Regulace enzymových aktivit

Regulace enzymových aktivit:

Změny množství enzymu v kompartmentu, buňce, orgánu:

- změna exprese, degradace atd.

- změna lokalizace

„Skutečné“ regulace:

- aktivace/inhibice nízkomolekulárními ligandy

- aktivace/inhibice inter- a intramolekulárními interakcemi
  protein-protein, komplementace

- limitovaná proteolysa

- kovalentní modifikace

- regulace fysikálními podmínkami

Aktivace/inhibice nízkomolekulárními ligandy:

Běžné buněčné nízkomolekulární regulátory:

cAMP, cGMP, diacylglycerol, IP_3

Ca^{2+}

prostaglandiny,

NO, CO, H_2S

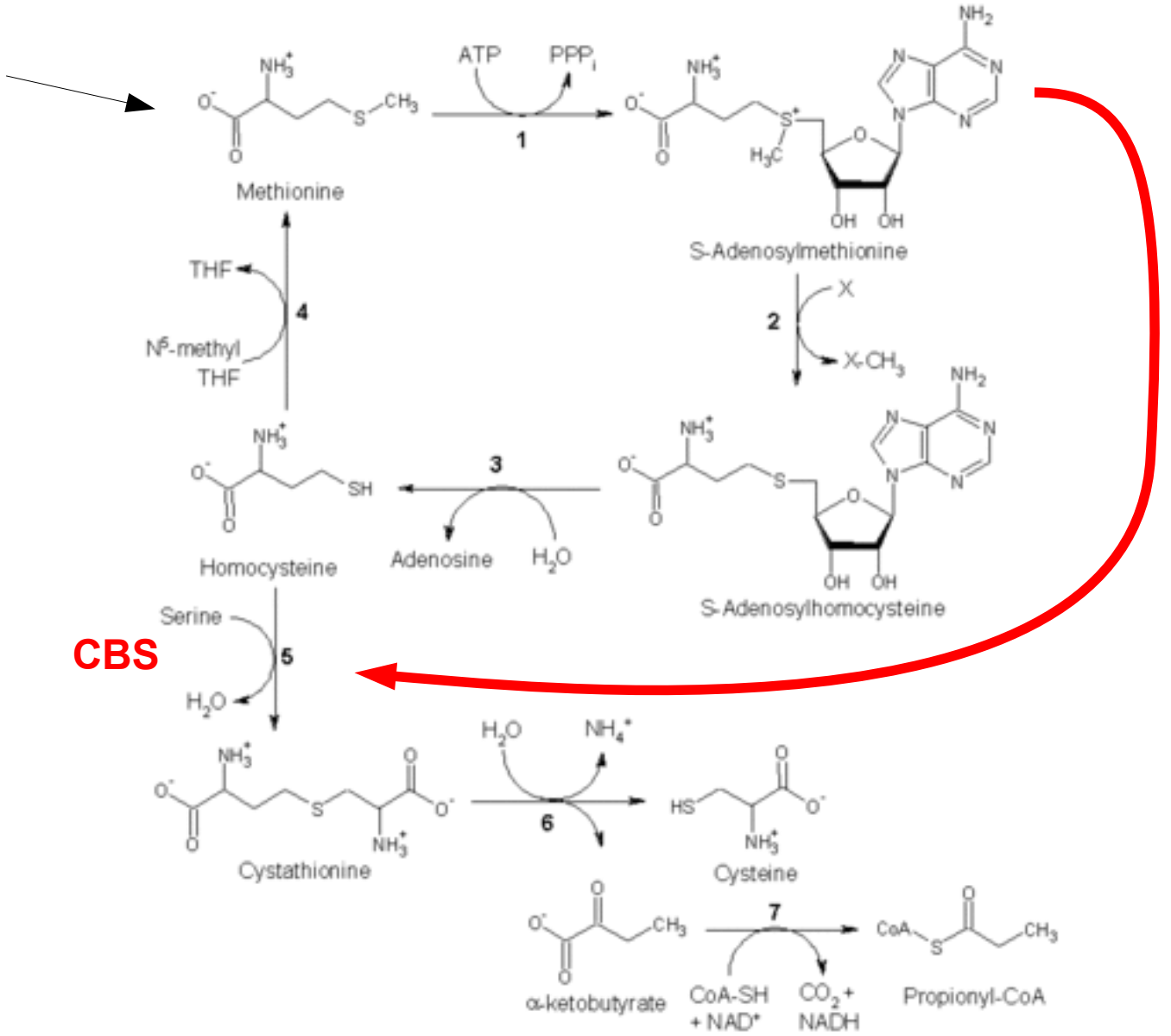
ethylen, ppGpp

ATP, GTP, AMP, ADP

metabolity

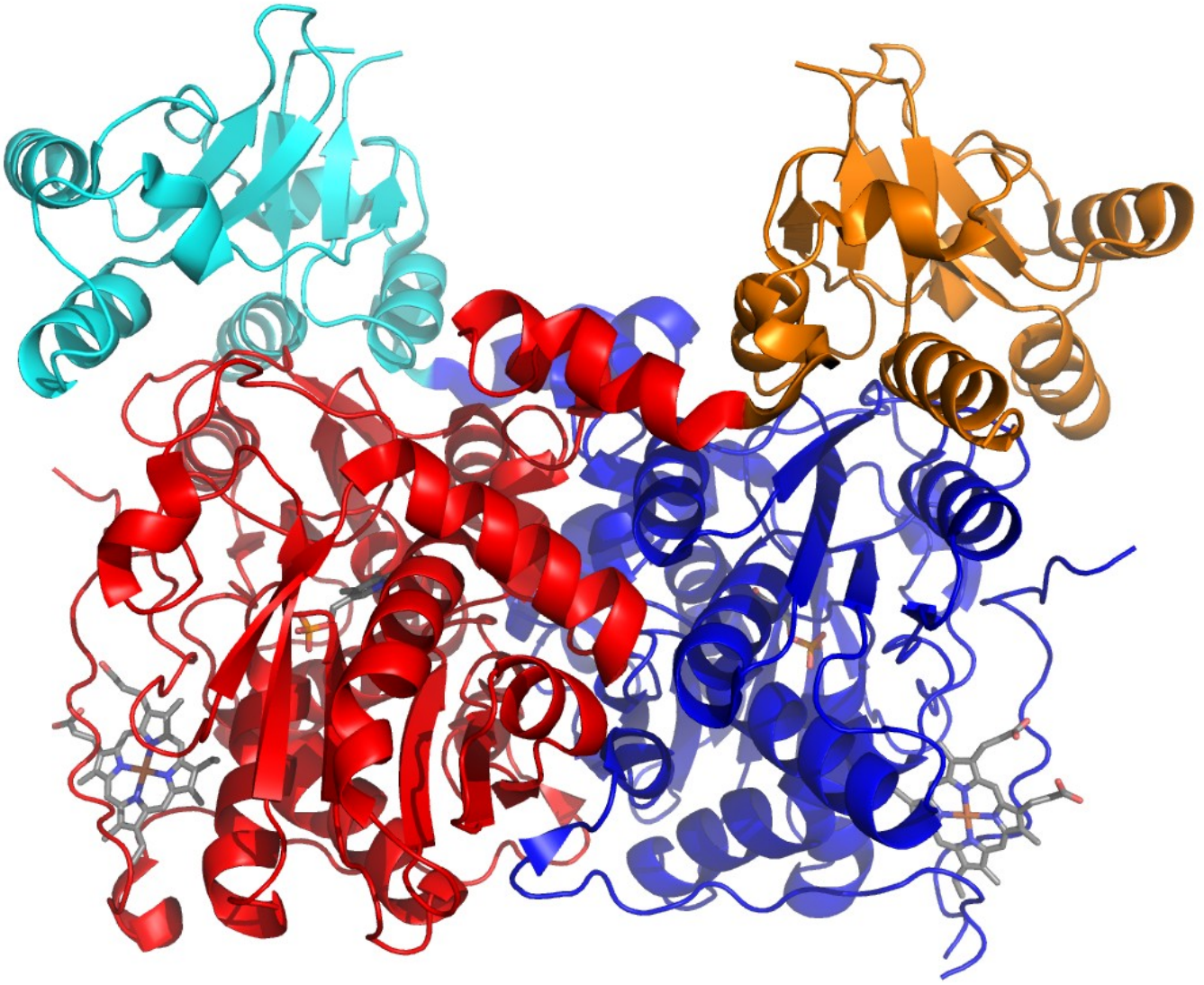
Aktivace/inhibice nízkomolekulárními ligandy:

aktivace lidské cystathionin-β-synthasy S-adenosylmethioninem



Aktivace/inhibice nízkomolekulárními ligandy:

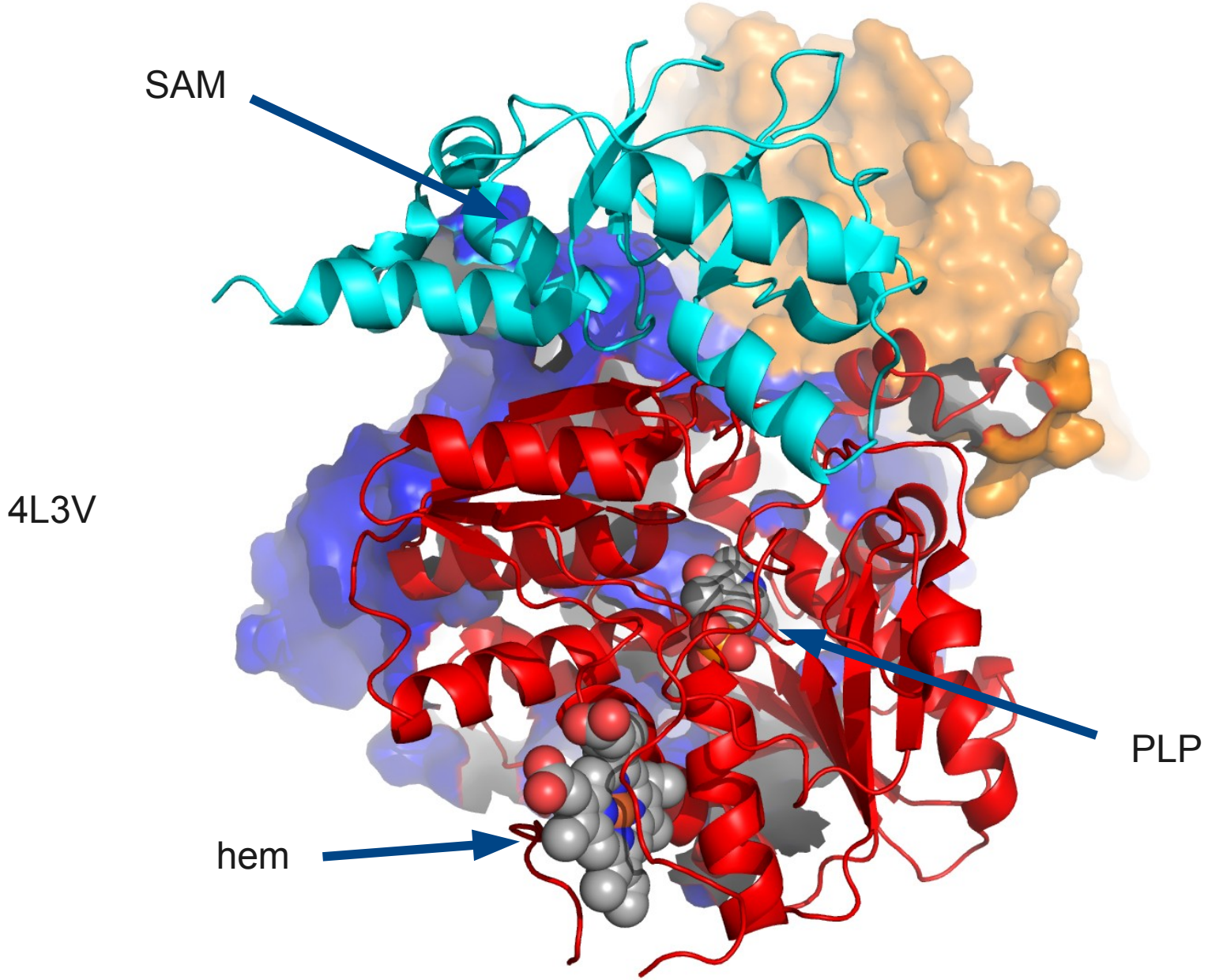
aktivace lidské cystathionin-β-synthasy S-adenosylmethioninem



4L3V

Aktivace/inhibice nízkomolekulárními ligandy:

aktivace lidské cystathionin-β-synthasy S-adenosylmethioninem



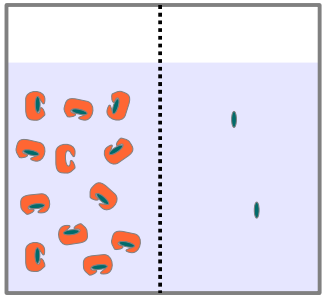
Aktivace/inhibice nízkomolekulárními ligandy:

Studium interakcí protein-ligand:

- přímé měření, radiometrické stanovení, afinitní chromatografie

- NMR

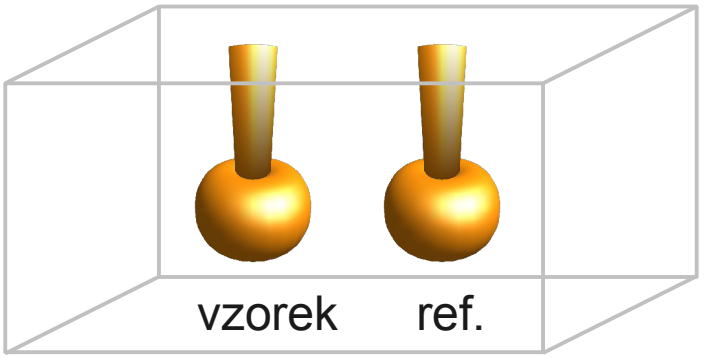
- rovnovážná dialysa



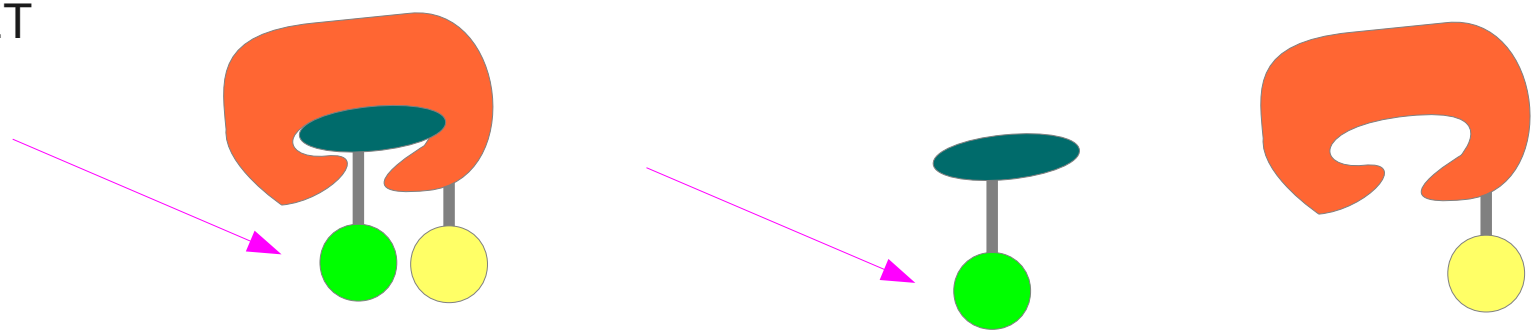
- diferenční spektrofotometrie/spektrofluorimetrie

Aktivace/inhibice nízkomolekulárními ligandy:

Studium interakcí protein-ligand:
- isotermální titrační kalorimetrie



- FRET



- jiné metody založené na fluorescenci

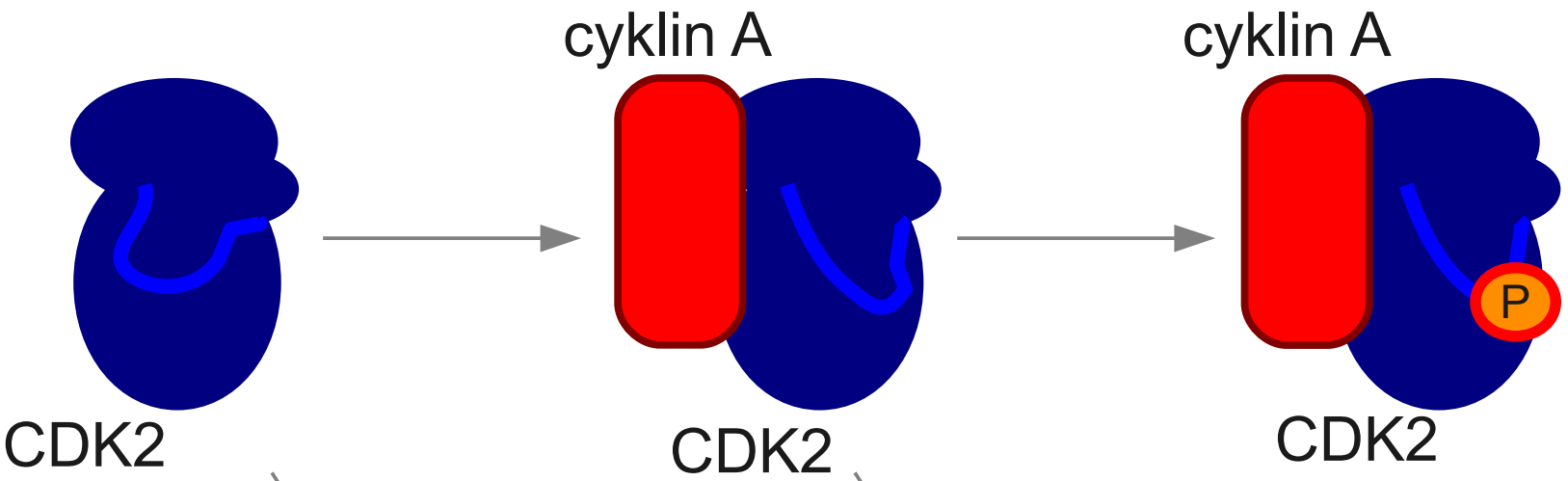
- biologická odezva, reportérové systémy

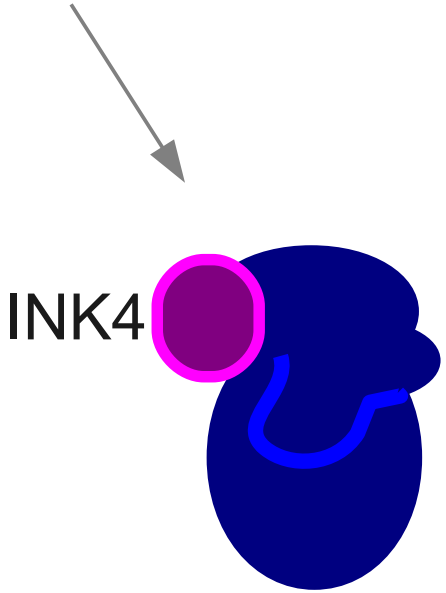
- měření inhibiční konstanty

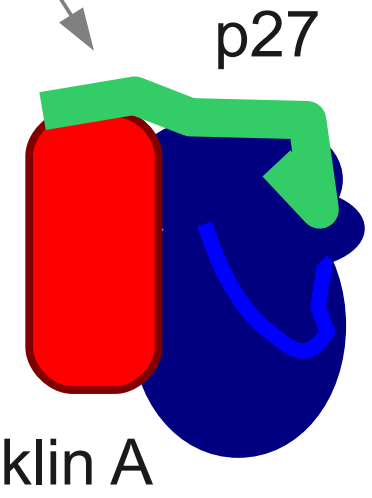
- protein-ligand docking

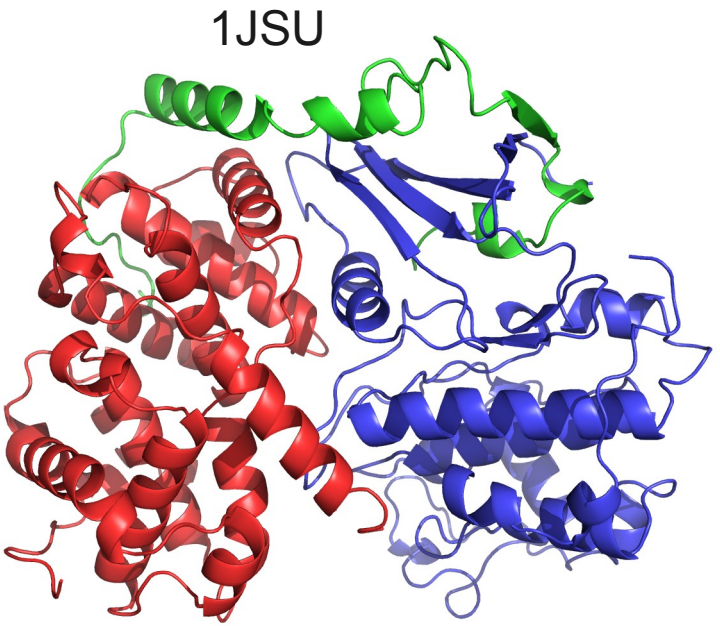
Aktivace/inhibice inter- a intramolekulárními interakcemi protein-protein, komplementace

Cyklin-dependentní kinasy



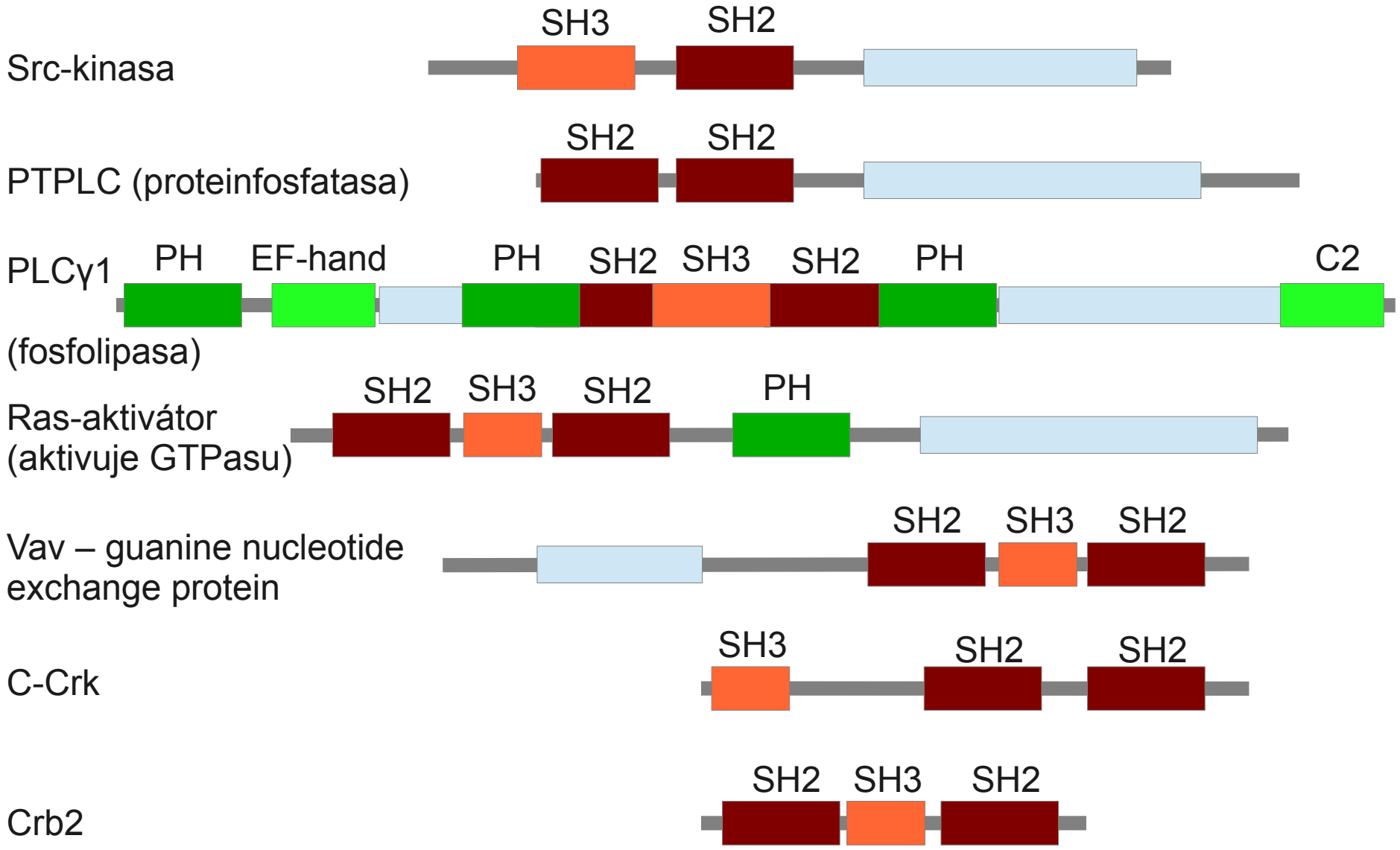






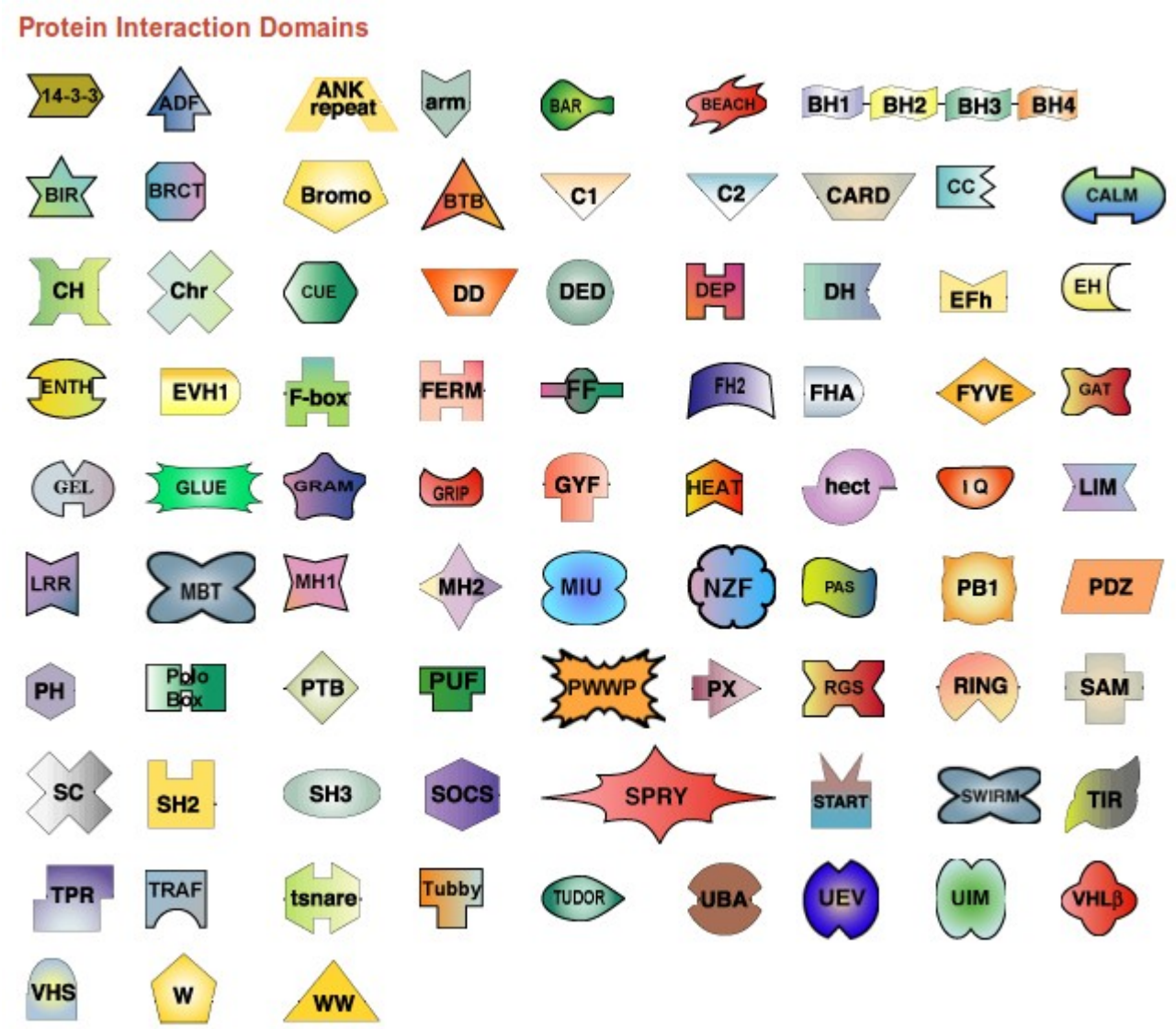
Aktivace/inhibice inter- a intramolekulárními interakcemi protein-protein, komplementace

Adaptérové domény



Aktivace/inhibice inter- a intramolekulárními interakcemi protein-protein, komplementace

Adaptérové domény - http://pawsonlab.mshri.on.ca



Aktivace/inhibice inter- a intramolekulárními interakcemi
protein-protein, komplementace

Adaptérové domény
- SH2 doména (Src-homology type 2)
  proteinkinasy, proteinfosfatasy, fosfolipasy, regulační proteiny atd.
  -pY–x–x–Φ-

- SH3 doména (Src-homology type 3)
  proteinkinasy, proteinfosfatasy, fosfolipasy, regulační proteiny,
  myosin, spektrin atd.
  -R/K–x–x–P–x–x–P-
  -x–P–x–x–P–x–R/K-

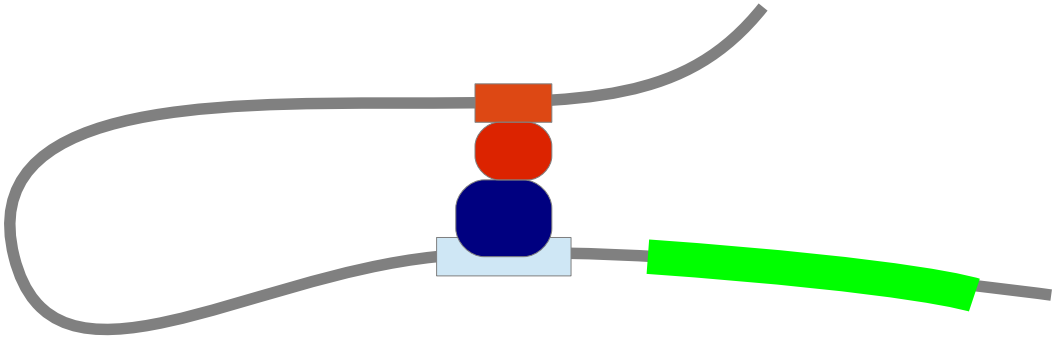
- PH doména (Pleckstrin-homology)
  fosfolipasy, proteinkinast atd.
  Inositolfosfáty (PIP2, PIP3)

- EH2 doména (Eps15-homology type 2)
  clathrin adapter proteins
  -S/T–N–P–F–Φ-

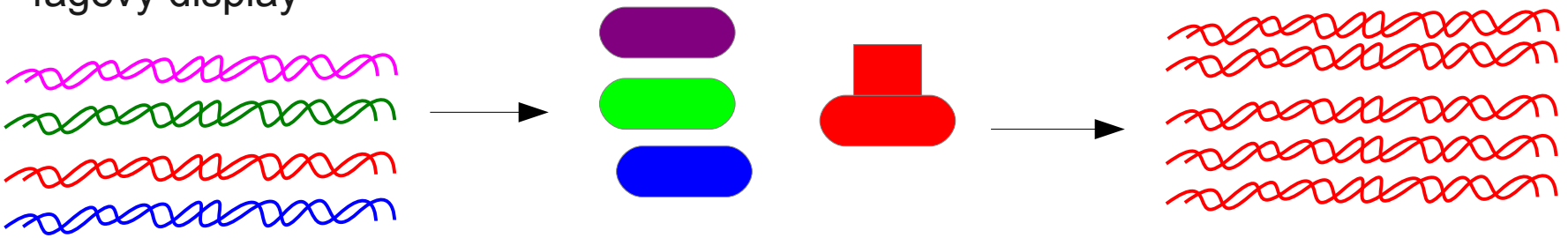
- PDZ doména (nesmyslná zkratka)
  C-terminální peptidy

Aktivace/inhibice inter- a intramolekulárními interakcemi
protein-protein, komplementace

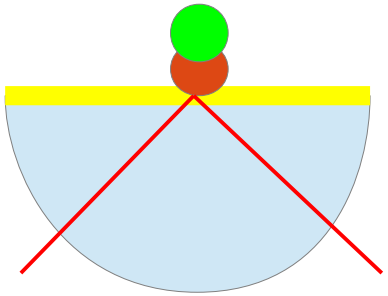
Studium interakcí protein-protein:
- dvouhybridní systémy



- fágový display



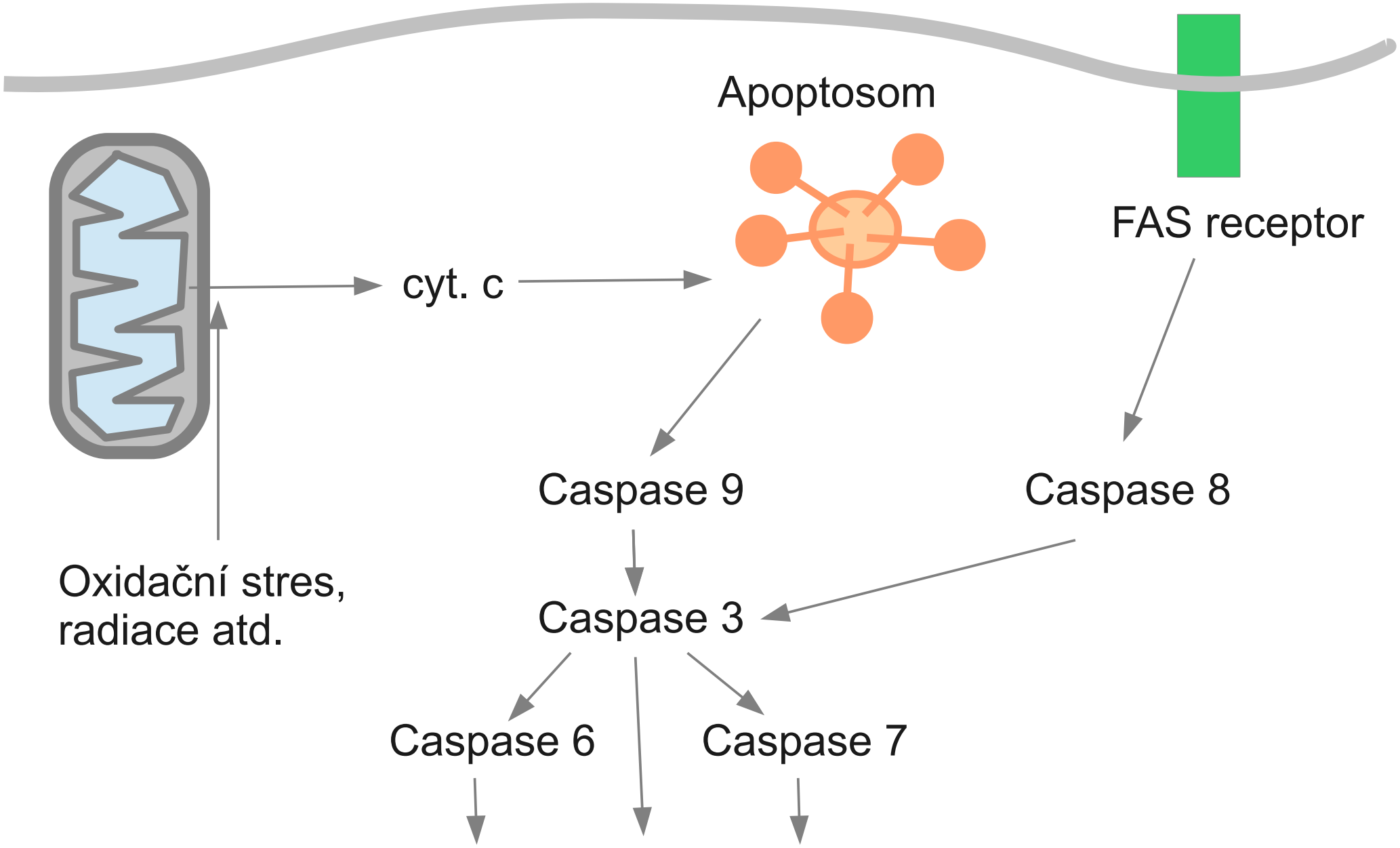
- povrchová plasmonová resonance



- FRET
- afinitní chromatografie, pull-down
- mikroskopie atomárních sil

Limitovaná proteolysa

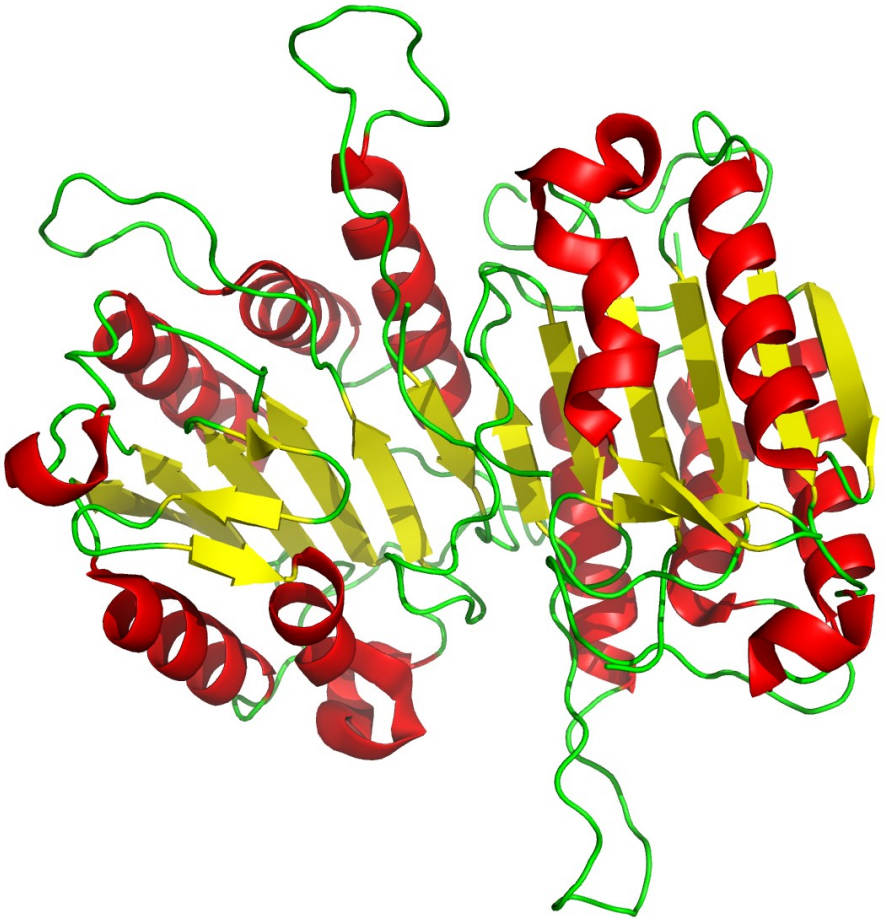
Apoptosa – caspasy - cysteine-dependent aspartate-directed proteases



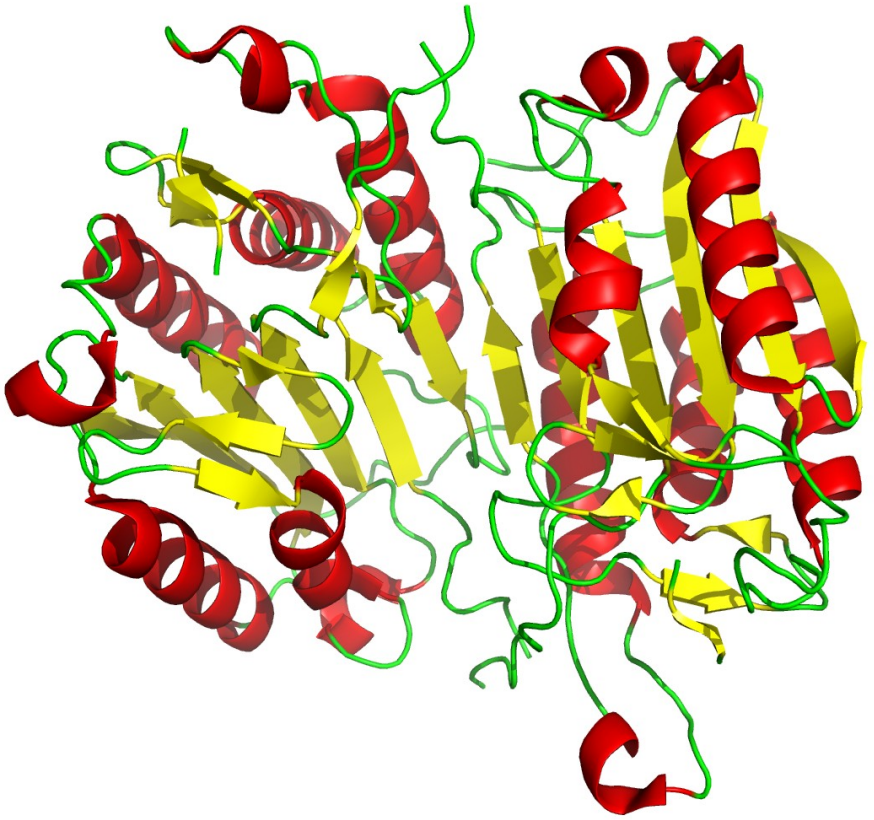
Limitovaná proteolysa

Apoptosa – caspasy - cysteine-dependent aspartate-directed proteases

Caspasa 7 – inaktivní
1K88

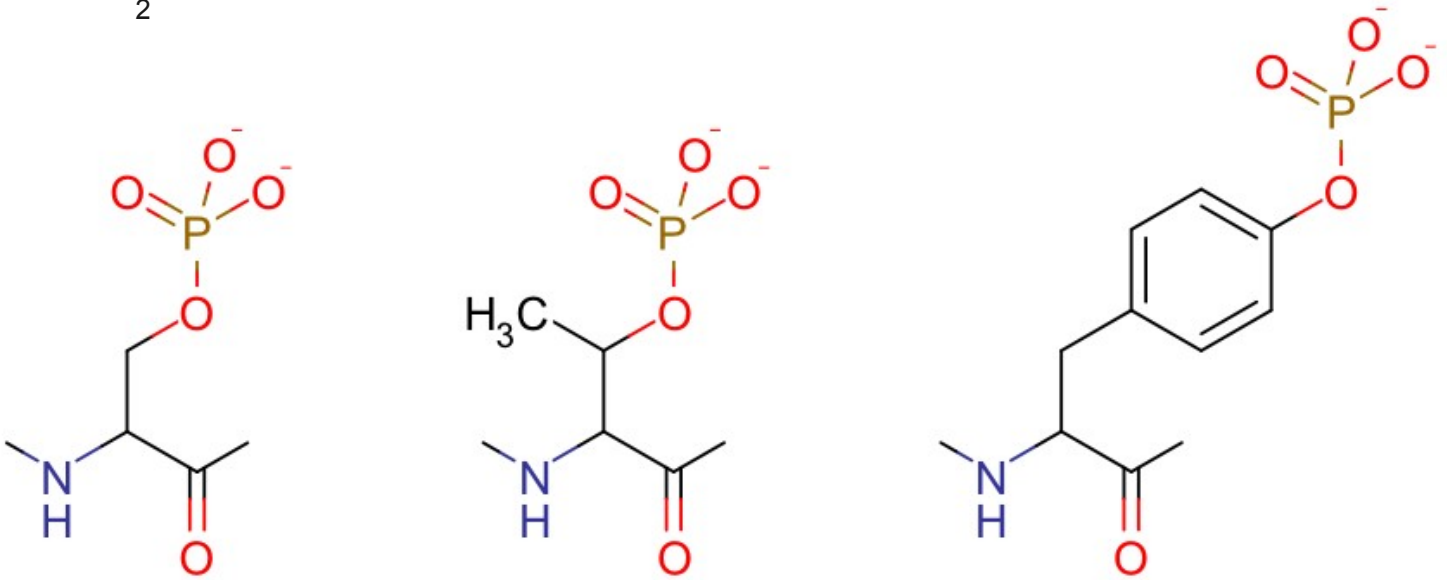


aktivní
1F1J



Kovalentní modifikace

Fosforylace



- ADP-ribosylace, adenylace, methylace, acylace …

Kovalentní modifikace

Fosforylace
Lidský genom – 518 genů proteinkinas (kinom)

Serin/threoninkinasy

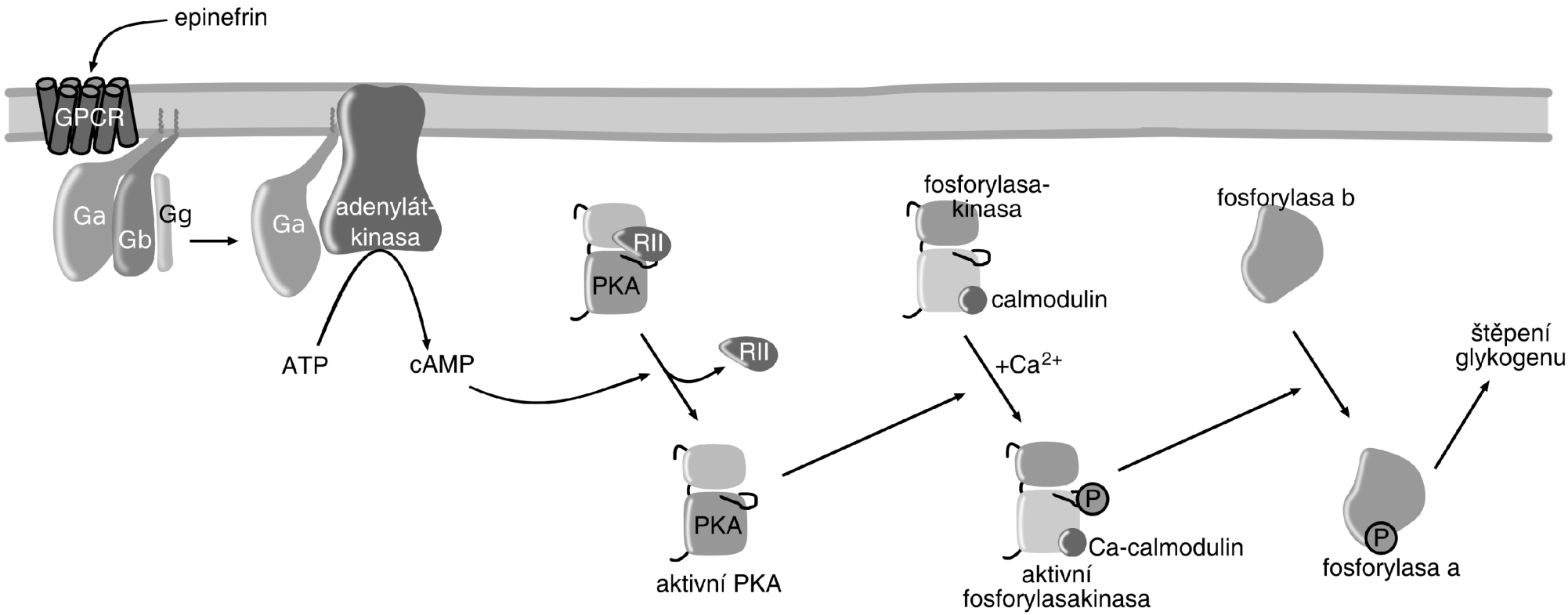
Proteinkinasa A	cAMP
Proteinkinasa C	DAG, Ca2+
Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)	jiné kinasy
Ca2+/calmodulin-dependent protein kinases (CaM kinases)	komplex Ca2+-calmodulin
fosforylasakinasa	PKA, fosfatasa
proteinkinasa B (AKT)	fosfolipidy, jiné PK, …

Tyrosinkinasy

Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)	PDGF
Epidermal growth factor receptor (EGFR)	EGF
Insulinový receptor	insulin
Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)	IGF1
Src, Abl, JAK, Lck, Lyn …	různé způsoby regulace

Kovalentní modifikace

Fosforylace – regulace metabolismu glykogenu



Kovalentní modifikace

Fosforylace – metody studia

- anti-p-Ser, anti-p-Thr, anti-p-Tyr, další protilátky

- ^{32}P

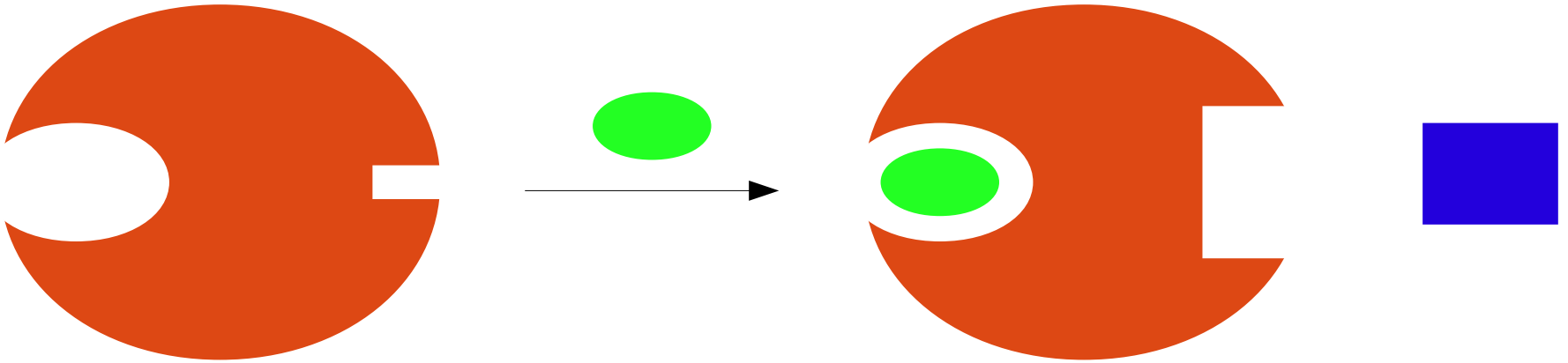
- hmotnostní spektrometrie

- metalo-afinitní chromatografie

Allosterický jev

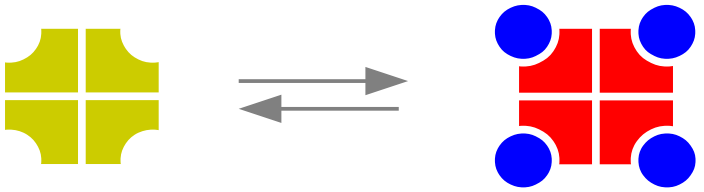
- homo- / heterotropní

- positivní / negativní



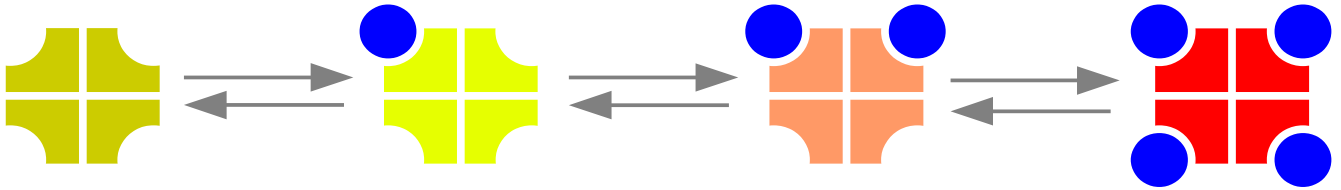
Allosterický jev

Hillův model

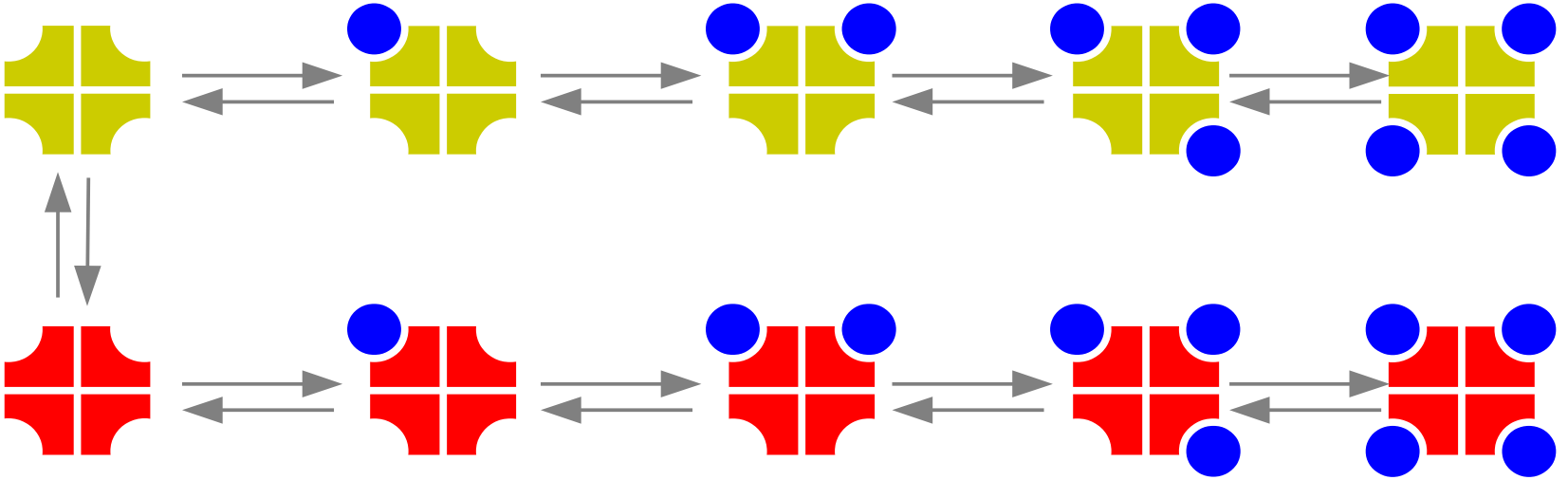


$$S = \frac{[A]^{\kappa}}{[A]^{\kappa} + K_S}$$

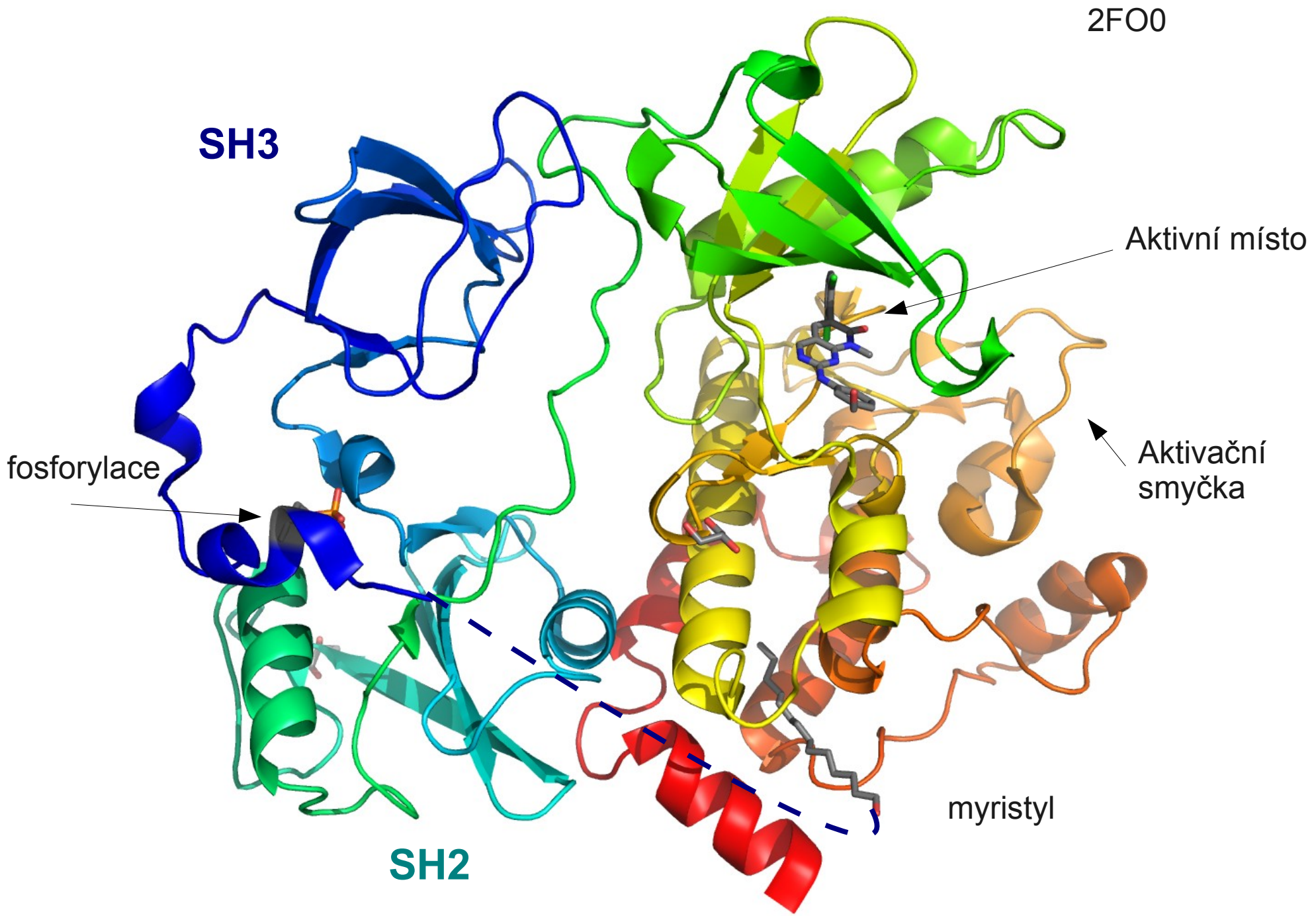
Aldairův model



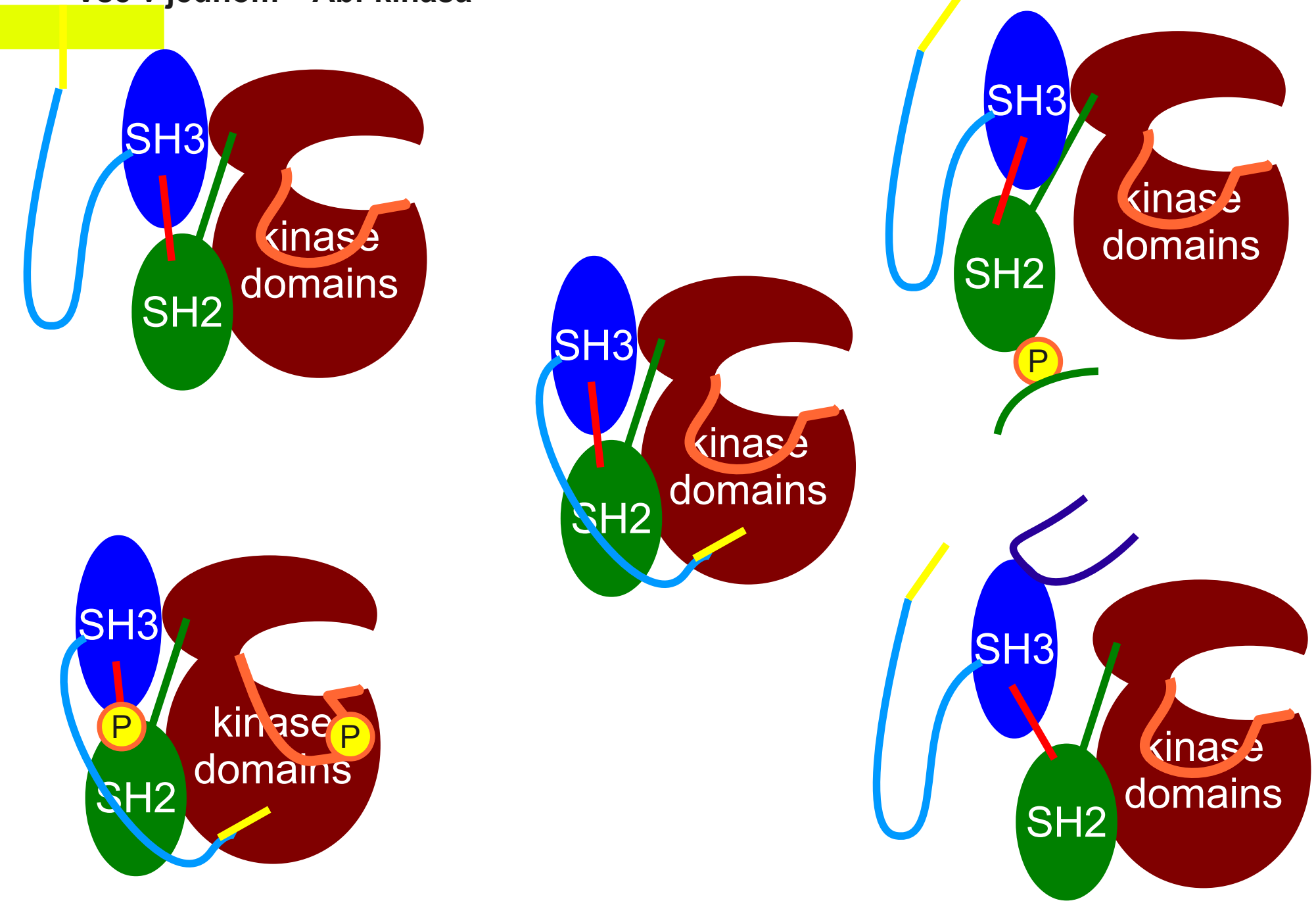
Koshlandův-Némethyho-Filmerův model
Monodův-Wymanův-Changeuxův model



Vše v jednom – Abl-kinasa



Vše v jednom – Abl-kinasa



Vše v jednom – Abl-kinasa