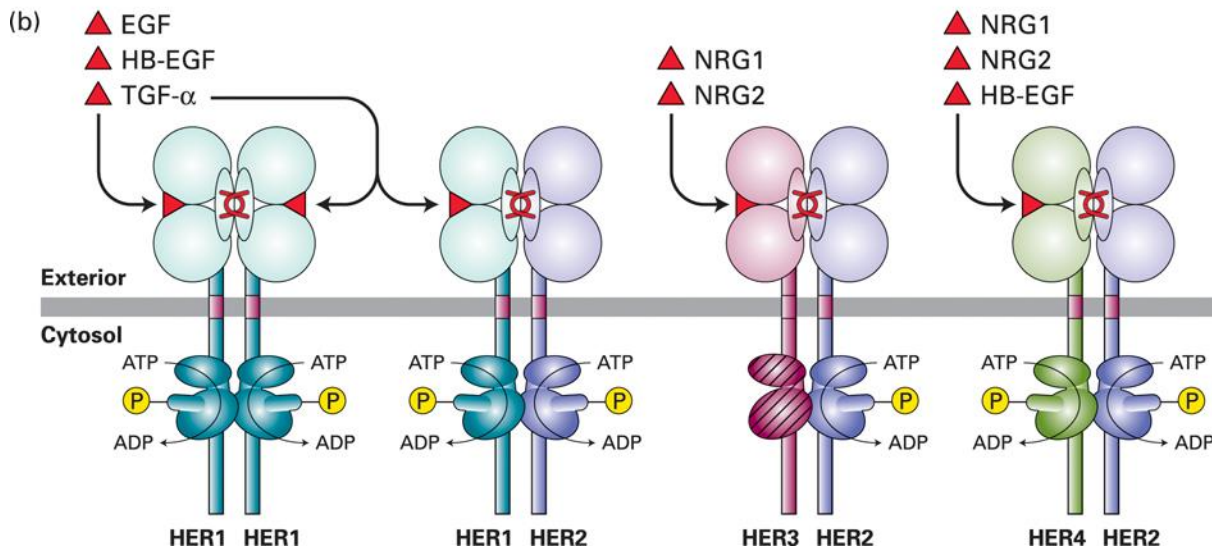


HB – vezan heparan  
NRG – neuregulin iz EGF družine  
TGF- $\alpha$  - Transforming growth factor alpha

# HER in rak dojke



- Več kopij gena za HER2
- Prekomerno izražanje HER2
- Pri 25 % pacientk z rakom na dojki, rak na pljučih
- Tumorske celice občutljive že na šibko stimulacijo z rastnimi faktorji
- Zdravilo: mAb proti HER2, inhibitorji TK, mAb, ki zavirajo angiogenezo



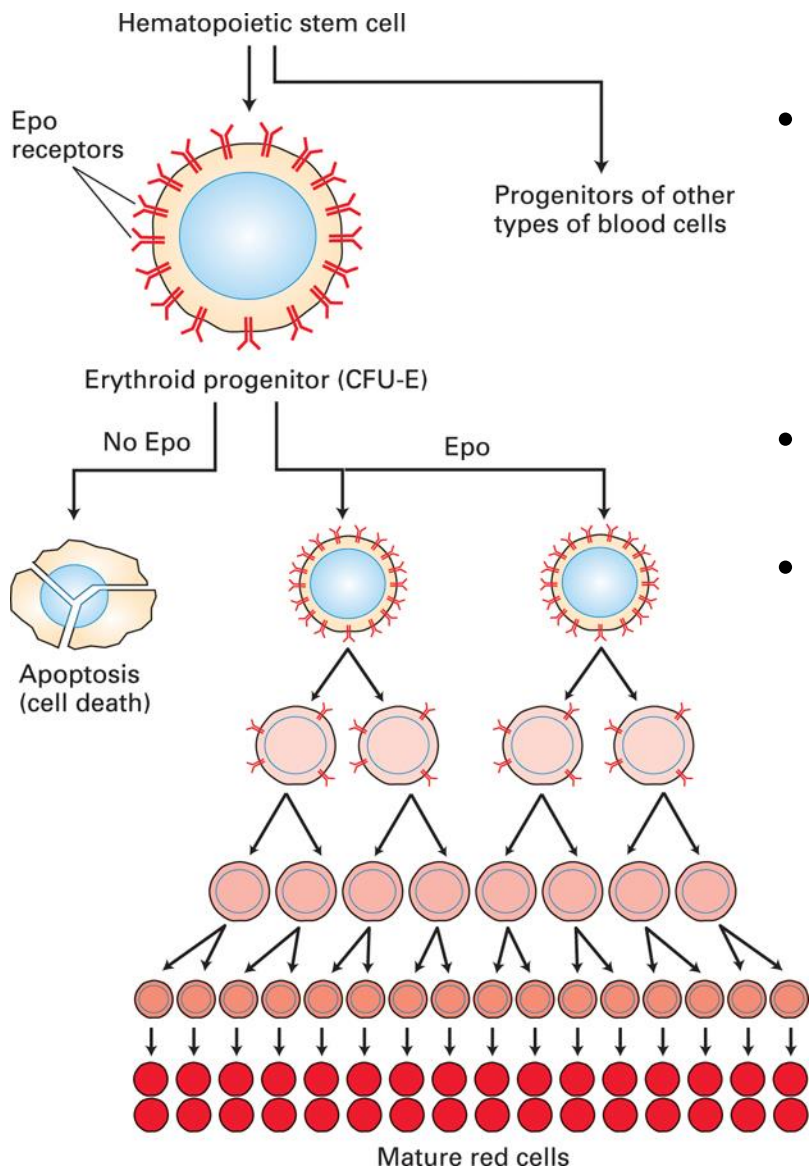
HB – vezan heparan  
NRG – neuregulin iz EGF družine



# Citokini preko citokinskih receptorjev aktivirajo tirozin-kinaze

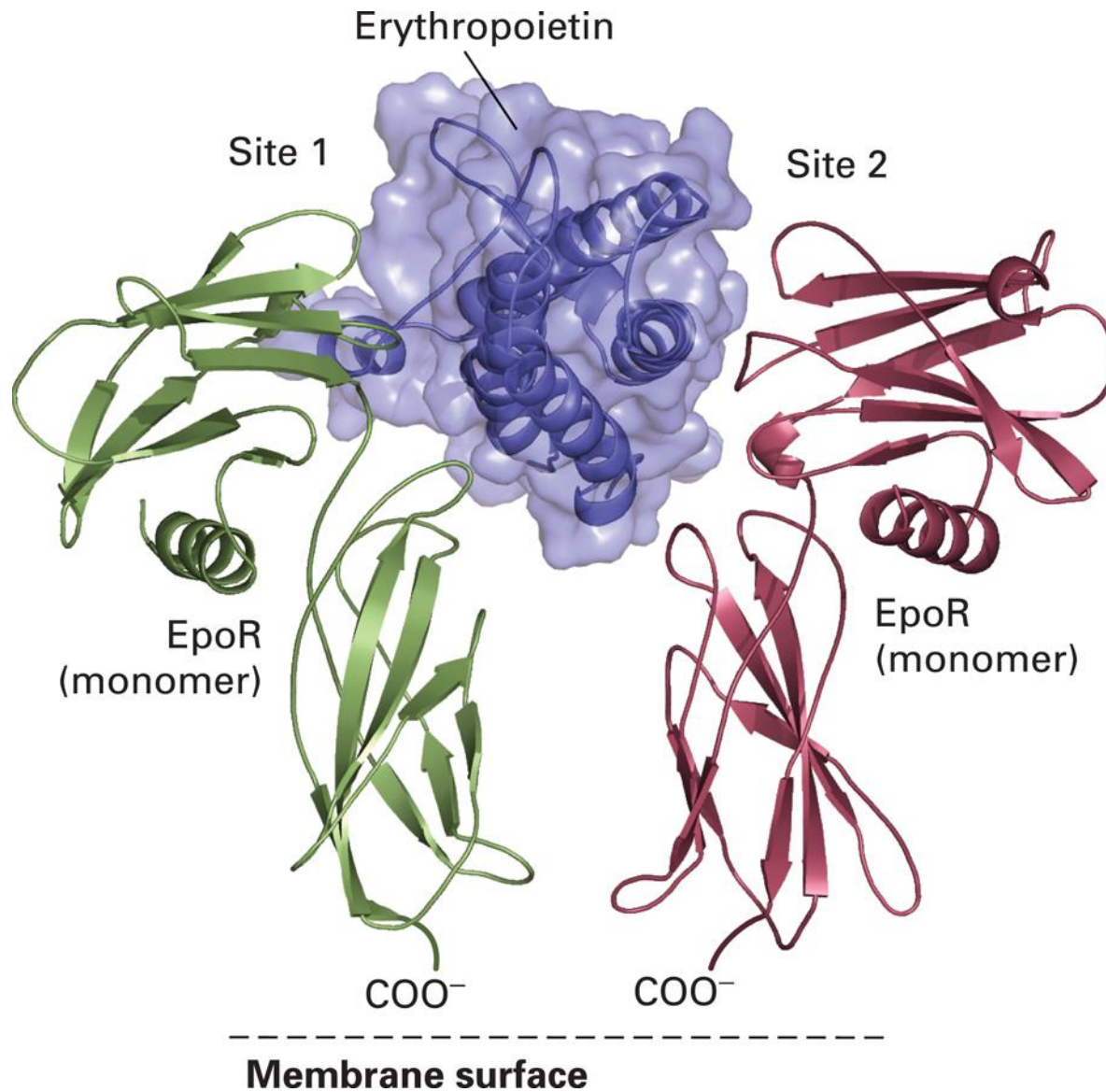
- Male molekule, 160 aminokislin
- 4 dolge  $\alpha$ -vijačnice
- Kontrola rasti in diferenciacije celic
- Primeri:
  - prolaktin (z diferenciacijo epitelijskih celic te proizvajajo mlečne proteine v mlečnih žlezah)
  - interlevkini (proliferacija T in B celice)
  - interferoni (virusna infekcija-aktivacija encimov na sosednjih celicah, da so bolj odporne na viruse)
  - citokini, ki inducirajo nastanek krvnih celic iz predniških celic (G-CSF, granulocyte colony stimulating factor, eritropoetin)

# Razvoj eritrocitov z eritropoetinom

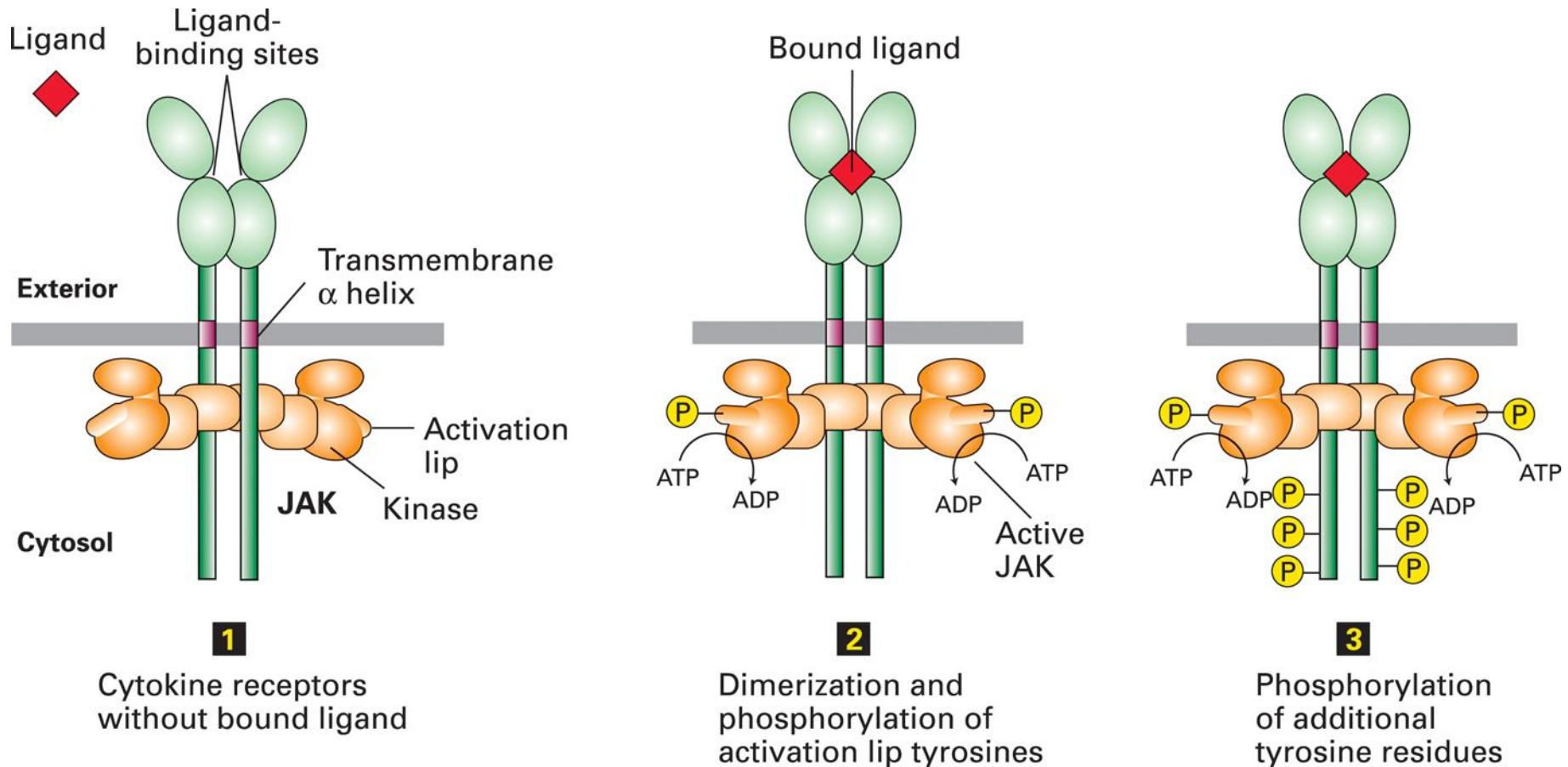


- Znižanje kisika v krvi preko TF HIF-1 aktivira sintezo eritropoetina v ledvičnih celicah. V nekaj dneh iz 1 predniške celice nastane ~ 50 eritrocitov.
- Zdravljenje anemije pri ledvičnih bolnikih.
- Del terapije pri rakavih obolenjih.

# Struktura eritropoetina z receptorjem

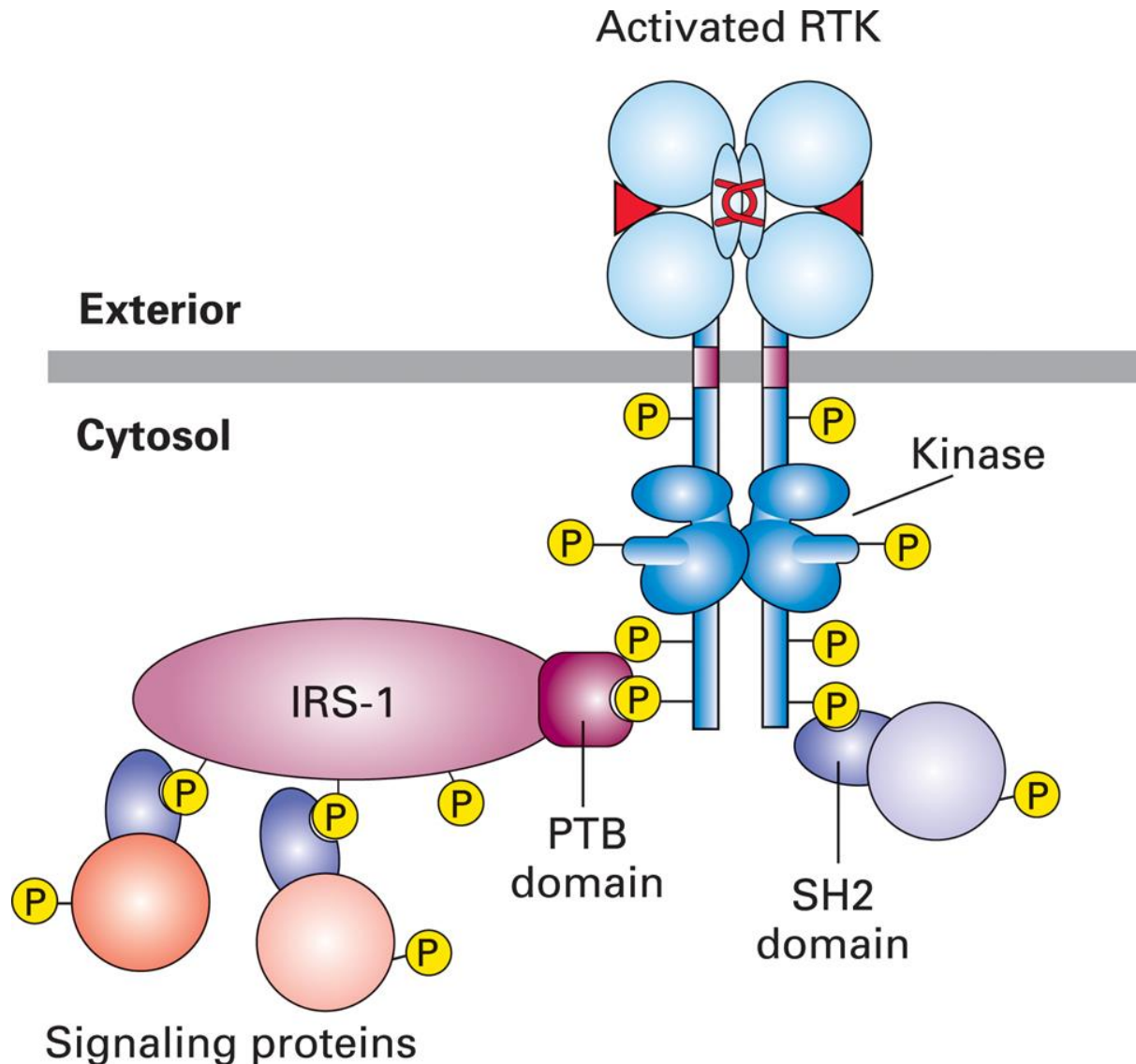


# Aktivacija citokinskih receptorjev



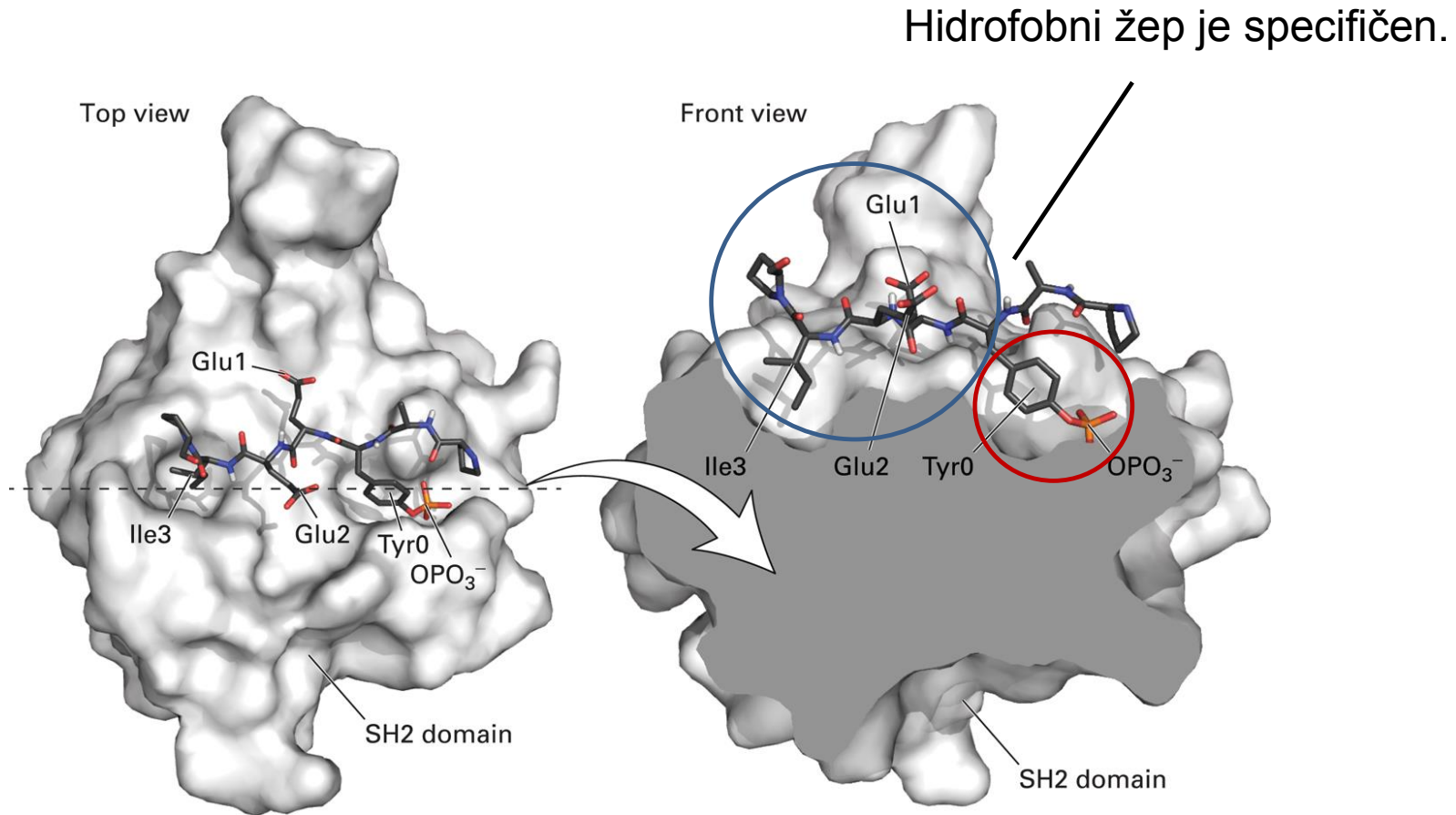
- Receptor je dimer
- Na citosolni del sta vezani 2 protein-tirozin-kinazi
- Vezava liganda približa obe JAK, ki postaneta aktivni
- Sledi fosforilacija tirozinov na C-koncu receptorja
- Na P-Tyr se vežejo proteini s specifičnimi domenami (SH2, PTB)

# Signalni proteini se vežejo na P-Tyr v RTK in citokinskih receptorjih ali na umestitvene proteine (npr. IRS-1)



IRS – insulin receptor substrate  
PTB – phosphotyrosine binding

# Proteini z SH2 domeno se vežejo na fosforiliran receptor v citoplazmi



SH2 – Src homology 2 domain

# Aktivacija STAT transkripcijskih faktorjev

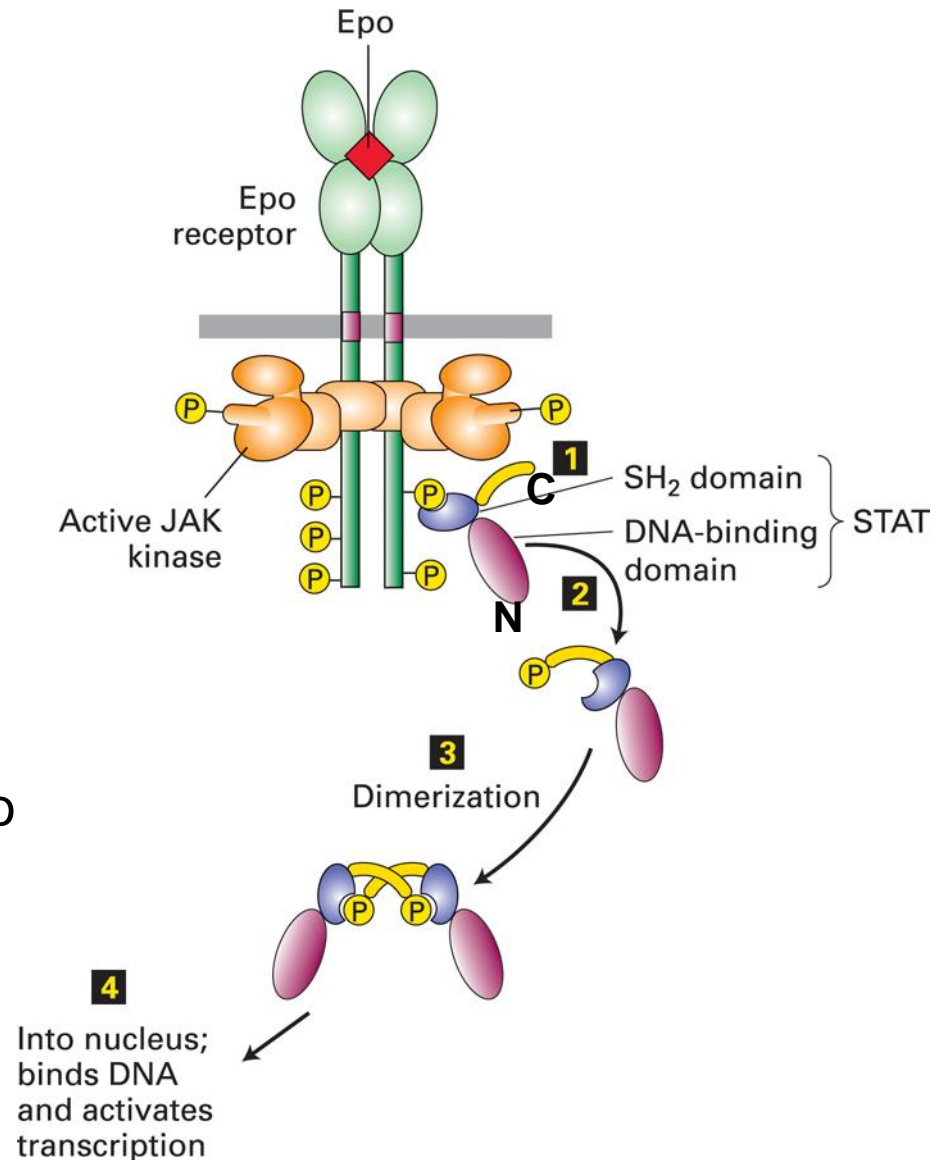
STAT proteini imajo:

- N-konec, ki se veže na DNA
- SH2 domeno
- C-konec s tirozinom

Fosforilacija Tyr

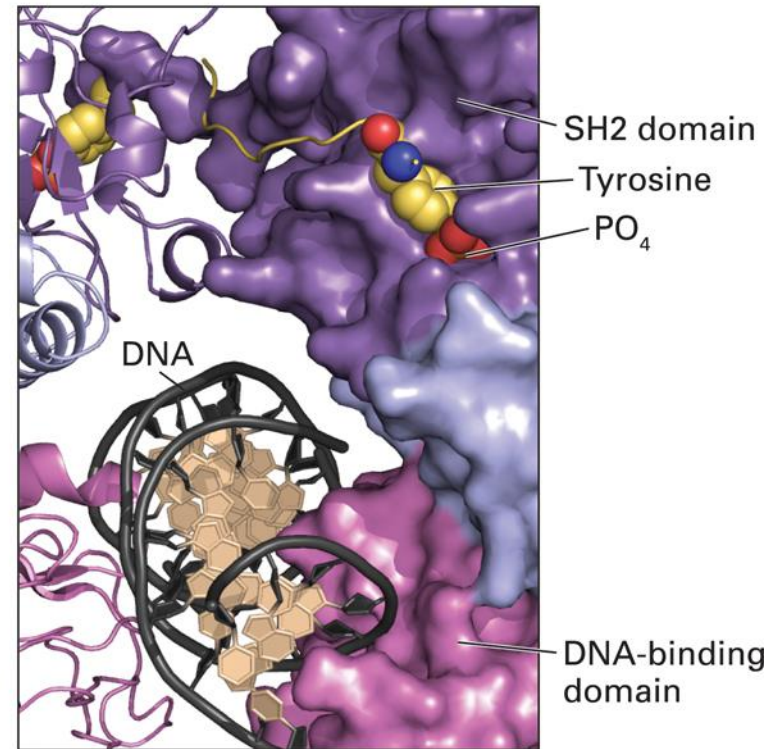
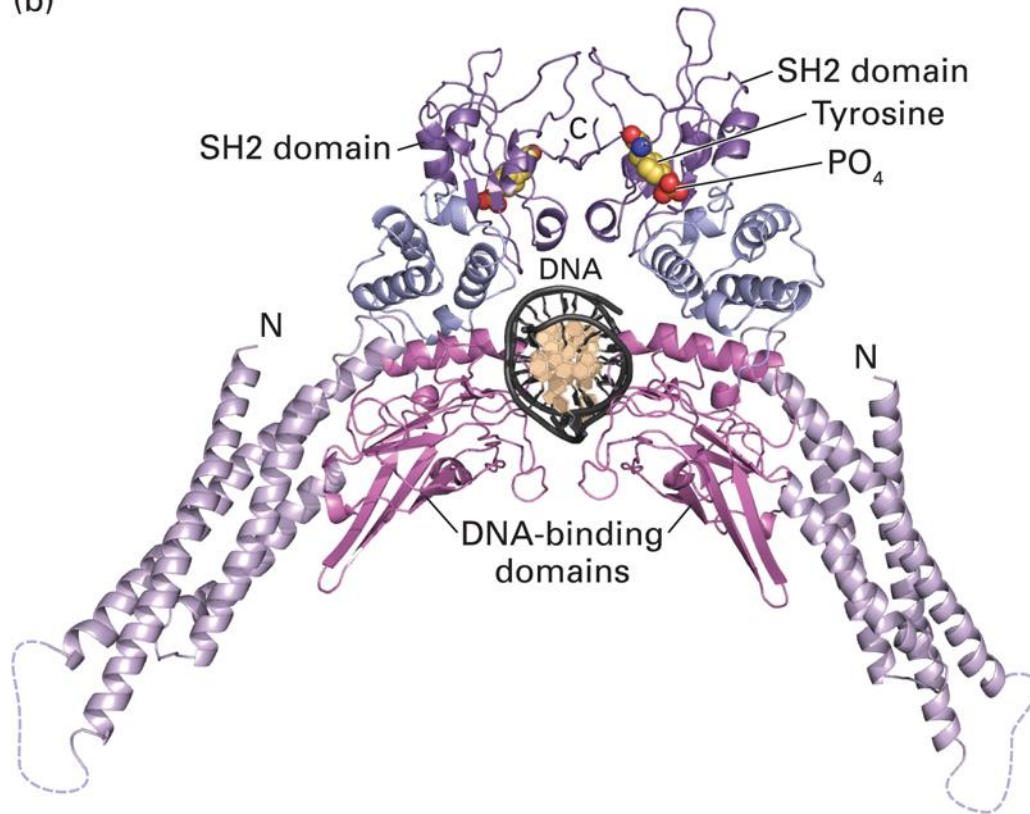
2 prosta STAT proteina dimerizirata,  
konformacijske spremembe

NLS se izpostavi, STAT potuje v jedro  
Veže se na ojačevalna zaporedja



# Struktura STAT proteina

(b)





# Aktivacija transkripcije s STAT

Določen STAT protein aktivira transkripcijo različnih genov v različnih celicah.

V celicah so različni TF, drugačne epigenetske modifikacije, geni, pripravljeni za transkripcijo s STAT.

Primer: aktivacija STAT5 z eritropoetinom v eritroidnih predniških celicah in s prolaktinom v mlečnih žlezah.

Različni ligandi – receptorji – celice  
enaka signalna molekula aktivira druge gene!

# Znižanje učinka signalne poti z RTK in s citokini

- Endocitoza receptorjev:

HER1 ima brez EGF razpolovni čas 10-15 ur, internalizacija receptorja vsakih 30 min (v endosome in nazaj v celično membrano)

Ob prisotnosti EGF se internalizacija 10x poveča, malo receptorjev se vrne v membrano, večina se razgradi v lizosomih

- Razgradnja v lizosomu:

Signal za razgradnjo (ubikvitinacija) ali recikliranje

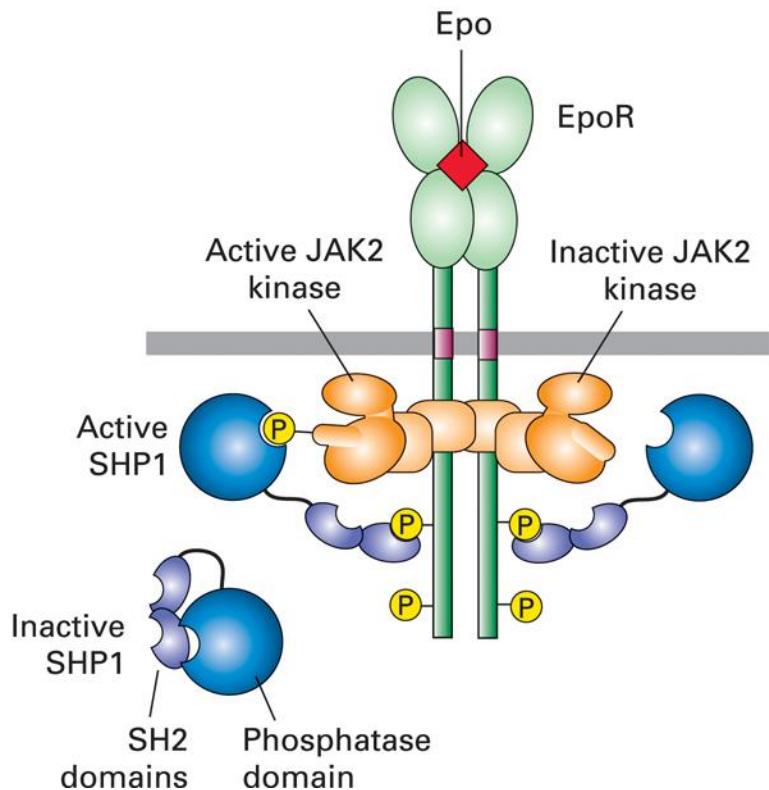
Če ni internalizacije, ima HER1 konstantni odgovor na EGF, kar vodi v nastanek tumorjev.

- Fosfotirozin fosfataze
- SOCS proteini

# Regulacija prenosa signala na eritropoetinskem receptorju

## Fosfotirozin fosfataza SHP1

(a) Short-term regulation: JAK2 deactivation by SHP1 phosphatase

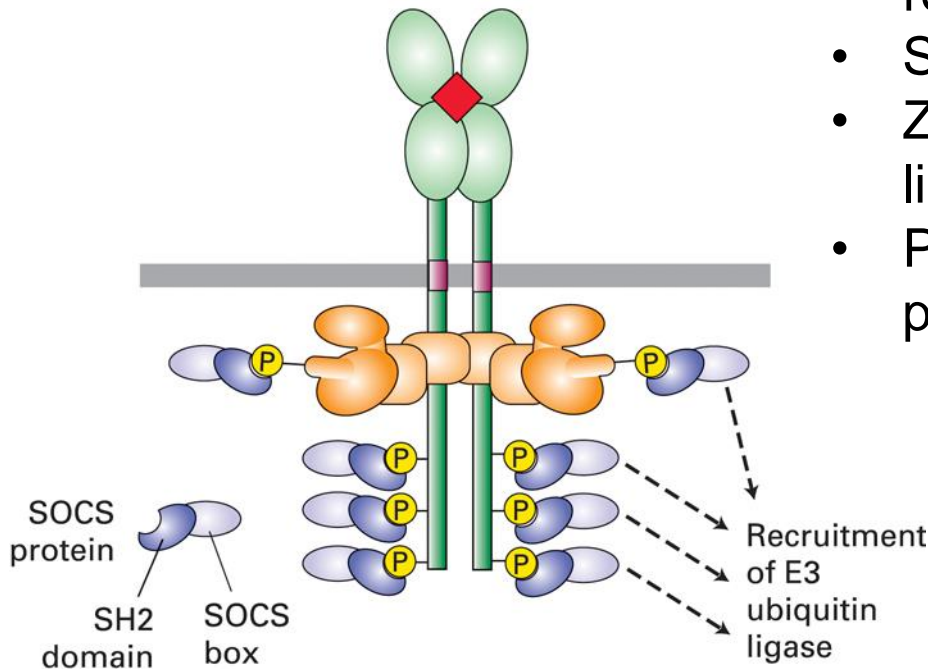


SHP1 se veže na P-Tyr na EpoR receptorju (z SH2 domeno) in inaktivira JAK2 (dokler se na receptor ne veže nov citokin).

# Prekinitev prenosa signala na eritropoetinskem receptorju

## SOCS proteini (Suppressor of cytokine signaling)

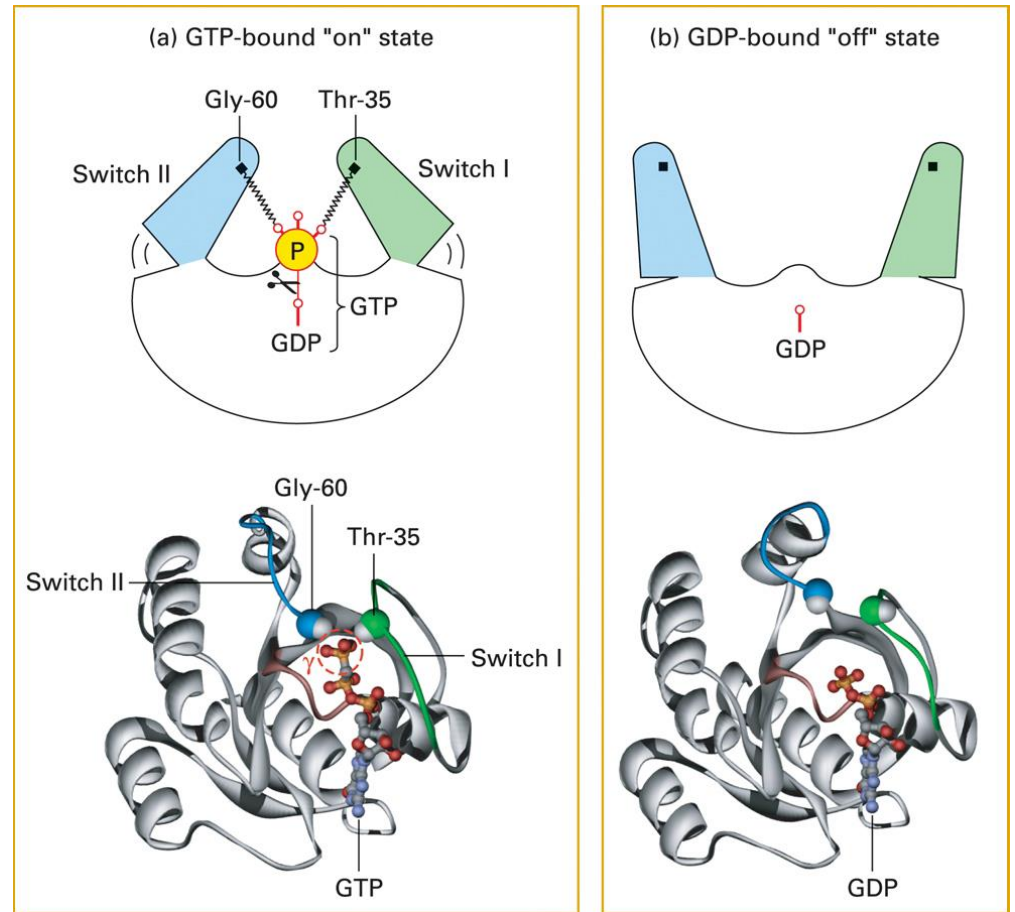
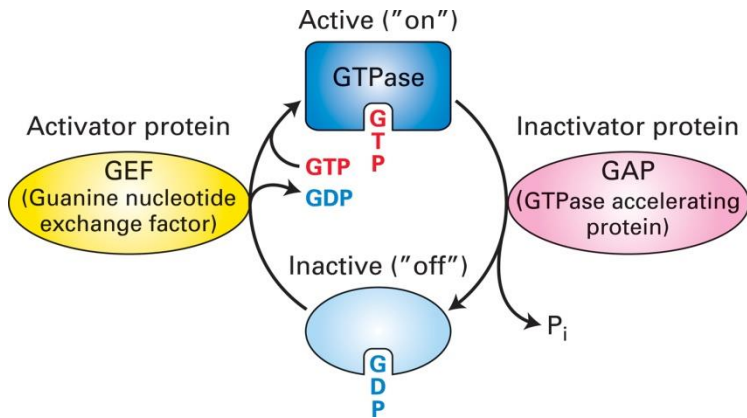
Long-term regulation: signal blocking and protein degradation by SOCS proteins



- TF STAT (negativna regulacija)
- Kompetitivna vezava z SH2 domeno na receptor
- SOCS1 se veže na JAK2, inaktivacija
- Z SOCS 'box' domeno veže E3 ubikvitin ligazo
- Poliubikvitinilacija JAK2 in razgradnja v proteasomu

# Signalna pot z Ras/MAP kinazo

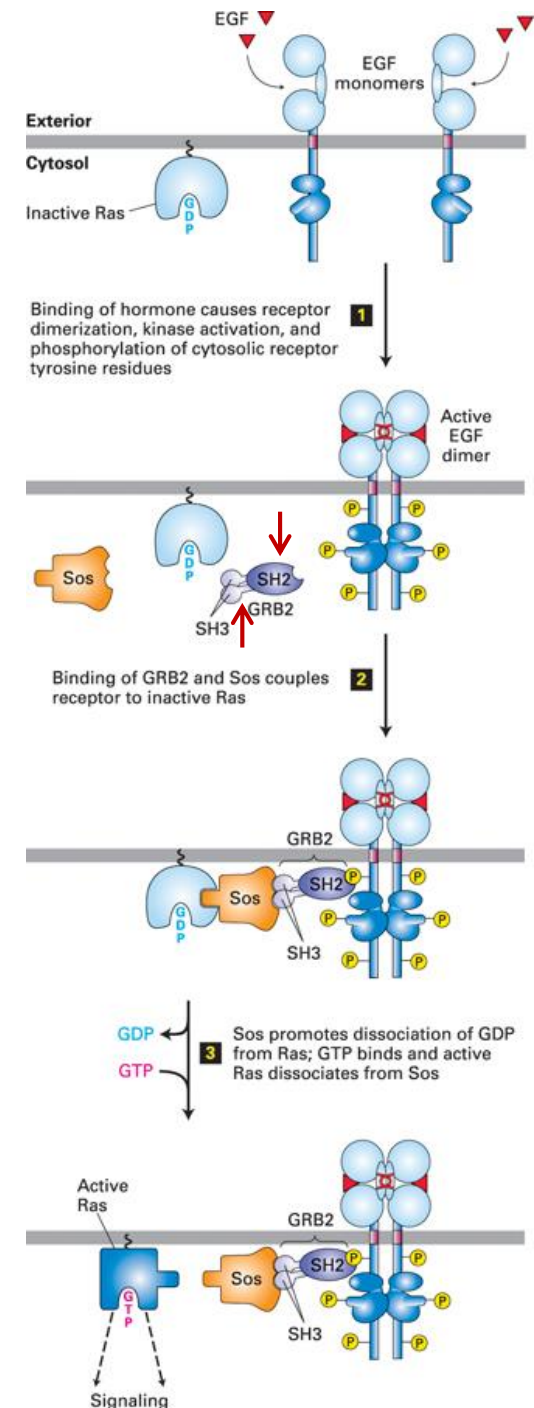
- Receptorji: RTK in citokinski receptorji
- Ras GTPaza
- Študija na *Drosophili*, *C. elegans*, proteini ohranjeni



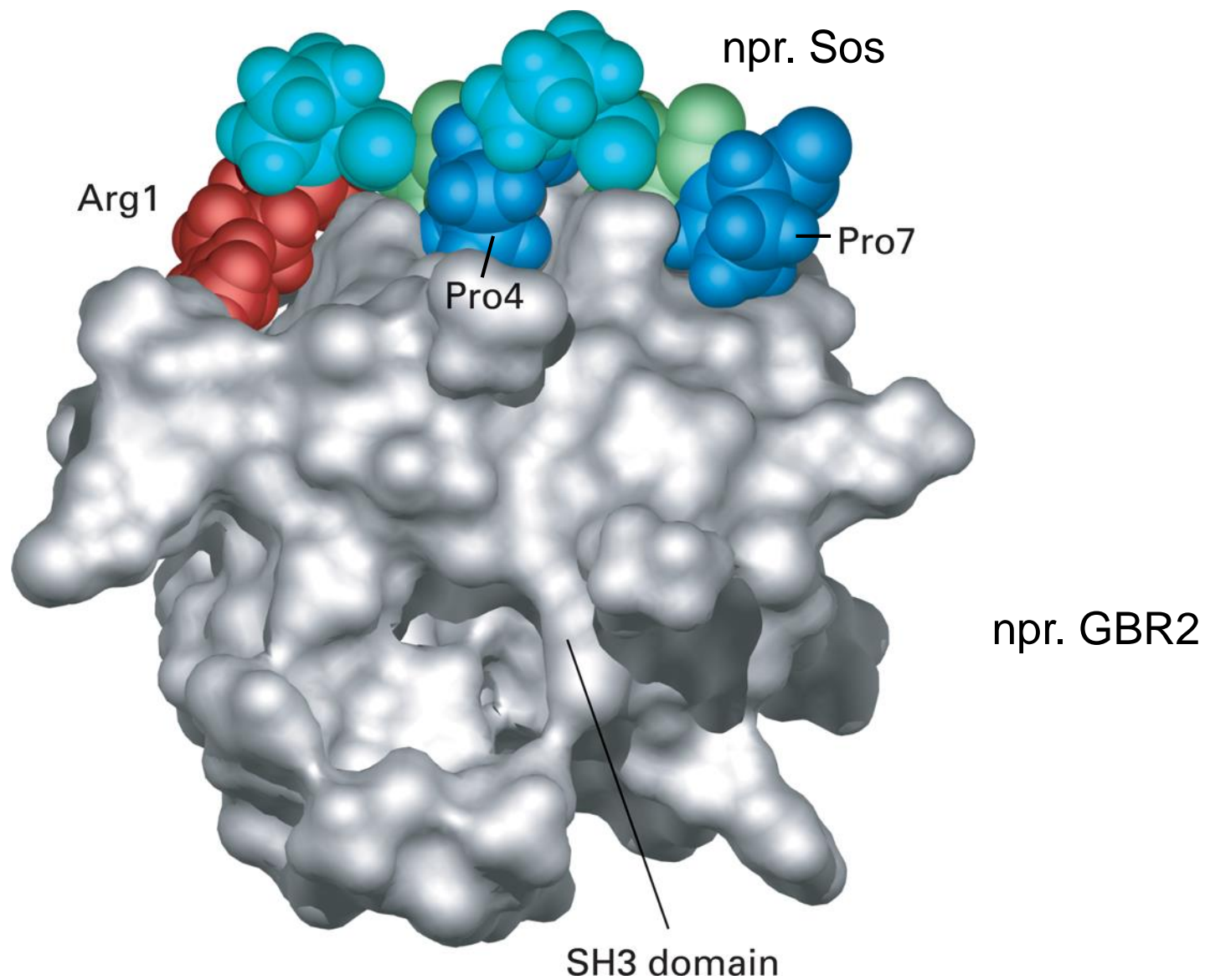
Ras stikalo

# Signalna pot z Ras/MAP kinazo

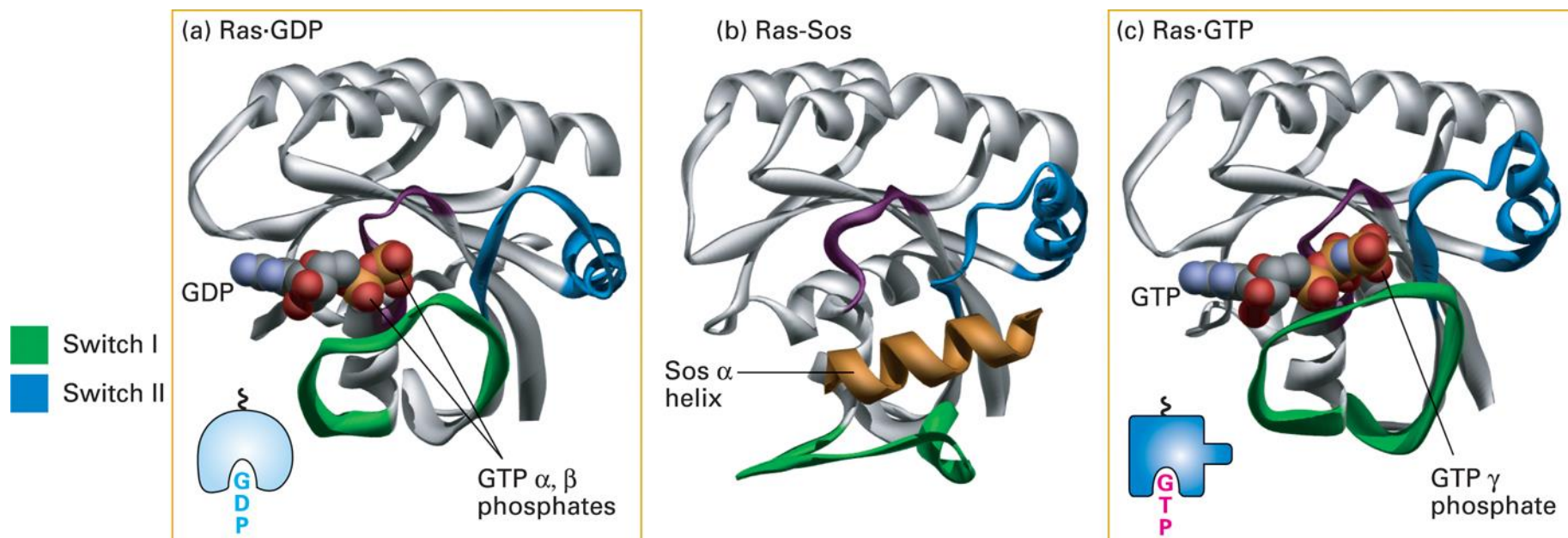
- Receptorji: RTK in citokinski receptorji
- Ras GTPaza
- Kaskada kinaz se konča z MAP kinazo (Mitogen-Activated Protein Kinase)
- MAP kinaza aktivira TF, ki vplivajo na celični cikel in diferenciacijo celic.
- Mutacije v RTK, Ras in 'downstream' proteinih so našli v skoraj vseh vrstah človeških tumorjev.
- Ras se na tirozin-kinazo veže preko vmesnih proteinov, Sos je GEF



# Specifične interakcije SH3 domene s prolin bogato regijo



# Strukturne spremembe Ras, ko je vezan na GDP, Sos in GTP

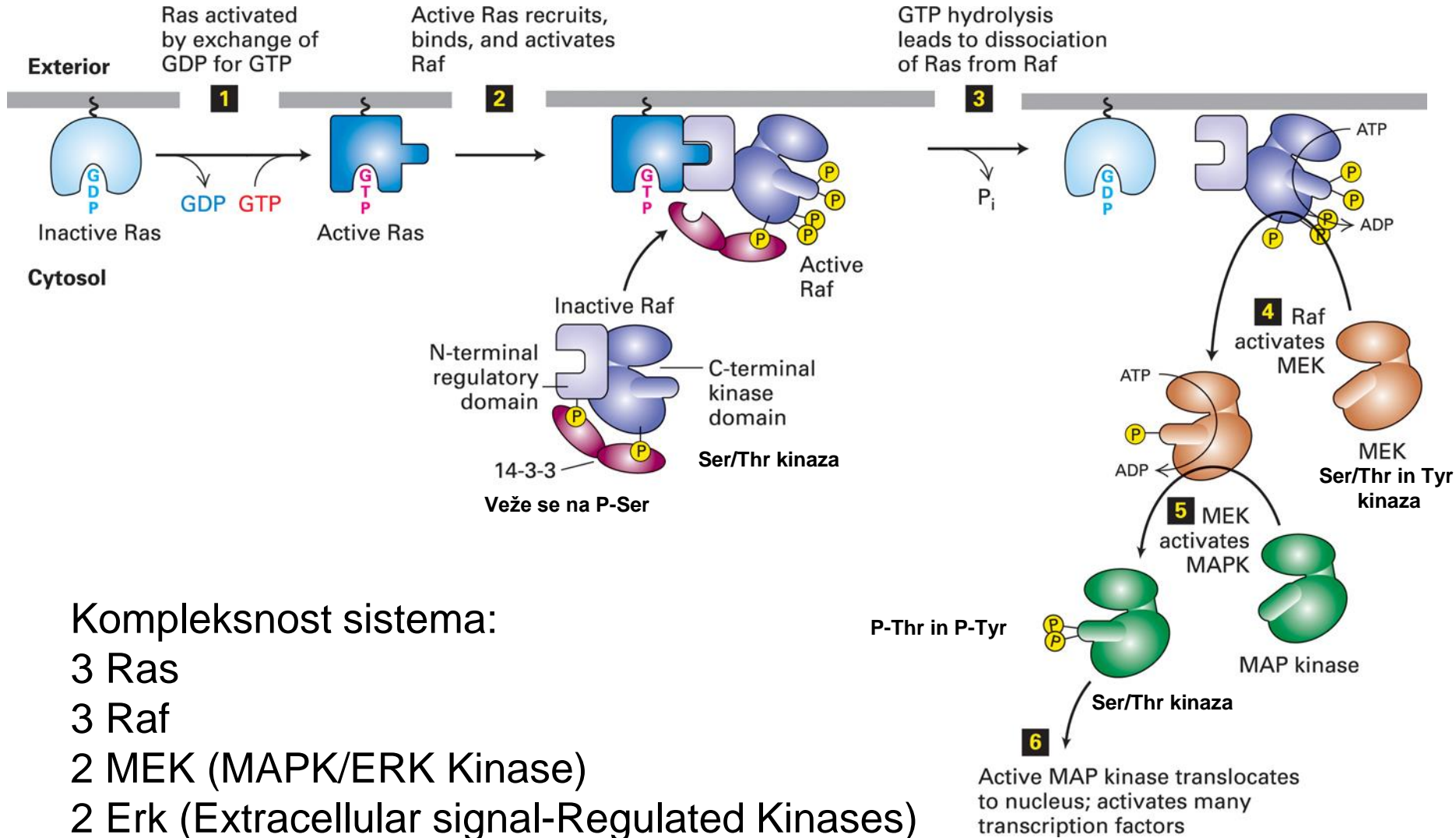


Ko se GTP veže v žep, se Sos sprosti iz kompleksa.

Strukturne spremembe omogočijo interakcije s proteini iz kaskade kinaz.



# Signalna pot preko Ras/MAP kinaze



Kompleksnost sistema:

3 Ras

3 Raf

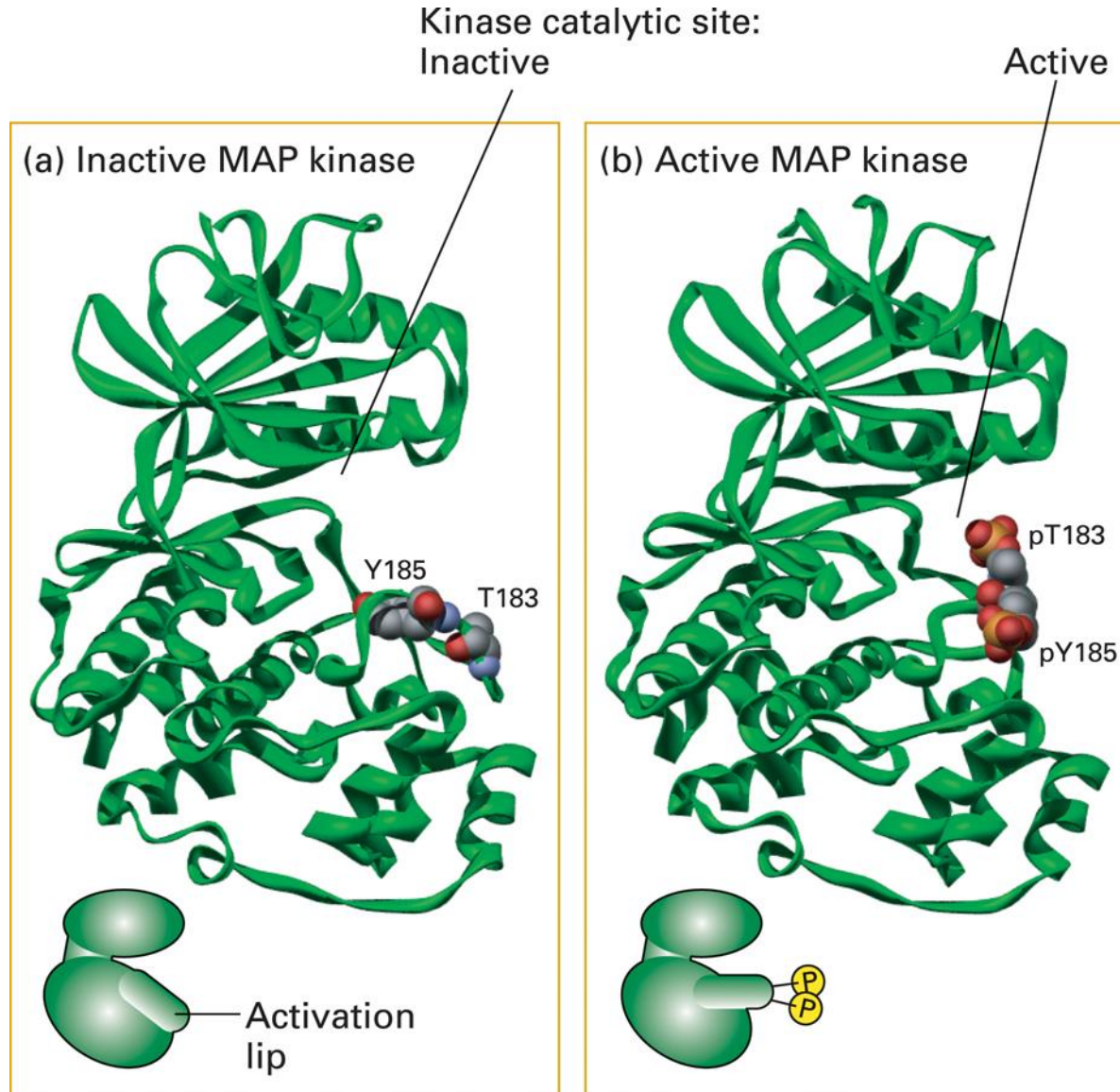
2 MEK (MAPK/ERK Kinase)

2 Erk (Extracellular signal-Regulated Kinases)

## Mutacije v *B-Raf* povzročijo melanom

- 40 % primerov melanoma je mutacija v genu za B-Raf
- 90 % mutacij je Glu 600 Val
- Stimulacija MEK brez rastnega faktorja
- Inhibitorji B-Raf kinaze v kliničnih študijah

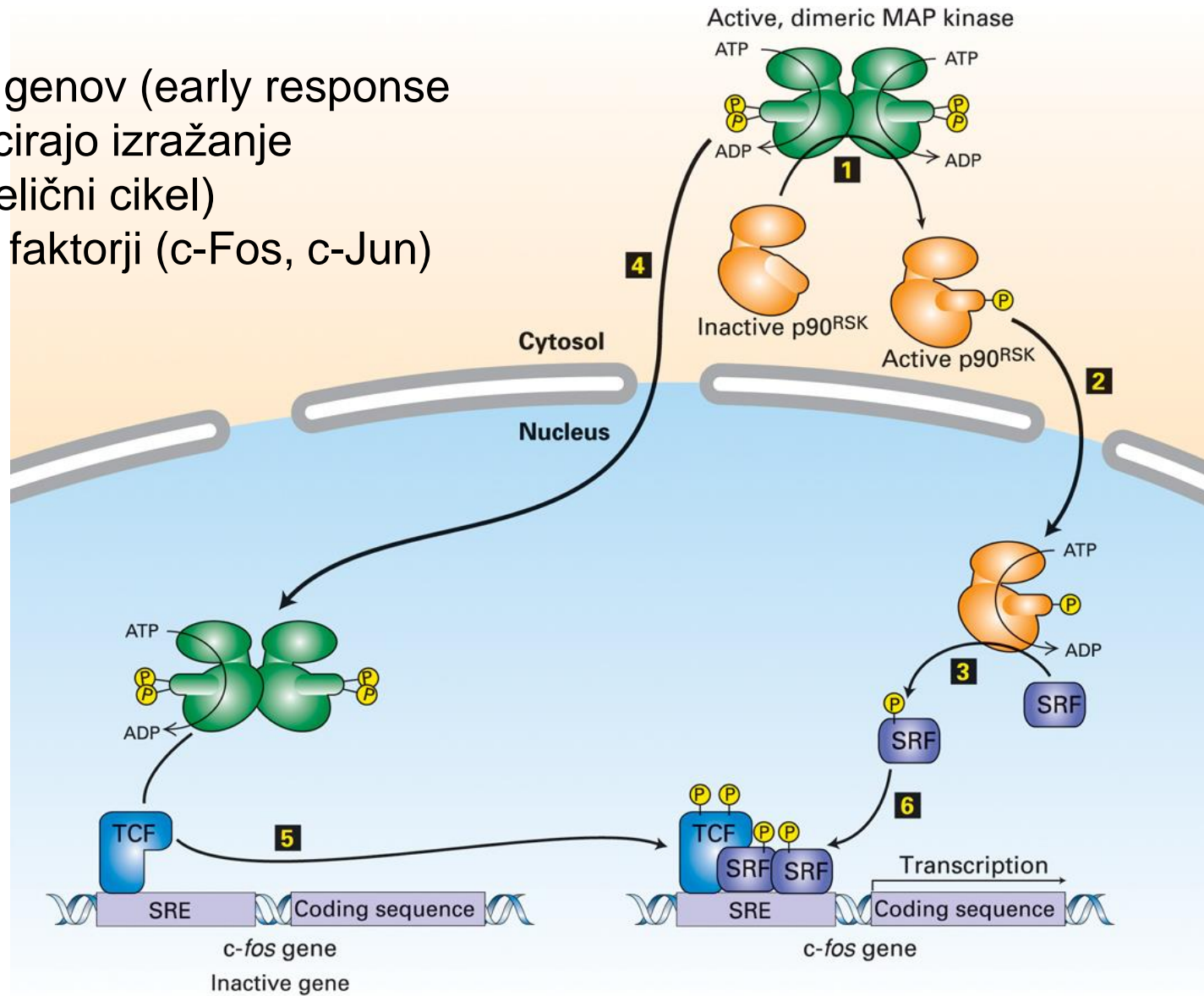
# Aktivna in neaktivna oblika MAP kinaze



Fosforilacija povzroči aktivacijo in dimerizacijo (transport v jedro).

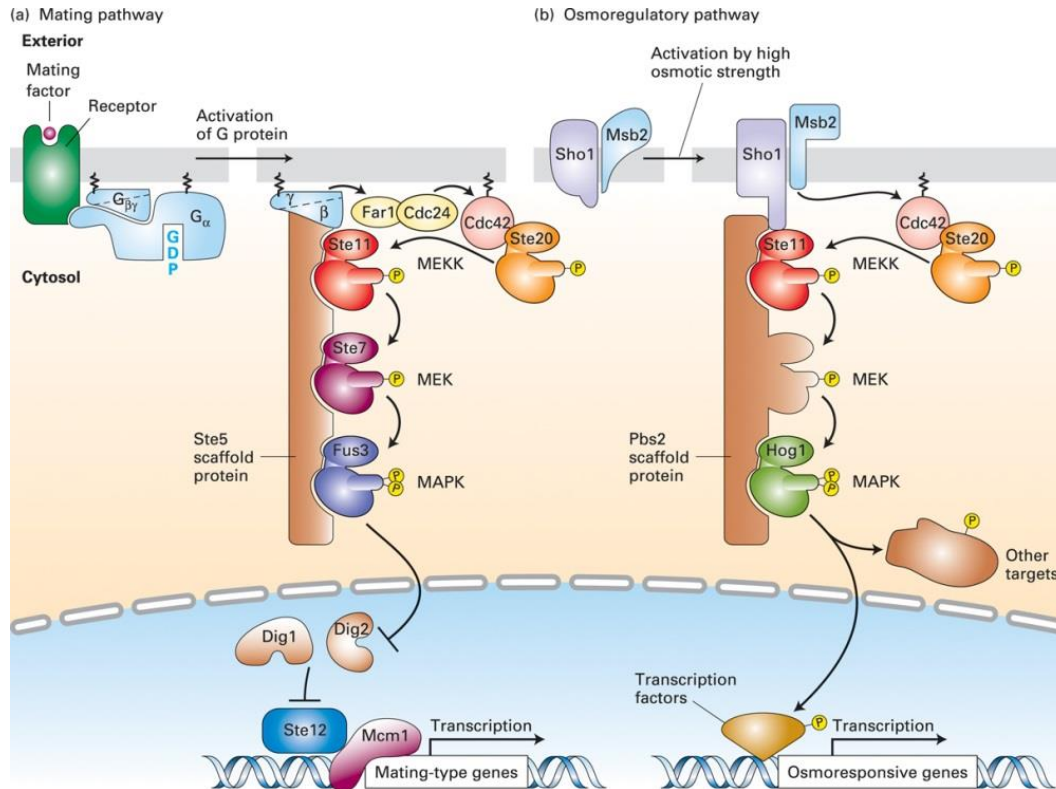
# Aktivacija transkripcije z MAP kinazo

- Aktivacija 100 genov (early response genes, ki inducirajo izražanje proteinov za celični cikel)
- Transkripcijski faktorji (c-Fos, c-Jun)



SRE – serum response element  
SRF – serum response factor  
TCF – ternary complex factor

# „Scaffold“ proteini ločijo različne signalne poti preko MAP kinaz

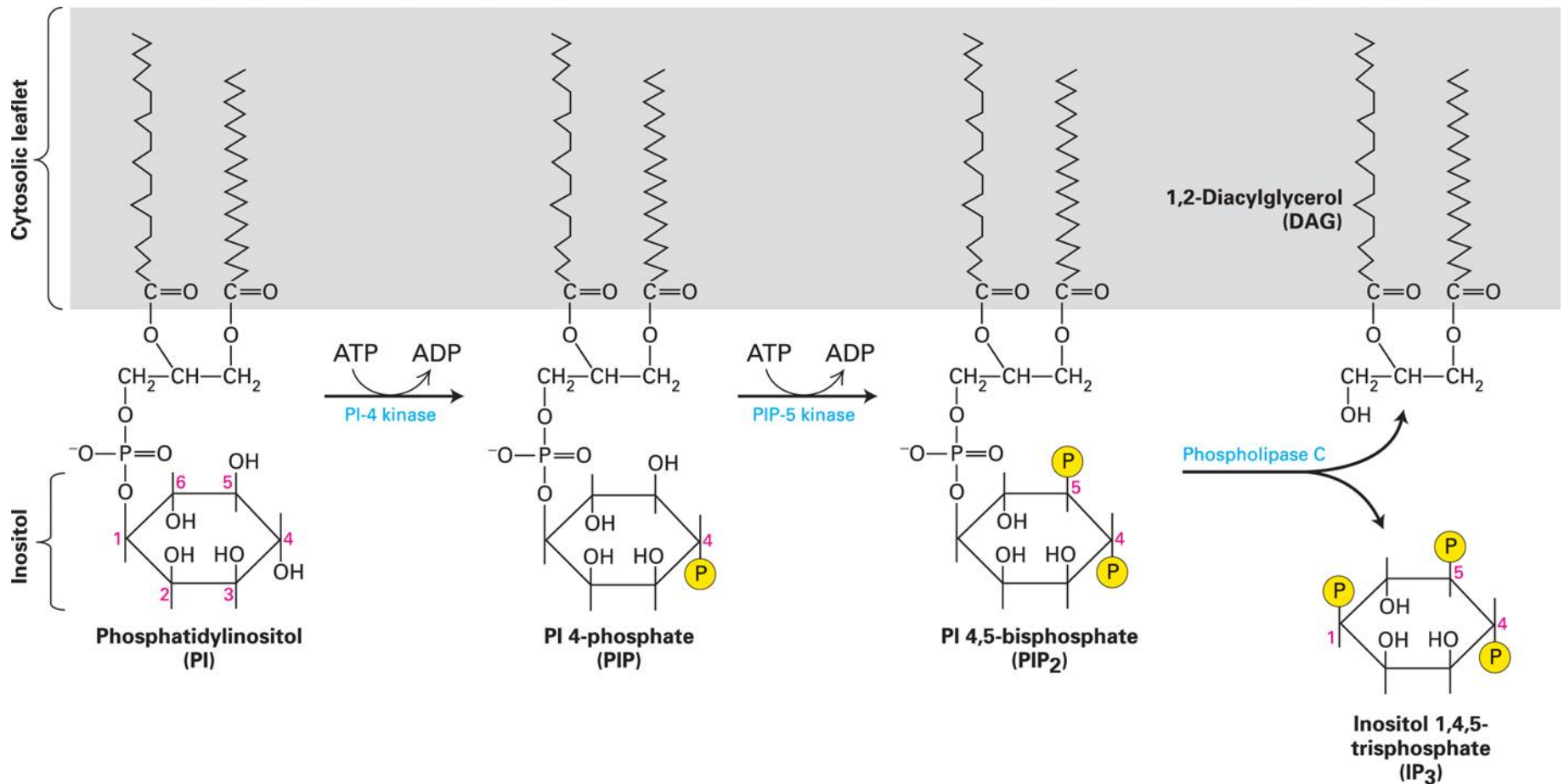


**Figure 16.24** Yeast MAP kinase cascades in the mating and osmoregulatory pathways.

**Signalna pot preko fosfoinozitudov**

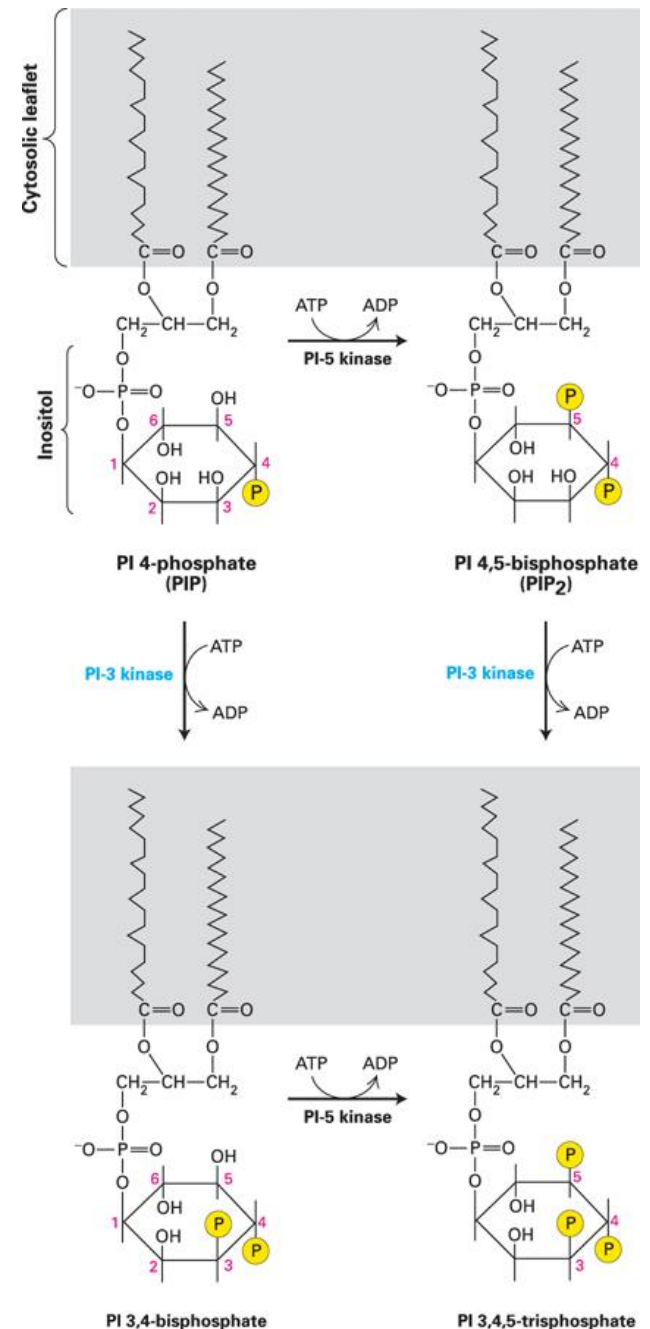
# Sinteza sekundarnih prenašalcev DAG in IP<sub>3</sub> s PLC

- GPCR - PLC $\beta$  - DAG in IP<sub>3</sub> (Ca<sup>2+</sup>)
- RTK, citokinski receptorji - PLC $\gamma$  (SH2 domena) - DAG in IP<sub>3</sub>



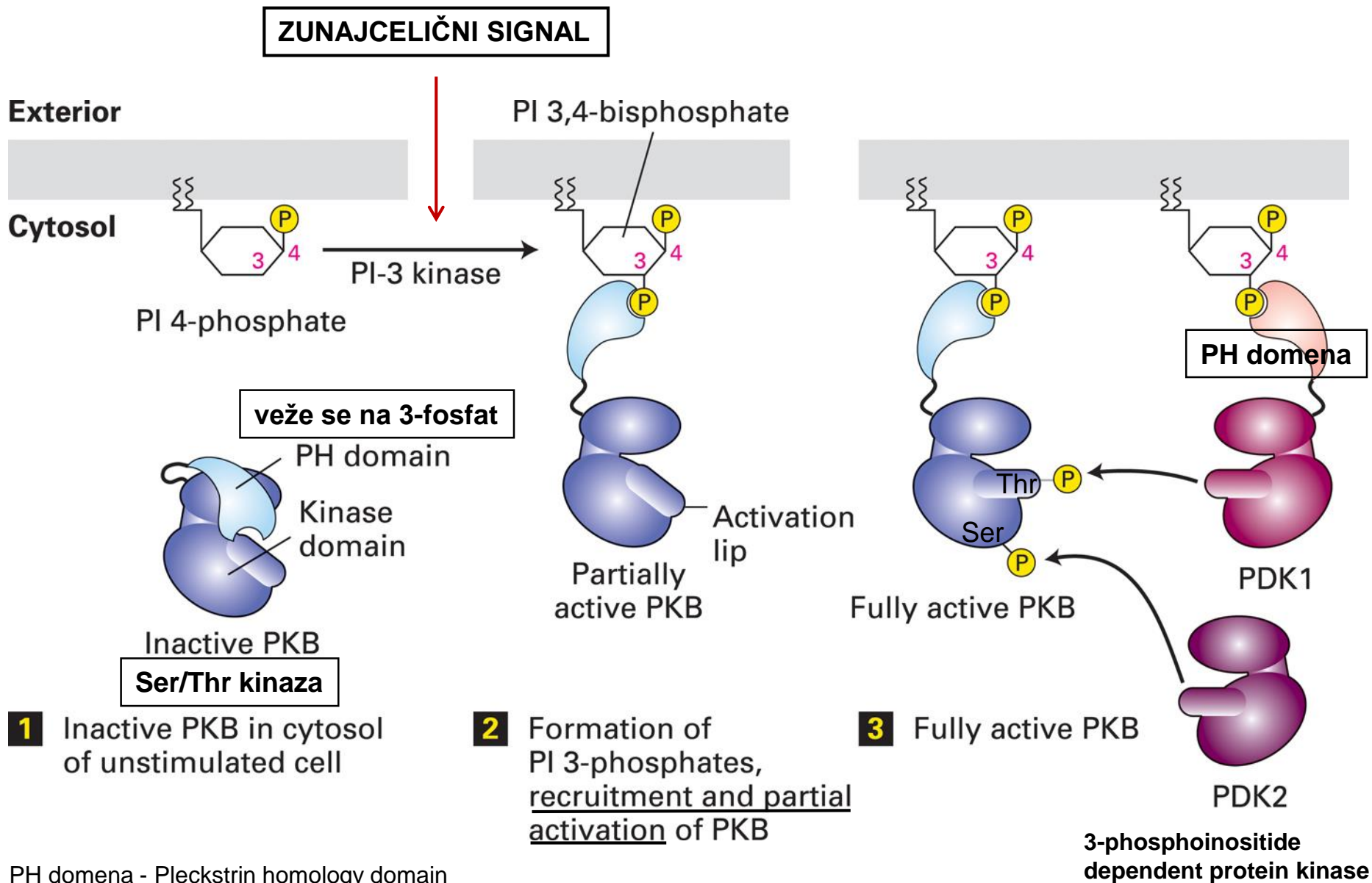
# Fosfatidil inozitol 3,4,5-trisfosfat

- RTK, citokinski receptorji
- PI-3 kinaza (SH2 domena), 9 človeških homologov
- PI-3 kinaza se veže na receptor na citosolni strani – približa se substratu
- Pot sproži celično delitev, prepreči apoptozo, inducira spremembe v metabolizmu
- Dolgotrajni efekt na izražanje genov
- Protein-kinaza B (PKB), protein-kinaza C (PKC)





# Aktivacija PKB v signalni poti preko PI-3 kinaze



PH domena - Pleckstrin homology domain

# Vloga PKB

- Fosforilacija ter inaktivacija pro-apoptotičnih proteinov
- Primer: fosforilacija Forkhead TF FOXO3a prepreči njegovo indukcijo izražanja proapoptotičnih proteinov  
Rastni faktorji – PKB – fosforilacija FOXO3a – nanj se veže 14-3-3 – prenos v citosol
- Rak, diabetes
- Insulin – RTK – PKB – poraba in skladiščenje glukoze (ena signalna pot kontrolira različne celične funkcije v različnih celicah)

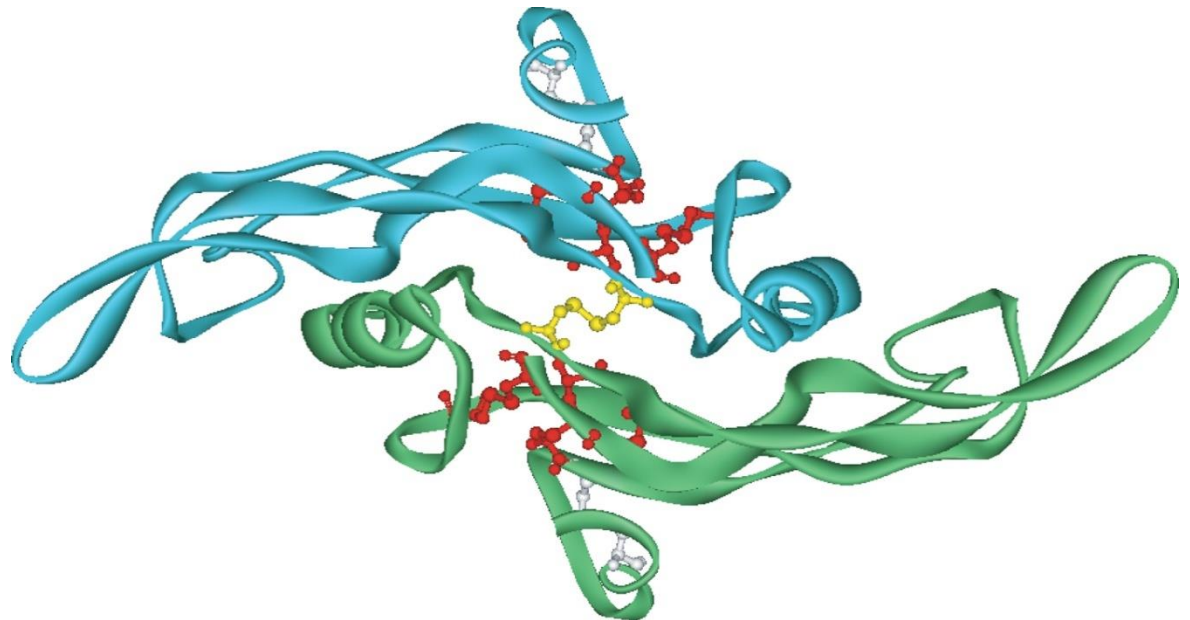
# Negativna regulacija PI-3 kinaze s PTEN fosfatazo

- Fosforilacija s PI-3 kinazo je reverzibilna
- PTEN (Phosphatase and tensin homolog), tumor-supresorski gen
- Široka specifičnost (Tyr, Ser, Thr)
- Poglavitna vlog: defosforilacija 3-fosfata iz PI 3,4,5-trisfosfata – apoptoza
- Delecije gena v naprednih rakih (PKB ni inhibirana, prekomerna celična rast)
- Miške z izbitim genom za PTEN imajo večje možgane in večje število nevronov (kontrola normalnega razvoja)

### 3. signalna pot preko receptorja serinske kinaze

## Signalna molekula TGF- $\beta$

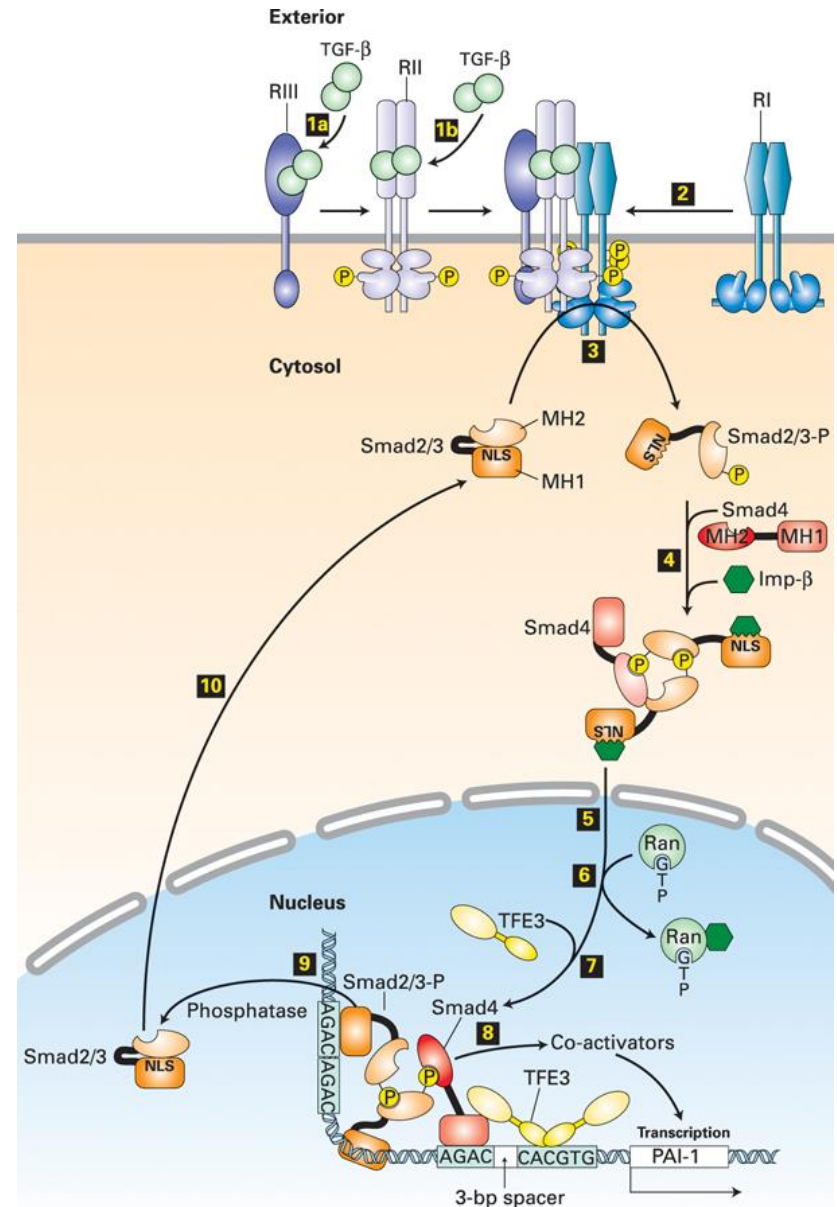
- TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) – zunajcelična signalna molekula
- TGF- $\beta$ 1,2,3 – normalna vloga: inhibicija celičnega cikla (zgodnji raki, metastaze), BMP (bone morphogenic protein)
- V matriksu v neaktivni obliki
- Hitra aktivacija s proteolizo ali odcepitvijo inhibitorja
- 7 Cys – 3 disulfidne vezi, 1 Cys za dimerizacijo (homodimer, heterodimer)



# TGF- $\beta$ /Smad signalna pot

## Receptor serinske kinaze

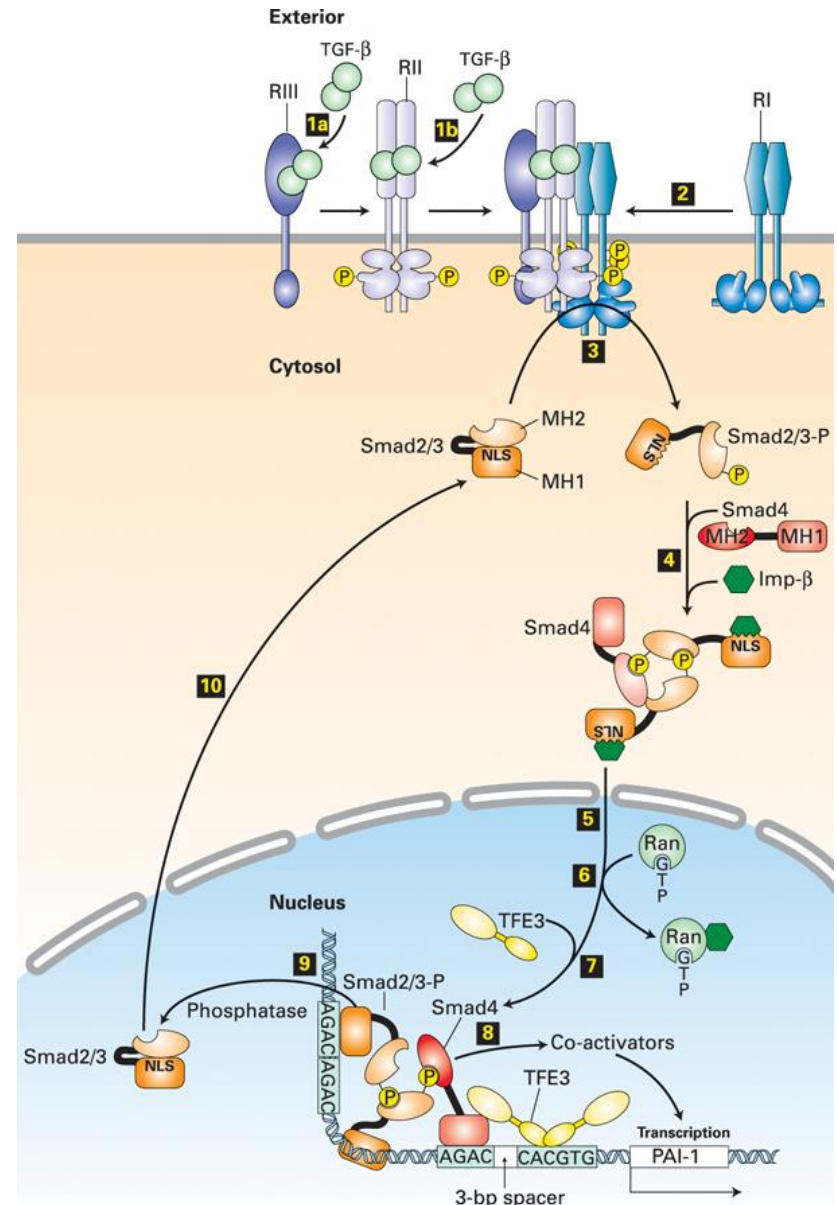
- Komplex 3 TGF- $\beta$  receptorjev
- RIII je največ,  $\beta$ -glikan – proteoglikan (GAG-protein)
- RI in RII sta dimera
- RII konstitutivno aktiven
- RII in RIII vežeta TGF- $\beta$
- Komplex RIII, 2x RII, 2xRI (ko je veliko TGF- $\beta$ )
- RII fosforilira RI
- Fosforilirajo Smad TF



# TGF- $\beta$ /Smad signalna pot

## Smad TF

- Neaktivni v citosolu (R-, co-, i)
- Imajo 2 domeni: MH1 (veže na DNA, NLS) in MH2 domeni
- Fosforilacija aktivira Smad 2/3
- Kompleks dveh Smad2/3, Smad 4 in dveh importinov potuje v jedro
- Smad 2-4 ali Smad3-4 se vežeta na druge TF
- Defosforilacija Smad2/3, recikliranje v citoplazmo
- Smad vežejo različne TF v različnih celicah – drugačen celični odgovor
- Smad regulirajo rast in diferenciacijo



# TGF- $\beta$ /Smad signalna pot

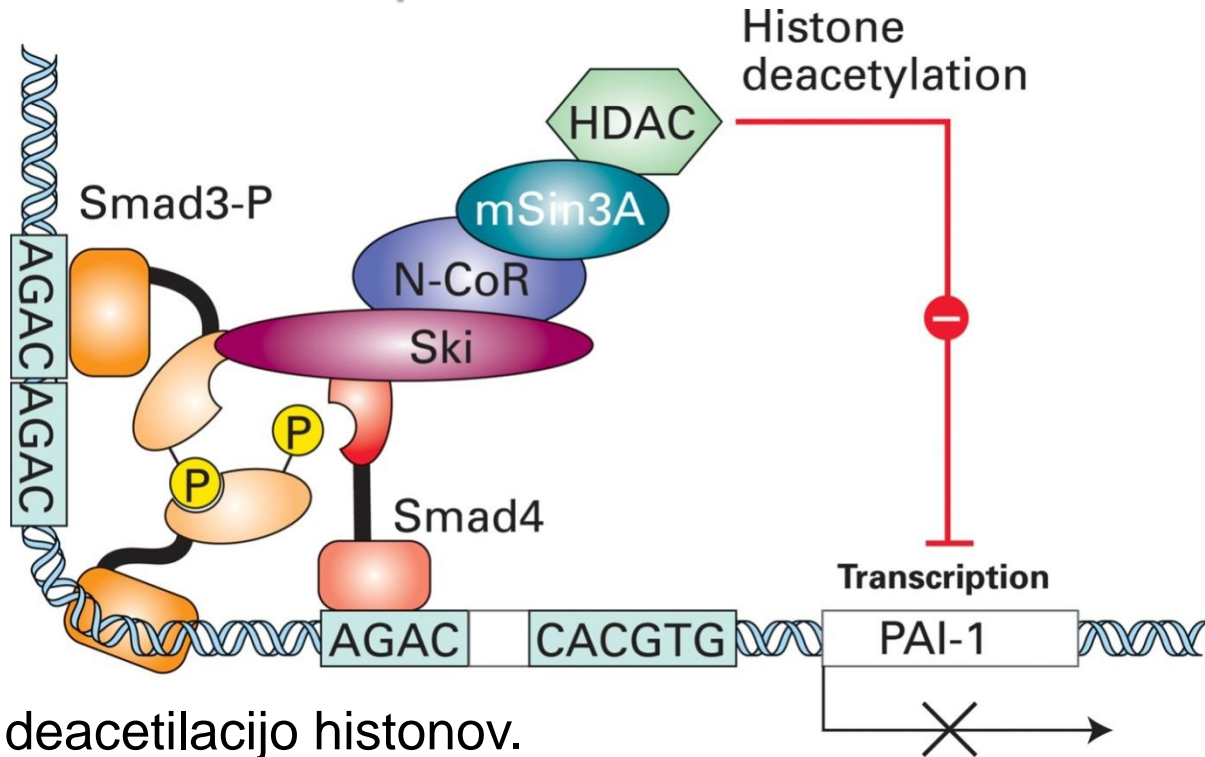
- Smad vežejo različne TF v različnih celicah – drugačen celični odgovor
- Primer: v epitelijskih celicah in fibroblastih TGF- $\beta$  inducirajo izražanje proteinov zunajceličnega matriksa (fibronektin, kolagene) in proteine, ki inhibirajo serinske proteaze (cepijo zgornje proteine). S tem se stabilizira matriks, posledično tkivo. Inhibitor serinskih proteaz je PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1).
- Preprečijo proliferacijo celic
- Brez TGF- $\beta$  pride do zgodnjega razvoja rakov (mutacije). Pankreatični raki imajo delecijo v genu za Smad4.
- Zdravljenje z rekombinantnimi proteini TGF- $\beta$ .



# Negativna regulacija TGF- $\beta$ signalizacije

- Inhibicija transkripcije, ki jo povzročijo Smad proteini
- S Smad7 (i Smad)
- S Ski in SnoN proteinoma

# Zmanjšanje signalizacije preko Smad TF s Ski ali SnoN proteinoma



- Inducirata deacetilacijo histonov.
- Izražanje SnoN in Ski vodi v nenormalno proliferacijo celic
- Prekomerno izražena v rakih (melanoma, rak na prsih)
- Znižano izražanje – manjša rast pankretnega tumorja
- Negativna zanka: po TGF- $\beta$  stimulaciji se SnoN in Ski razgradita. Po nekaj urah se poveča izražanje SnoN (Smad2-4 se veže na njegov promotor) – izniči se dolgotrajni efekt prenosa signalov zaradi neprestanega delovanja TGF- $\beta$ .

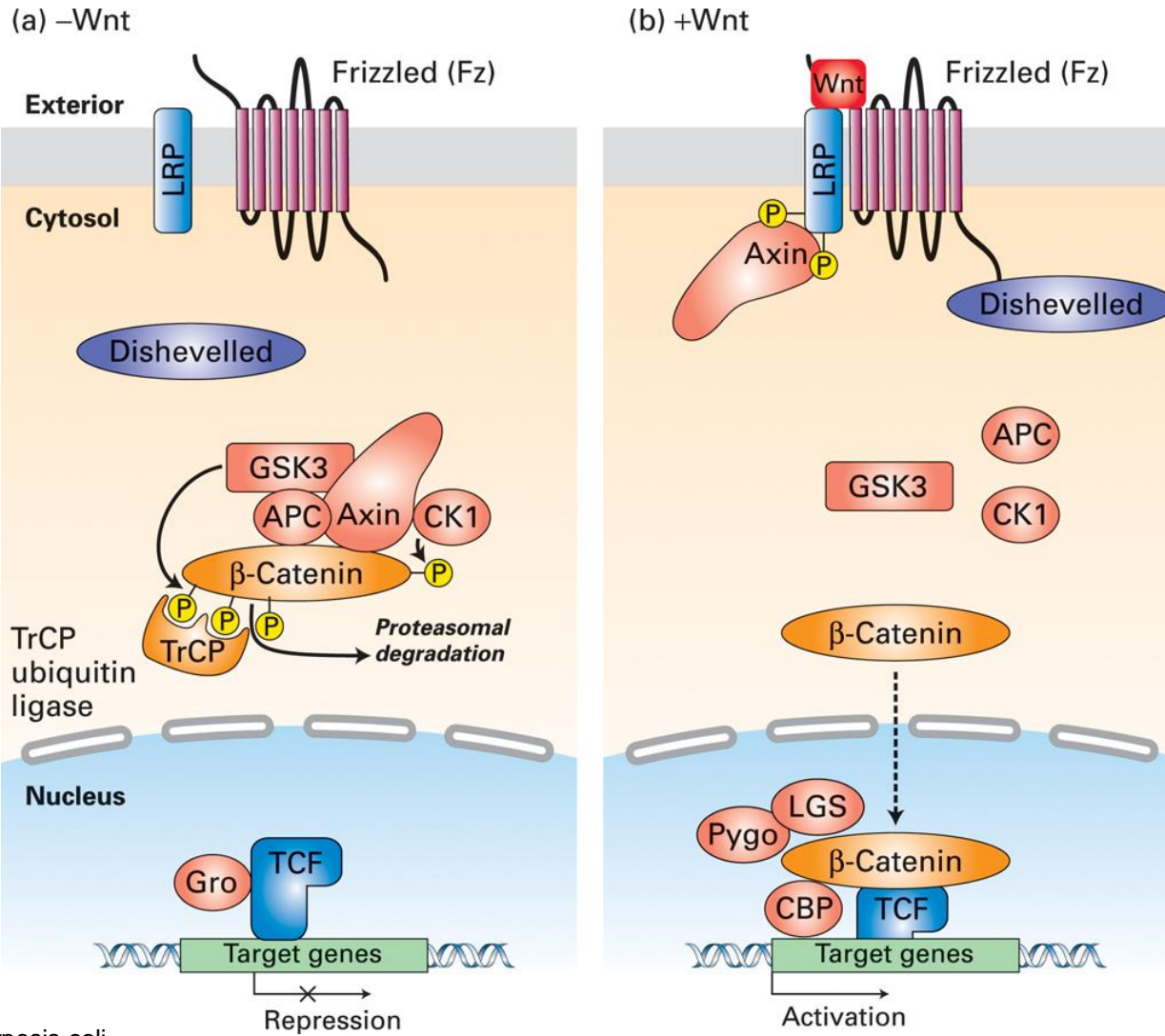
## 4. signalne poti, kontrolirane z ubikvitinacijo

- Večinoma ireverzibilen proces
- Wnt in Hedgehog poti podobni (TF-U, razgradnja TF)
- NF- $\kappa$ B (U-inhibitor TF)

# Wnt signalna pot

- Wnt: wingless (*Drosophila*) + int (integracija retrovirusa pri miškah)
- Wnt1 (miške) je protoonkogen
- Kontrola razvoja (možgani, udi, organogeneza), nastanka osteoblastov, kontrola matičnih celic, proliferacija, preživetje, polarnost, migracija
- Wnt so zunajcelični glikoproteini (19)
- Modifikacija na N-koncu – hidrofoben palmitat – za vezavo na membrano celic (bližnje celice, so lokalno omejeni)
- 2 receptorja Fz (Frizzled - GPCR) in LRP

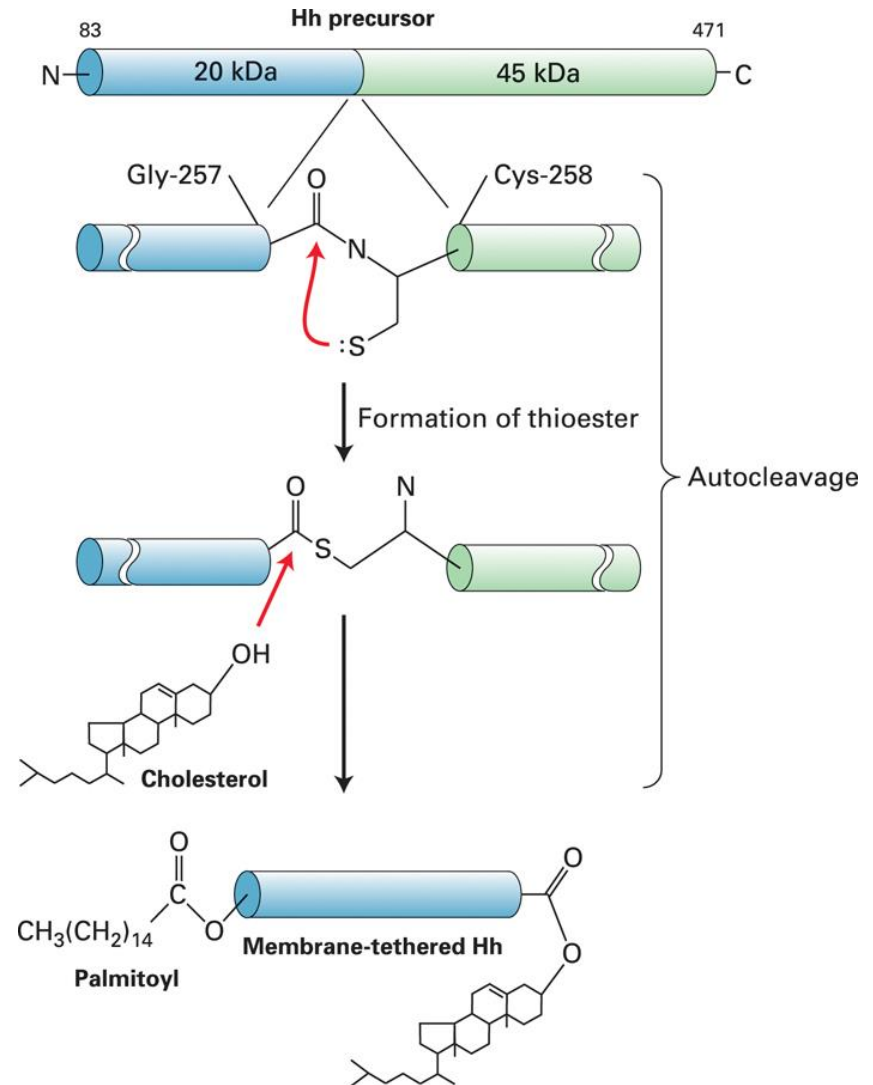
# Wnt signalna pot



APC – adenomatous polyposis coli  
 GSK3 – glycogen synthase kinase 3  
 CK1 – casein kinase 1  
 TCF - transcription factor  
 Gro – Groucho, repressor

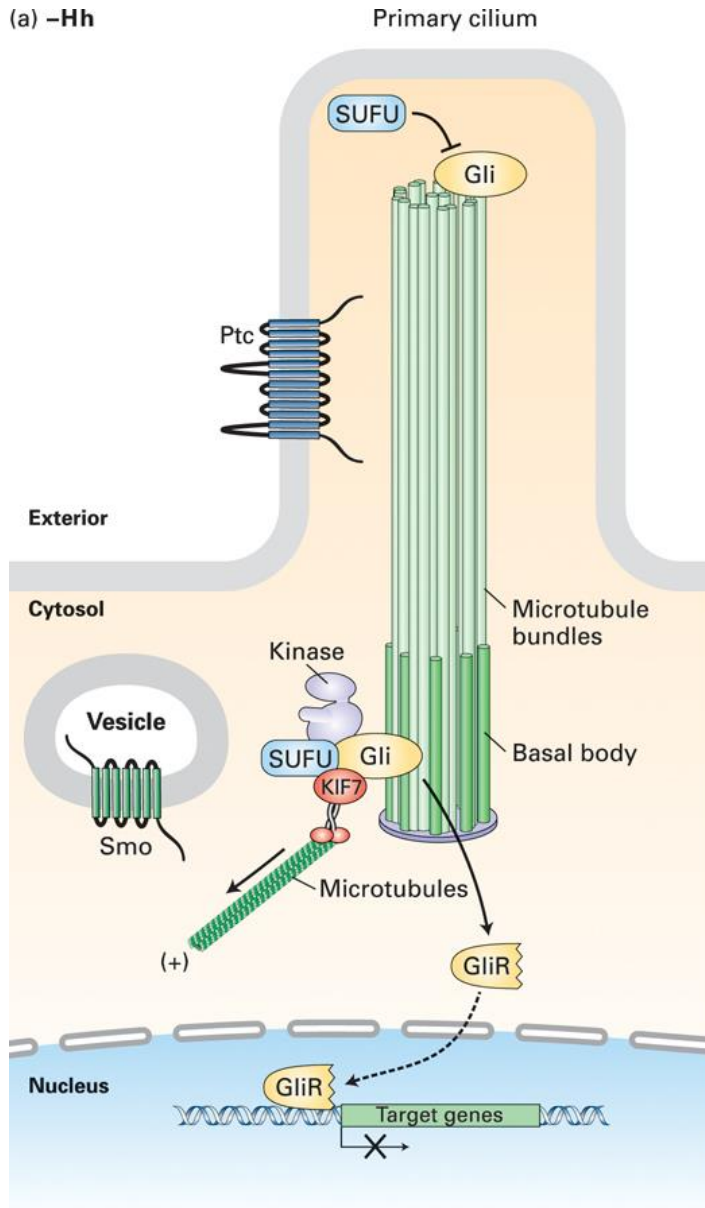
# Hedgehog signalna pot

- Hedgehog je sekretorni protein, avtoproteoliza
- Morfogen: koncentracijsko odvisna usoda celic
- Potuje do 20 celic daleč
- Modifikacije za vezavo na celično membrano
- 3 hh geni (sonic, desert, indian), 2 ptc, 3 Gli TF
- Nepravilna aktivacija Hh signalne poti – raki (tumor v cerebelumu, mišicah)

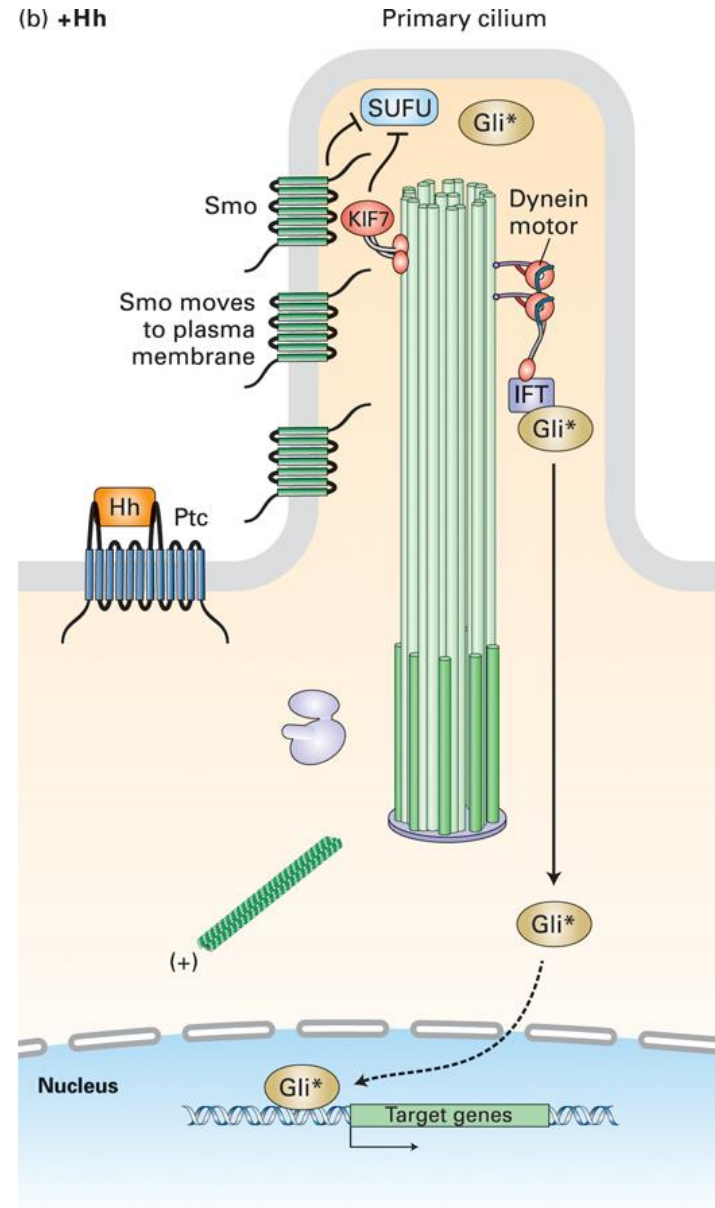


# Hedgehog signalna pot

(a) -Hh



(b) +Hh

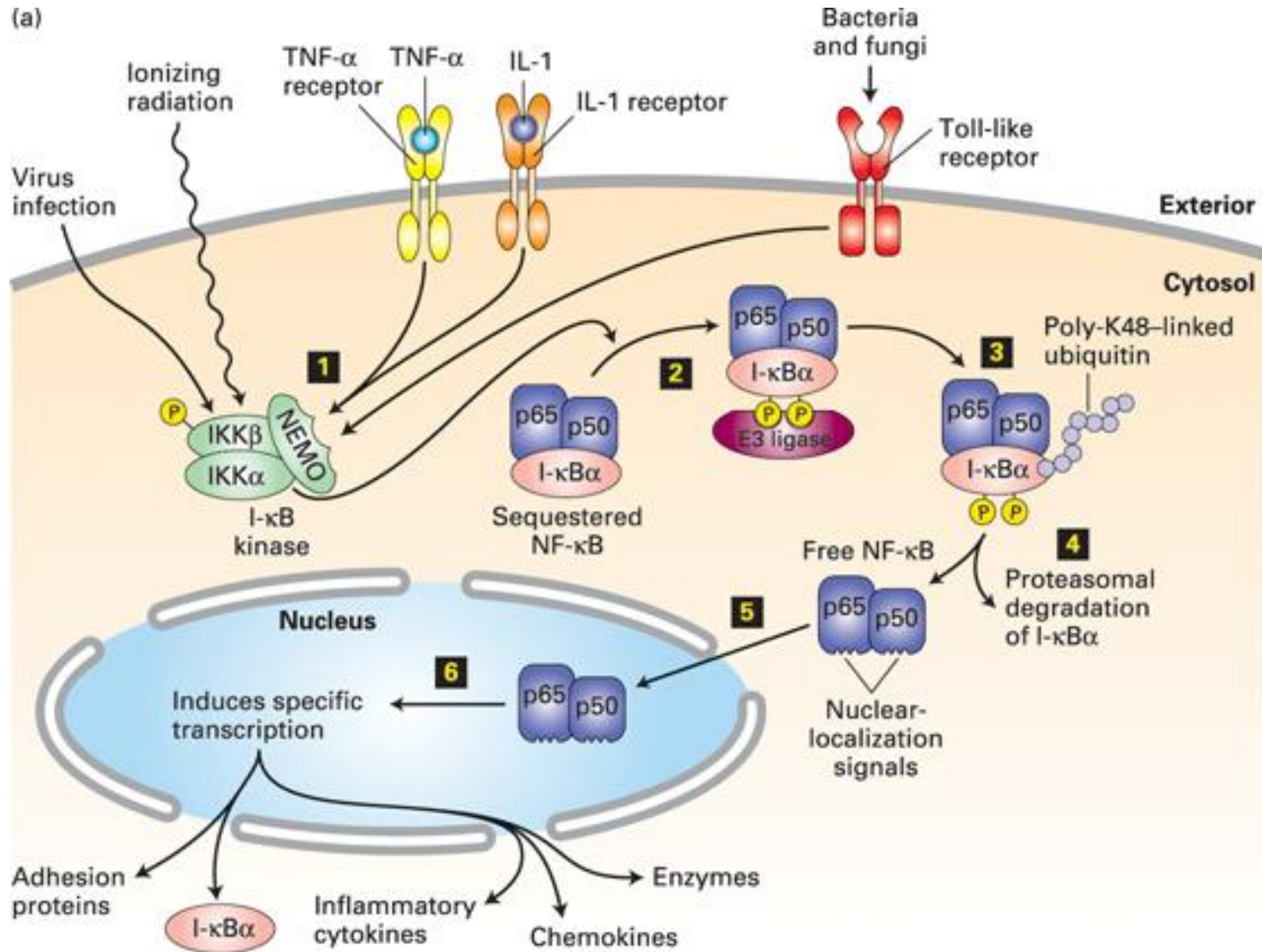


# NF- $\kappa$ B signalna pot

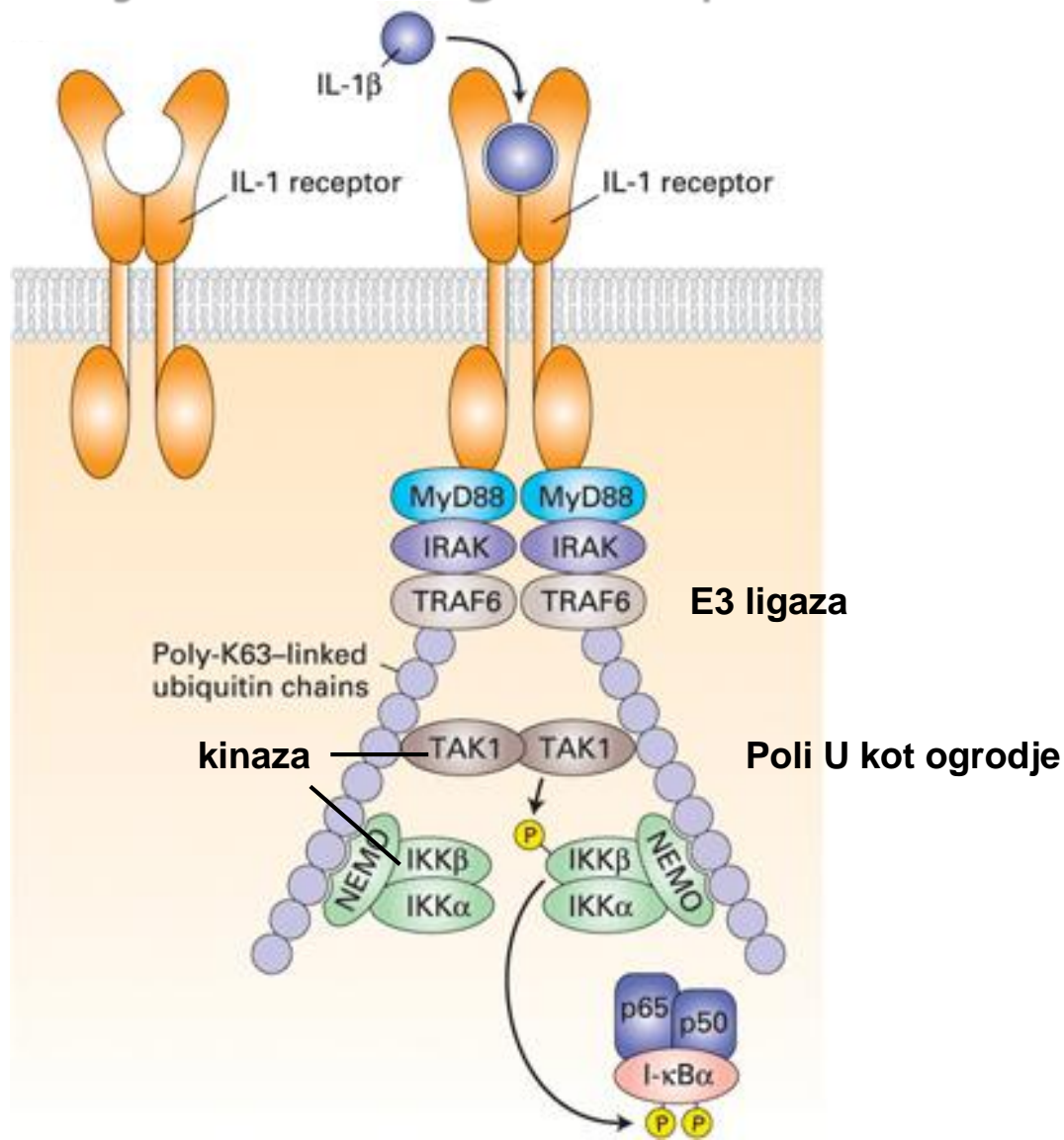
- NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa-light chain enhancer of activated B cells) je inhibiran v citosolu
- Aktivacija – stres, Toll-podobni receptorji, vnetni citokini (TNF $\alpha$ , IL-1)
- Nastane proteinski kompleks blizu celične membrane, kjer se inhibitor NF- $\kappa$ B ubikvitinira in razgradi
- Negativna povratna zveza: aktivacija transkripcije inhibitorja z NF- $\kappa$ B. Inhibitor v jedru veže NF- $\kappa$ B in ga vrne v citoplazmo.



# NF- $\kappa$ B signalna pot



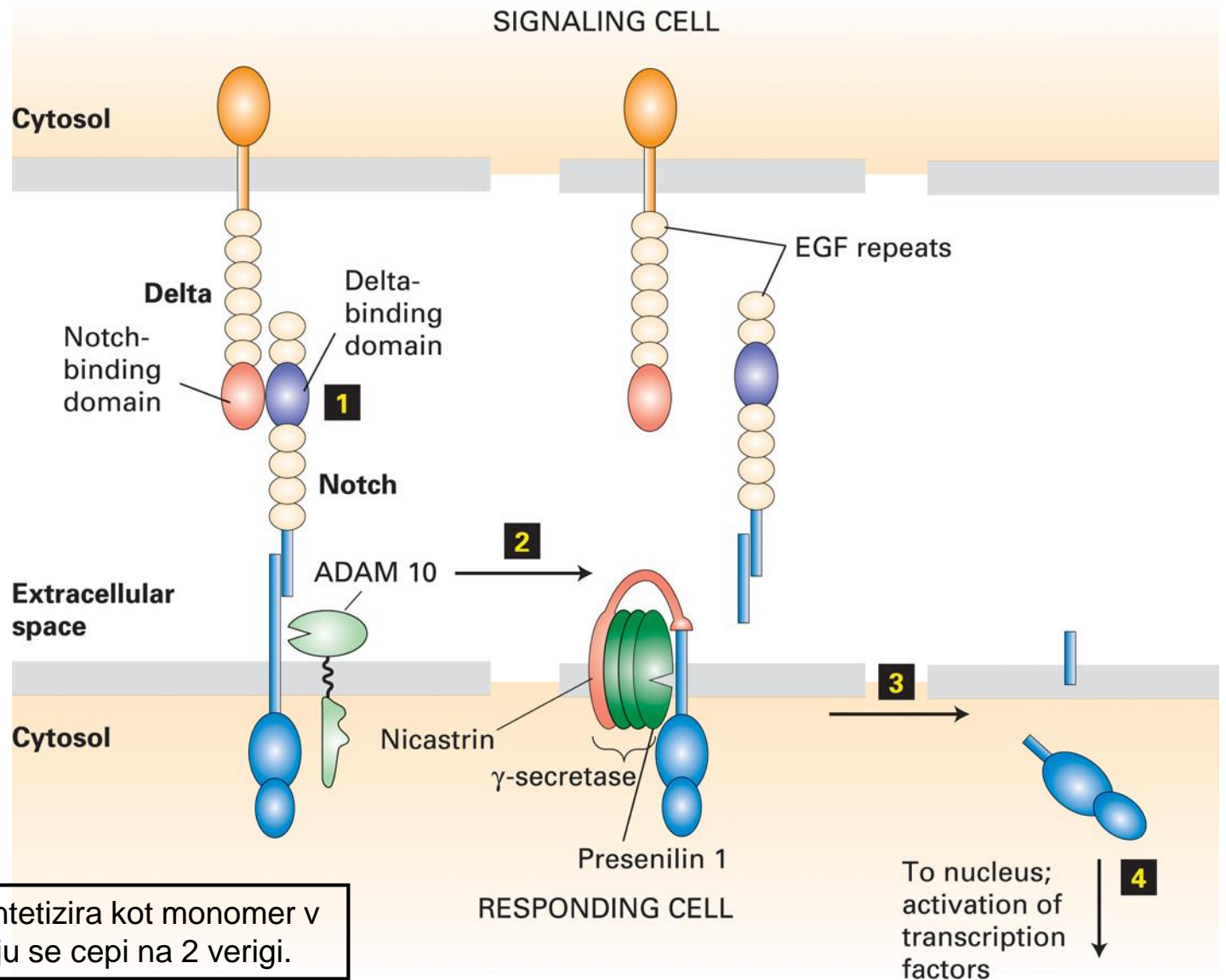
# Aktivacija NF- $\kappa$ B signalne poti z IL-1



## 5. signalne poti, kontrolirane s proteolizo

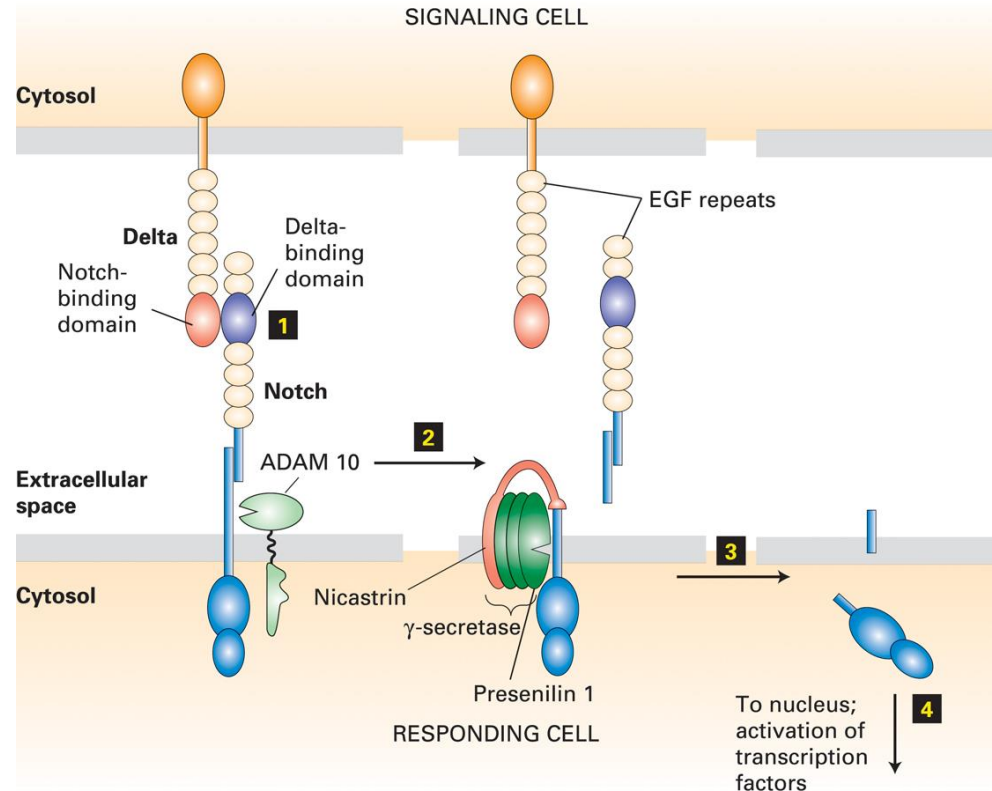
- Receptor se cepi 2x:
  1. metaloproteaze v matriksu cepijo zunajcelični del receptorja
  2. druge proteaze cepijo v celični membrani
- Citosolna domena se sprostí in deluje kot transkripcijski faktor
- Notch/Delta
- Cepitev prekursorjev rastnih faktorjev
- SREBP

# Notch/Delta signalna pot



Notch se sintetizira kot monomer v ER, v Golgiju se cepi na 2 verigi.

# Notch/Delta signalna pot



## Lateralna inhibicija

- Različna diferenciacija sosednjih celic
- Med enakovrednimi celicami ena celica določi, da imajo sosednje drugačno usodo (Notch stimulira izražanje Notcha).
- Različna usoda celic pri razvoju

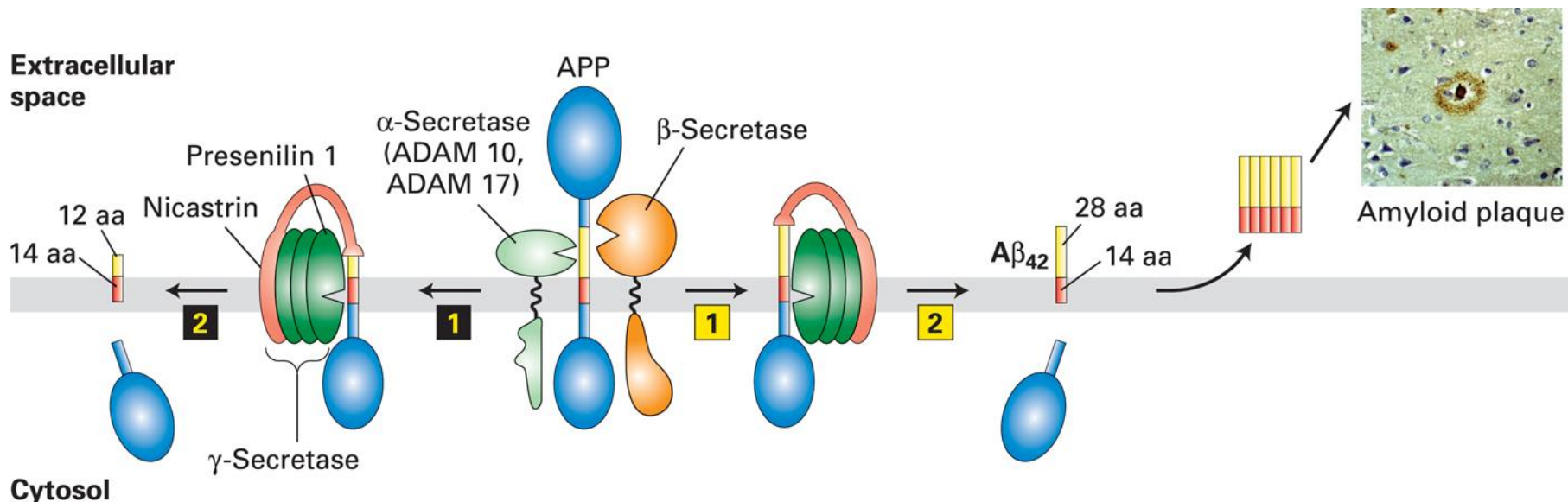
# Cepitev signalnih molekul z matriks-metaloproteazami

- Podobna cepitev kot pri Notch
- 19 metaloproteaz iz družine ADAM
- Rastni faktorji se sintetizirajo kot transmembranske molekule
- Matriks-metaloproteaze cepijo prekursor, sprosti se topna molekula rastnega faktorja.
- Odcepljeni protein je signalna molekula.
- Nepravilnosti vodijo v nenormalno celično proliferacijo.
- Cepitev prekursorjev EGF družine (EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$ , NRG1,2)

# Posledice nepravilnega delovanja ADAM metaloproteaz

- Povečano delovanje ADAM proteinov (opazili pri rakih):
  - Visoka koncentracija EGF zunaj celice (avtokrina, parakrina stimulacija) – nepravilna proliferacija.
  - S proteolizo uničijo zunajcelični matriks, kar vodi v nastanek metastaz.
- ADAM so vpletene v bolezni srca: epinefrin stimulira delovanje  $\beta$ -adrenergičnega receptorja – glikogenoliza in povečano krčenje srčne mišice. Pri daljšem zdravljenju z epinefrinom se aktivira ADAM9, cepi HB-EGF prekurzor, ta se veže na receptor v celicah srčne mišice – nepravilna rast (povečano, a šibko srce).

# Proteolitična cepitev APP z ADAM pri Alzheimerjevi bolezni



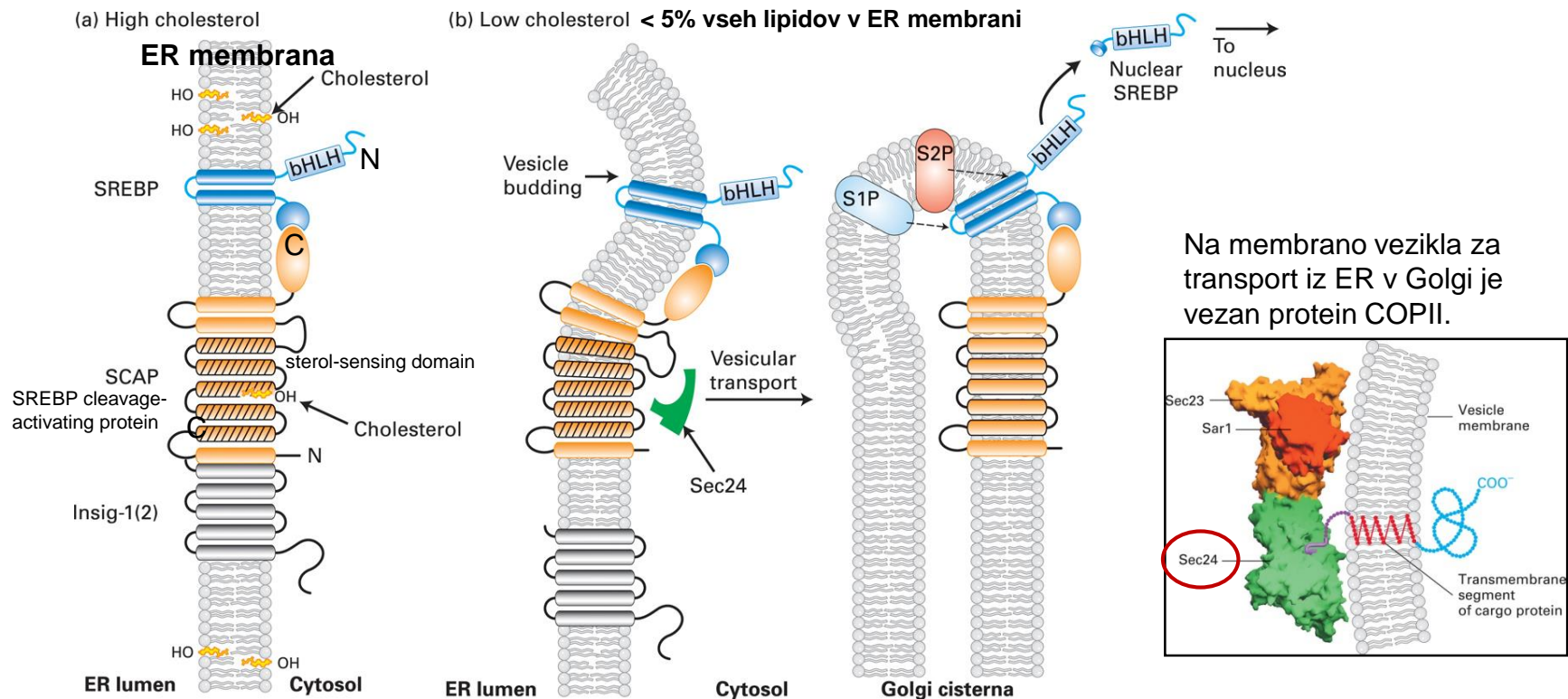
- Kopičenje  $A\beta_{42}$  peptida v plakih – smrt nevronov
- Nepravilna cepitev amiloid-prekursor-proteina (funkcija neznana)
- 1 zunajcelična in 1 membranska cepitev
- Genetske napake v APP na mestih, kjer cepijo sekretaze in v proteazah, kar favorizira nastanek amiloida  $A\beta_{42}$
- Sekretaze niso dobra tarča za zdravila (Notch/Delta)
- GRASP ( $\gamma$  secretase activating protein) poveča količino amiloida  $A\beta_{42}$ , ker interagira z  $\beta\beta$ , inhibitor tega proteina potencialno, dovolj specifično zdravilo.



# Proteoliza intramembranskega proteina SREBP

- Kontrola količine membranskih lipidov (pravo razmerje med fosfolipidi in holesterolom) poteka z regulacijo sinteze holesterola in njegovega vnosa v celico.
- Sinteza holesterola (iz manjših prekurzorjev s HMG-CoA reduktazo) in LDL receptorja (vnos v celico) je znižana, če je dovolj holesterola v celici (regulacija transkripcije).
- SREBP (SRE binding protein) je TF, odvisen od holesterola
- Znotraj celice
- Geni, katerih izražanje je regulirano s steroli imajo mesto SRE (sterol regulatory element, 10 bp).

# Aktivacija SREBP s holesterolom



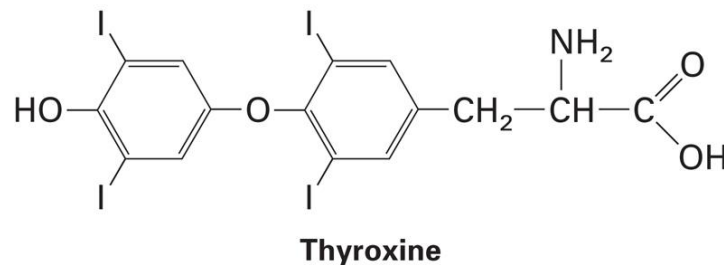
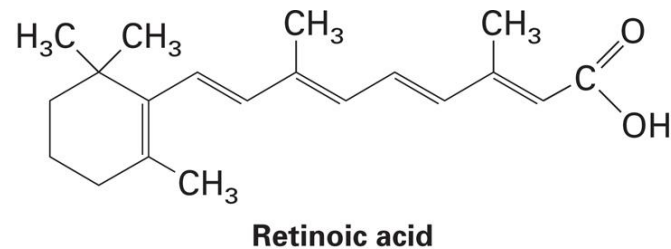
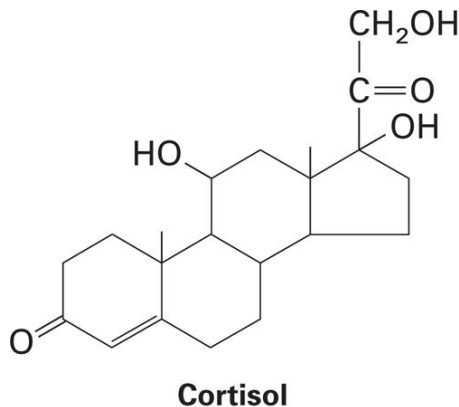
- Ko je sterol-sensing domain v SCAP vezan na holesterol, je protein vezan tudi na insig-1(2).
- Vezan insig-1(2) prepreči vezavo na Sec24 (protein na COPII veziklu, ki potujejo v Golgi) – ko je holesterola v ER membrani več kot 5% vseh membranskih lipidov.
- Če insig ni vezan na SCAP, se nanj veže Sec24, SCAP-SREBP kompleks gre v Golgi.
- V Golgiju se SREBP cepi z S1P in S2P.
- nSREBP gre v jedro, veže se na SRE in sproži transkripcijo (npr. genov za LDL receptor, HMG-CoA reduktazo). nSREBP se hitro razgradi, a hitro nastane – hiter celični odgovor.

# Regulacija lipidov v celici

- Koordinirana regulacija: vseh lipidov (rast membran)
- Diferencialna regulacija: potreba po nekaterih lipidih (npr. holesterolu za sintezo steroidnih hormonov)
- Diferencialna regulacija s 3 SREBP
- SREBP1a in 1c (alternativni splicing) imata večji vpliv na metabolizem maščobnih kislin kot na holesterol
- SREBP2 ima večji vpliv na metabolizem holesterola
  
- Ateroskleroza – preveč LDL v krvi, zato naj bi zmanjšali LDL in povečali HDL
- S statini se inhibira HMG-CoA reduktaza (količina holesterola v jetrih). Odgovor je aktivacija SREBP in s tem izražanje HMG-CoA reduktaze ter LDL receptorja (več receptorjev v jetrih-zmanjša se količina LDL v krvi).

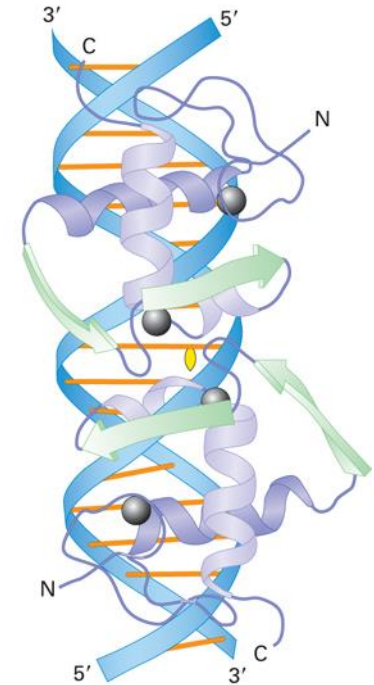
## 6. regulacija transkripcije z malimi hormoni

- Extracelularna signalizacija
- Signalne molekule so mali hidrofobni hormoni
- Hormoni so topni v lipidih.
- Difundirajo skozi celično in jedrno membrano.
- Vežejo se na proteine iz naddružine jedrnih receptorjev.
- Primeri: Steroidni hormoni, retinoidi, tiroidni hormoni

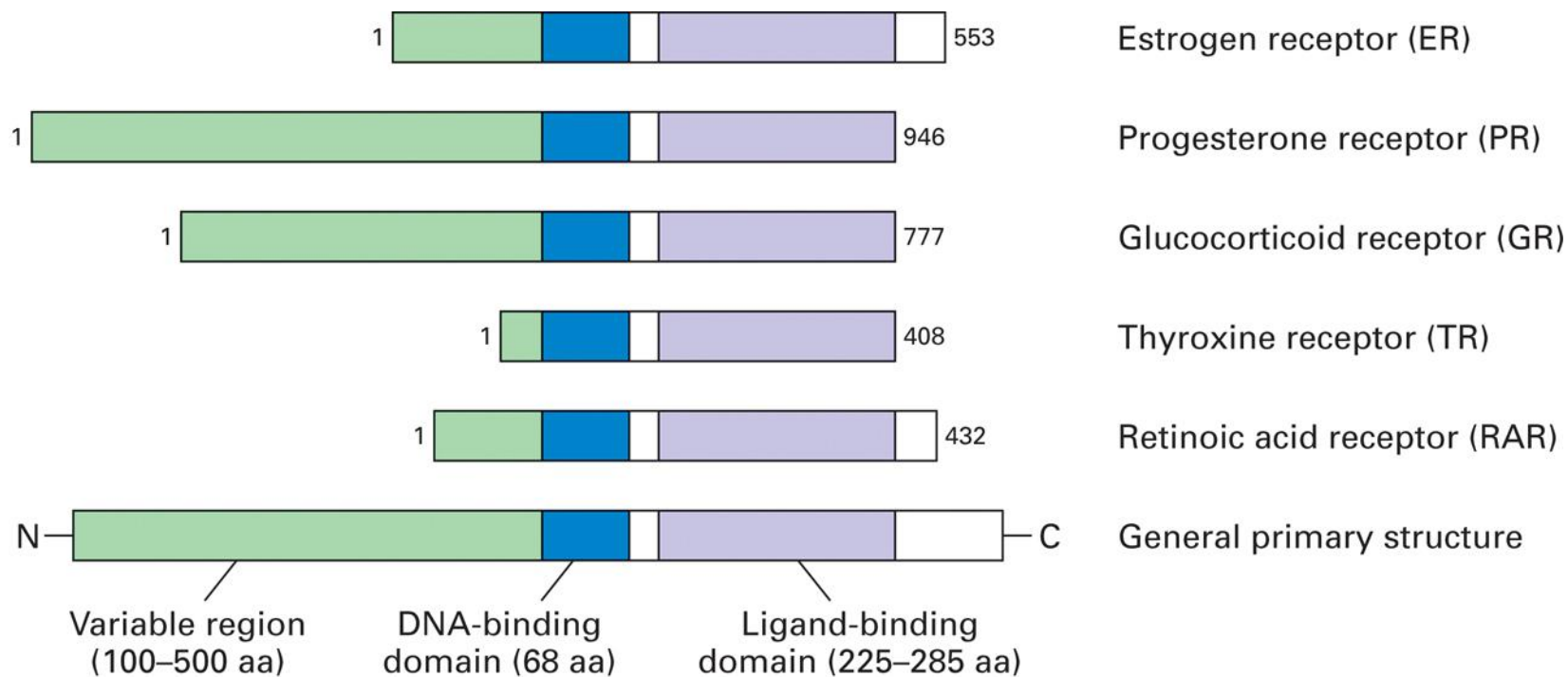


# Jedrni receptorji

- So transkripcijski faktorji, regulirani z lipidotopnimi hormoni, ki jih dobimo z dieto in preko okolja.
- > 50 človeških transkripcijskih faktorjev
- S Cys4 cinkovim prstom se vežejo na DNA.
- Homodimer ali heterodimer
- Vežejo se na DNA ponovitve.



# Ohranjena struktura domen transkripcijskih faktorjev iz naddružine jedrnih receptorjev



**Amino acid identity: 0**

Ena ali več aktivacijskih domen

**42–94%**

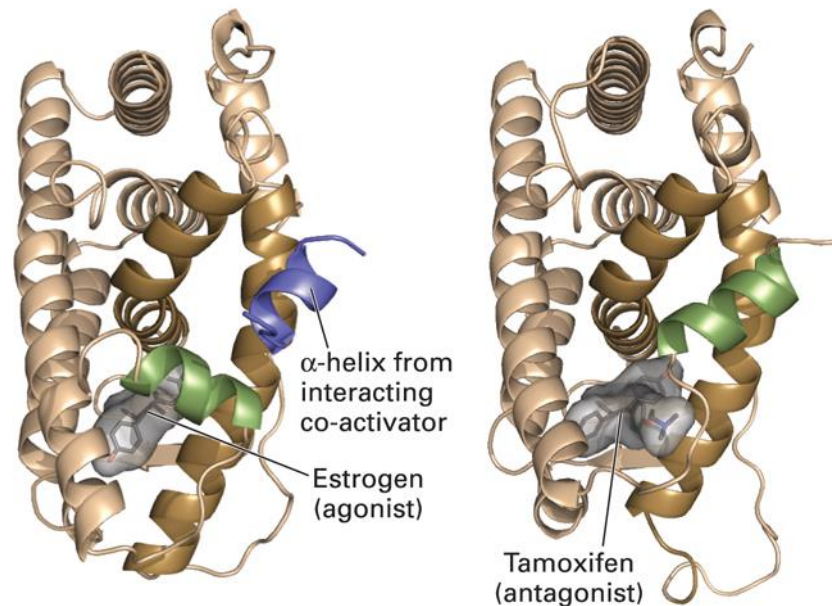
Cinkov prst

**15–57%**

Od hormona odvisna aktivacijska domena

# C-terminalni del receptorja: hormon-vezavna domena

- Receptor estrogena
- Z zelenim heliksom nastane hidrofobni žep za hormon
- Pri vezavi antagonista se zeleni heliks pomakne v mesto za koaktivator - represija



# Odzivni elementi jedrnih receptorjev

Glukokortikoid

(a) **GRE**

5' AGAACA(N)<sub>3</sub>TGTTCT 3'  
3' TCTTGT(N)<sub>3</sub>ACAAGA 5'

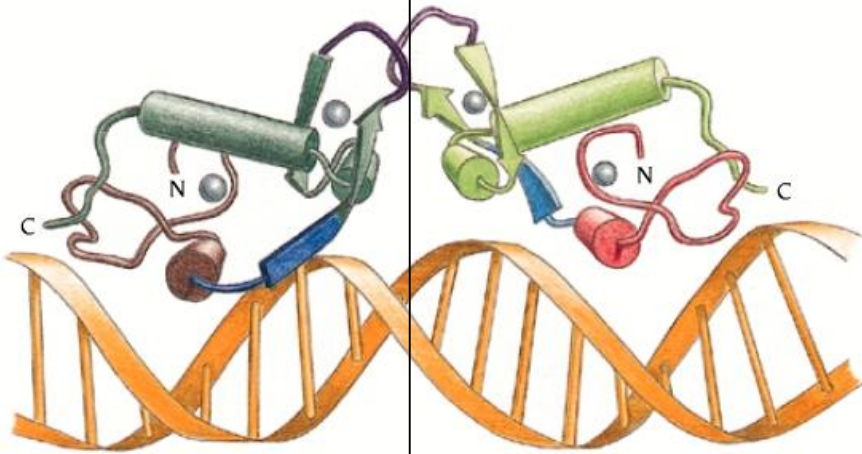
obratne ponovitve

Estrogen

(b) **ERE**

5' AGGTCA(N)<sub>3</sub>TGACCT 3'  
3' TCCAGT(N)<sub>3</sub>ACTGGA 5'

receptor je homodimer

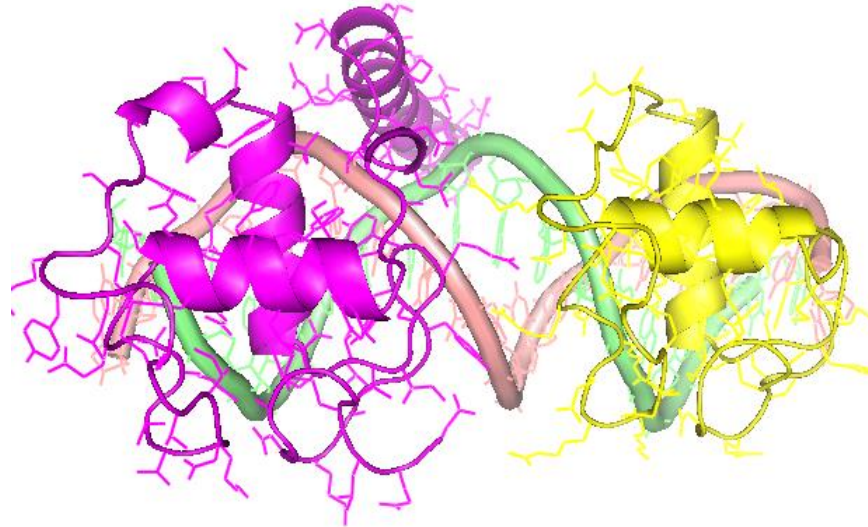


© 1999 GARLAND PUBLISHING INC.  
A member of the Taylor & Francis Group



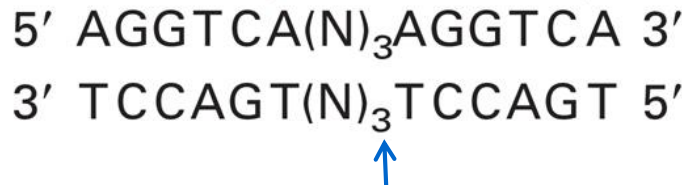


# Odzivni elementi jedrnih receptorjev



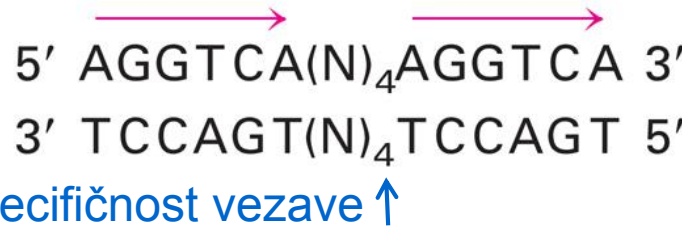
Vitamin D3

(c) **VDRE**



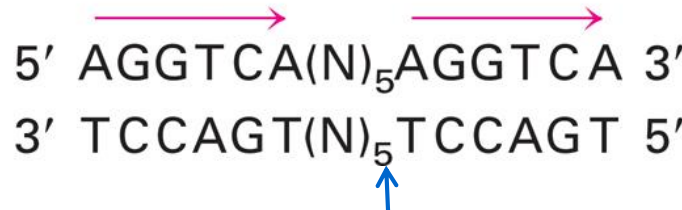
Tiroidni hormon

(d) **TRE**



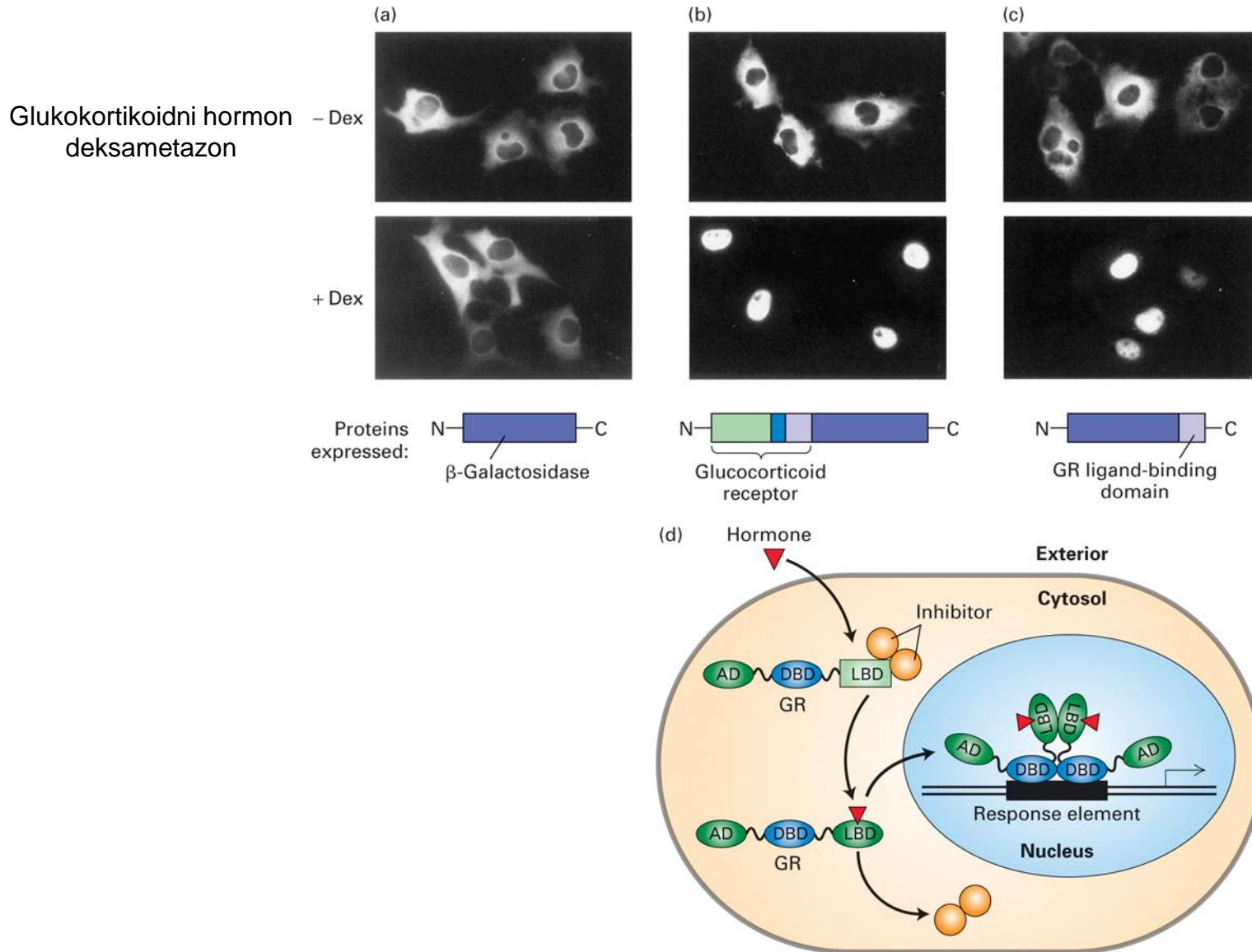
Retinojska kisl

(e) **RARE**

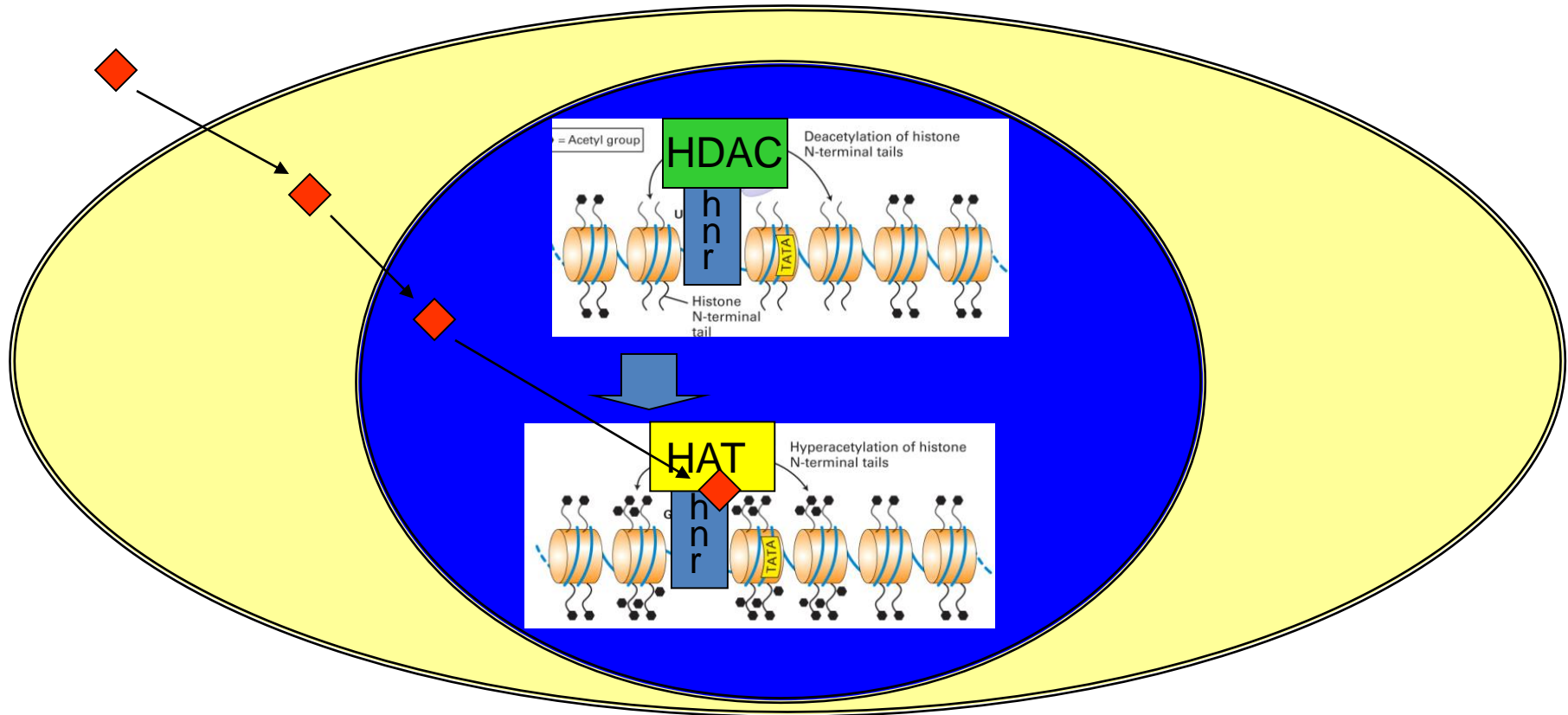


receptor je heterodimer

# Vezava liganda na homodimerni jedrni receptor povzroči prenos kompleksa v jedro



# Hormon se na heterodimerni jedrni receptor veže v jedru



- Brez hormona se heterodimerni receptor veže na DNA odzivni element SRE. Na receptor se veže tudi HDAC (histone deacetylases). Transkripcija je blokirana.
- Ko v jedro difundira hormon, se HDAC sprostí, veže pa se histon-acetilaza. Transkripcija je aktivirana.

## 7. regulacija transkripcije med elongacijo

### Hsp

- Ustvljena elongacija Pol II 200bp od transkripcijskega začetka
- Aktivacija HSTF s toplotnim šokom, elongacija s Pol II se nadaljuje – hiter odgovor

### Myc

- kontrola elongacije s Pol II
- Regulacija celične rasti in delitve
- Povečano izražanje v rakah
- Glavni TF pri reprogramiranju somatski celic v pluripotenentne matične celice

## 8. regulacija transkripcije s $\text{Ca}^{2+}$ ioni

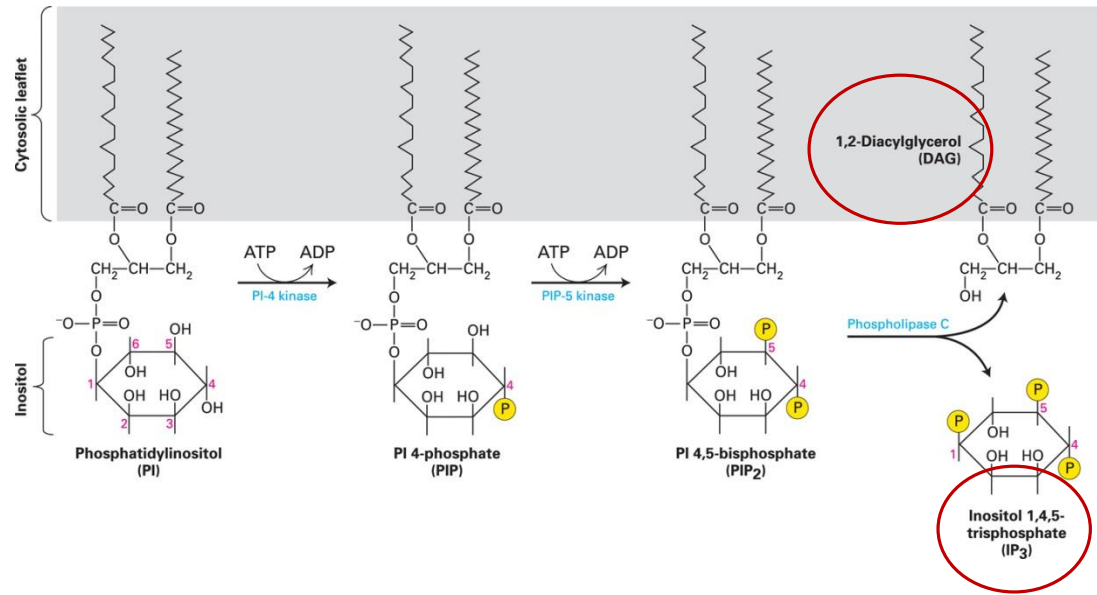
- GPCR in receptorji s tirozin kinazo (RTK in receptorji citokinov)

Tissue	Hormone Inducing Rise in $\text{Ca}^{2+}$	Cellular Response
Pancreas (acinar cells)	Acetylcholine	Secretion of digestive enzymes, such as amylase and trypsinogen
Parotid (salivary) gland	Acetylcholine	Secretion of amylase
Vascular or stomach smooth muscle	Acetylcholine	Contraction
Liver	Vasopressin	Conversion of glycogen to glucose
Blood platelets	Thrombin	Aggregation, shape change, secretion of hormones
Mast cells	Antigen	Histamine secretion
Fibroblasts	Peptide growth factors	DNA synthesis, cell division (e.g., bombesin and PDGF)

\*Hormone stimulation leads to production of inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ), a second messenger that promotes release of  $\text{Ca}^{2+}$  stored in the endoplasmic reticulum.

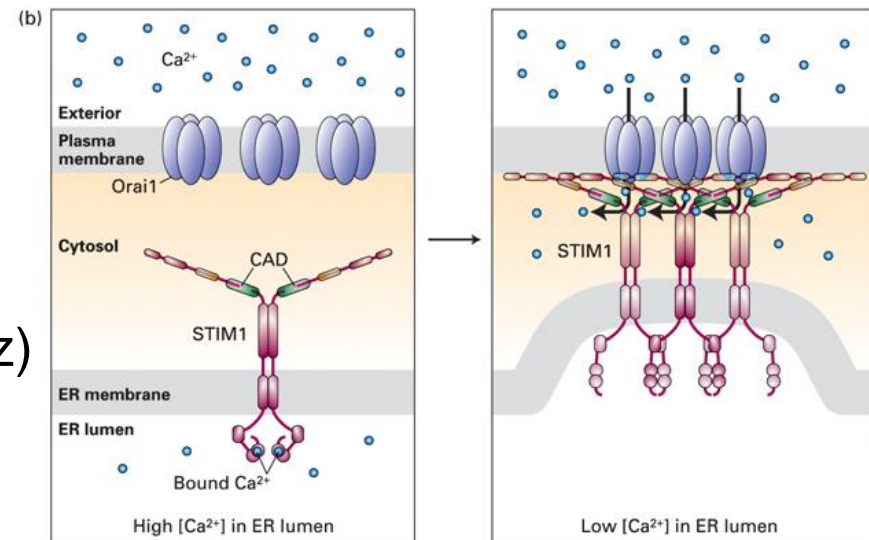
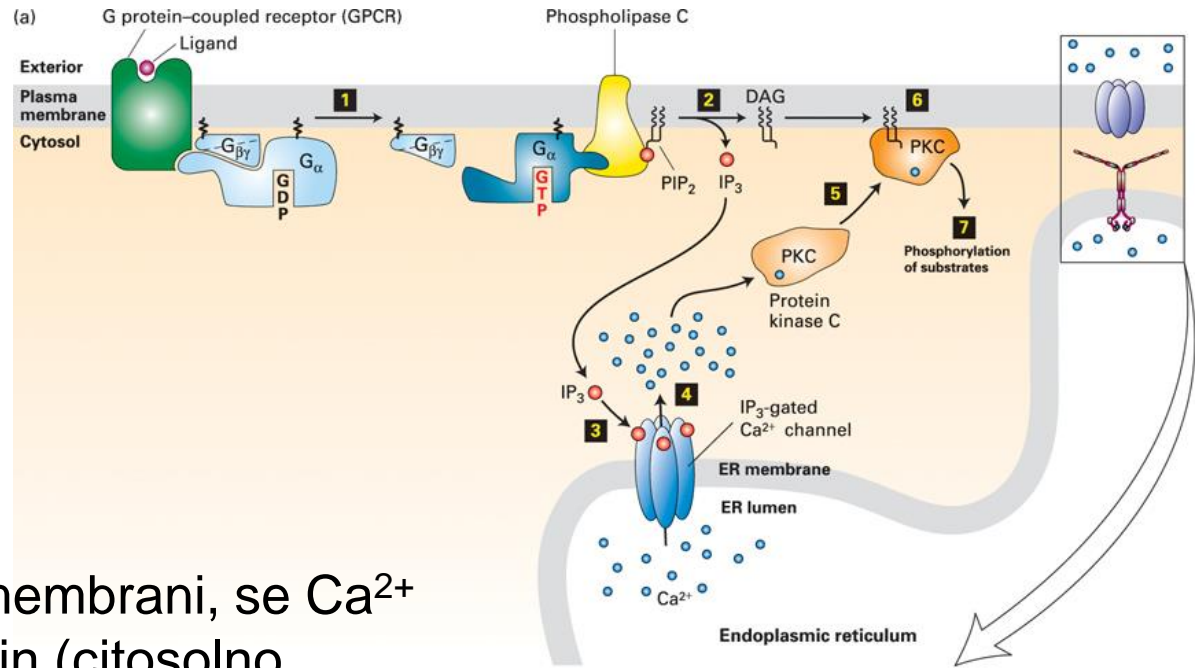
SOURCE: M. J. Berridge, 1987, *Ann. Rev. Biochem.* 56:159, and M. J. Berridge and R. F. Irvine, 1984, *Nature* 312:315.

# Regulacija transkripcije s $\text{Ca}^{2+}$ ioni



- PLC katalizira nastanek 2 sekundarnih prenašalcev DAG in  $\text{IP}_3$
- $\text{IP}_3$  je odgovoren za kratkotrajno sproščanje  $\text{Ca}^{2+}$  ionov iz lumna ER (ni povečanja ionov zunaj celice)
- $\text{Ca}^{2+}$  ioni pomagajo pri aktivaciji PKC z DAG.
- PKC vplivajo na celično rast in metabolizem: npr. na metabolizem glikogena v jetrih. **Regulirajo transkripcijo s fosforilacijo TF.**

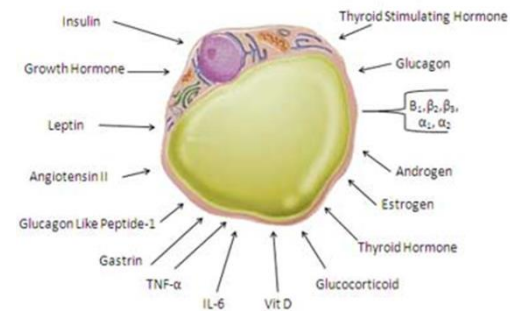
# Aktivacija PLC s citosolnim $\text{Ca}^{2+}$ ioni



- Poleg prenosa PKC k membrani, se  $\text{Ca}^{2+}$  ioni vežejo na kalmodulin (citosolno stikalo) kooperativno.
  - Vloga  $\text{Ca}^{2+}$  - kalmodulin kompleksa:
    - krčenje mišic z aktivacijo miozina
    - degradacija cAMP – fina regulacija
    - **aktivacija TF** (aktivacija kinaz in fosfataz)
- Sproščanje gladkih mišic v žilah (NO)  
Regulacija glikogenolize

# Regulacija diferenciacije adipocitov z interakcijo različnih signalnih poti

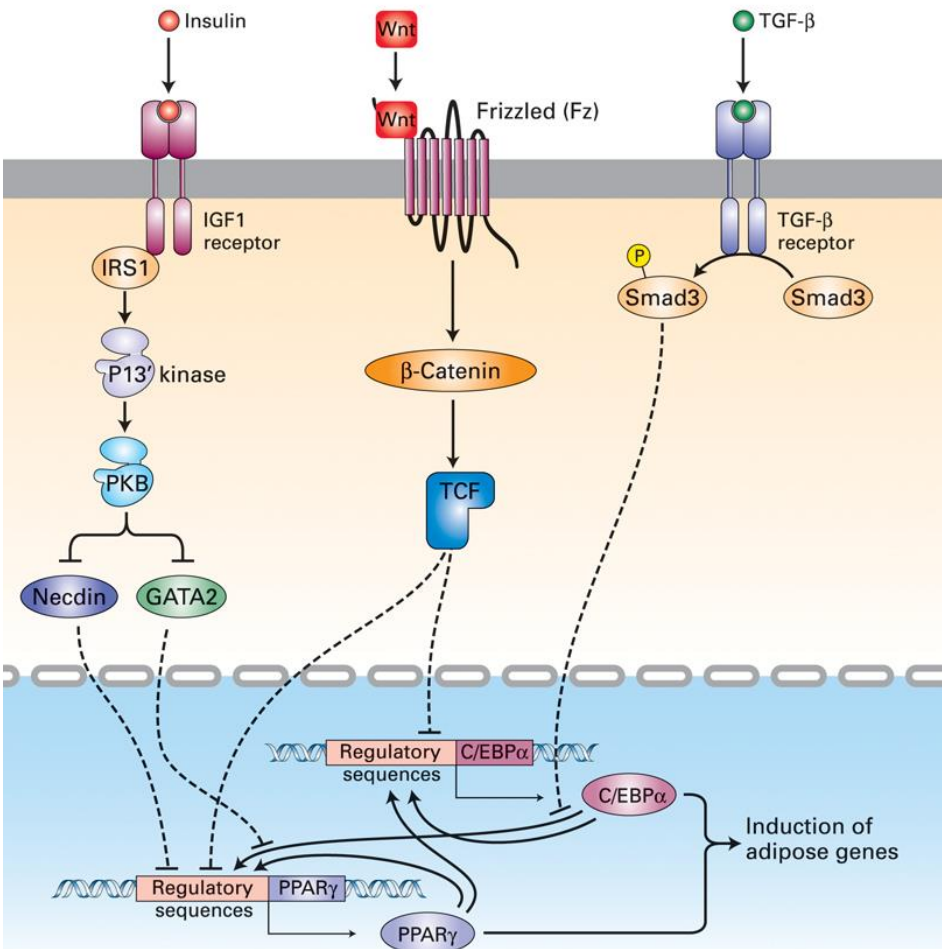
RECEPTORS FOUND ON ADIPOCYTE



(a) Promotes induction of adipose genes

(b) Inhibits induction of adipose genes

(c) Inhibits induction of adipose genes



PPAR - peroxisome proliferator-activated receptors

- Beli adipociti za skladiščenje maščob v trigliceridnih globulah
- So endokrine celice
- Iz mezenhimalnih matičnih celic lahko nastanejo adipociti, osteoblasti in celice, ki proizvajajo hrustanec
- TF  $PPAR\gamma$  je glavni transkripcijski regulator za diferenciacijo adipocitov (jedrni receptor)
- Aktivni  $PPAR\gamma$  verjetno potrebuje vezan ligand (oksidiran derivat maščobne kisline).
- Tudi TF  $C/EBP\alpha$  se inducira med diferenciacijo adipocitov.
- Skupaj inducirata izražanje vseh proteinov, potrebnih za nastanek maščobnih celic
- Inzulini + , Wnt - , TGF- $\beta$  -