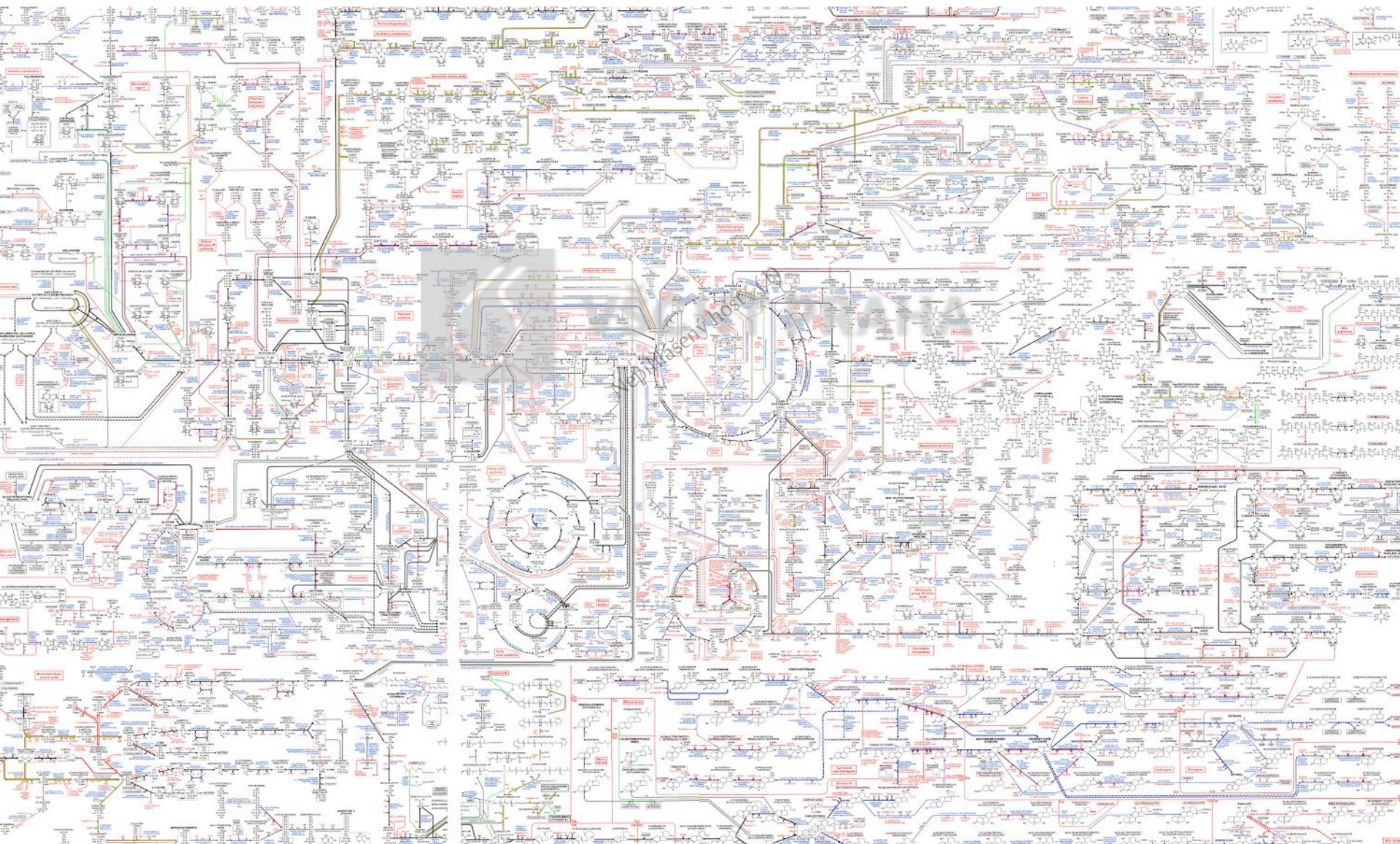


REGULACE ENZYMOVÉ AKTIVITY



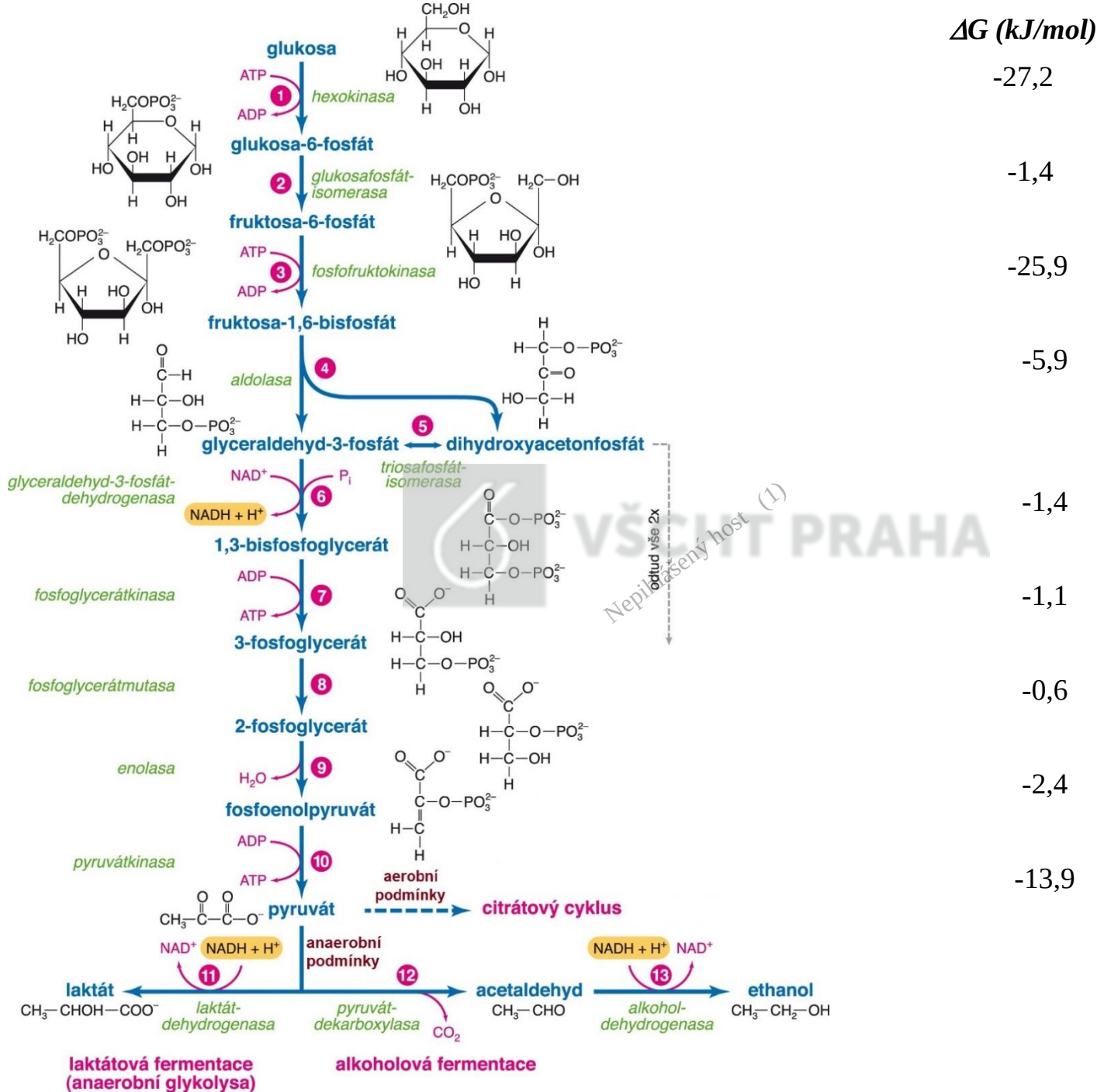
Proč je nutno regulovat enzymovou aktivitu? (*homeostasa*)

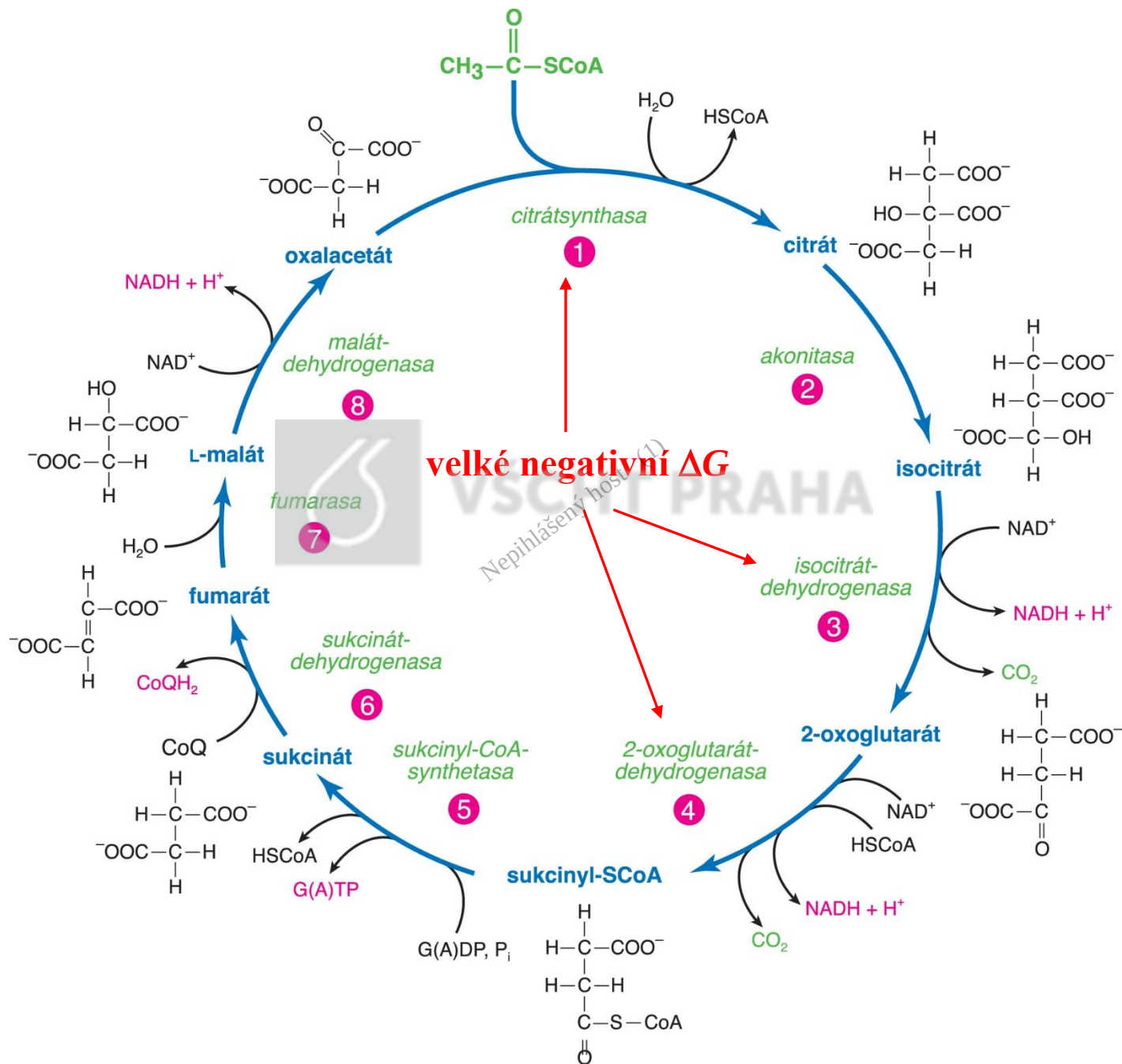
Řada úrovní:

- A. regulace množství přítomného enzymu (exprese=proteosynthesa, odbourávání)
- B. synthesa (výběr) vhodného enzymu (isoenzymy)
- C. kompartmentace (membrány, u eukaryot organely)
- D. prostorová organizace „následných“ enzymů
- E. nevratná aktivace (limitovaná proteolýsa)
- F. vratná kovalentní modifikace
- G. vratná nekovalentní modifikace aktivity (efektory),
inhibice zpětnou vazbou (regulace koncovými produkty metabolických drah)
- H. rychlost reakce v závislosti na koncentraci substrátu

Které enzymy regulovat:

- začátky (klíčové body) metabolických drah (citrátsynthesa, fosfofruktokinasa)
- reakce s velkým energetickým spádem ($\Delta G \ll 0$)





A) Regulace množství přítomného enzymu

konstitutivní, indukovatelné a reprimovatelné enzymy

a) Regulace na úrovni transkripce (a translace)

- podle momentálních metabolických potřeb (adaptabilita metabolismu)
- podle tkáňové specializace v mnohobuněčných organismech (diferenciace buněk)

Co to je „exprese genu“???

Možnosti regulace:

u prokaryot:

operon: koordinovaná jednotka
transkripce

regulační oblast s promotorem
+ strukturní geny

(jednotná regulace,
polycistronní geny)

Příklady: lac-operon - 3 bílkoviny:

β -galaktosidasa (hydrol. laktosy)

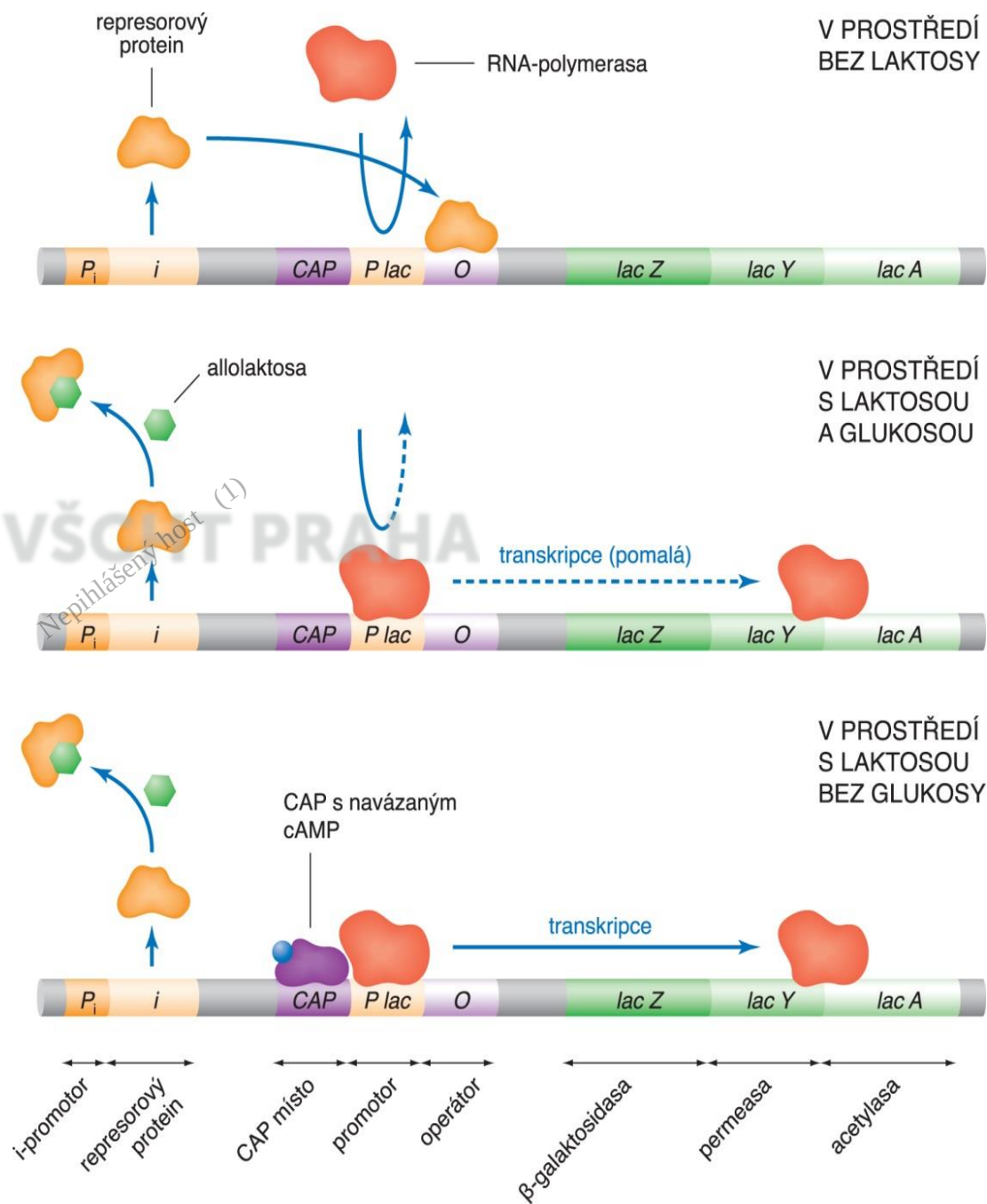
galaktosidpermeasa

(aktivní transport laktosy)

galaktosidacetylasa

(zatím ne zcela jasná
funkce)

CAP = catabolite activator protein



u eukaryot (řada mechanismů regulace exprese genu):

- **hormony pronikající do buňky:**

 - steroidní a thyreoidní hormony - rozpustné receptory

- **kovalentní modifikace :** - methylace DNA a histonů

 - fosforylace transkripčních faktorů

- **různé posttranskripční úpravy mRNA:**

 - alternativní setřih

 - selektivní transport mRNA do cytoplasmy

- **řízení rychlosti degradace mRNA:**

 - microRNA (miRNA)

- **regulace na úrovni translace: inhibice iniciačních a elongačních faktorů**
(interferony, fosforylace v retikulocytech ...)

Interakce regulačních bílkovin s DNA

aneb Jak nalézt určitou sekvenci v dvouřetězcové DNA?

konformace DNA (vlásenky, palindromní sekvence)

interakce vazebných bílkovin se specifickými sekvencemi „zvenku“ (docking)

vazebné motivy v proteinu:

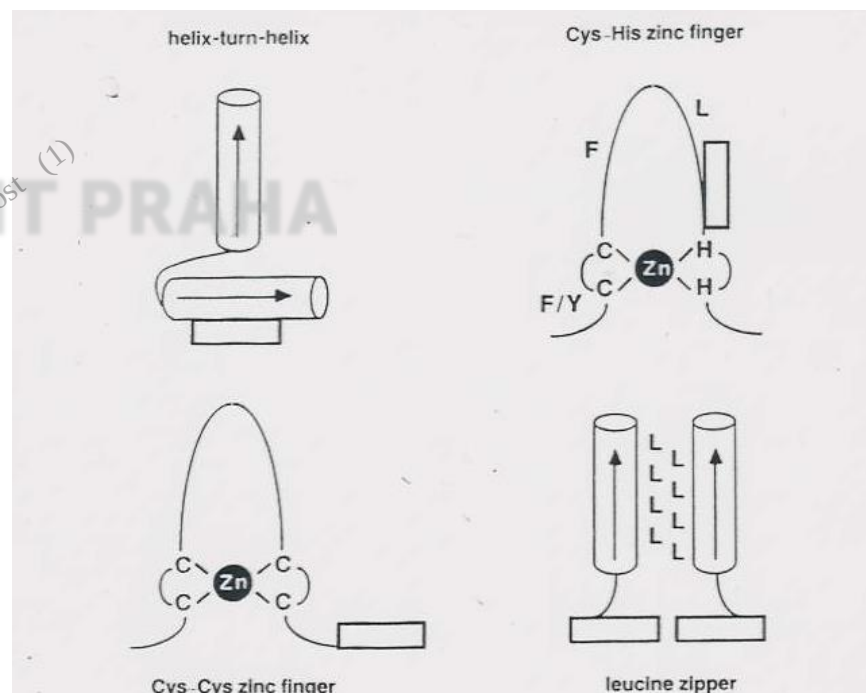
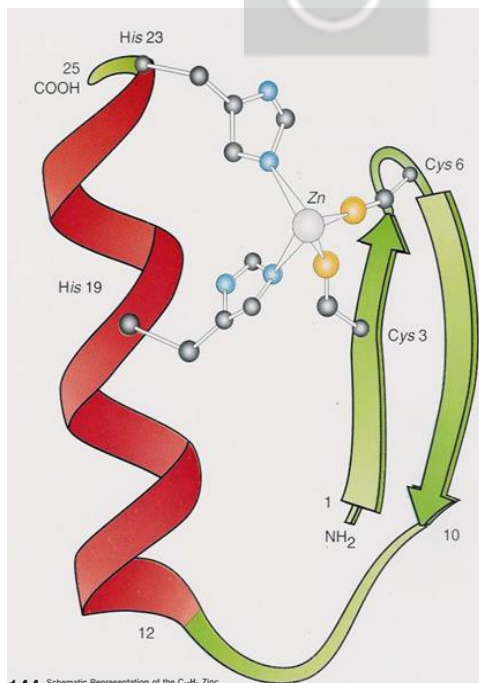
helix - turn - helix

zinkové prsty

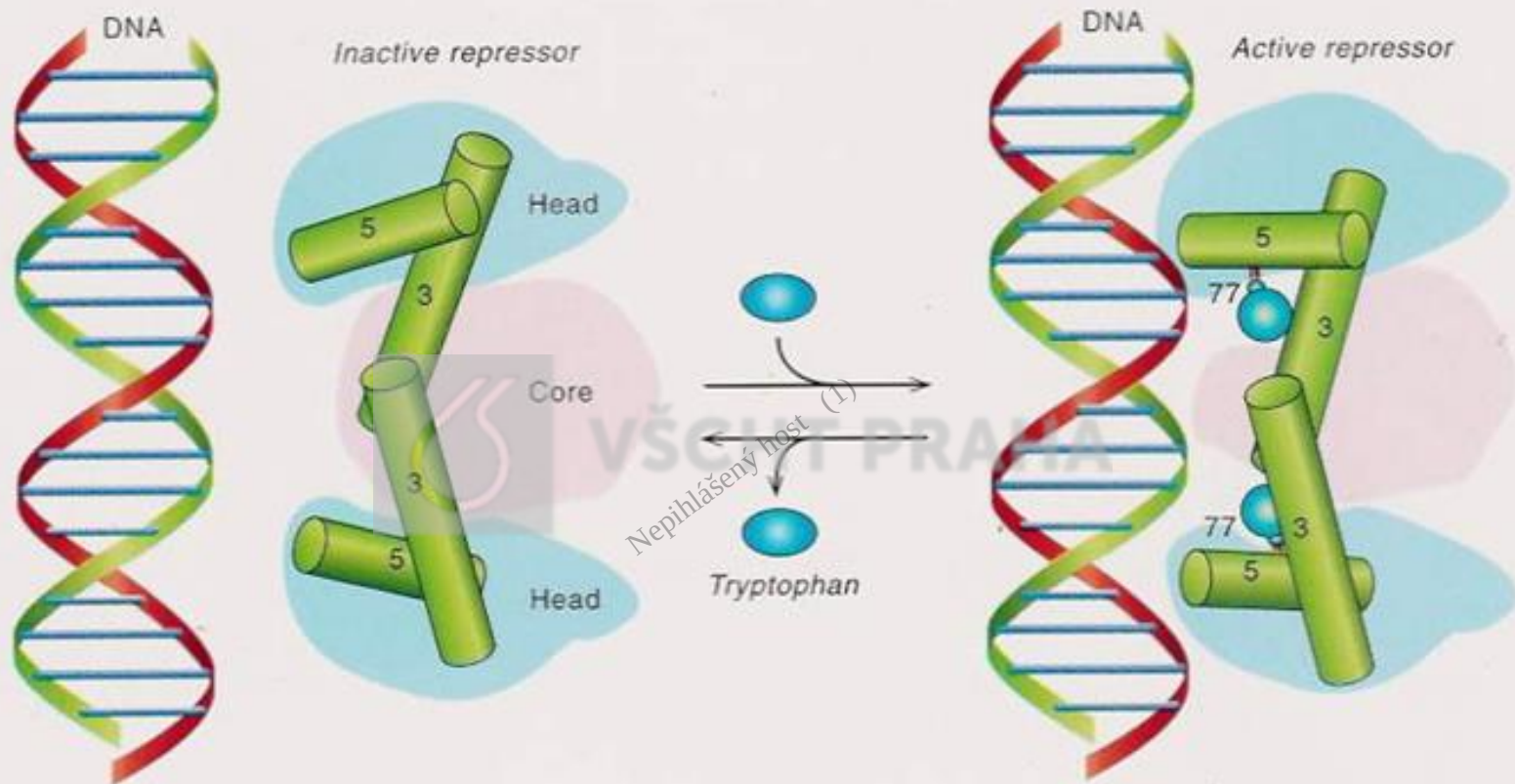
leucinový zip

aj.

Zubay G.L. *et al*:
Principles of
Biochemistry,
1995



Obr.7. Schematické znázornění vazebných motivů, které se uplatňují při vazbě specificky vázaných proteinů. Vlevo nahoře motiv dvojitého helixu, vpravo nahoře a vlevo dole motivy zinkového prstu a vpravo dole motiv leucinového zipu. Obdélníkem jsou vyznačeny oblasti vážící se na DNA.



141 Docking of the *trp* Repressor to the *trp* Operator
Figure 30.29

b) Regulace rychlosti odbourávání enzymu

u eukaryot: **ubiquitin** (velmi konzervativní malá bílkovina (76 AK))

vazba na aminoskupiny Lys = označení proteinu pro odbourání

rozhodující: N-koncová aminokyselina:

<http://genomics.energy.gov>, 2007

N-koncová AK

poločasy života

Met, Ser, Ala, Thr, Val, Gly	> 20 h
Ile, Glu	> 30 min
Tyr, Gln	> 10 min
Phe, Leu, Asp, Lys, Arg	2 - 3 min



B) Syntéza vhodného enzymu – isoenzymy

Definice: dva enzymy stejné substrátové i účinkové specifity s různou primární strukturou (produkované různými geny)
(pseudoisoenzymy: stejný gen, různé posttranslační modifikace)

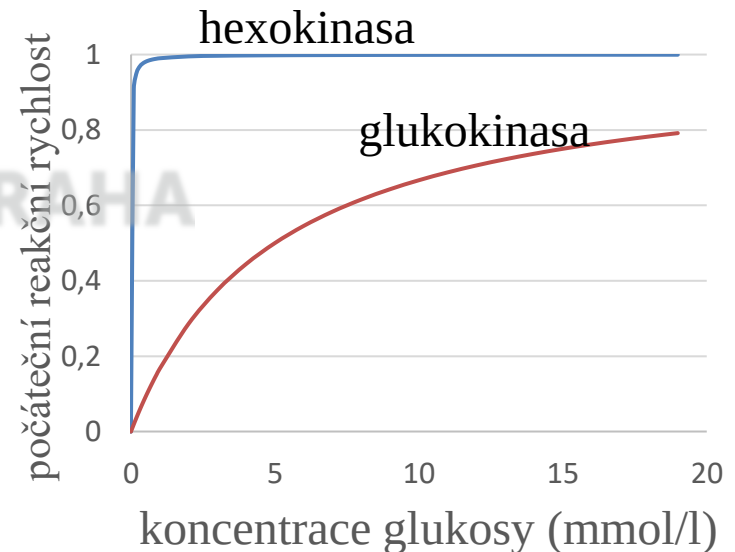
Příklady:

hexokinasa vs. glukokinasa (jaterní)

reakce: $\text{glc} + \text{ATP} \rightarrow \text{glc-6-fosfát} + \text{ADP}$

$$K_{M, \text{glc, hexokinasa}} = 0,01 \text{ mmol.dm}^{-3}$$

$$K_{M, \text{glc, glukokinasa}} = 5 \text{ mmol.dm}^{-3}$$

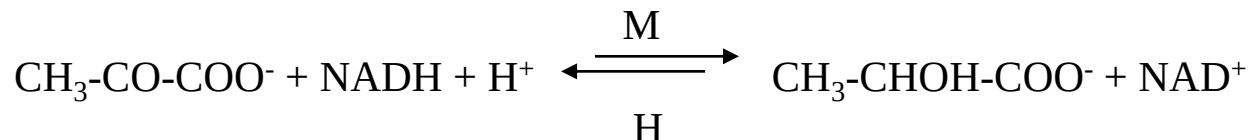


laktátdehydrogenasa srdce vs. svaly

podjednotky M a H, tetramer H_xM_y , $x + y = 4$

(různá pohyblivost na elfo - diagnostika infarktu myokardu)

H - aerobní tkáň (inhibice vyšší koncentrací pyruvátu), M - anaerobní tkáň



C) Kompartimentace (organely)

- lokalisace specifických funkcí (mitochondrie, peroxisomy, endoplasmatické retikulum a Golgiho komplex ...)
- zajištění specifických podmínek (různé pH - lysosomy...)

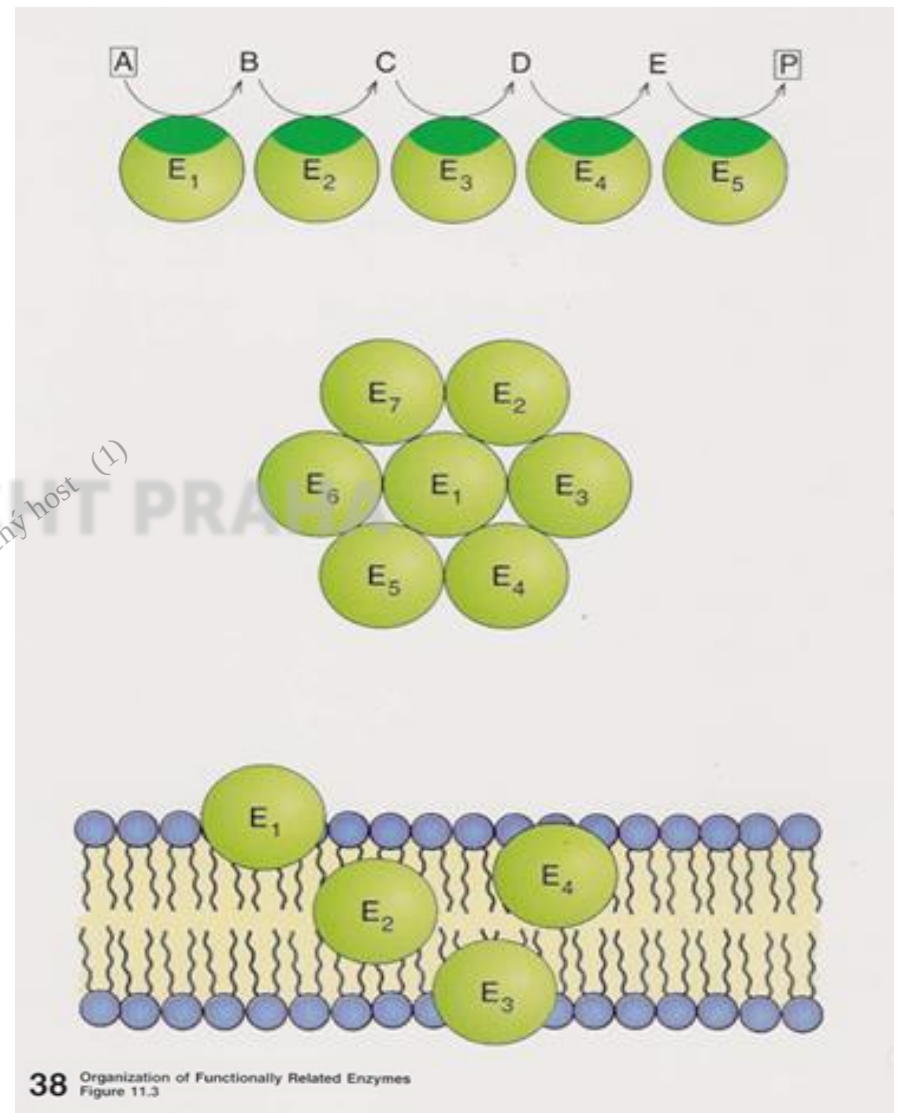
D) Prostorová organisace „následných“ enzymů

multifunkční enzymy
(synthasa mastných kyselin)

multienzymové jednotky
(pyruvátdehydrogenasový
komplex)

„redukce rozměrnosti“
(dýchací řetězec)

organisace následných enzymů
pomocí cytoskeletu???



E) Nevratná aktivace (limitovaná proteolysa)

zymogeny, proenzymy

odštěpování pre- a pro-sekvencí

Odštěpování vnitřních sekvencí

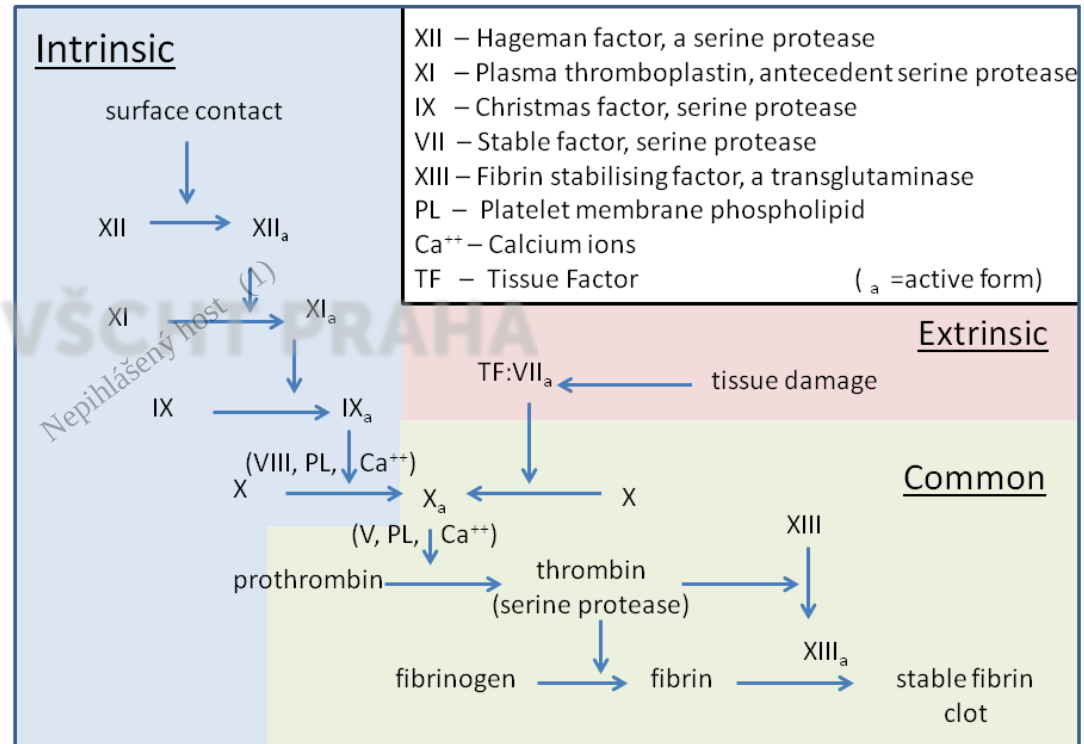
Aktivace polyproteinů
(produkty polycistronních genů)

Příklady:

- trávicí enzymy (trypsin, pepsin ..., autokatalytická aktivace, konformační změna)
- kaskády – „amplifikace signálu“ (koagulační, komplement)



The three pathways that make up the classical blood coagulation pathway



Beards G. 2012:

<http://www.wikiskripta.eu/index.php/>

Soubor:Classical_blood_coagulation_pathway.png

F) „Vratná“ kovalentní modifikace (fosforylace, adenylace...)

součást regulačních kaskád, pečlivé řízení enzymů:

nejdůležitější: proteinkinasa vs. proteinfosfátfosfatasa

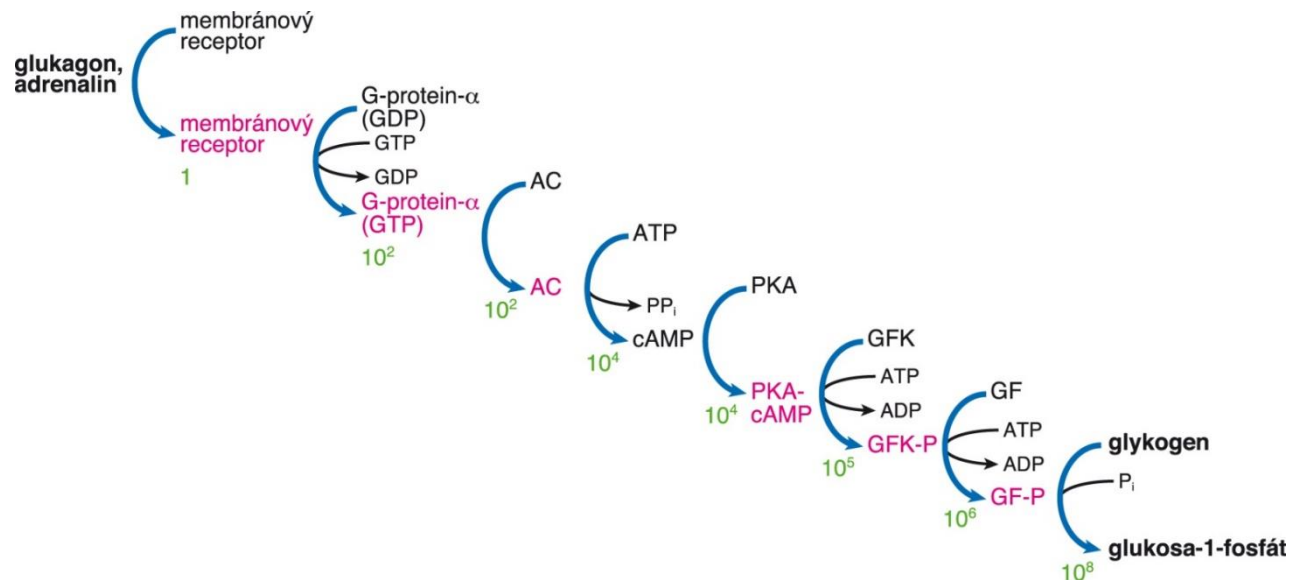
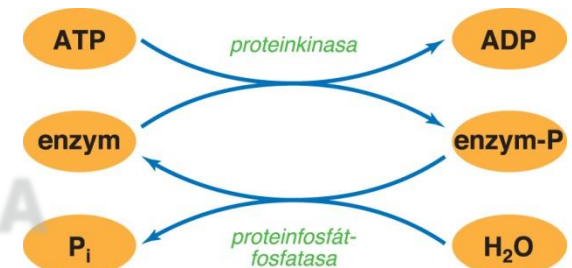
názvosloví: ATP:[acetylCoA-karboxylasa]-fosfotransferasa

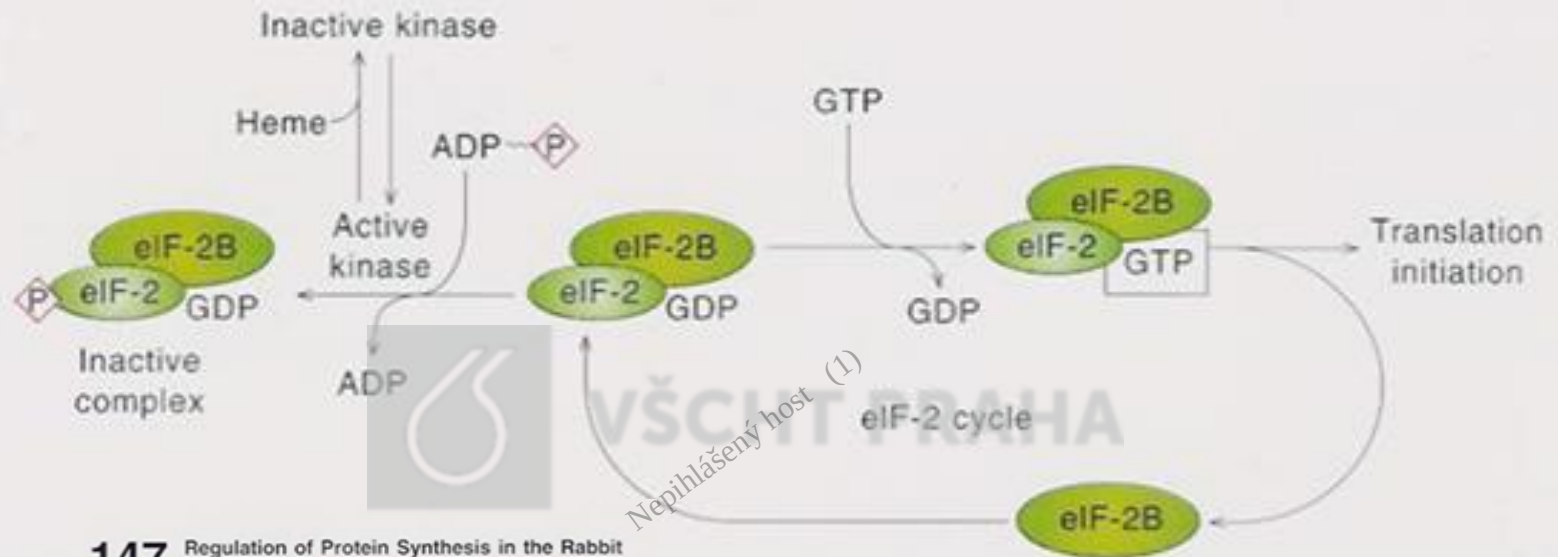
[acetylCoA:CO₂-ligasa (ADP-tvořící)]-fosfát-fosfohydrolasa

(pozn: Fosforylovaná forma je neaktivní!)

Důsledky fosforylace:

- ovlivnění struktury aktivního místa
- ovlivnění oligomerního až polymerního stavu
(obvykle monom. neaktivní, oligo- až polym. aktivní,
např. glykogenfosforylasa, acetylCoA-karboxylasa)





147 Regulation of Protein Synthesis in the Rabbit Reticulocyte
Figure 31.23

Zubay G.L. *et al*: Principles of Biochemistry, 1995

G) Vratná modifikace aktivity pomocí efektorů

pojmy:

efektor

aktivátor

inhibitor

„čistá“ a smíšená inhibice

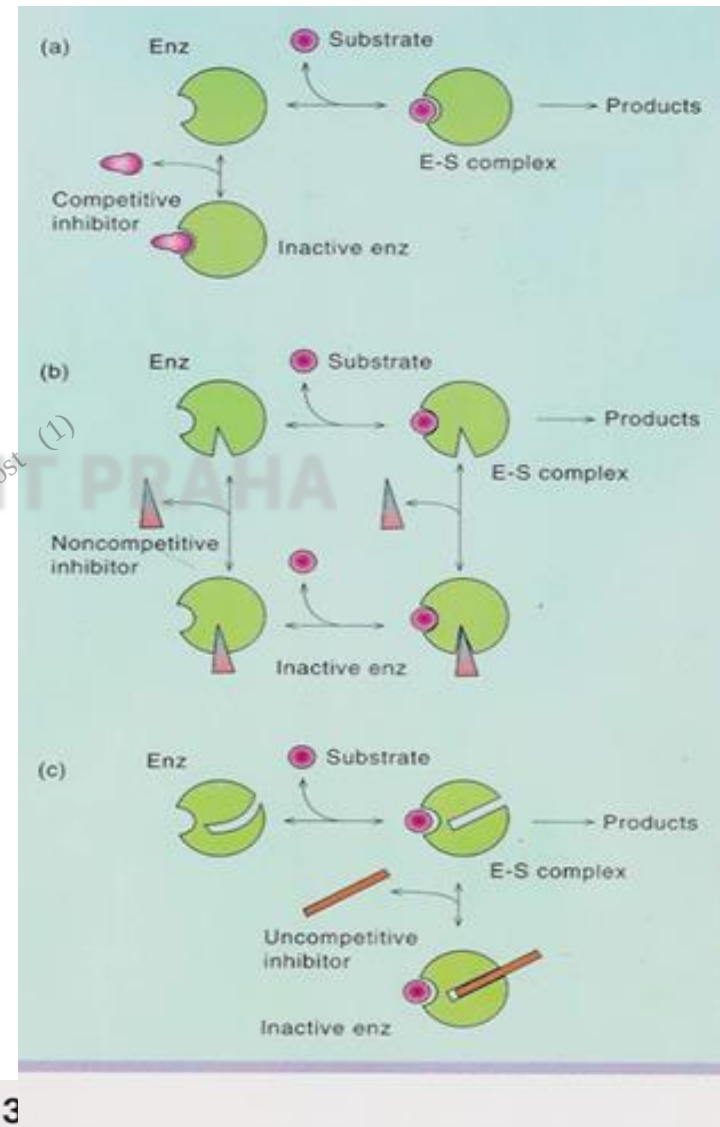
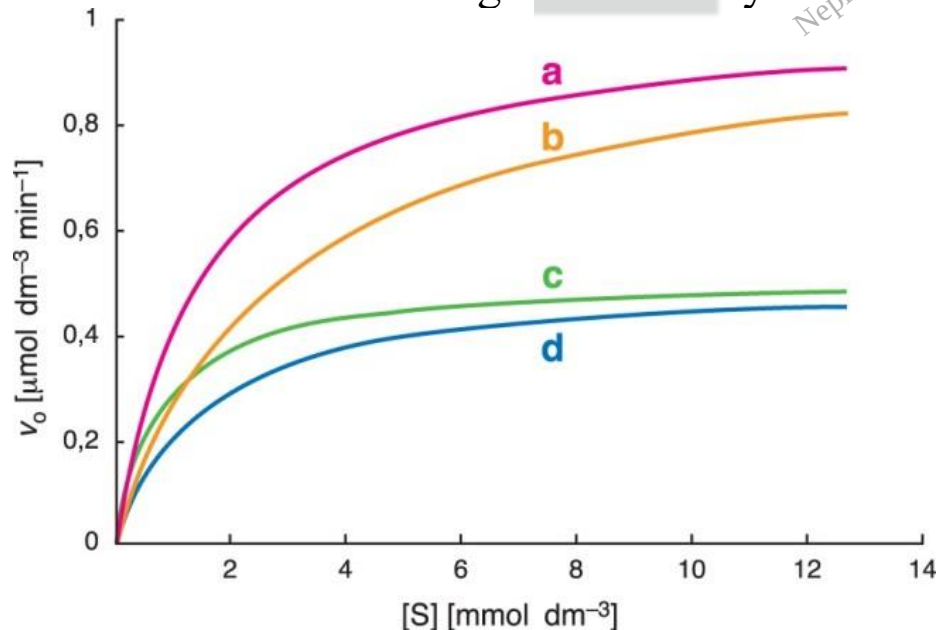
inhibitor kompetitivní

nekompetitivní

akompetitivní

heterotropní allosterický

efekt u regulačních enzymů



Inhibice aktivity zpětnou vazbou (regulace koncovými produkty metabolických drah)

POZOR: „obrácení“ reakce změnou koncentrací (termodynamický trik) NE VLIV ENZYMŮ!!!

kompetitivní inhibice: „překážení“ přímého produktu reakce v aktivním místě

nekompetitivní nebo akompetitivní inhibice: působení koncového produktu dráhy

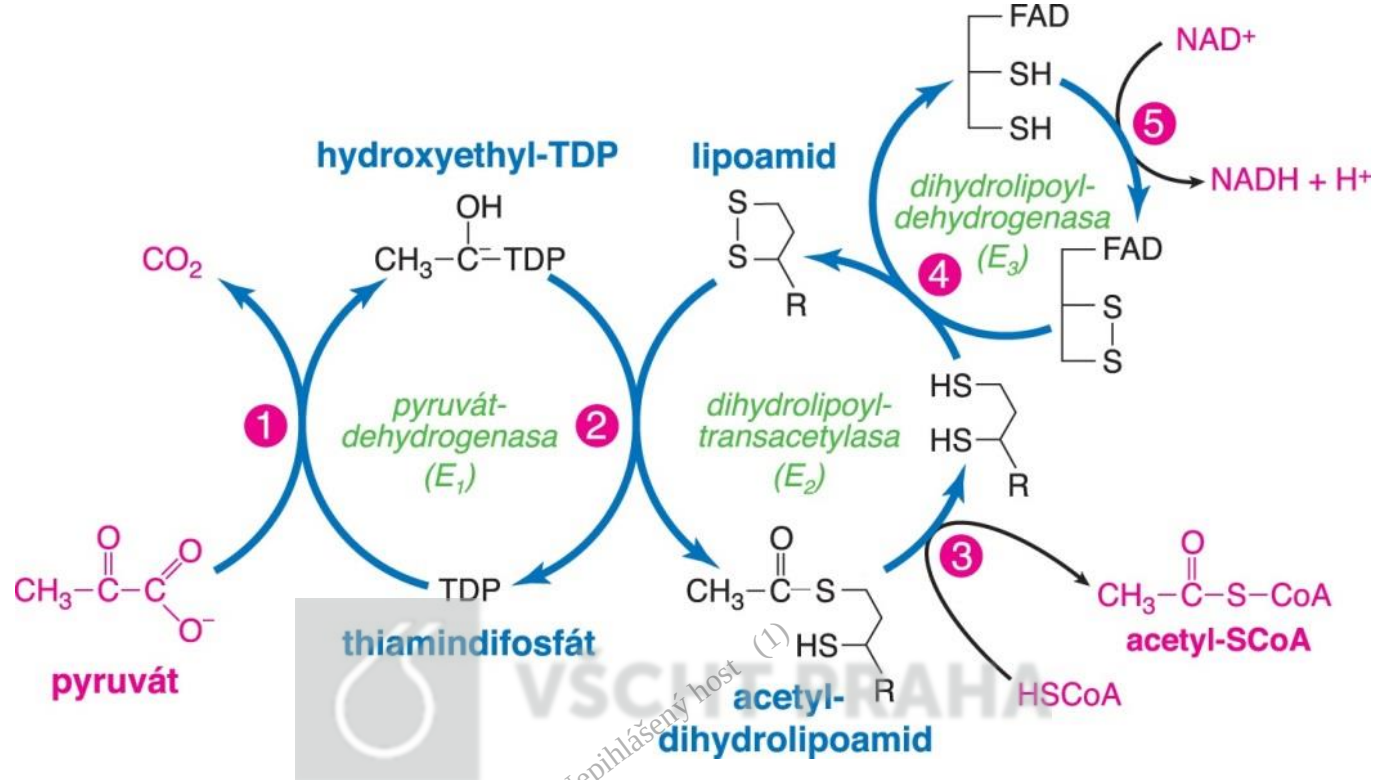


Příklady:

- regulace aktivity pyruvátdehydrogenasového komplexu

hlavní způsoby:

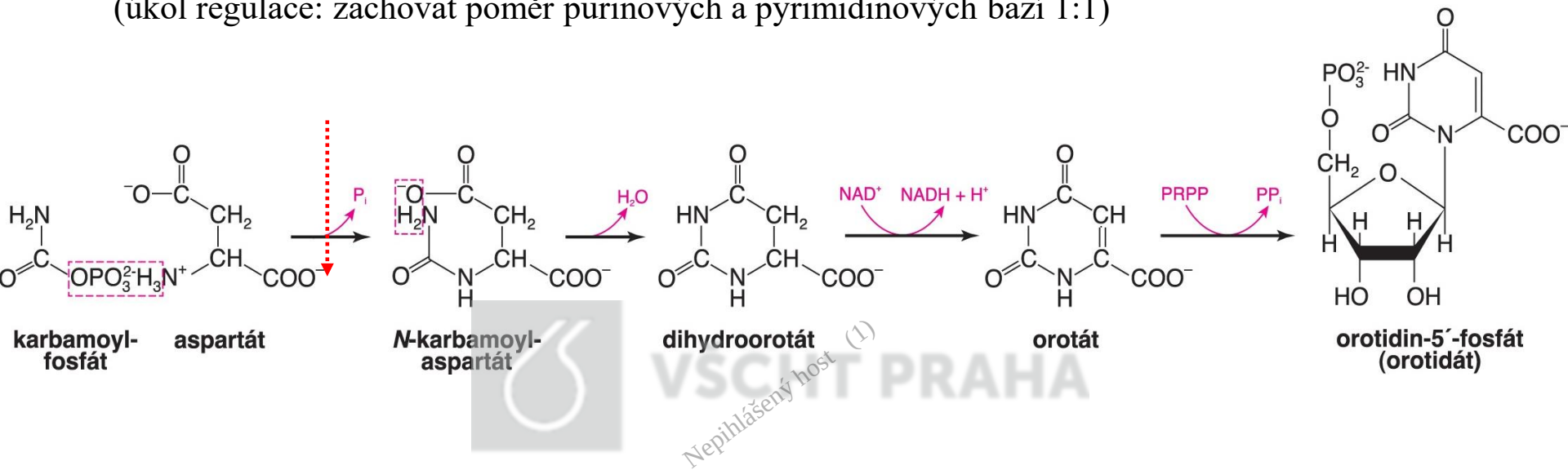
- „termodynamický trik“ (změna hodnoty ΔG)
- fosforylace (inhibice) enzymu E_1



regulátor	aktivace/inhibice +/-	cílový enzym	mechanismus inhibice
acetyl-S-CoA/HSCoA	-	E_2	změna hodnoty ΔG
NADH/NAD ⁺	-	E_3	změna hodnoty ΔG
ATP	-	E_1	substrát [pyruvátdehydrogenasa]-kinasy
[pyruvátdehydrogenasa]- kinasa	-	E_1	fosforylace, aktivace produkty (acetyl-S-CoA a NADH), inhibice pyruvátem, ADP a Ca^{2+}
[pyruvátdehydrogenasa]- fosfatasa	+	E_1	defosforylace, aktivace AMP, Ca^{2+} , NAD ⁺ a insulinem, inhibice NADH

- aspartátkarbamoyltransferasa (milovaný příběh)

(úkol regulace: zachovat poměr purinových a pyrimidinových bazí 1:1)



aktivátor: ATP, inhibitor: CTP

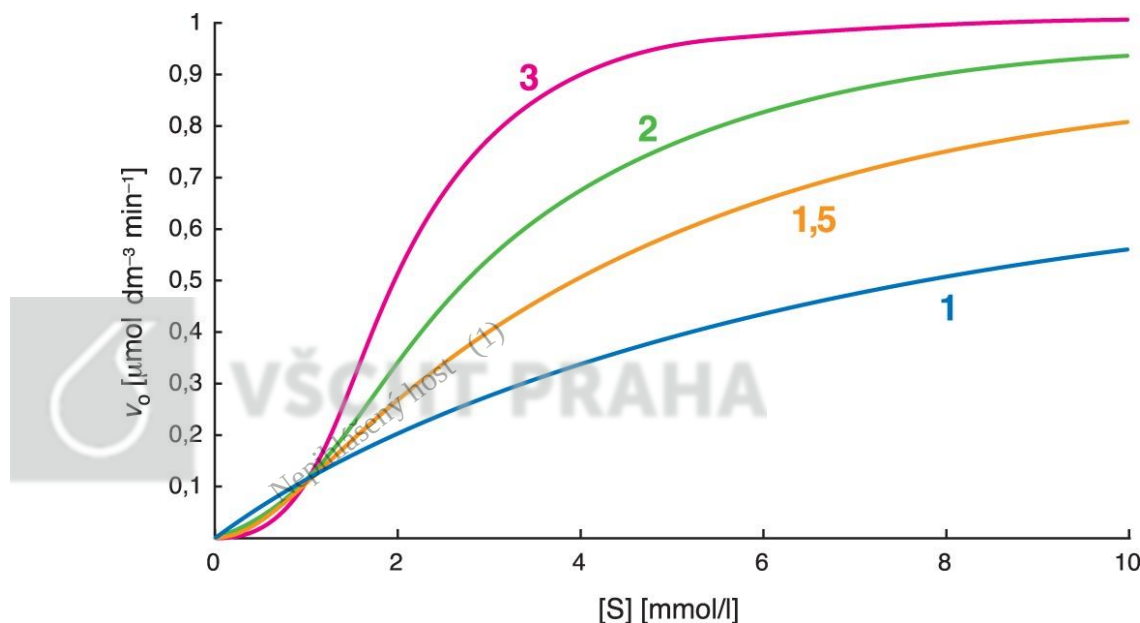
(heterotropní allosterický efekt – viz následující)

H) Rychlost reakce v závislosti na koncentraci substrátu (rovnice Michaelise a Mentenové, Hillova rovnice)

$$v_o = \frac{V_{\text{lim.}} [S]^n}{K + [S]^n}$$

$$K = [S]_{1/2}^n$$

Nešťastný termín:
„allosterické enzymy“



$V_{\text{lim}} = 1 \text{ mmol/l/min}$, $K = 8 \text{ mmol/l}$, hodnoty n jsou vyznačeny u křivek

DĚKUJI ZA POZORNOST!



VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

Příště:

ESENCIÁLNÍ FAKTORY (s doc. P. Lipovovou)