

Sejtszintű biológiai szabályozás

Szabályozás élő rendszerekben



2018 őszi

Tárgy adatai

Oktató: Vértessy G. Beáta, egyetemi tanár
(vertessy@mail.bme.hu)

Oktatásban résztvevő munkatársak:

Nagy Kinga, tanársegéd
Dr Szabó Judit Eszter Bolyai+ ösztöndíjas tud. munkatárs
Surányi Éva doktoráns
Rácz Gergely doktoráns
Molnár Petra doktoráns

Időpont és hely :

Előadás: Hétfő 11:15-15:00, Ch 201 terem
11:15-12:45 előadás
12:45-13:45 ebédszünet
13:45-15:00 megbeszélés

Labor: Szerda 10:00-16:00 Ch 1. emeleti labor

Vizsga: Előadás anyagából írásbeli vizsga lesz

Laborjegy: a laborgyakorlatok előtt beugró ZH eredménye: 30%
a laborgyakorlatokról beadott jegyzőkönyv: 70%

2

Kurzus felépítése

Fehérje/organelum/sejtszintű szabályozási témák

Előadások

Sor-szám	Dátum (hónap,nap)	Óra anyaga
1.	szept. 10.	Fehérje szerkezet és funkció kapcsolata: allosztéria
2.	okt. 1.	Kis G fehérjék – általános jellemzők
3.	okt. 8.	Génexpresszió szabályozás I
4.	okt. 29.	Sejten belüli transzport
5.	nov. 5.	Génexpresszió szabályozása II – epigenetika
6.	nov. 12.	Sejthalál folyamatok szabályozása

Laborok

Sor-szám	Dátum (hónap,nap)	Labor anyaga
1.	szept. 12.	Kinetika
2.	okt. 3.	Kötődés vizsgálat
3.	okt. 10.	Expresszált fehérje, tisztítás
4.	nov. 7.	Expressziós szint vizsgálat

Mikor lesz leginkább hasznos ez a tárgy?

- Pontos megértése a már meglévő koncepcióknak
- Honnan tudjuk ezeket a dolgokat?
- Értsük meg a megismerés folyamatát:
 - a benne lévő innovatív ötletekkel!
 - a benne lévő limitációkkal!
- Biztos molekuláris tudás
- Gondolkodás: mire lehet felhasználni?

4

Mikor lesz leginkább hasznos ez a tárgy?

- Kísérletek tervezése molekuláris alapon
- Konkluzív fogalom megértése
- Mit és miért mérünk?
 - a benne lévő innovatív ötletekkel!
 - a benne lévő limitációkkal!
 - pozitív és negatív kontrollokkal

5

Fehérje szerkezet és funkció kapcsolata

6

alkalmazkodás ↔ molekuláris szintű szabályzás



7

Az előadás témái

- Molekuláris felismerés típusai
- Enzimreakció kinetikája
- Enzim inhibíció
 - Információátvitel ligand kötés útján
- Kooperativitás.
- allostérikus szabályzás

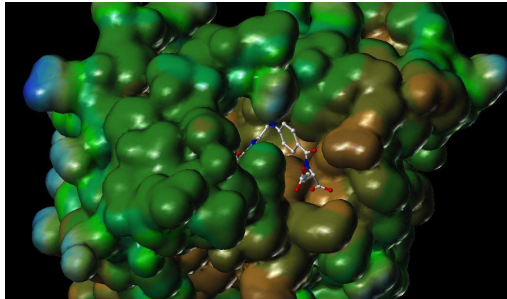
Biológiai példák.

A leggyorsabb és legáltalánosabb módszer: reakció sebességének befolyásolása az enzimaktivitás közvetlen és általában reverzibilis változtatása révén.

Ligand kötés jellegzetességei Enzim-szubsztrát komplex

1. 3D kötőhely, az alkotó oldalláncok szekvenciálisan távol helyezkednek el

2. Térfogata elenyésző a teljes enziméhez képest
A fehérjeszerkezet jelentős része váz- (scaffold) funkcióval bír



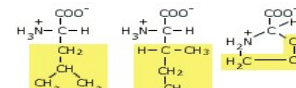
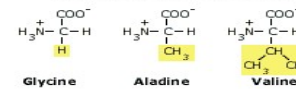
Why are enzymes so big??

Kémia:
Próbáljunk ebből tanulni
Szupramolekuláris
katalízis

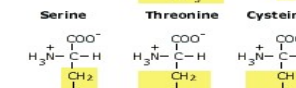
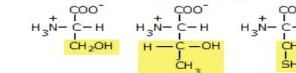
9

Aminosavak: oldallánc és főlánc

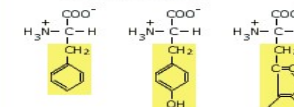
Nonpolar, alphabetical R groups



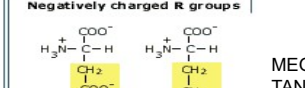
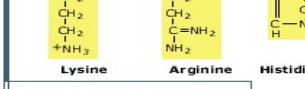
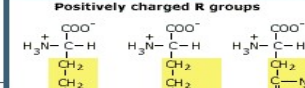
Polar, uncharged R groups



Aromatic R-groups

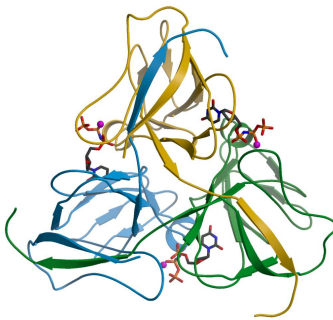


Positively charged R groups



MEG KELL
TANULNI
MEG KELL
ÉRTENI

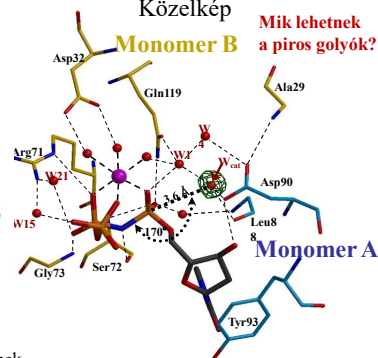
Madártávlat



3 fehérjelánc: kék, zöld, sárga szalag
három ligandum: golyó-pálcika/atomi színek

Barabás O, Pongrácz V, Kovári J, Wilmanns M, Vértessy BG.
JBC. 2004;279(41):42907-15

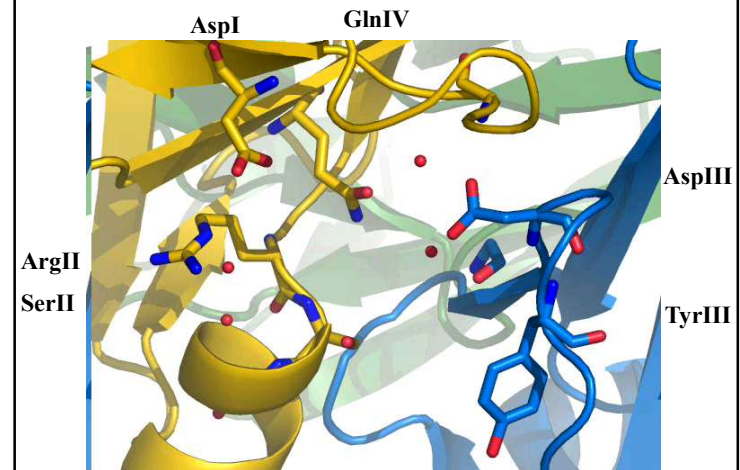
Közelkép
Monomer B Mik lehetnek a piros golyók?



Ligandum koordinálása: golyó/pálcika
atomi színek, Mg lila

ATOMI SZÍNEK:
Kék: nitrogén, piros: oxigén

dUTPáz mechanizmus: atomi mozi



Gyenge másodlagos kölcsönhatások összessége

Hidrogén-híd kötés

Hidrogén donor
Hidrogén akceptor

Hol vannak ilyen csoportok a fehérjékben?

Hidrofób effektus
Az energianyereség a víz entrópiájának növekedéséből származik.

van der Waals kötések

π - π kölcsönhatás

DNS kettős hélix
Trp, Phe, Tyr

13

Gyenge másodlagos kölcsönhatások összessége

Kovalens és ionos kötés összehasonlítása

atoms

SHARING OF ELECTRONS

TRANSFER OF ELECTRON

molecule

positive ion

negative ion

covalent bond

ionic bond

Figure 2.6 Essential Cell Biology, 2/e. © 2004 Garland Science

Ligand kötés modellek

Kulcs-zár hipotézis (E. Fischer, 1894)

Substrate

Active site

Enzyme

ES complex

15

Ligand kötés modellek

Indukált-illeszkedés ("induced-fit") (D. Koshland, 1958)

Substrate

Enzyme

ES complex

16

Ligand kötés modellek

Illeszkedés lehetőségek

Kulcs-zár

Induced fit

Fluktuációs fit
Straub, 1960
(aka „conformational selection”)

Vertessy, Orosz, Bioessay, 2011

17

ENZIMKINETIKA



Sokaság-
megközelítés

Kinetika: sebességi egyenletek írják le a komponensek megjelenését és eltűnését.

- Alapvető biomézői ismeretanyag része
- Biomézői műveletek (Sevella Béla)

18

MICHAELIS-MENTEN megközelítés

Kezdeti sebesség feltétele

Feltétel :
(ES) komplex stabil, mérés körülményei alatt [EP] nem halmozódik fel

Megoldás:
A termék keletkezés, kezdeti, lineáris szakaszán mérünk, t=0 pontra extrapolált egyenest illesztünk-> V₀, kezdeti sebesség ; [P] -> 0

$$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} E + P$$

$$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Szépséges görbék, de mi a valóság?¹⁹

MICHAELIS-MENTEN megközelítés

Rapid equilibrium

- **Feltételek:**
 - egy szubsztrát (ha több, egy változik, a többi állandó)
 - [S] >> [E_{total}]
 - T, pH, μ (ionerő) állandó
 - ES komplex gyors képződése: k₂ << k₁[s] , k₋₁

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

$$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

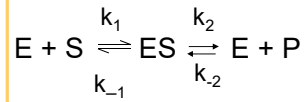
$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

$$V = d[P]/dt = k_2[ES]$$

$$V_{\max} = k_2 E_0$$

20

BRIGGS-HALDANE megközelítés kvázi steady-state állapot

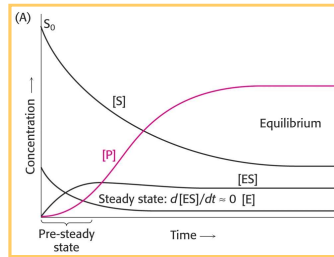


+ feltétel: kvázi steady-state állapot

Rövid felfutási szakasz után az [ES] mennyisége kevésbé változik.
d[ES]/dt ≈ 0

$$K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$$

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$



21

Kinetikai paraméterek jelentése I.

V_{max}: maximális reakciósebesség, amikor minden enzim aktív hely telített

$$V \rightarrow V_{max} \quad [S] \rightarrow \infty$$

$$[V_{max}] = M^{-1} \cdot s^{-1} \text{ enzim koncentráció függés}$$

k_{cat} = V_{max}/E₀ katalitikus állandó/átviteli szám (turnover number)

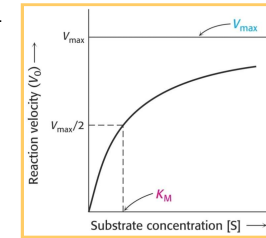
egy enzim molekula által adott időegység alatt

átalakított szubsztrátmolekulák száma.

$$[k_{cat}] = s^{-1} \text{ enzim koncentrációtól}$$

független mennyiség

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$



22

Kinetikai paraméterek jelentése II.

K_M: Michaelis állandó

[K_M] = M ; koncentráció dimenziójú mennyiség

az enzim affinitását mutatja a szubsztráthoz

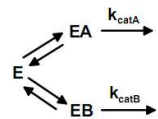
K_M a V_{max}/2-hoz tartozó [S]

Ha (!) k₂ << k₁, K_M ≈ K_s, ebben az esetben disszociációs állandóra jellemző

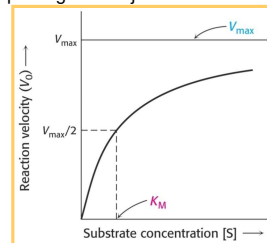
k_{cat}/K_M: katalitikus hatékonyság

$$[k_{cat}/K_M] = M^{-1} \cdot s^{-1}$$

az enzim szubsztrát felhasználási képességét mutatja

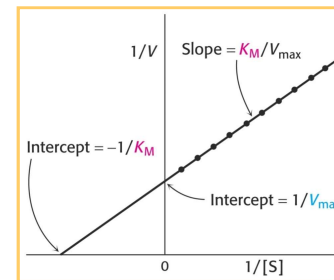


$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

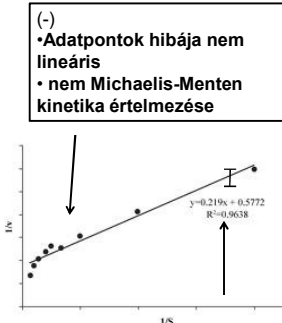


23

Kinetikai állandók meghatározása: kettős-reciprok (Lineweaver-Burk) ábrázolás



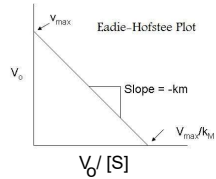
(+) Egyszerű, átlátható,
Könnyen számítható paraméterek.



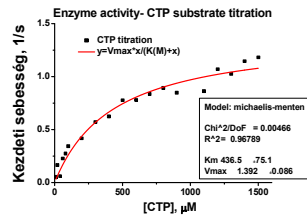
A reciprok ábrázolás felnagyítja a hibát

24

Hibanövekedés kikerülése: Eadie-Hofstee ábrázolás



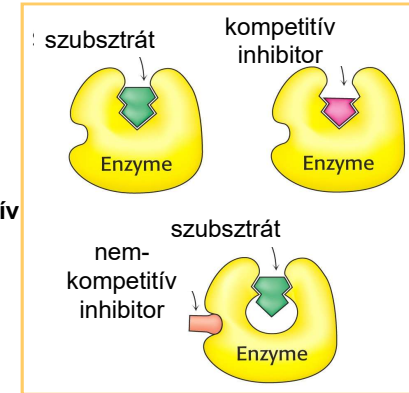
Megbízható kinetikai paraméterek nyerése: v/[S] görbe regressziós függvényel illesztése



25

ENZIMGÁTLÁSOK

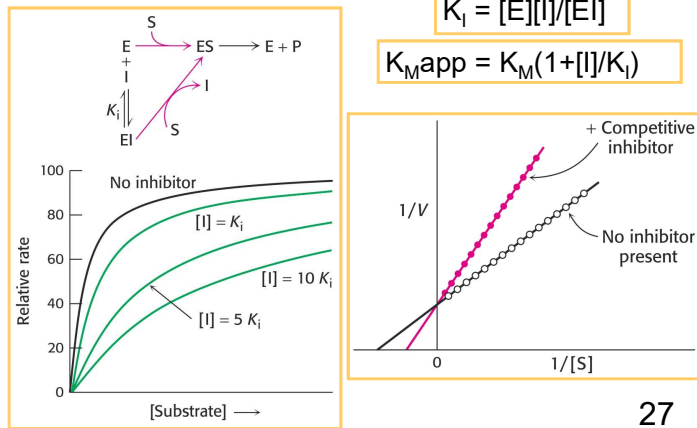
- **reverzibilis**
 - **kompetitív**
 - ES v. EI
 - **nem kompetitív**
 - ESI
 - **kevert ("is-is")**
 - **unkompetitív**



26

Kompetitív gátlás: versengés a kötőhelyen

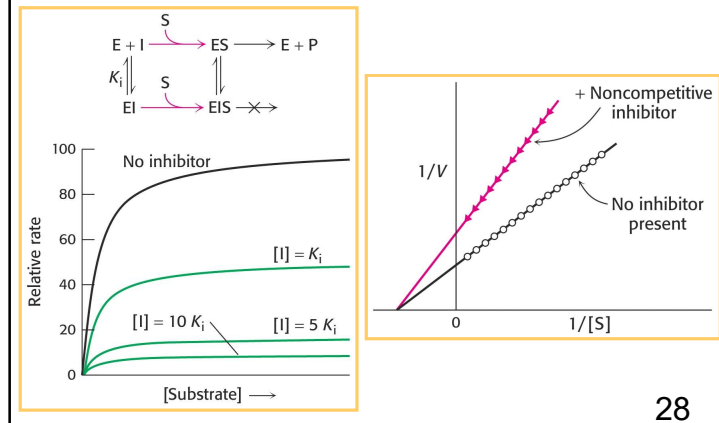
– K_M^{app} növekszik, V_{max} változatlan



27

Nem-kompetitív gátlás

– V_{max} csökken, K_M nem változik



28

Unkompetitív „enzimsubstrát” inhibíció

Specifikus kötődés az ES komplexhez
 V_{max} és K_M is csökken

$$E + S \xrightleftharpoons{K_S} ES \xrightarrow{k_p} E + P$$

$$ES + I \xrightleftharpoons{K_i} ESI$$

29

Irreverzibilis gátlószerek (ált. kovalens kötés)

– oldallánc specifikus reagensek

- Ser + organofoszfátok: diizopropil-fluorofoszfát (DFP), szarin és tabun (ideggázok), parathion (inszekticid)

acetilkolin-észteráz;
Ser-proteázok

inaktív enzim

30

Kooperativitás

Kooperativitás:
 Ligand bekötése befolyásolja a következő ligand kötődését az **aktív helyen**

Pozitív/negatív kooperativitás
 Könnyebb/nehezebb második ligand kötődés

Homotróp/heterotróp kooperatív hatás
 Azonos/más második ligand kötődését befolyásolja

31

Szubsztrátkötés negatív kooperativitása

A glicerol-3-foszfát citidililtranszferáz **homodimer** enzim

Titrlás a két szubsztráttal (CTP, G-3P)

második szubsztrát kötődése csupán magas [L] esetén

Homotróp kooperatív hatás „1.” CTP-> „2.” CTP
Heterotróp kooperatív hatás lenne „1.” CTP-> „2.” G-3P

Stevens Nat Struct Biol. 2001
 Sanker J Biol. Chem. 2001

32

Alloztéria görög „más hely”

Alloztérikus hatás:

Egy **effektor** (nem aktív hely) **kötőhelyhez** koordinálódó ligandum kötődése befolyásolja egy következő ligandum kötődését vagy átalakításának katalizisét

alloztérikus modulátorok típusai:

Homotróp: saját ligand
Heterotróp: nem saját ligand

Alloztérikus modulátorok típusai:

Pozitív: aktivátor molekula
Negatív: inhibitor molekula

33

Aspartate transcarbamoylase (ATCase)

Alloztérikusan szabályzott enzim

CTP végtermék gátlása:
Feedback inhibíció:
A végtermék a saját szintézisét befolyásolja

A CTP és a saját szubsztrátok
Szerkezetileg különbözőek:

Alloztérikus CTP kötőhely jelenléte

34

Alloztérikus hatás leírása modellekkel

a) Együttműködő
 ("concerted")
 MWC, Monod, Wyman, Changeux (1965)

b) Szekvenciális
 Koshland (1966)

ELMÉLET SZÉP

GYAKORLATBAN HOGYAN KÜLÖNBÖZTETJÜK MEG EZEKET?

35

Esettanulmány: Molekuláris részletek a szabályozás háttérben

MIOGLOBIN ÉS HEMOGLOBIN

- Globin család: O₂ tárolás (Mb) és szállítás (Hb)
- Hem (Fe²⁺-protoporfirin IX) proszтетikus csoport

porfirin gyűrű

Fe²⁺ : hat koordinációs hely

hem

36

A két fehérje alegységei hasonlóak

mioglobin (153 a.s.) hemoglobin β-lánc (146 a.s.)

Monomer Tetramer ($\alpha_2\beta_2$)

37

Oxigén kötés a hem prosztetikus csoportnál

- O_2 kötés hidrofób zsebbe – fehérje légzés segítségével
- oxigenáció → színváltozás (vénás és artériás vér)
- CO, NO mérgezés

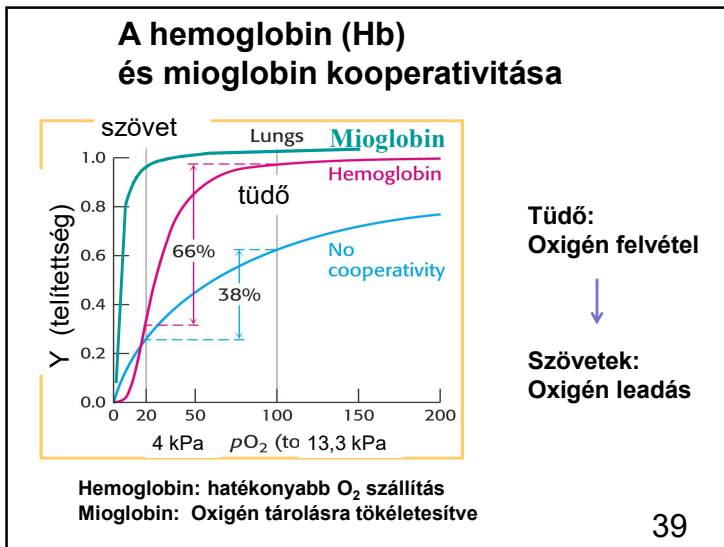
Milyen aminosav? Phe CD1

Milyen atom? O₂

(a)

(b)

38



• A Hb kooperativitás molekuláris alapja I

- Kötőhelyek közötti kommunikáció
- O_2 -kötés → konformációváltozás (4° szerkezet)
- Fe^{2+} hem síkba rendeződik (0,4 Å)

$\alpha_1\beta_1-\alpha_2\beta_2$ interface

Deoxyhemoglobin

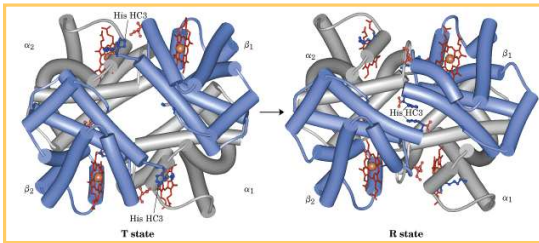
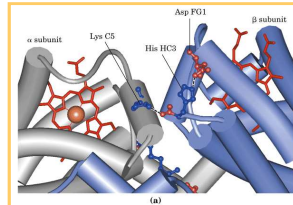
Oxyhemoglobin

Szerkezeti változás továbbterjedése: koordináló His, majd alfa-hélix

40

A Hb kooperativitás molekuláris alapja II

- **T → R konformációs átmenet** ("tense", "relaxed")
 - T: alacsony O₂ affinitás;
 - R: magas O₂ affinitás
 - T-állapot: extra sóhidak stabilizálnak: Lys - Asp



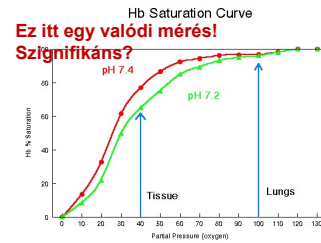
15°-os elfordul a monomer a többiekhez képest

41

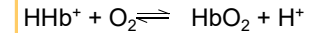
A Hb oxigénszállítás finomhangolása I

Bohr effektus: pH szerepe

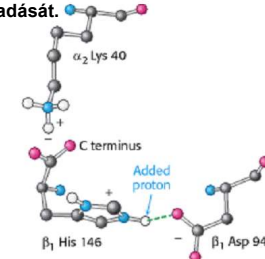
pH különbség CO₂ fokozza az O₂ leadást a szövetekben



Ez itt egy valódi mérés!
Szignifikáns?



Izommunka szén-dioxidot, protonot (és tejsavat) termel – ez segíti a hemoglobin oxigén leadását.

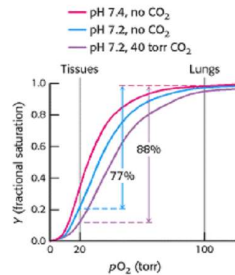


His146 protonált állapotban sóhidat képez, ezzel stabilizálva a deoxiHb konformációt
Mi is az a „protonált” állapot?
Hogyan is függhet ez a pH-tól?
Egysúlyok!

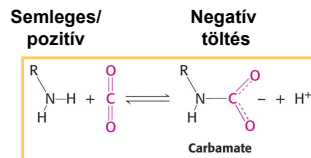
42

A Hb oxigénszállítás finomhangolása II

Bohr effektus: CO₂ szerepe



CO₂ jelenlét elősegíti az O₂ leadást a szövetekben

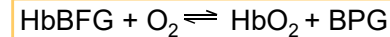


A CO₂ a terminális aminosocportokkal képes reagálni, karbamátot képezve.

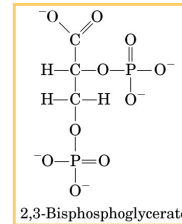
43

A Hb oxigénszállítás finomhangolása III

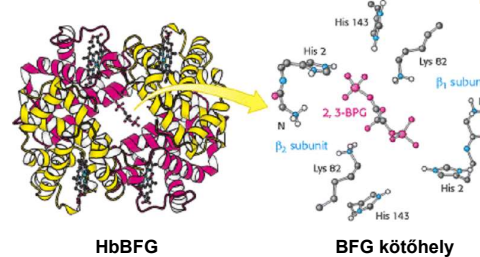
Biszfoszfoglicerát (BPG) szerepe



A BPG stabilizálja a deoxiHb konformációt, gyengítve ezzel az oxigénaffinitást és növelve az O₂ leadóképességet.



Honnan jön ez a 2,3BPG?



O₂Hb állapotban a BPG kötőhely eltűnik

Hány darab BPG / hemoglobin?

44

A Hb oxigénszállítás finomhangolása IV Magzati Hb (fHb) oxigénfelvétele

A magzat hatékonyan fel tudja venni az O₂-t az anyai vérből.

- Magzati Hb ($\alpha_2\gamma_2$)
 - γ : His143Ser
 - 2 + töltéssel kevesebb
 - a BPG kötőhelyen

Kevesbé stabilizált deoxiHb állapot

45

Hb alloszterikus regulációja (összefoglalás)

- homotróp effektor: O₂ (kooperativitás)
- heterotróp effektorok: H⁺, CO₂, BFG
- Szigmoid jellegű kötődési görbe (nem Michaelis-hiperbola)
- O₂ affinitás csökkentése szövetekben (R → T)
- allosztéria modellek: a két tiszta határeset közt van.

a) Együttműködő ("concerted")
MWC, Monod, Wyman, Changeux (1965)

b) Szekvenciális
Koshland (1966)

46

Összefoglalás Enzimszintű szabályzási stratégiák

- Molekuláris felismerés alapjai:
 - o másodrendű kölcsönhatások
- Ligand kötődési modellek:
 - o kulcs-zár, induced-fit, konformációs szelekció
- Enzim kinetika:
 - o Michaelis-Menten modell, kinetikai paraméterek
- Reverzibilis, irreverzibilis inhibíció; feedback inhibíció
- Allosztérikus szabályzás, kooperativitás
 - o Hemoglobin

47

Ajánlott irodalom:

10. fejezet (regulatory strategies)

48