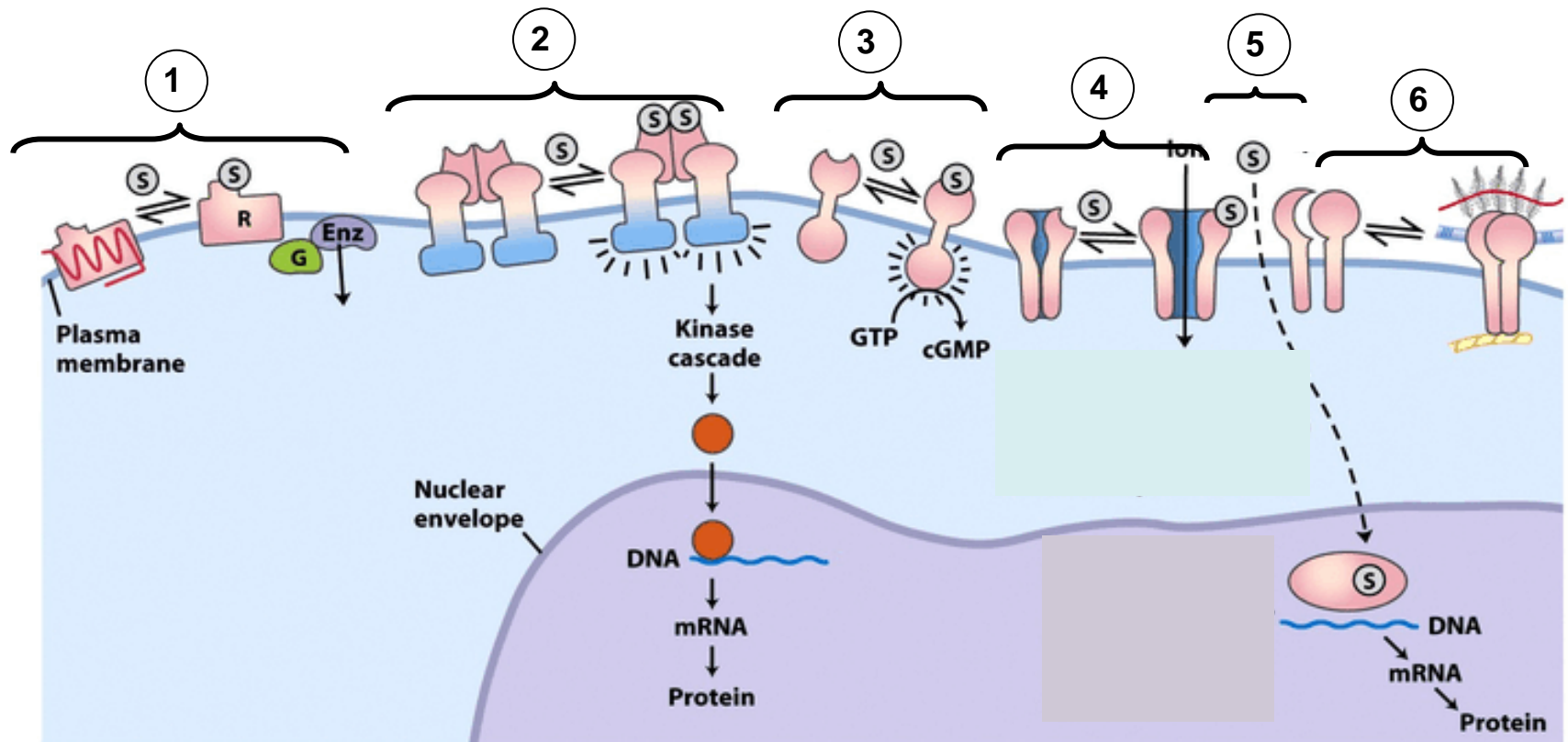


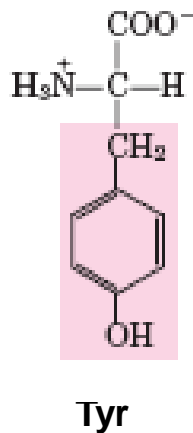
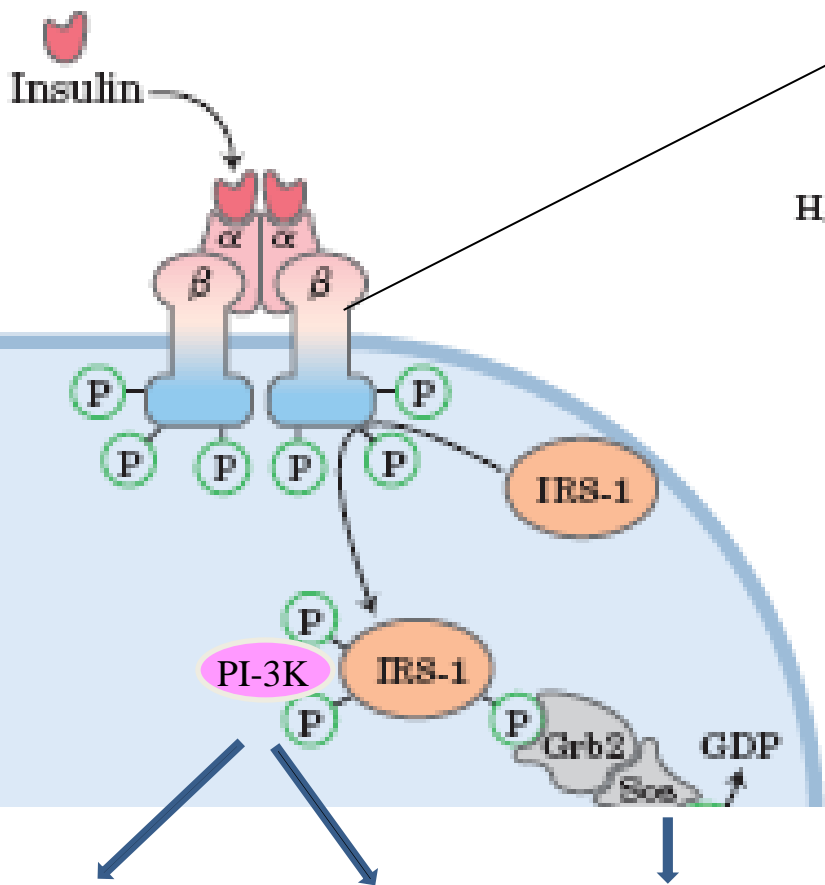
Evkariontske celice: 6 vrst mehanizmov prenosa signala

(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 $2\alpha, 2\beta$

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.

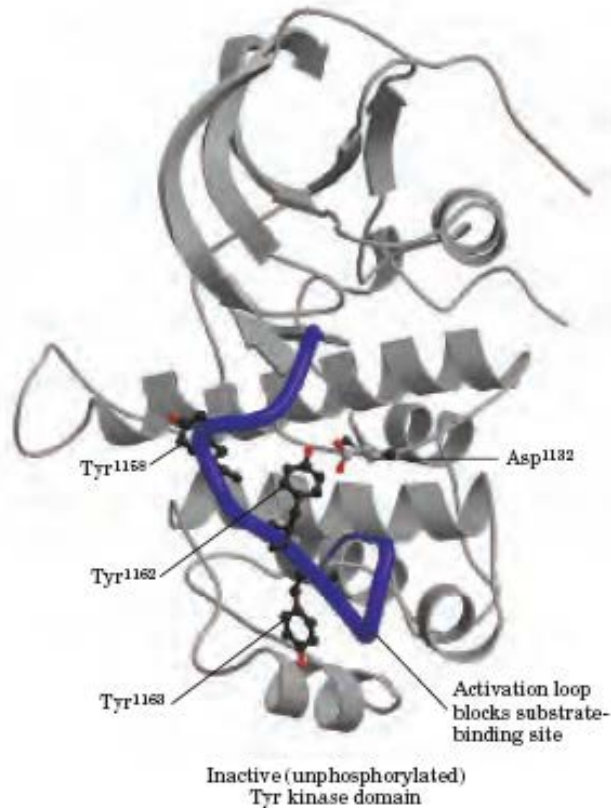
premik transporterja za glukoza

aktivacija encimov

aktivacija genov (sinteza proteinov)

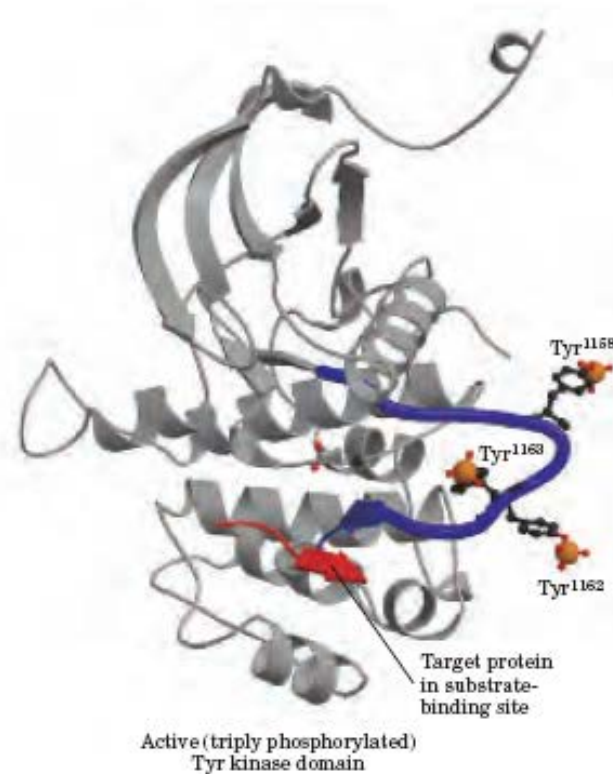
Aktiviranje inzulinskega receptorja – tirozinske kinaze z avtofosforilacijo → sprememba konformacije

Neaktivna domena tirozinske kinaze



Tyr zaščit

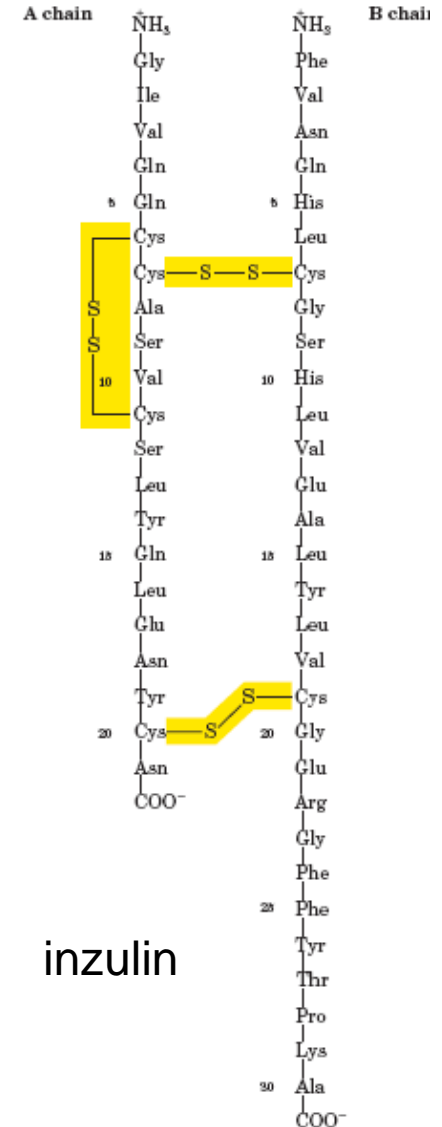
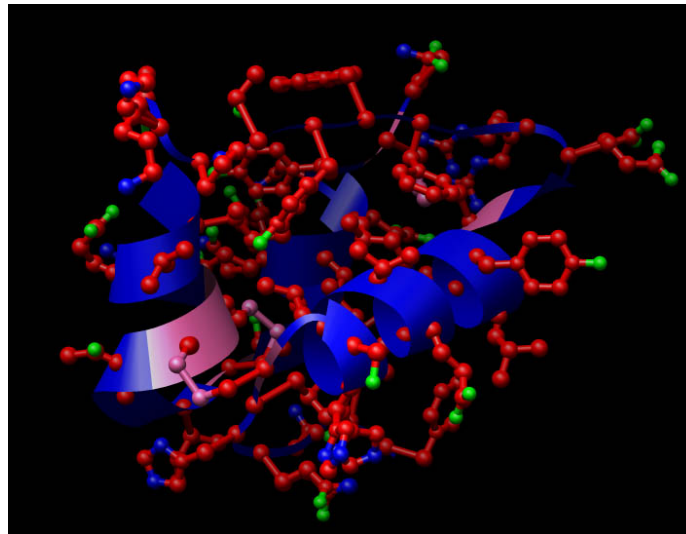
Aktivna domena – 3 tyr ostanki fosforilirani



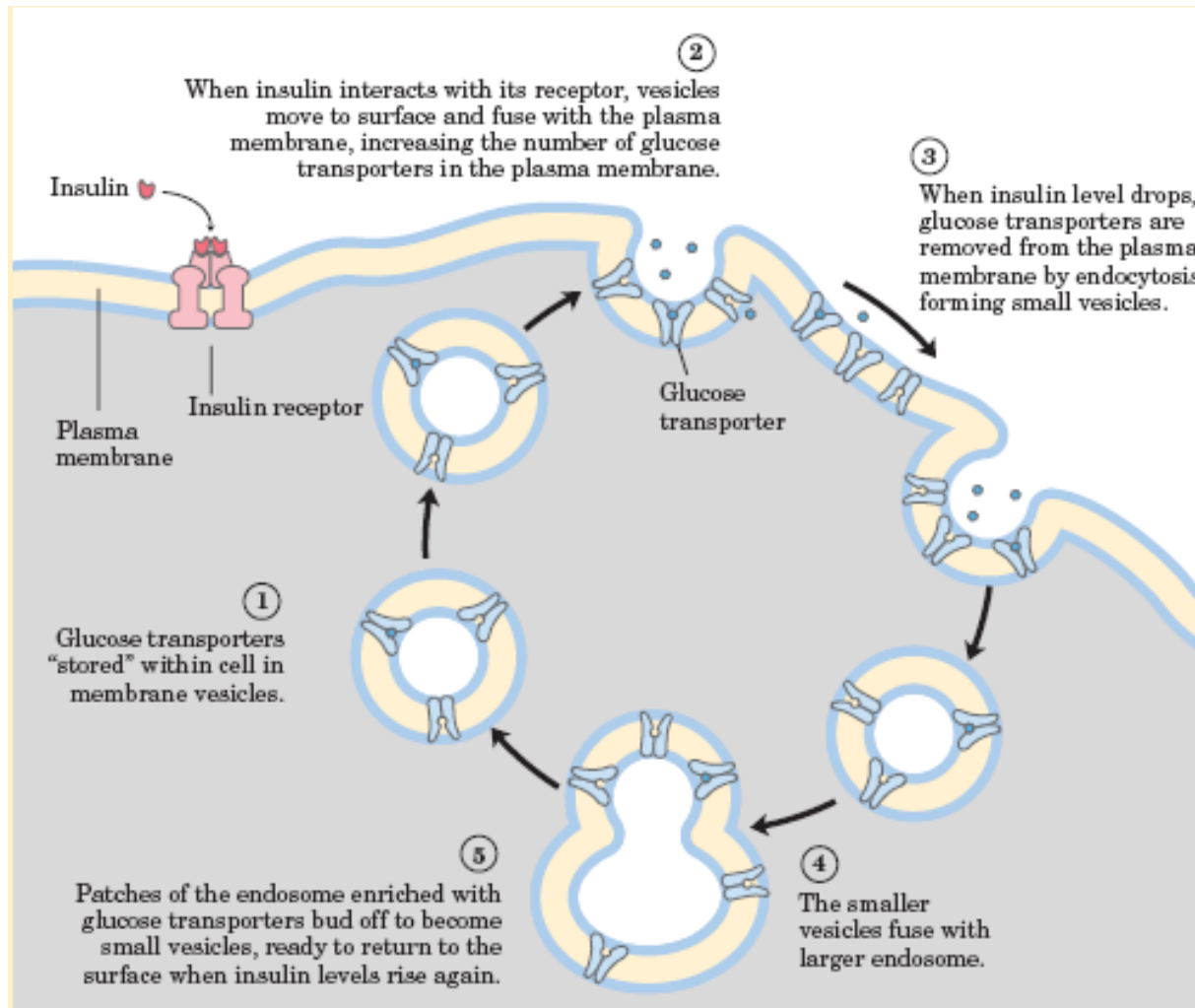
Tyr prost - fosforilacija

Osnovni učinki inzulina

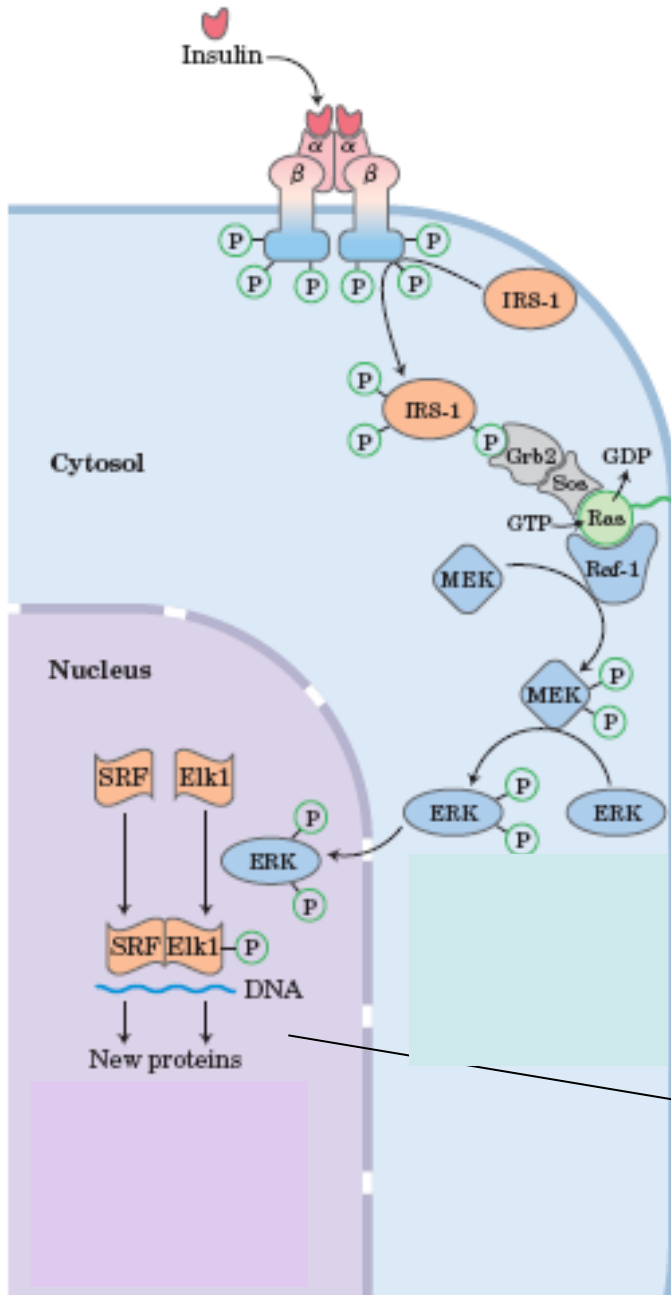
- Hitri (sekunde): pospešen transport glukoze, AK in K^+ v celice, občutljive na inzulin
- Srednje hitri (minute):
 - stimulacija sinteze, inhibicija razgradnje glikogena
 - stimulacija sinteze, inhibicija razgradnje proteinov
 - stimulacija razgradnje, inhibicija sinteze glukoze
- Kasnejši (ure): povišana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




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



Uravnavanje izražanja genov z inzulinom (počasni učinek)



 **IRS-1 insulin receptor substrat**

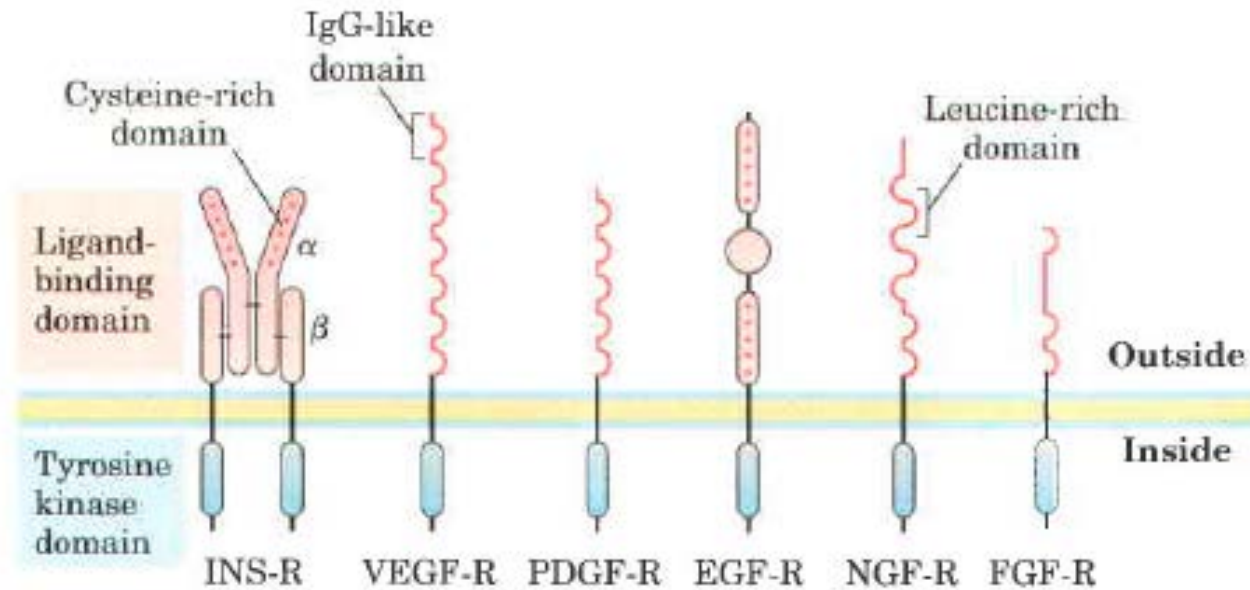
 **kinaze**
inzulinski receptor
Raf
MEK
ERK

 **Ras G protein**

 **transkripcijski faktor**

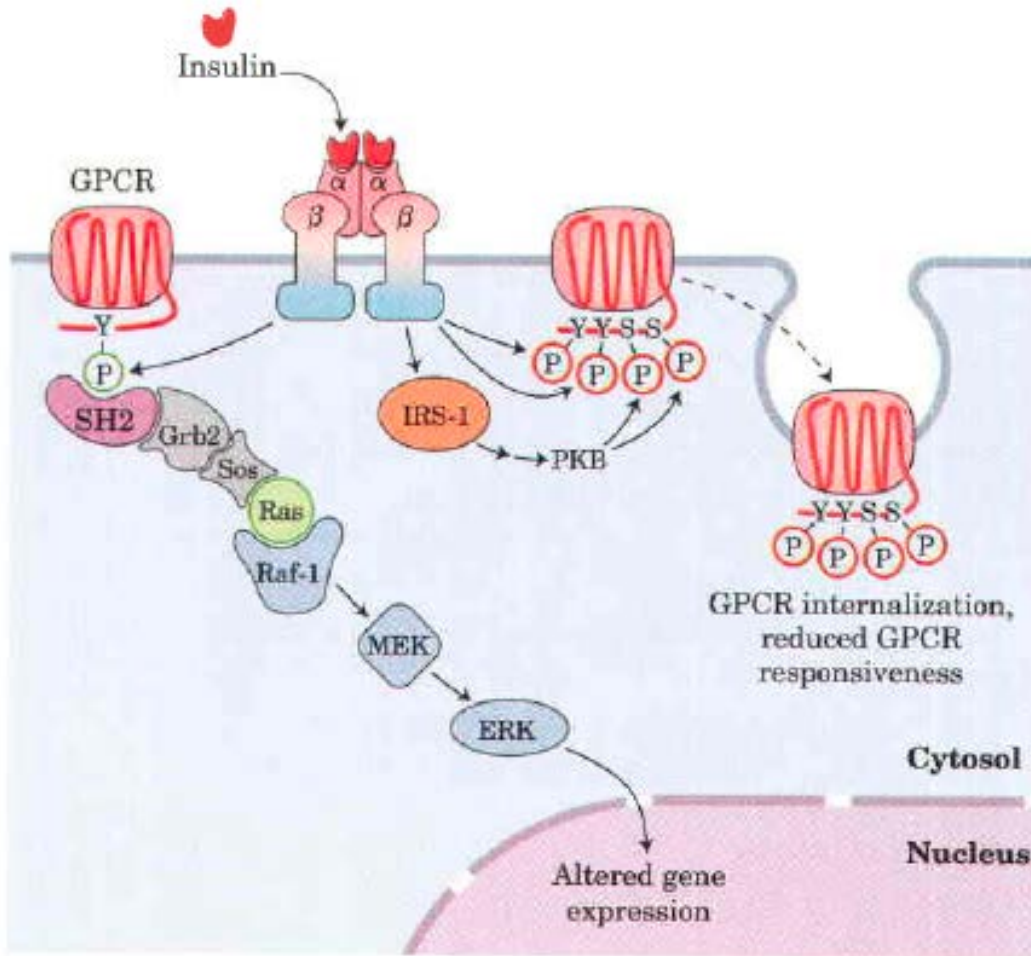
Prepisovanje genov, ki kodirajo encime, vključene v metabolizem glukoze

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

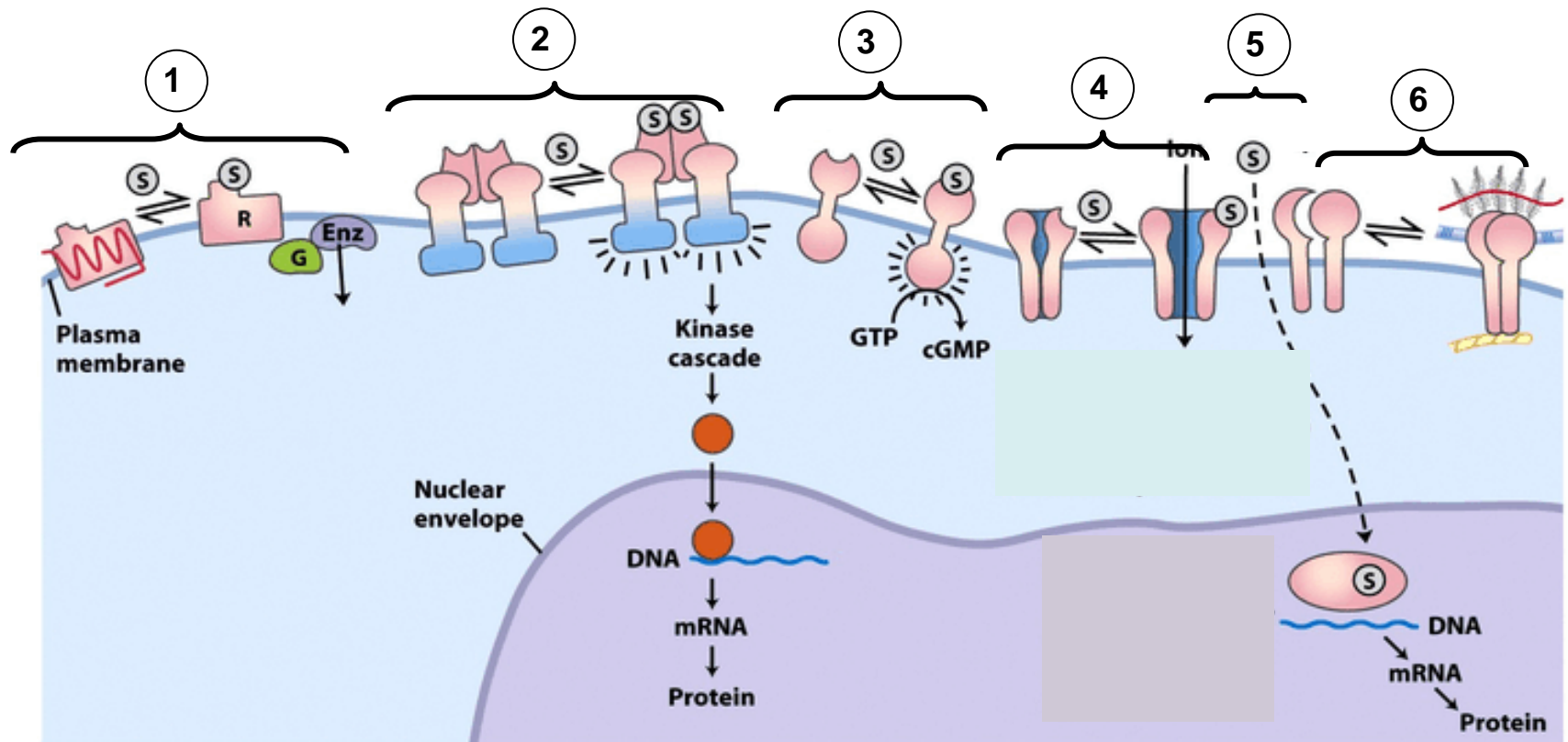


- Insulin je signal, ki preko fosforilacije adrenergičnega receptorja povzroči :
- 1) zmanjšanje odzivnosti na adrenalin;
 - 2) Spremenjeno izražanje genov preko Ras signalne poti.

Evkariontske celice: 6 vrst mehanizmov prenosa signala

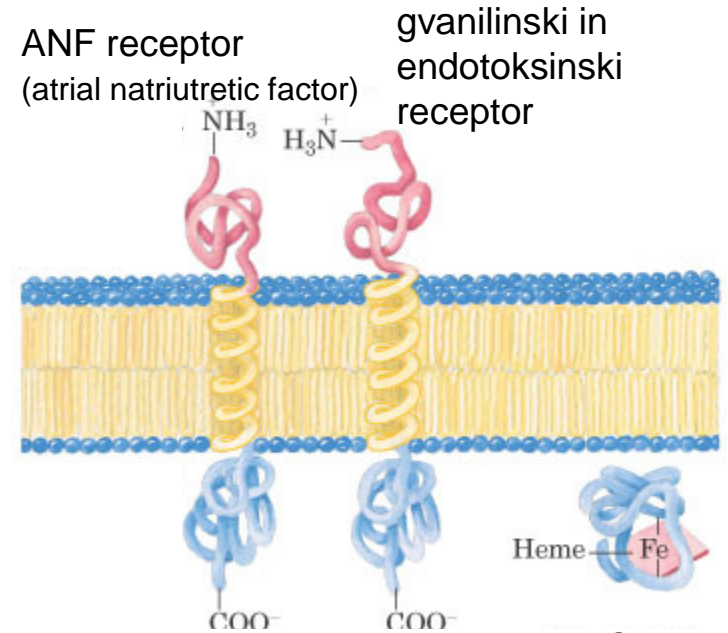
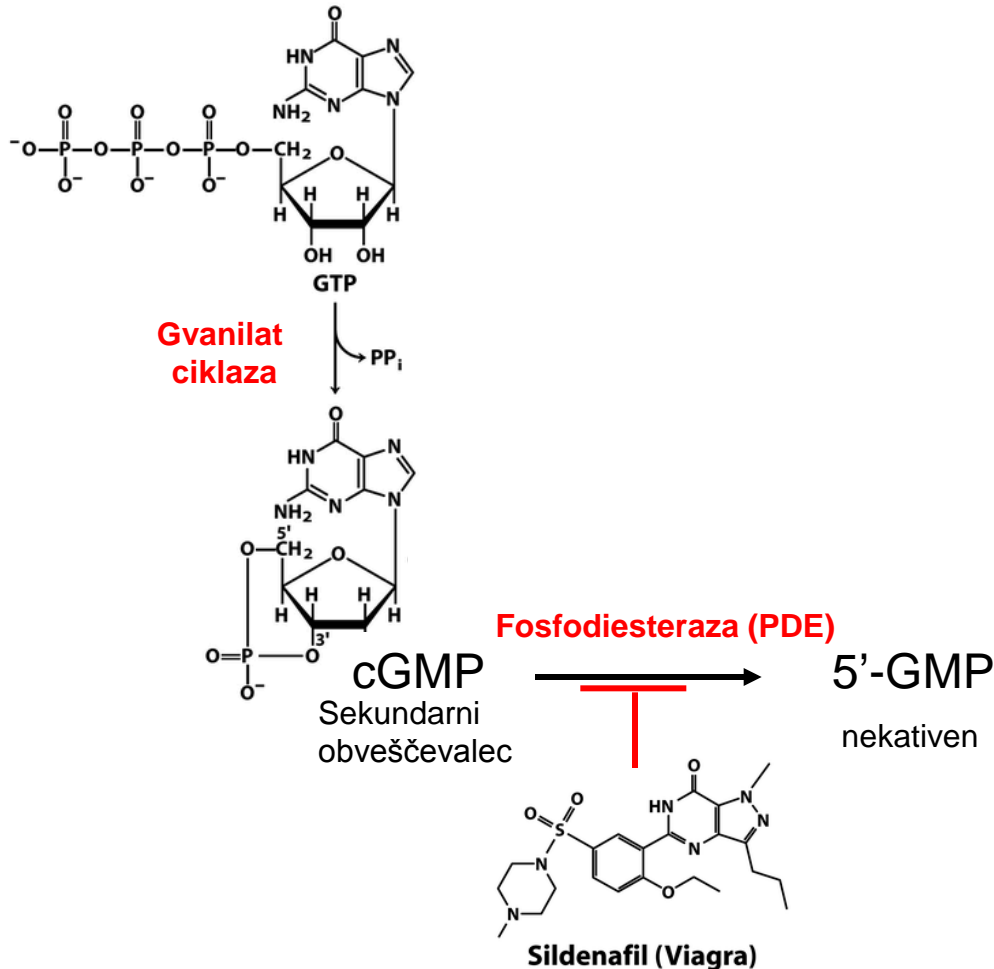
(Lehninger 2008)

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

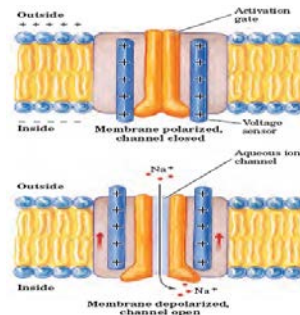
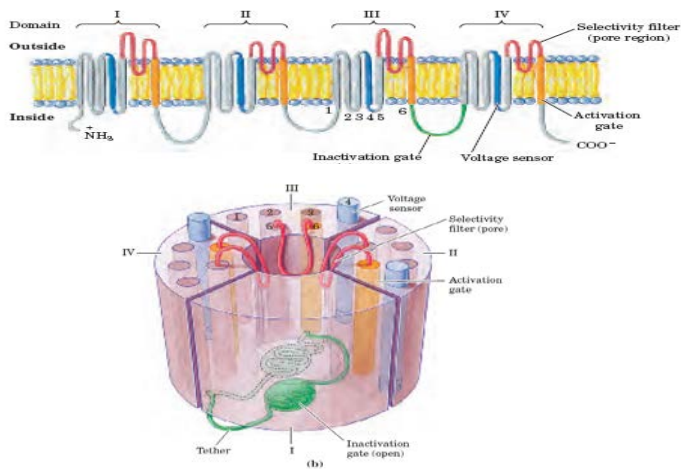
- **ionski kanalčki, odvisni od napetosti**

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

- **ionski kanalčki, odvisni od liganda**

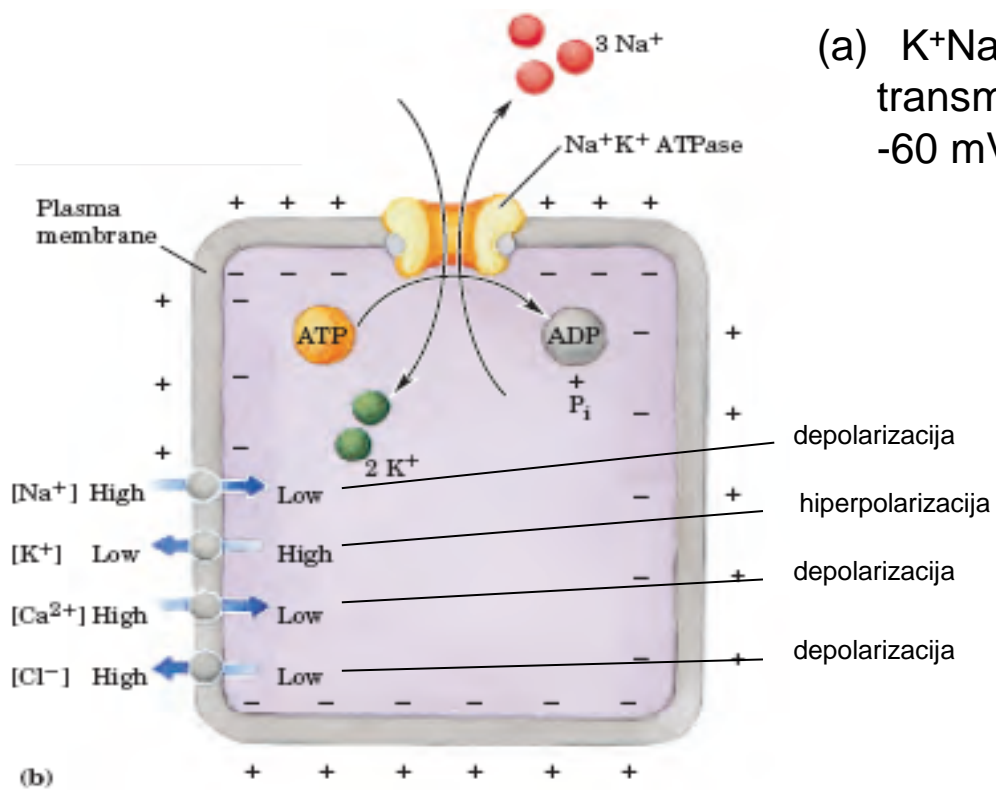
primer: acetilholinski receptor

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 AK ostankov)

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



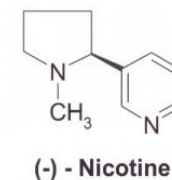
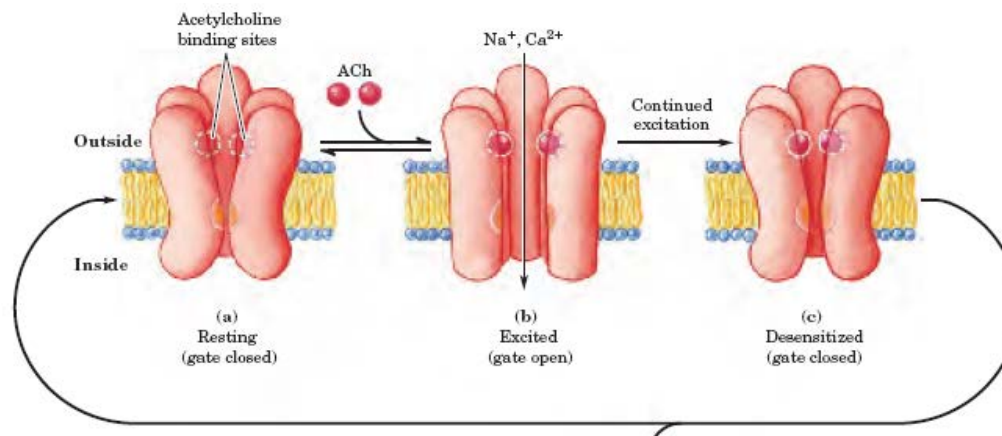
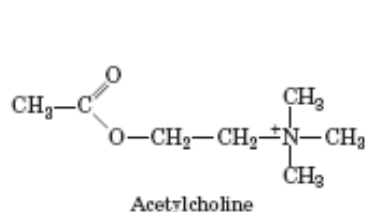
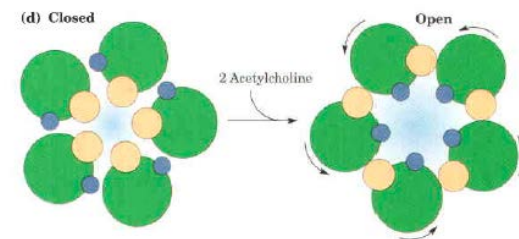
(a) $\text{K}^+\text{Na}^+\text{ATPaza}$ ustvarja transmembranski potencial -60 mV

Če se kanalčki odprejo – sprememba v membranskem potencialu!!

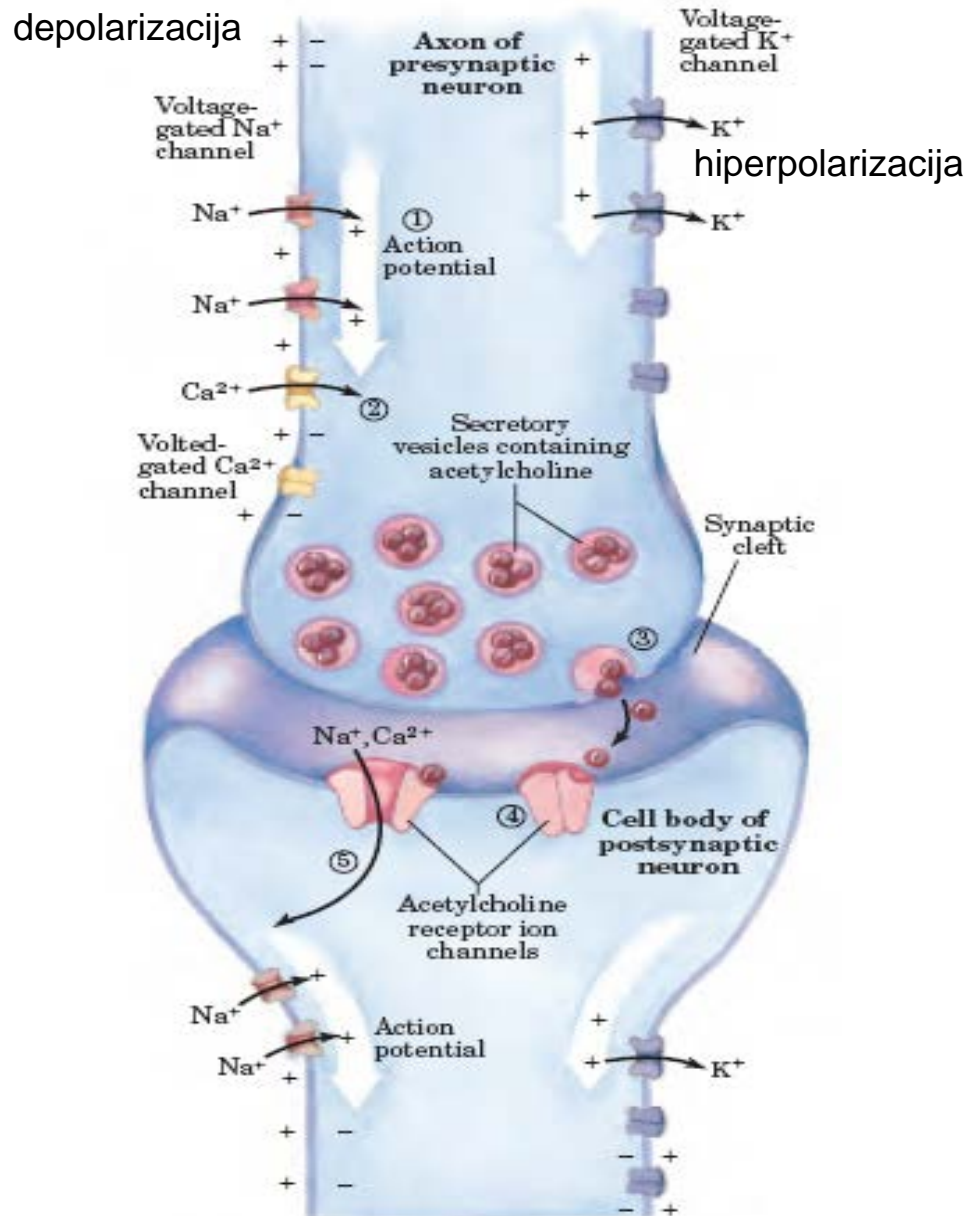
(b) Ioni težijo h gibanju v smeri elektrokemijskega gradienta skozi polarizirano membrano – spremembe transmembranskega potenciala

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 membrane
- 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



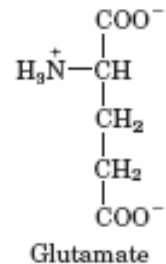
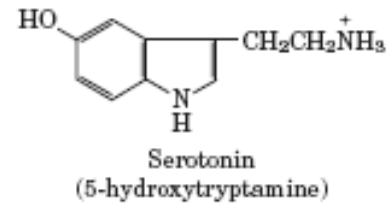
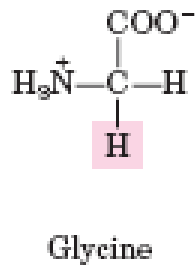
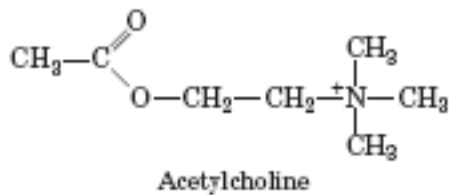
Ionski kanalčki za zaporo so ključni pri prenosu živčnega impulza



- 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

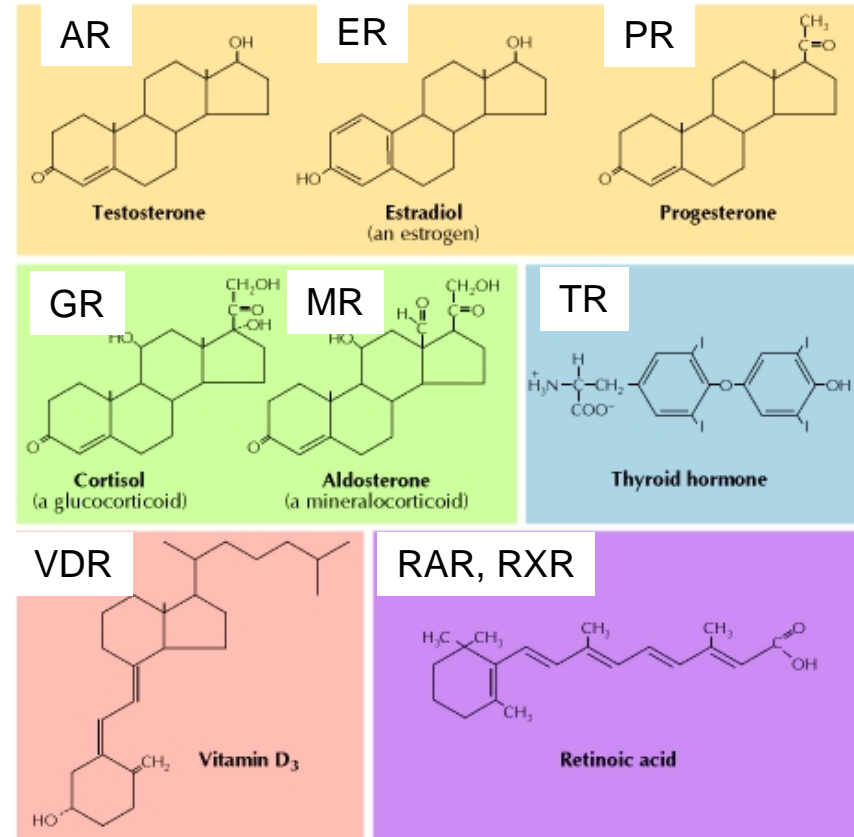
Nevroni vsebujejo ionske kanalčke (receptorje), ki se odzivajo na različne neurotransmiterje

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



5. Signaliziranje preko jedrnih receptorjev

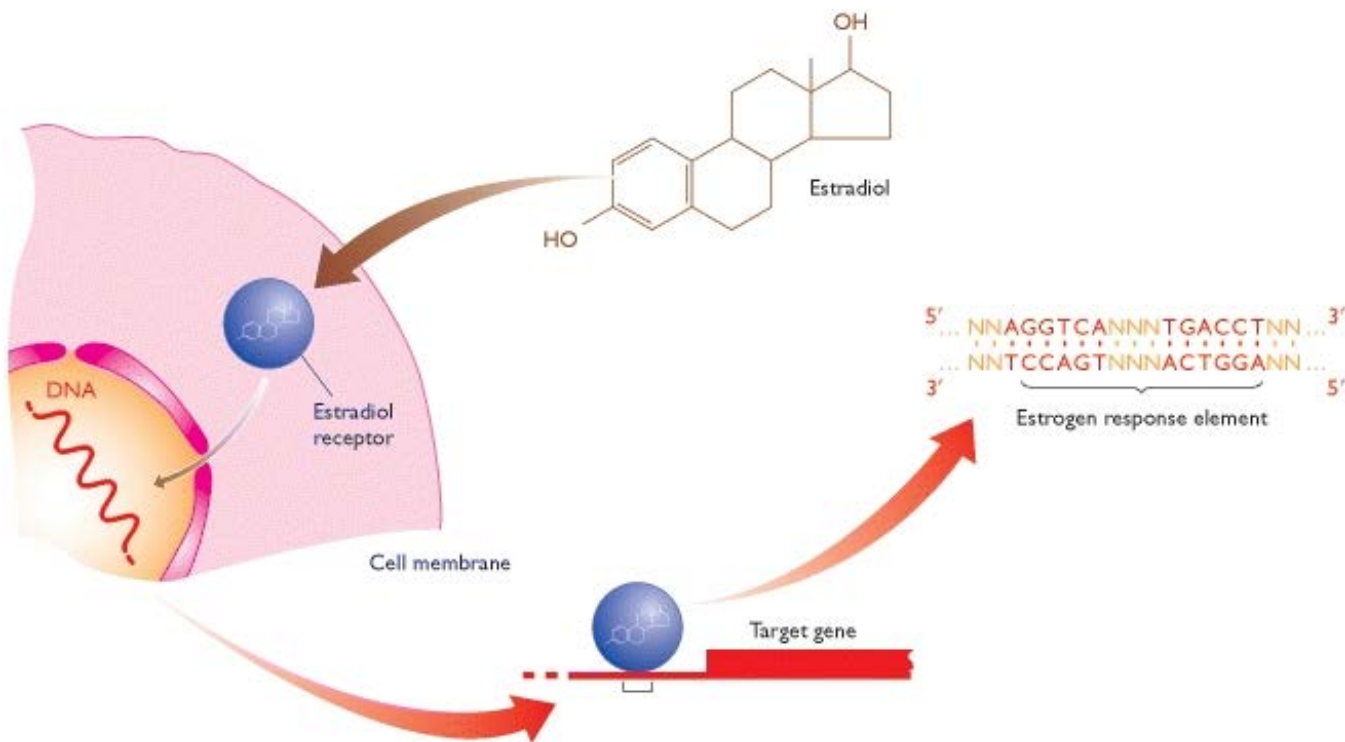
- **Lipidotopni hormon** sproži biološki odgovor v odzivnih tkivih, ki vsebujejo jedrne receptorje za hormon
- Hormon se veže na receptor z visoko afiniteto ($K_d \approx 10^{-9}$ M) in specifičnostjo v kompleks hormon-receptor
H + R = H-R
- Ob vezavi hormona se receptor konformacijsko spremeni, odkrije 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!!

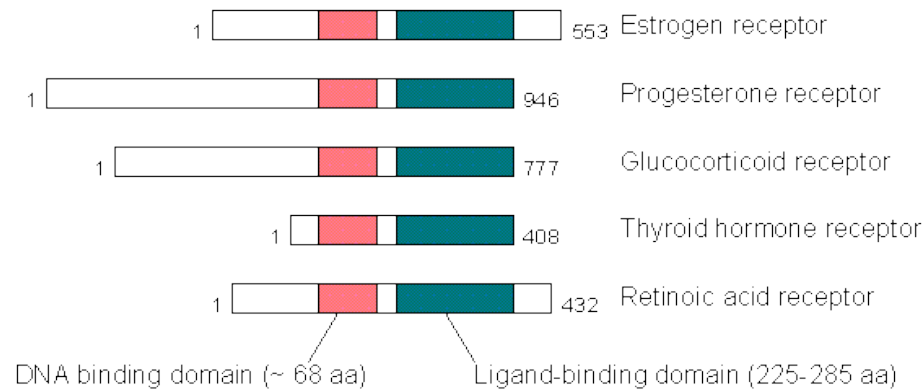
Lipidotopni hormoni lahko delujejo tudi preko receptorjev na plezmemki membrani.

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

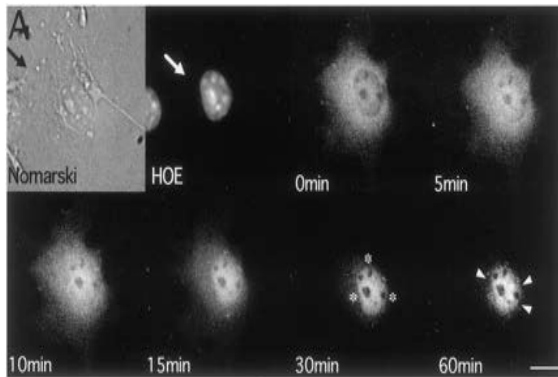


Primer delovanja estrogenskega receptorja po jedrnem mehanizmu (počasen odgovor).

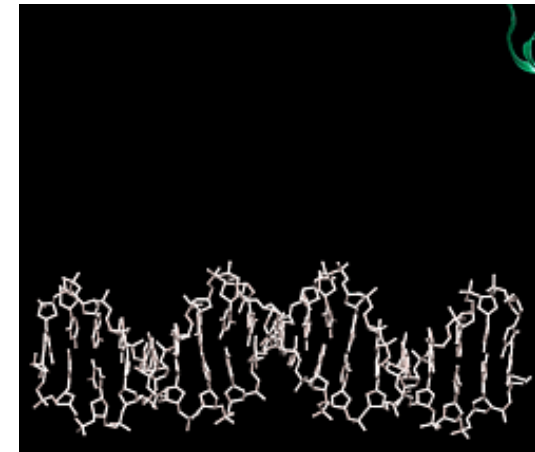
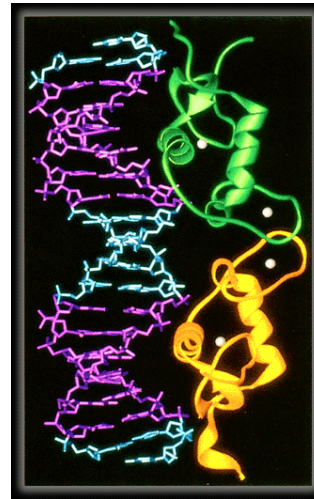
Jedrni receptorji so DNA vezavni proteini, ki vsebujejo DNA vezavno domeno Zn prstov



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

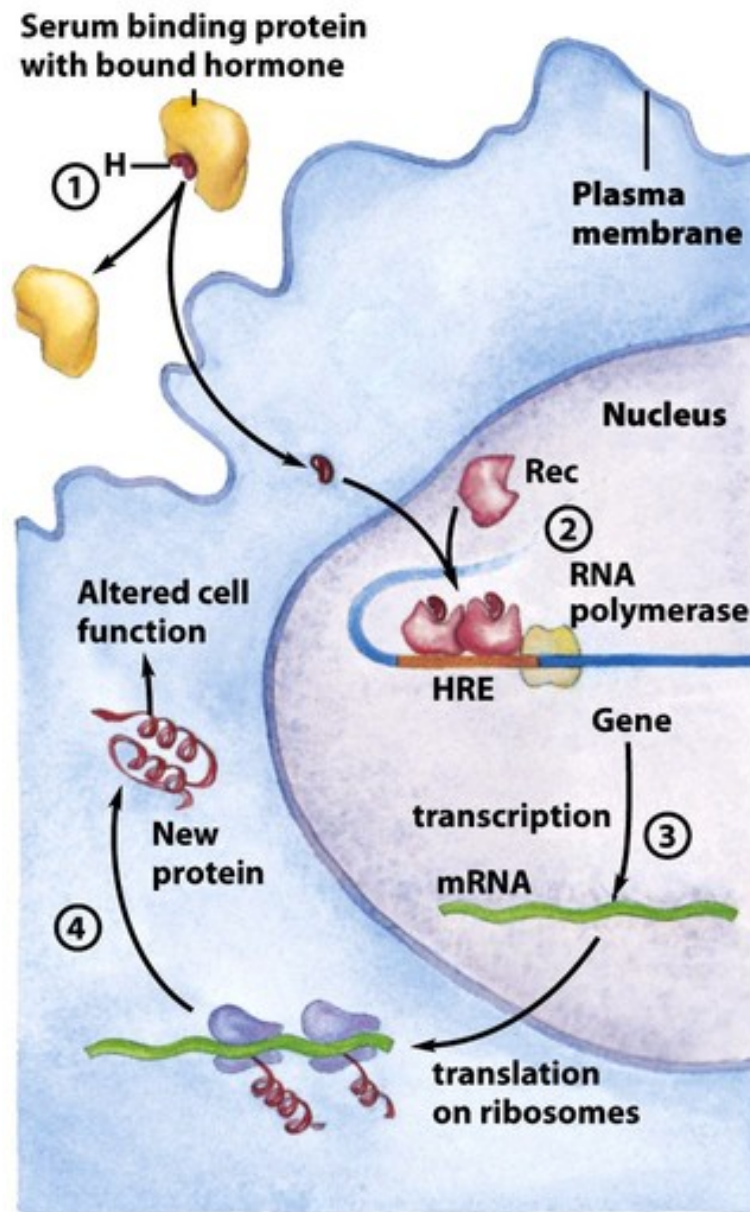


Ligand (kortikosteron) sproži prehod MR v jedro



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 onkogenezo

Protoonkogeni se lahko pretvorijo v onkogene zaradi zunanjih dejavnikov

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

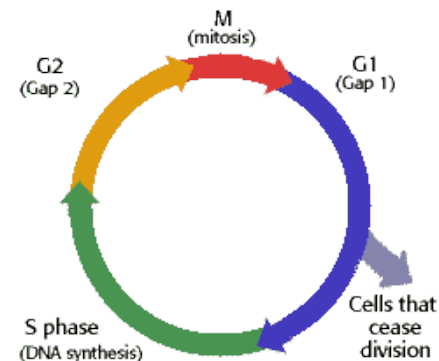
Napake v onkogenih ali tumor zaviralnih genih lahko tudi podedujemo.

Onkogeni kodirajo

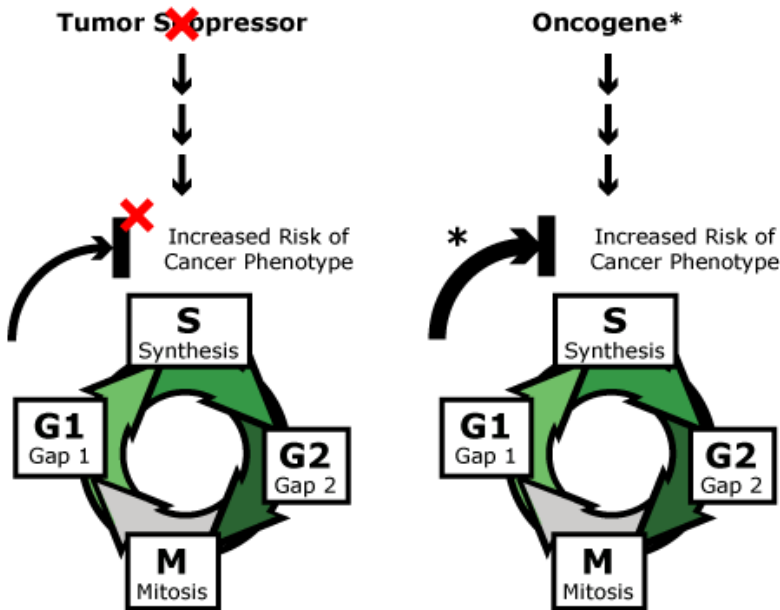
- Rastne faktorje
- Membranske proteine - **receptorje za rastne faktorje**
- Citoplazemske proteine
 - **G proteine (Ras)**
 - **Proteinske kinaze**
 - **Jedrne transkripcijske faktorje**, ki so ključnega pomena za delitev celice

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



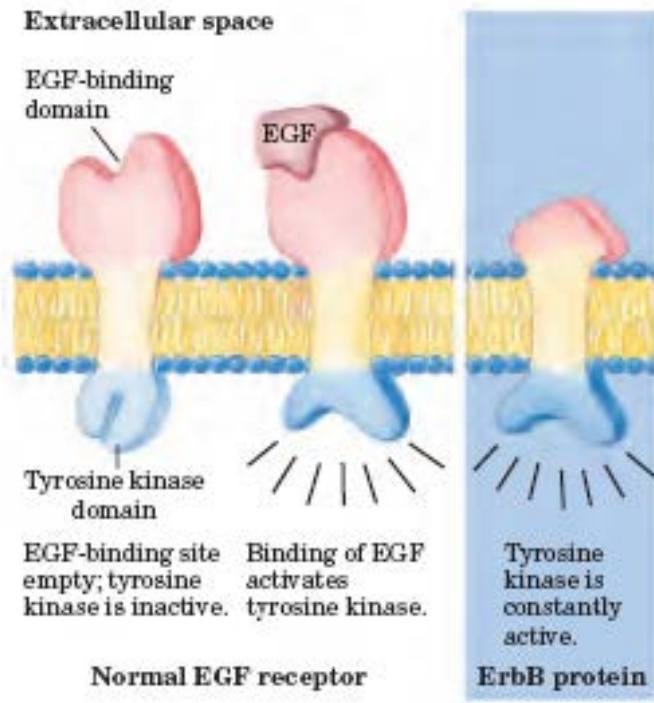
Mutacije v onkogenih in tumor zaviralnih genih in onkogeneza



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

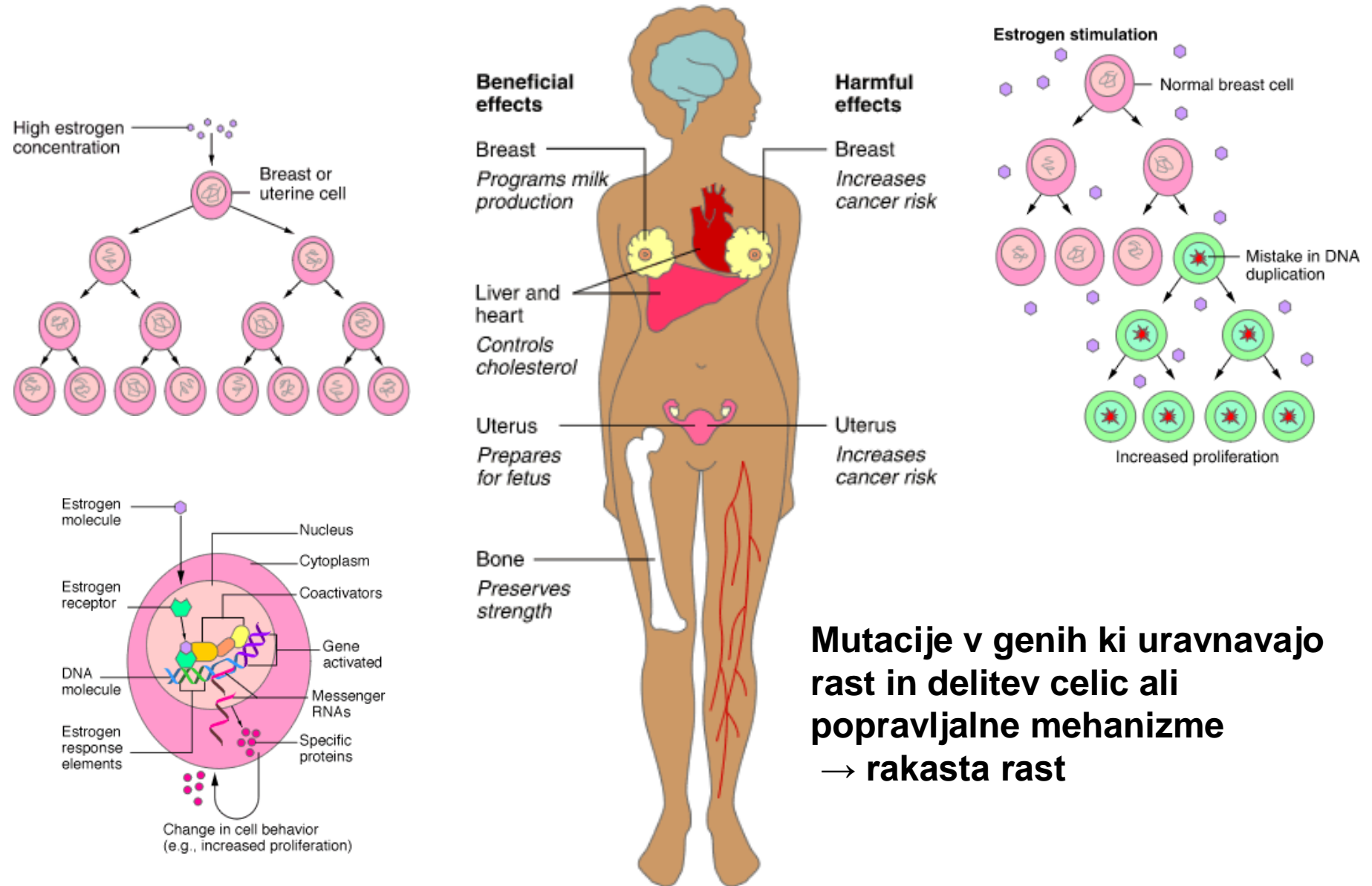
Onkogen, ki kodira okrnjen receptor za epidermalni rastni faktor (EGF) – motnja v odzivu na zunanji stimulus - stalno aktivirana signalna pot



onkogeni EGF receptor

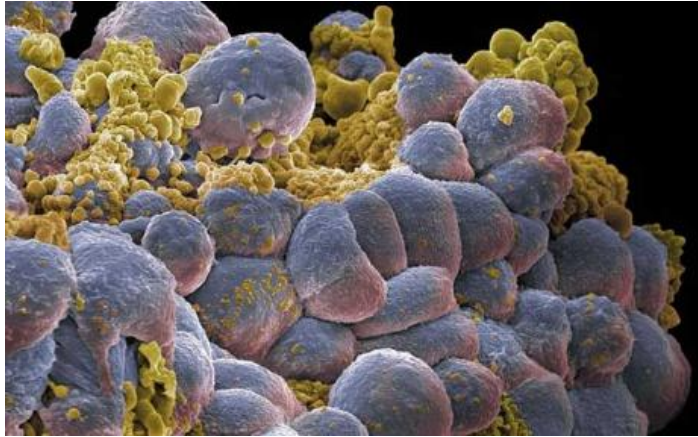
Stalen signal za delitev povzroči, da se celica nekontrolirano deli!

Estrogeni stimulirajo delitev celic

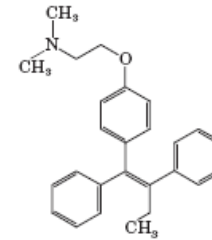


Mutacije v genih ki uravnavajo rast in delitev celic ali popravljalne mehanizme → rakasta rast

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.

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)**

Encimi

- Splošne strukturne in biokemijske lastnosti
- Specifičnost delovanja
- Encimska aktivnost.
- Izoencimi
- Prostetične skupine.
- Mehanizem encimske katalize (teorija prehodnega stanja)
- Kislinsko-bazična kataliza, kovalentna kataliza, kataliza s kovinskimi ioni

- Klasifikacija encimov

- Encimska kinetika

- Encimska inhibicija

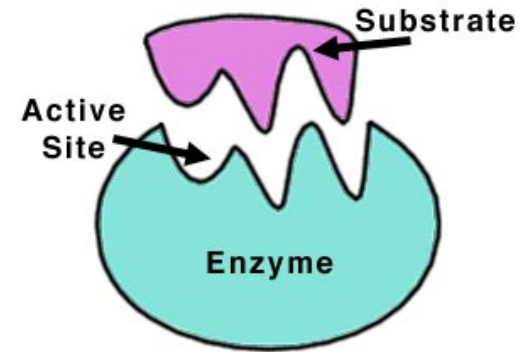
- Uravnavanje biokemijskih reakcij

- Encimi v medicinski diagnostiki

- Encimi v biotehnologiji in sinteza zdravil

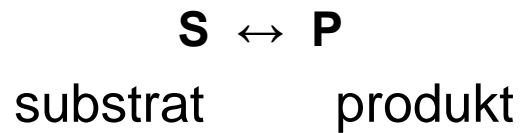
Splošne lastnosti encimov

- Encimi so visokospecializirani proteini (ali RNA!!)
 - velika katalitična moč
 - velika specifičnost
- Encimi – biokatalizatorji omogočajo reakcije v blagih razmerah (temperatura, pH, tlak) - primer razgradnja saharoze, vaje (1,5 in 2,5 M HCl)
- Delujejo organizirano – katalizirajo reakcijska zaporedja po stopnjah, npr. razgradnja hranilnih molekul in shranjevanje / transformacija energije biosinteze makromolekul, ...
- Bolezenske spremembe - spremenjena encimska aktivnost (znižana, zvišana) → diagnostika, terapija
- Uporaba encimov: v medicini, v farmacevtski in živilski industriji, v agronomiji...



Kako encimi delujejo?

Nekatalizirana kemijska reakcija



Encimsko katalizirana kemijska reakcija



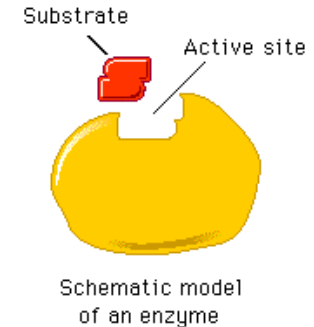
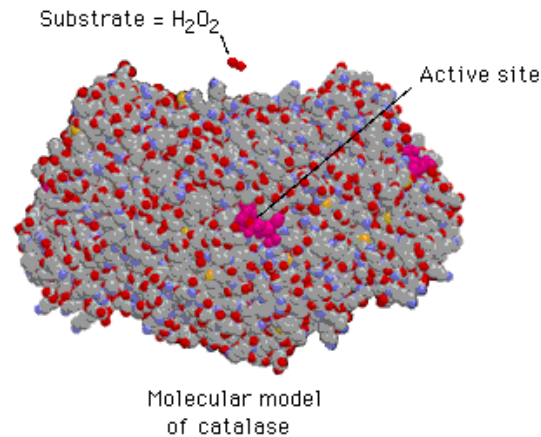
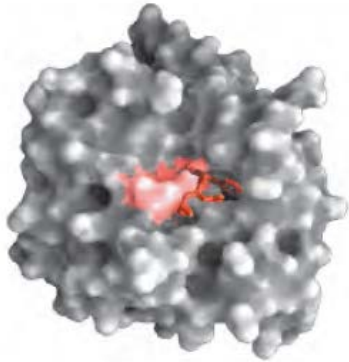
E – encim

S – substrat, **P** – produkt

ES – kompleks encim-substrat

EP – kompleks encim-produkt

Substrat, vezan na (v) aktivno mesto encima

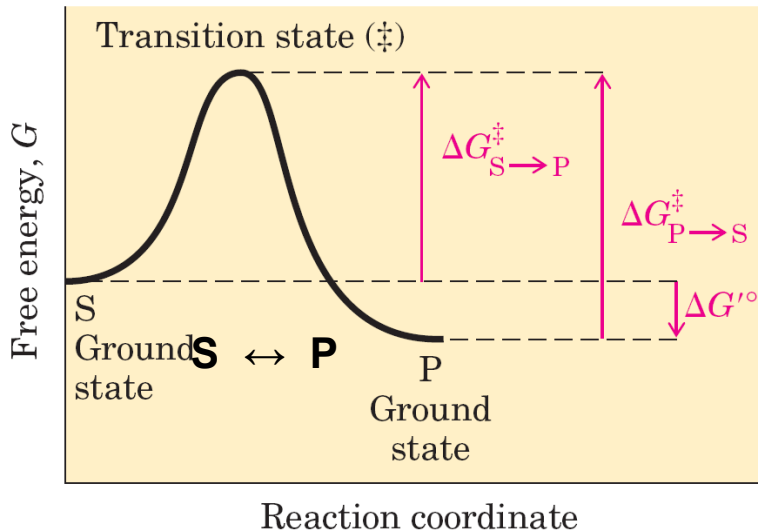


Encim predstavlja za molekule, ki reagirajo (substrate), specifično okolje, reakcija poteče na aktivnem mestu encima

Potek encimsko katalizirane reakcije

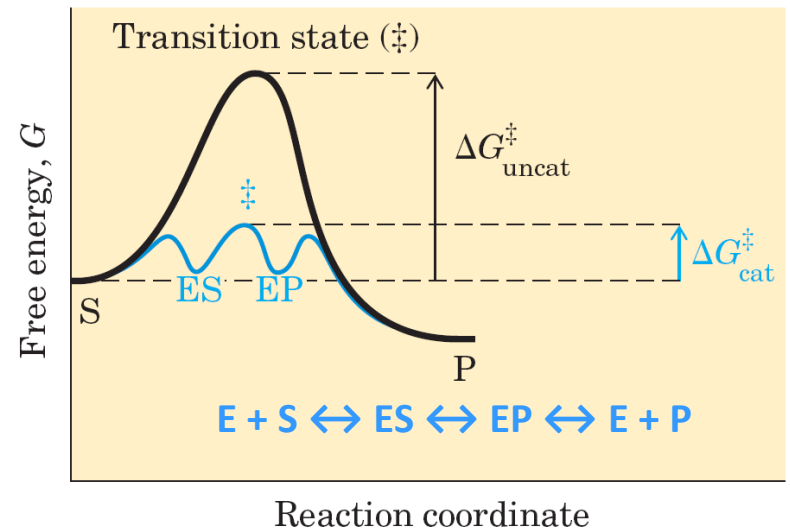


nekatalizirana reakcija



- ΔG° sprememba standardne proste energije pri prehodu $S \rightarrow P$
- $\Delta G^{\ddagger}_{S \rightarrow P}$ energijska bariera za prehod $S \rightarrow \#$ (prehodno stanje)
- $\Delta G^{\ddagger}_{P \rightarrow S}$ energijska bariera za prehod $P \rightarrow \#$ (prehodno stanje)

katalizirana reakcija



- $\Delta G^{\circ}_{\text{nekatalizirana}} = \Delta G^{\circ}_{\text{katalizirana}}$
katalizator ne vpliva na ravnotežje !!!
- ES, EP intermediata katalizirane reakcije
- $\Delta G^{\ddagger}_{\text{cat}}$ energijska bariera katalizirane reakcije

Ravnotežna konstanta K_{ravn} (K_{eq}) in sprememba standardne proste entalpije $\Delta G'^{\circ}$

K'_{eq}	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)
10^{-6}	34.2
10^{-5}	28.5
10^{-4}	22.8
10^{-3}	17.1
10^{-2}	11.4
10^{-1}	5.7
1	0.0
10^1	-5.7
10^2	-11.4
10^3	-17.1

Encim je katalizator, zato ne spreminja ravnotežja reakcije! Reakcija, ki spontano ne poteka od reaktantov do produktov, tudi v prisotnosti encima ne bo potekala v to smer. V prisotnosti encima ne moremo dobiti nič več produktov kot jih lahko dobimo brez encima.

SPREMENI SE SAMO HITROST!



$$K'_{\text{eq}} = \frac{[\text{P}]}{[\text{S}]}$$

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K$$

Hitrost (v) reakcije $S \rightarrow P$ določa hitrostna konstanta k , to pa ΔG^\ddagger



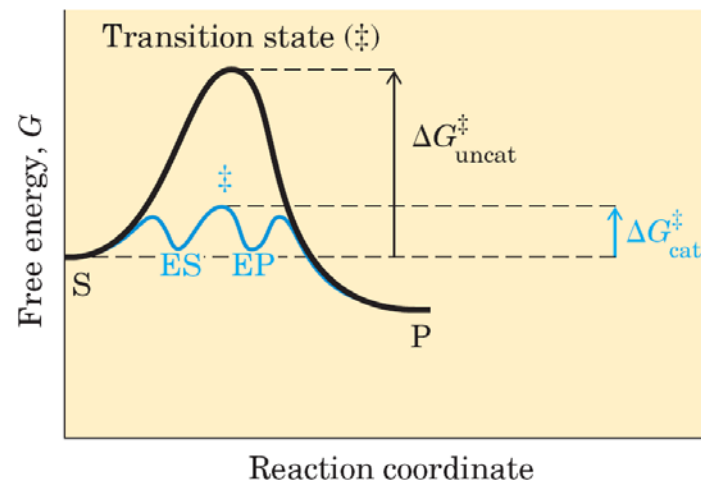
$$k = \frac{kT}{h} e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$$

k – Boltzmannova konstanta ($n \cdot R/N_A$; n = št. molov, R = plinska konstanta, N_A = Avogadrova konstanta)

h – Planckova konstanta

ΔG^\ddagger – aktivacijska energija (aktivacijska prosta entalpija)

R, T – konstanti



Primerjava nekatalizirane in katalizirane reakcije

Nekatalizirana reakcija



- Ravnotežje $K = \frac{P}{S}$
- Večja aktivacijska energija
- Manjša reakcijska hitrost
- Reakcijski mehanizem preko prehodnega stanja

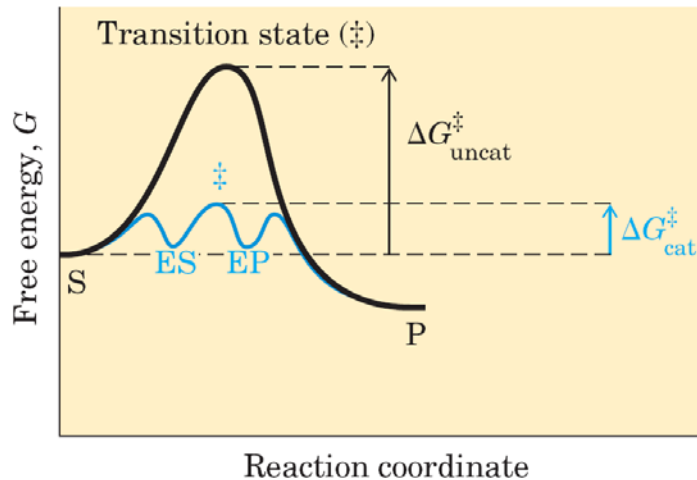
Katalizirana z encimom



- Ravnotežje $K = \frac{P}{S}$
- Manjša aktivacijska energija
- Večja reakcijska hitrost
- Reakcijski mehanizem preko drugih reakcijskih intermediatov in prehodnih stanj

Aktivacijska energija ΔG^\ddagger določa hitrost reakcije

Katalizatorji pospešijo hitrost reakcije (znižajo aktivacijsko energijo), ne spremenijo pa ravnotežja reakcije!



$$\Delta G^\circ = \Delta G^\circ = -RT \ln K$$

$$\Delta G^\# < \Delta G^\# \quad v > v$$



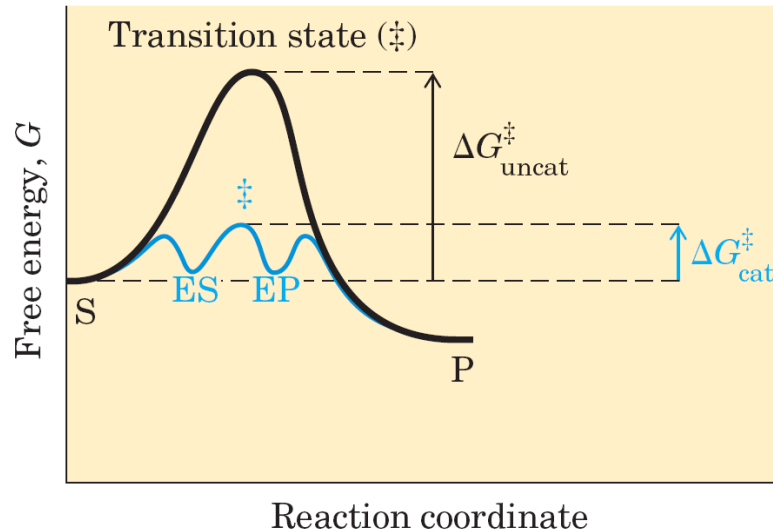
- če je reakcija sestavljena iz zaporedja več reakcij, hitrost celotne reakcije določa najpočasnejša stopnja (največja aktivacijska energija) – “rate limiting step”
- energijske bariere so ključnega pomena za življenje – če jih ne bi bilo, bi se makromolekule spontano razgrajevale v osnovne gradnike ...
- med evolucijo (zelo dolg čas!) so se razvili encimi, ki selektivno znižujejo aktivacijsko bariero

Zvišanje reakcijske hitrosti z encimi – katalitična moč encimov

TABLE 6–5 Some Rate Enhancements
Produced by Enzymes

Cyclophilin	10^5
Carbonic anhydrase	10^7
Triose phosphate isomerase	10^9
Carboxypeptidase A	10^{11}
Phosphoglucomutase	10^{12}
Succinyl-CoA transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidine monophosphate decarboxylase	10^{17}

K energijski barieri ΔG^\ddagger prispeva:

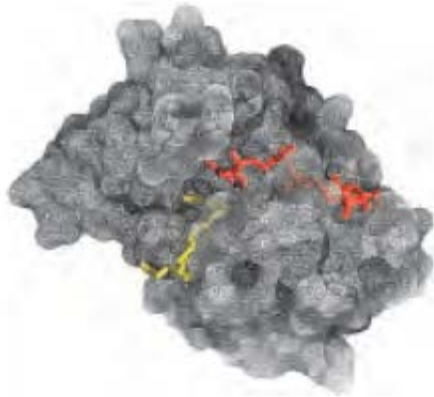
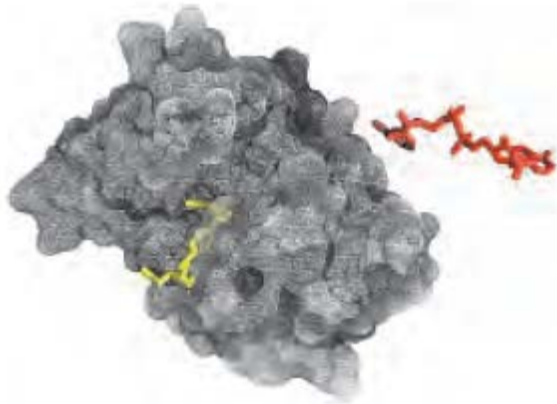


- Zmanjšanje entropije - manjša svoboda gibanja dveh molekul v raztopini
- Hidrationski plašč vode obdaja biomolekule in jih stabilizira
- Deformiranje ('prelom') substrata v reakciji
- Potreba po pravilnem prileganju katalitičnih funkcionalnih skupin encima s substratom

Od kod energija za znižanje energijske bariere?

1. Sproščena prosta entalpija zaradi tvorbe šibkih vezi med interakcijo encima in substrata.
2. Šibke interakcije se med prehodom v prehodno stanje optimizirajo; aktivno mesto encima ni komplementarno substratu, temveč PREHODNEMU STANJU, čez katerega substrat preide na prehodu v produkte

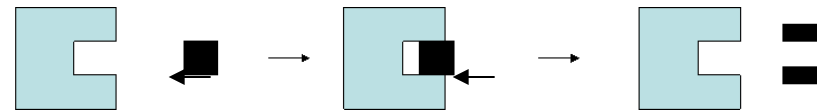
ES - komplementarnost substrata z vezavnim mestom na encimu: šibke interakcije so optimizirane v prehodnem stanju



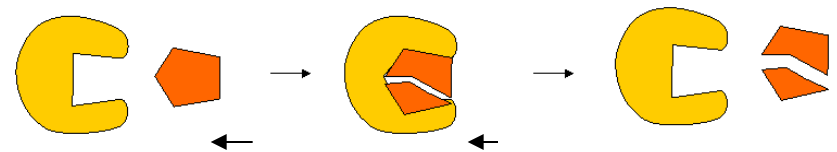
Primer: encim dihidrofolatna reduktaza; NADP⁺ (rdeče) in tetrahidrofolat (rumeno) sta substrata.

Emil Fischer 1894

E in S - ključ v ključavnico



Inducirano prilagajanje encima substratu in substrata encimu



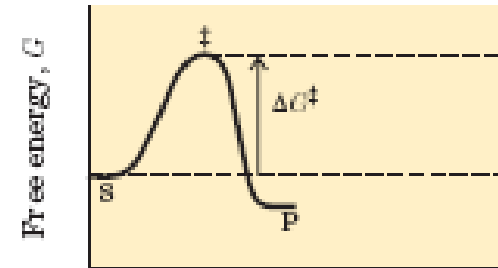
Encim je komplementaren reakcijskemu prehodnemu stanju

Aktivacijska energija se zniža zaradi sproščene vezavne energije ob nastanku šibkih interakcij med encimom in substratom

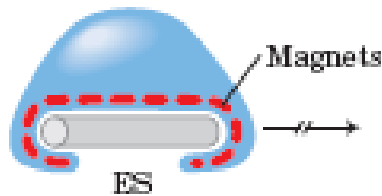
Imaginarni encim, ki katalizira prelom kovinske palice



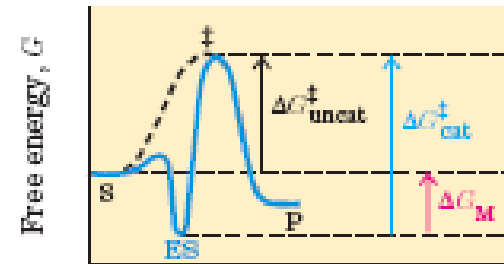
(a) No enzyme



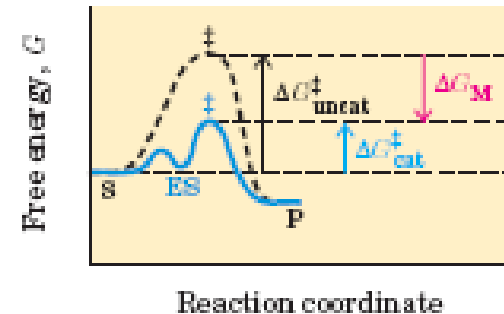
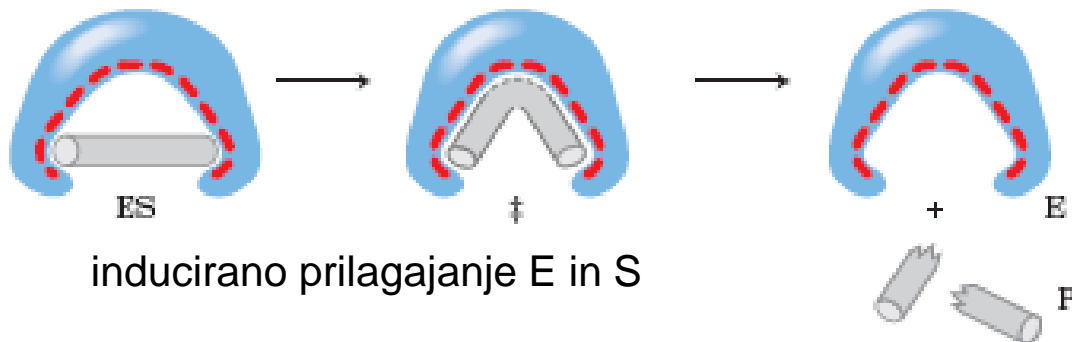
(b) Enzyme complementary to substrate



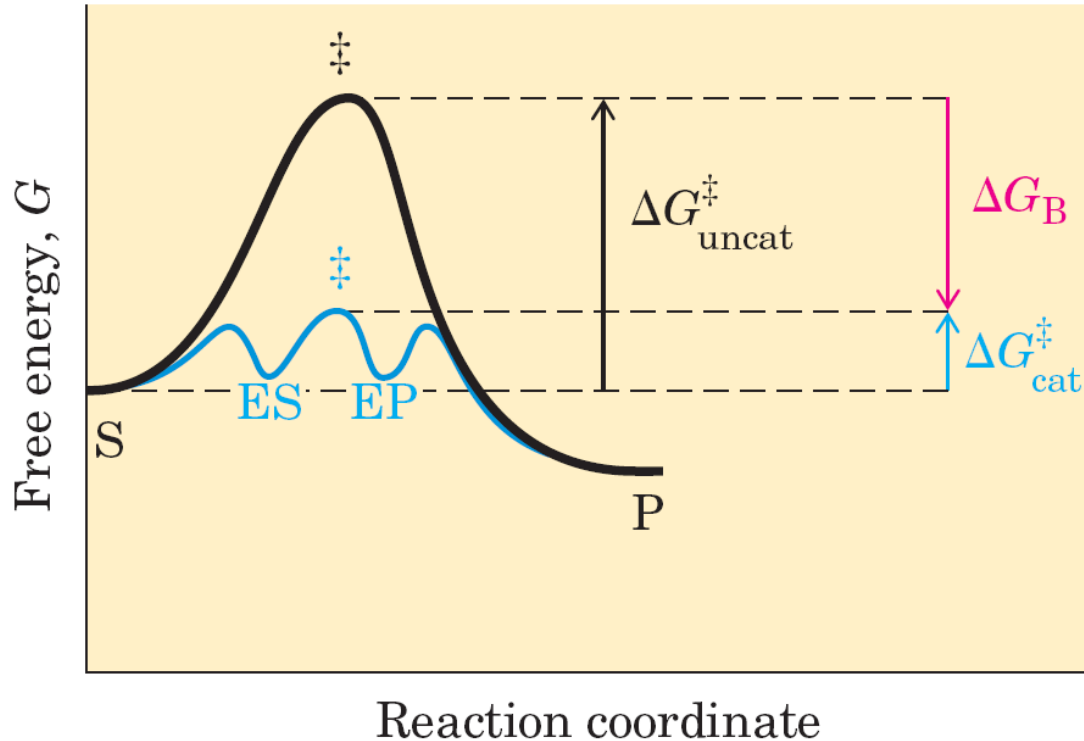
ključ - ključavnica



(c) Enzyme complementary to transition state



Vezavna energija prispeva h katalizi in k specifičnosti



Šibke interakcije
4-30 kJ/mol

Znižanje ΔG^{\ddagger} za
60-100 kJ/mol

Maksimalno št. interakcij
med encimom in substratom
v prehodnem stanju
(intermediatom)

Skupine na encimu ustrezajo
skupinam na substratu –
specifičnost!