

BIOCHEMIE – STUDIJNÍ TEXT

62. ročník ChO, kategorie A

Jan Vavřín

Obsah

Chemické rovnováhy	1
Kinetika enzymatických reakcí	2
Úvod do regulace biochemických procesů	4
Konformační změny a R/T model	4
Alosterická regulace kvantitativně	5
Regulace transkripce	7
Transkripční faktory	8
Hormony a buněčná signalizace	9
Receptory	10
G proteiny a cAMP jako druhý posel	11
Hormonální regulace transkripce	12
Citlivost a kooperativita	12
Kooperativita – Hillova funkce	13
Systémová biologie	14
Jednoduchý model transkripce a fázové portréty	15
Negativní zpětná vazba – robustní regulace	16
Feedforward loop	17
Inzulin, glukóza a glukotoxicita	19
Biologický oscilátor	23
Shrnutí	25
Dodatek: numerické řešení diferenciálních rovnic	25

Tento studijní text je základním zdrojem k biochemické části letošního ročníku ChO – obsahuje většinu materiálu, který budete potřebovat k úspěšnému řešení úloh. Sekce o systémové biologii je koncipována tak, abyste vůbec nemuseli koukat do jiných zdrojů. Pro ostatní témata by ale bylo vhodné využít alespoň částečně i další doporučenou literaturu.

Začneme stručným přehledem *chemických rovnováh a enzymové kinetiky* – přestože tato témata nebudou hlavním předmětem olympiády, bude potřeba se seznámit s jejich základy.

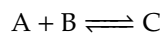
Další části vás zasvěťí do regulace biochemických procesů. Nejprve se podíváme na to, proč je regulace důležitá, a dále si vysvětlíme několik běžných způsobů regulace – *alosterickou regulaci*, *fosforylaci enzymů* a *regulaci transkripce*. Nakonec se krátce podíváme na to, jak regulace probíhá na úrovni celého organismu, a to za pomoci *hormonů* a *buněčné signalizace*.

Velkým tématem letošního ročníku je ale nejen kvalitativní popis regulace, nýbrž i popis kvantitativní. Zamysleme se tedy nad regulačními systémy trochu v inženýrském duchu jako nad systémy se „vstupem“ a „výstupem“. Nejprve si představíme jejich klíčovou vlastnost, *citlivost*, a podíváme se, jak ji ovlivňuje *kooperativita*. Nakonec si ukážeme několik příkladů z oboru systémové biologie – uvidíme, jak můžeme matematicky popsat regulaci pomocí *diferenciálních rovnic* a jak nám v jejich pochopení pomáhají *fázové portréty*.

Chemické rovnováhy

Pochopení chemických rovnováh je klíčové pro kvantitativní přemýšlení nad biochemickými procesy; už jen proto, že velká část chemických reakcí v buňce je v rovnováze – se znalostí rovnovážné konstanty tak můžeme spočítat koncentrace jednotlivých reaktantů nebo produktů. Chemické rovnováhy jsou také provázané s termodynamikou, a to konkrétně se změnou Gibbsovy energie.

Pro abstraktní chemickou reakci



je rovnovážná konstanta dána vztahem¹

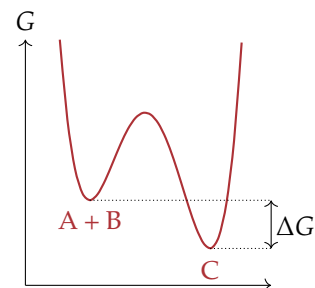
$$K = \frac{\frac{c_C}{c^\circ}}{\frac{c_A}{c^\circ} \frac{c_B}{c^\circ}},$$

kde standardní koncentrace $c^\circ = 1 \text{ M}$. Můžeme si všimnout, že takto definovaná rovnovážná konstanta je bezrozměrná.

Pro takto definovanou rovnovážnou konstantu pak lze odvodit vztah

$$K = e^{-\Delta G^\circ / RT},$$

kde ΔG° je *standardní změna Gibbsovy energie*. To znamená změna Gibbsovy energie v situaci, kdy jsou všechny látky ve standardním stavu. Hodnota ΔG° (a tedy i hodnota K) tak záleží na tom, jaký standardní stav zvolíme. Pozorovatelné hodnoty (např. množství produktu v rovnováze) jsou ale



Obrázek 1: Energetický profil rovnovážné reakce.

1: Nebudeme se trápit tím, že bychom místo koncentrací měli používat aktivity – i když v tak koncentrovaném roztoku, jako je vnitřek buňky, je tento předpoklad poněkud sporný.

Pro většinu biochemických reakcí tak hodnota ΔG° nemá větší smysl – koncentrace látek v buňce jsou mnohem menší než 1 M. A např. pro H^+ ion by standardní koncentrace odpovídala $\text{pH} = 0$, což je poněkud absurdní.

vždy dané rozdílem energií a ten je na volbě standardního stavu nezávislý – intuitivně se standardní stav vždycky „vykrátí“.

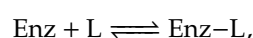
Hodnota ΔG nám říká, kterým směrem reakce poběží – pokud je záporná, reakce poběží dopředu, pokud kladná, reakce poběží zpátky. Hodnota ΔG (na rozdíl od ΔG°) závisí na koncentracích reaktantů a produktů. V rovnováze reakce nepoběží žádným směrem², a platí tedy $\Delta G = 0$.

V biochemii si často zjednodušujeme život a koncentraci v jednotkách M značíme hranatou závorkou, $[\cdot]$. Píšeme pak

$$K = \frac{[C]}{[A][B]}$$

a rovnovážná konstanta má nyní jednotky M^{-1} .

V olympiádě se setkáme hlavně s vazebnými rovnováhami typu



kde se nějaký ligand (L) naváže na enzym (nebo na molekulu DNA). V takovém případě většinou známe koncentraci ligandu, $[L]$,³ a chceme vyjádřit poměr množství enzymu s navázaným ligandem vůči celkovému množství enzymu,

$$f = \frac{[\text{Enz-L}]}{[\text{Enz}]_{\text{tot}}} = \frac{[\text{Enz-L}]}{[\text{Enz}] + [\text{Enz-L}]}.$$

Pro rovnovážnou konstantu ale známe vztah

$$K = \frac{[\text{Enz-L}]}{[\text{Enz}][L]},$$

a krátkou matematickou úpravou (ta vás čeká v domácím kole) tak získáme

$$f = \frac{K[L]}{1 + K[L]}.$$

V tomto případě bychom reakci označili jako asociační reakci a konstantu K jako *asociační* konstantu. Biochemici ale rádi pracují s hodnotou $K_d = 1/K$, což je tzv. *disociační* konstanta.⁴ Ta je lepší v tom, že má jednotky M, a lze ji tedy přímo porovnávat s koncentrací ligandu. Rovnici pro f snadno přepíšeme jako

$$f = \frac{[L]}{K_d + [L]}. \quad (1)$$

Vidíme tedy, že pro $[L] = K_d$ je $f = 1/2$. Disociační konstanta je tedy koncentrace, pro kterou je přesně polovina enzymu navázaná na ligand. Identickou situaci uvidíme u enzymové kinetiky, kde místo K_d bude Michaelisova konstanta K_M .

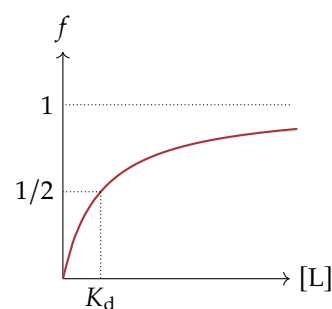
Kinetika enzymatických reakcí

Rychlost enzymatických reakcí se dá popsat rovnicí Michaelise a Mentenové,

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_M + [S]}. \quad (2)$$

2: Ze středoškolské chemie asi víte, že rovnováhy jsou *dynamické* – jak dopředná, tak zpětná reakce tedy budou v rovnováze probíhat, ale stejnou rychlostí.

3: V principu je $[L]$ pouze koncentrace volného ligandu, nikoli jeho celková koncentrace $[L] + [\text{Enz-L}]$ – v praxi je ale ligandu vždy mnohem více než enzymu, a tyto dvě hodnoty jsou tak zaměnitelné.

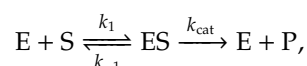


4: Disociační konstanta K_d je rovnovážná konstanta pro opačnou reakci, tedy $\text{Enz-L} \rightleftharpoons \text{Enz} + \text{L}$.

Rychlost reakce v je změna koncentrace produktu v čase – má tedy jednotky M s^{-1} . Maximální rychlost $v_{\max}$ má tytéž jednotky a Michaelisova konstanta K_M má jednotky koncentrace – lze ji tedy přímo porovnávat s koncentrací substrátu.

Na grafu vlevo vidíme, že rychlost enzymatických reakcí má dva limitní případy. Pro nízké koncentrace substrátu ($[S] \ll K_M$) je rychlost přímo úměrná množství substrátu – je omezená hlavně tím, že množství substrátu je malé. Pokud je naopak $[S] \gg K_M$, tak má rychlost v podstatě konstantní hodnotu $v_{\max}$ nezávisle na $[S]$. V tomto případě je všechen dostupný enzym saturovaný substrátem a reakce je tak omezená tím, jak efektivně ji enzym katalyzuje.

Rovnice (2) se dá odvodit z následujícího mechanismu:



kde E je volný enzym, ES je komplex enzym–substrát a P je produkt. Tento mechanismus ale zametá několik věcí pod koberec.

Zprv jsme úplně zanedbali zpětnou reakci – jak ale asi víte, každý enzym umí katalyzovat jak reakci $\text{S} \longrightarrow \text{P}$, tak $\text{P} \longrightarrow \text{S}$. Jako katalyzátor totiž sice umí reakci zrychlit, ale nemůže změnit rovnovážnou konstantu, která závisí jen na volných energiích produktu a reaktantu. Rovnice (2) tak popisuje *počáteční rychlost* reakce; tedy rychlost ve stavu, kdy je koncentrace produktu tak malá, že zpětnou reakci můžeme zanedbat.

Zadruhé, druhý krok reakce, $\text{ES} \longrightarrow \text{E} + \text{P}$, je ve skutečnosti nejspíše několik po sobě jdoucích kroků⁵ a k_{cat} je tak jakási „efektivní rychlostní konstanta“.

Rovnici (2) lze odvodit pomocí aproximace stacionárního stavu, se kterou se setkáte ve fyzikálně–chemické části. Pro nás bude důležitý jen výsledek, a to že

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{\text{cat}}}{k_1}.$$

V typickém případě (určitě ale ne vždycky) je $k_{-1} \gg k_{\text{cat}}$, a tedy platí

$$K_M \approx \frac{k_{-1}}{k_1}.$$

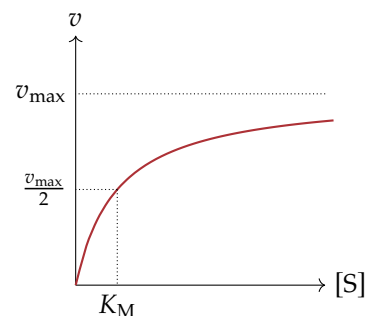
To znamená, že K_M je v podstatě disociační konstanta pro rovnovážnou reakci $\text{E} + \text{S} \rightleftharpoons \text{ES}$. Čím lépe enzym váže substrát, tím nižší je K_M .

Dále také platí

$$v_{\max} = k_{\text{cat}}[\text{E}]_{\text{tot}};$$

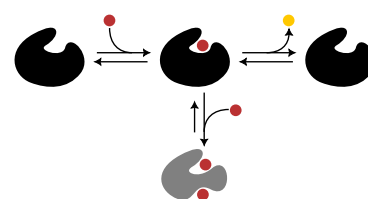
maximální rychlost tak závisí jak na celkovém množství enzymu, tak na tom, jak dobře enzym umí katalyzovat druhý krok reakce. Rovnovážné konstanty k_1 a k_{-1} se v rovnici pro $v_{\max}$ nevyskytují, protože při vysoké $[S]$ je všechen přítomný enzym navázaný na substrát a rychlost reakce pak záleží jen na druhém kroku.

Ukazuje se ale, že rychlost některých enzymů rovnicí (2) popsat nejde. Jeden případ už jsme viděli, a to když nemůžeme zanedbat zpětnou reakci. Dalším případem je, když se substrát může na enzym navázat více než jednou. To vede (v nejjednodušším případě) k tvorbě komplexu ES_2 , který může být buď více reaktivní než ES, nebo naopak méně. Těmto



5: Budou to vždy alespoň dva kroky – „katalytický“ krok za vzniku komplexu EP a vyvázání produktu z aktivního místa. Vyvázání produktu je většinou ale rychlý krok – zajímavou výjimkou je ATP syntáza.

$$[\text{E}]_{\text{tot}} = [\text{E}] + [\text{ES}]$$



Obrázek 2: Schéma inhibice substrátem. Navázání druhé molekuly substrátu na alosterické místo převede enzym do neaktivní konformace.

případům říkáme *substrátová aktivace* (resp. *inhibice*). Schematicky je tento mechanismus ukázán na obrázku 2.

Některé enzymy také mají více než jeden substrát – typickým příkladem jsou *kinázy*, jejichž druhým substrátem je ATP. Jejich kinetika pak záleží na tom, v jakém pořadí se na ně substráty vážou – většinou ale lze využít nějaké zobecnění kinetiky Michaelise a Mentenové. Např. pokud se substráty vážou nezávisle na sobě, můžeme definovat K_M pro každý substrát zvlášť (ale $v_{\max}$ bude jen jedna pro celý enzym – ta odpovídá situaci, kdy máme všech substrátů dostatek).

Úvod do regulace biochemických procesů

Po přečtení předchozí části by se mohlo zdát, že pokud známe K_M a $v_{\max}$, víme o enzymu v podstatě všechno. To je sice pravda v *in vitro* systémech, kde máme čistý roztok enzymu a substrátu, ale rozhodně ne v kontextu celé buňky. Pro buňku je totiž důležitá regulace aktivity enzymů – chce měnit rychlost reakcí v závislosti na tom, v jakých podmínkách se zrovna nachází.

Příkladem může být situace, kdy jsme se hodně najedli a lehli jsme si do postele, takže nemusíme vynakládat moc energie na pohyb. Buňky v našem těle by tak chtěly vzít získanou energii z jídla a uložit si ji na později. energii získáváme ve formě glukózy, ale tělo ji ukládá jako glykogen. Budeme tedy chtít aktivovat transport glukózy do buněk a enzymy, které vyrábí glykogen.

Aktivovat enzym znamená zvýšit jeho rychlost, v . Toho lze dosáhnout několika způsoby – mohli bychom např. snížit jeho K_M nebo zvýšit $v_{\max}$. Druhou možností navíc můžeme způsobit buď zvýšením k_{cat} , nebo zvýšením samotné koncentrace enzymu, $[E]_{\text{tot}}$. Tyto možnosti odpovídají různým mechanismům regulace.

Parametry K_M a k_{cat} jsou závislé na struktuře enzymu. To, jak dobře enzym katalyzuje reakci, je dané vhodným umístěním aminokyselin, aby mohly správně interagovat se substrátem. Změny těchto parametrů tedy obnáší *změnu konformace* – v podstatě změníme tvar enzymu tak, aby reakci katalyzoval lépe (nebo hůře, pokud ho chceme deaktivovat).

Oproti tomu $[E]_{\text{tot}}$ závisí na tom, jak rychle enzym buňka vyrábí a degraduje.⁶ Výroba enzymu obnáší transkripci na mRNA a následnou translaci. Regulace $[E]_{\text{tot}}$ tak znamená změnu rychlosti těchto procesů. Nejčastěji jde o regulaci transkripce pomocí vazby *transkripčních faktorů* na DNA, a tímto mechanismem se budeme zabývat níže. Regulace se může uplatňovat i na úrovni translace či degradace, ale tyto způsoby jsou méně běžné (nebo alespoň hůře pochopené).⁷

Konformační změny a R/T model

Jak jsme již naznačili výše, aktivitu enzymu můžeme regulovat změnou jeho tvaru (nebo vědeckěji *konformace*). Toho dosáhneme buď nekovalentní vazbou ligandu na enzym – *alosterickou regulací* – nebo chemickou modifikací samotného enzymu, nejčastěji *fosforylací*.

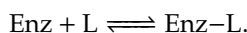
Glukóza samozřejmě není jediný zdroj energie – v letošním ročníku ChO se ale o metabolismu jiných látek bavit nedeme. Principy regulačních procesů jsou navíc podobné pro všechny živiny.

Nezapomeňte, že rychlost enzymatické reakce je dána vztahem $v = \frac{v_{\max}[S]}{K_M + [S]}$.

6: S těmito procesy se setkáme kvantitativně v části o systémové biologii.

7: Pokud vás toto téma zajímá více, můžete se podívat např. na miRNA nebo na proteinkinázu R. Degradace proteinů pomocí ubiquitinace je navíc klíčovým hráčem v regulaci buněčného cyklu.

Alosterická regulace znamená, že se jistý ligand⁸ (může to být samotný substrát nebo jiná látka) naváže na enzym na jiné než aktivní místo. Nejde tedy o přímou inhibici, kdy by ligand soutěžil o aktivní místo se substrátem!⁹ Tato vazba ale změní konformaci celého enzymu a tím i jeho katalytickou aktivitu. Toho dosáhne pomocí nám známých mezimolekulových interakcí, jako např. vodíkových můstků, elektrostatických nebo i disperzních interakcí. Alosterickou regulaci lze popsat rovnovážnou reakcí¹⁰



Oproti tomu fosforylace je způsobena kovalentní vazbou fosfátu na –OH skupiny¹¹ vhodných aminokyselin enzymu – tedy serinu, threoninu nebo tyrosinu. Nejčastěji se setkáme s fosforylací serinu, ale i ostatní dvě mají své funkce (např. v regulaci buněčného cyklu). Fosforylace (resp. defosforylace) neprobíhá sama od sebe, nýbrž je katalyzovaná enzymy – *kinázami* (resp. *fosfatázami*).

Oba tyto mechanismy lze ale popsat tím samým modelem. Ten předpokládá, že enzym má dvě stabilní konformace, R a T.¹² Konformace R je aktivní, zatímco konformace T je neaktivní.

Pro jednoduchost budeme předpokládat, že konformace T je úplně neaktivní. Rychlost enzymatické reakce tak bude dána rovnicí Michaelise a Mentenové, ale místo celkové koncentrace enzymu budeme mít pouze celkovou koncentraci aktivní konformace R, $[\text{R}]_{\text{tot}}$.

$$v = \frac{k_{\text{cat}}[\text{R}]_{\text{tot}}[\text{S}]}{K_{\text{M}} + [\text{S}]},$$

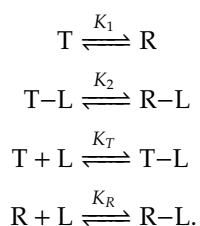
kde parametry k_{cat} a K_{M} platí pro enzym v konformaci R. Ekvivalentně můžeme říci, že rychlost je stále daná rovnicí Michaelise a Mentenové, ale s „efektivní konstantou“

$$v_{\text{max}} = k_{\text{cat}}[\text{R}]_{\text{tot}},$$

která bude záviset na množství alosterického efektoru nebo na fosforylaci.

Alosterická regulace kvantitativně

Pojďme si spočítat, jak alosterická regulace ovlivní rychlost reakce. Enzym má dvě konformace, R a T, a každá z nich může být buď volná, nebo s navázaným ligandem. Budeme tedy muset uvažovat čtyři různé rovnovážné reakce,



První dvě popisují rovnováhu mezi R a T konformacemi pro volný enzym a pro enzym s navázaným ligandem. Pro alosterickou *aktivaci* by

8: Ligand v tomto případě nazýváme *alosterický efektor*. Podle účinku rozeznáváme *aktivátory* a *inhibitory*.

9: Příroda přímou inhibici enzymů jako regulační mechanismus nepoužívá – my ji ale často používáme ve farmakologii, abychom pomocí léků deaktivovali určité proteiny.

10: Ligand se může na enzym vázat více než jednou – to vede ke *kooperativitě*, o které si ale povíme až za chvíli.

11: I jiné nukleofilní skupiny lze fosforylovat, u eukaryot je ale význam takové regulace sporný.

12: Označení vychází z angl. *tense* a *relaxed*.

Následující část je dobrovolná – výpočty jsou nad rámec požadavků letošní ChO. Pro regulaci fosforylací je výpočet jednodušší a zkusíte si ho sami v domácím kole.

Můžete se přesvědčit, že musí platit $\frac{K_1 K_R}{K_2 K_T} = 1$.

tedy mělo platit $K_2 > K_1$ – vazba ligandu způsobí, že konformace R je preferovanější.

Celková koncentrace R je daná součtem $[R]_{\text{tot}} = [R] + [R-L]$. My sice neznáme koncentrace jednotlivých konformací, známe ale celkovou koncentraci enzymu,

$$[E]_{\text{tot}} = [R] + [R-L] + [T] + [T-L].$$

Chtěli bychom tedy vyjádřit $[R]_{\text{tot}}$ pomocí rovnovážných konstant (ty známe – můžeme je změřit separátně v *in vitro* experimentech), $[E]_{\text{tot}}$ a $[L]$.

To je ale jednoduché, pokud známe správný trik.¹³ Vyjádříme si

$$\frac{[R]_{\text{tot}}}{[E]_{\text{tot}}} = \frac{[R] + [R-L]}{[R] + [R-L] + [T] + [T-L]}$$

a dosadíme jednotlivé rovnovážné konstanty. Tak dostaneme

$$\frac{[R] + K_R[R][L]}{[R] + K_R[R][L] + [T] + K_T[T][L]} = \frac{[R](1 + K_R[L])}{[R](1 + K_R[L]) + [T](1 + K_T[L])}.$$

Nakonec vydělíme čitatele i jmenovatele proměnnou $[T]$, čímž získáme

$$\frac{K_1(1 + K_R[L])}{K_1(1 + K_R[L]) + (1 + K_T[L])}.$$

To můžeme ještě upravit na

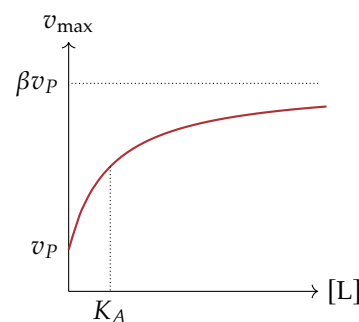
$$\frac{[R]_{\text{tot}}}{[E]_{\text{tot}}} = \frac{K_1 + K_1 K_R [L]}{(1 + K_1) + (K_T + K_1 K_R) [L]}.$$

Výsledný „efektivní“ parametr v_{max} se pak standardně zapisuje pomocí nových parametrů v_P , β a K_A jako

$$v_{\text{max}} = k_{\text{cat}}[R]_{\text{tot}} = v_P \frac{K_A + \beta[L]}{K_A + [L]}.$$

Každý parametr má biochemický význam – v_P je v_{max} při $[L] = 0$, β nám říká, kolikrát aktivnější bude enzym při vysoké koncentraci L, a K_A je jakási „rovnovážná konstanta aktivace“ – je ale lepší ji prostě brát jako užitečný parametr než jako skutečnou rovnovážnou konstantu.

13: Podobný trik s dělením celkovou koncentrací se ve výpočtech rovnováh hodí překvapivě často.



Cvičení 1 Ukažte, že parametry v_P , K_A a β lze napsat pomocí našich rovnovážných konstant jako

$$\begin{aligned} v_P &= \frac{k_{\text{cat}} K_1 [E]_{\text{tot}}}{1 + K_1} \\ K_A &= \frac{1}{K_T} \cdot \frac{1 + K_1}{1 + K_2} \\ \beta &= \frac{K_R}{K_T} \cdot \frac{1 + K_1}{1 + K_2}. \end{aligned}$$

Vidíme tedy, že pro případ $K_1 \ll 1$ a $K_2 \gg 1$ je $K_A \approx 1/K_2 K_T$, což je rovnovážná konstanta pro reakci $R-L \rightleftharpoons T+L$.

Pomoci vám může vztah

$$\frac{ax+b}{cx+d} = \frac{b}{d} \cdot \frac{\frac{ad}{bc}x + \frac{d}{c}}{x + \frac{d}{c}}.$$

Regulace transkripce

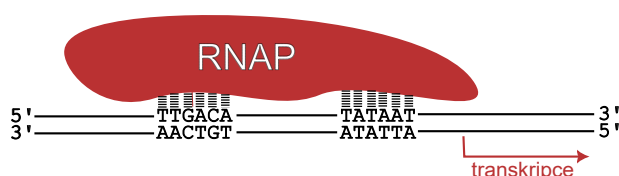
Regulace transkripce funguje oproti alosterické regulaci a fosforylaci na mnohem delších časových škálách. Navázání ligandu na enzym je záležitost (mili)sekund a fosforylace trvá nejdéle několik minut. Než se ale zvýšená transkripce projeví na změně aktivity enzymu, může to trvat klidně i několik hodin.¹⁴ Je to proto, že než z DNA vyrobíme protein, musíme překonat značné množství kroků:

1. Transkripce DNA za vzniku pre-mRNA.
2. Úprava pre-mRNA na mRNA.
3. Export mRNA z jádra.
4. Translace mRNA za vzniku proteinu.

Můžeme si tedy domyslet, že regulace transkripce se nepoužívá v případě, kdy je potřeba rychlá odezva – např. pokud potřebujeme rychle zvýšit výrobu energie, když na nás náhle zaútočí šavlozubý tygr. Bude ale klíčová pro regulaci dlouhodobých změn, a to jak v rámci hodin, tak i v rámci dní, měsíců a let – selektivní transkripce genů je hlavním mechanismem diferenciací buněk a vývoje mnohobuněčných organismů.¹⁵

Abychom pochopili regulaci transkripce, musíme se podívat na to, jak transkripce vůbec funguje. Na jednom vlákně DNA se nachází mnoho různých genů – jak tedy poznáme, kde máme s transkripcí začít, abychom přepsali jen určitý gen? To zajišťuje úsek genu zvaný *promotor*.

Enzym RNA polymeráza (RNAP), který transkripci katalyzuje, totiž nemůže začít jen tak někde. Musí najít konkrétní sekvence (u bakterií např. 5' -TTGACA -3' a 5' -TATAAT -3'), aby mohl transkripci začít.



Nejjednodušší promotor by tak obsahoval pouze tyto „povinné“ sekvence, jako na obrázku 3. Tak by vypadal promotor pro tzv. provozní gen – gen, který buňka potřebuje pro základní životní funkce, a je tedy vždy podobně aktivní.

Pokud místo 5' -TATAAT -3' má gen např. 5' -TATAGT -3', transkripce bude pořád probíhat, ale méně účinně (snížíme tedy rychlost transkripce) – tak můžeme rozlišit tzv. *slabé* a *silné* promotory.

Regulované geny ale v promotoru mají i další speciální sekvence, na něž se mohou vázat proteiny zvané *transkripční faktory*.

14: U bakterií, kde jsou genetické procesy mnohem jednodušší, má regulace transkripce rychlejší odezvu.

15: Všechny buňky v lidském těle mají stejnou DNA – liší se jen tím, které geny zrovna exprimují (tedy tím, které geny podléhají transkripci do mRNA).

U eukaryot je iniciace transkripce značně složitější; principy jsou ale podobné.

Obrázek 3: Vazba RNAP na promotor bakteriálního genu.

Provozní geny se také nazývají *house-keeping* geny. Jsou to např. geny pro ribozomální RNA, tRNA nebo samotnou RNAP.

Transkripční faktory

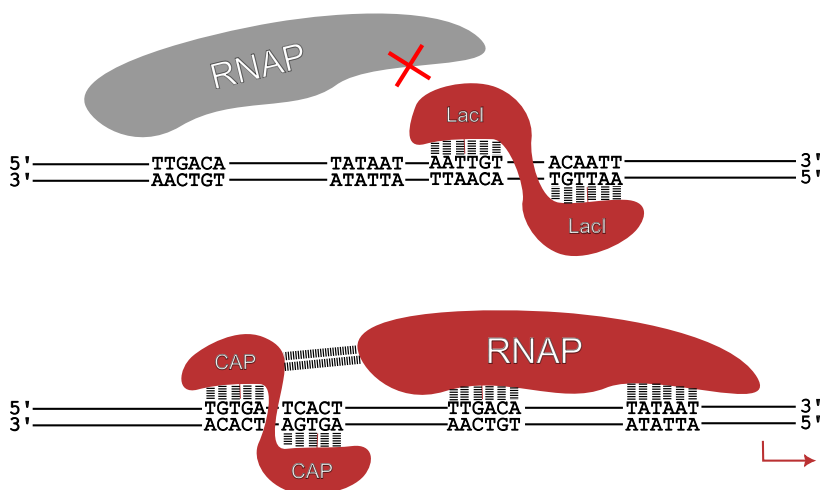
Podobně jako RNAP umí i transkripční faktory rozpoznat určitou sekvenci DNA. To je klíčové, aby se mohly navázat pouze na promotor určitého genu. Jak to ale dělají?

Musí se nějak dostat přímo k jednotlivým párům bází. Pokud si představíme dvojšroubovici DNA, vidíme, že se protein může „nacpat“ do tzv. velkého žlábků (viz obrázek 4). Dokonce to krásně vychází tak, že alfa-helix proteinu se do něj přesně vejde.

Aminokyseliny proteinu tak míří přímo k párům bází a mohou s nimi interagovat pomocí vodíkových můstků a hydrofobních interakcí. Tak můžeme specificky poznat všechny čtyři druhy párů.

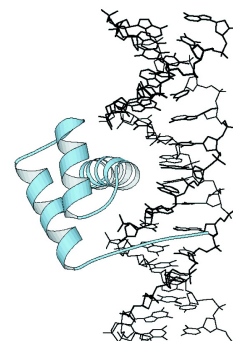
Pro zvýšení specifity se transkripční faktory často vážou jako dimery – druhý monomer pak rozpozná tu samou sekvenci, ale na druhém vlákně DNA.

Pro vazbu na DNA jsou potřeba i *nespecifické interakce* – ukazuje se, že aby transkripční faktor rychle našel svoji sekvenci, nejprve najde libovolnou sekvenci DNA a pak se posouvá po dvojšroubovici, dokud nenajde svoji specifickou.¹⁶ Tyto nespecifické interakce jsou většinou elektrostatické – fosfáty v DNA jsou záporně nabitě, a přitahují tak kladně nabitě aminokyseliny jako lysin nebo arginin. Podobně slouží i Mg^{2+} ion, který fosfáty váže částečně elektrostaticky a částečně koordinačně-kovalentně. (Podobný princip používá mnoho proteinů pro vazbu ATP.)



Jak transkripční faktory ovlivňují transkripci? Pro represory je vysvětlení snadné – prostě se navážou na stejné místo jako RNAP, a tak ji „zablokují“. Aktivátory se musí navázat o kousek vedle a „přesvědčit ji“ – pomocí vhodných mezimolekulových interakcí – aby se na promotor vážala raději.

U eukaryot transkripční faktory často fungují pomocí modifikace histonů. Eukaryotická DNA je totiž sbalená do *nukleozomů* pomocí proteinů zvaných *histony*. Pokud je sbalená moc pevně, tak se gen nepřepisuje. Transkripční faktor tak může fungovat přes ko-aktivátor, který nukleozomy „rozbalí“, a umožní tak jejich transkripci. Proces „sbalení“ a „rozbalení“ je regulovaný acetylací a metylací aminokyselin v histonech.



Obrázek 4: Vazba transkripčního faktoru na DNA. Všimněte si, že alfa-helix se přesně vejde do velkého žlábků, kde pak dochází ke specifickým interakcím mezi aminokyselinami a nukleotidy. Zbytek proteinu může s DNA interagovat i nespecificky, aby zvýšil efektivitu vazby. Zdroj: Garvie, C. W., & Wolberger, C. (2001). Recognition of specific DNA sequences. *Molecular cell*, 8(5), 937-946.

16: Skutečný proces hledání sekvence je asi o něco složitější – např. *lac* represor se pohybuje kombinací 1D a 3D difuze a „skoků“, které mu umožňuje jeho tetramerická struktura.

Obrázek 5: Aktivace a represe transkripce *lac* operonu pomocí transkripčních faktorů. *Lac* represor, neboli LacI, blokuje přístup RNAP k promotoru. Aktivátor CAP ji naopak pomáhá pomocí specifických interakcí.

Histony vážou DNA pomocí elektrostatických interakcí s lysinovými a arginiovými zbytky – musí se vázat nespecificky, aby se kolem nich mohl sbalit libovolný kus DNA.

Hormony a buněčná signalizace

Zatím jsme mluvili o regulaci uvnitř buňky a řekli jsme, že regulace nějak odpovídá na „vnější prostředí“. To by ještě dávalo smysl u jednobuněčného organismu, ale u mnohobuněčného to není tak jednoduché. Jednotlivé tkáně totiž mají specializované funkce a signál pro aktivaci jednoho orgánu může přijít z úplně jiné části těla. Jedna možnost, jak tento signál přenést, je pomocí elektrických impulsů – tak se často přenáší signály z mozku a my se o nich už dále nebudeme zmiňovat. Druhá možnost je pomocí specifických chemických látek, které jsou uvolňovány do krevního oběhu – *hormonů*.

Pro metabolismus glukózy jsou klíčové dva hormony – glukagon a inzulin¹⁷ – které jsou produkovány slinivkou, ale ovlivňují hlavně játra a svaly. Tyto dva hormony mají opačné funkce: inzulin odpovídá na situaci, kdy máme v krvi vysoké množství cukru – typicky po jídle – a snaží se „nacpat“ tuto přebytečnou glukózu do buněk. Aktivuje tedy procesy, které glukózu spotřebovávají – syntézu glykogenu a glykolýzu. Oproti tomu glukagon přijde na řadu, když je v krvi glukózy málo. To je problém hlavně pro mozek, který glukózu používá jako hlavní zdroj energie. Glukagon tedy řekne játrům, aby vyráběla glukózu – buď z glykogenu, nebo pomocí *glukoneogeneze*.

Je asi namístě malá poznámka o transportu glukózy přes buněčnou membránu – ten probíhá *facilitovanou difúzí*.¹⁸ To znamená, že glukóza má sice svůj transportní protein¹⁹ (GLUT), ale k transportu dochází pasivně po koncentračním gradientu. Zvýšení koncentrace glukózy v játrech tak povede k tomu, že bude automaticky difundovat do krve.

Hormony inzulin a glukagon tedy dají buňce „signál“, který je dále převedený na nitrobuněčné změny – např. fosforylaci proteinů. O tom, jak se to stane, si povíme v detailu níže. Jednoduché shrnutí ale je, že hormon se nejprve naváže na *receptor*, který přenesení signál dovnitř buňky. V buňce dále dojde ke kaskádě několika reakcí, jejichž úkolem je zesílení (*amplifikace*) signálu a nakonec i aktivace konkrétních enzymů. V případě glukagonu kaskáda reakcí povede k výrobě malé molekuly cAMP, která funguje jako aktivátor proteinkinázy A. Tato kináza pak fosforyluje vhodné metabolické enzymy a tím je (de)aktivuje.

Pro buněčnou signalizaci je několik důležitých principů. Prvním je amplifikace signálu – hormony jsou v krvi přítomny v koncentracích řádově 10^{-9} M – pokud by jedna molekula hormonu aktivovala jeden metabolický enzym, nic moc by se nestalo. Musíme tento signál zesílit, což se děje postupně pomocí několika kroků, kdy každý zesílí signál 10–100×.

Druhým principem je, že signalizační dráhy musíme umět i deaktivovat. To znamená, že když jsme pomocí glukagonu vypnuli glykolýzu, musíme ji zase zapnout, když koncentrace glukagonu klesne. Musíme tedy vrátit *všechny* kroky signalizační kaskády do původního stavu.

A za třetí, i když máme rozličné množství hormonů a receptorů, většina signalizačních drah nakonec využívá jen několik *druhých posílů* (jedním z nich je právě cAMP). Díky tomu mohou různé hormony aktivovat tu samou metabolickou dráhu – to je velmi užitečné. Příkladem mohou být glukagon a adrenalin, které (v játrech) oba fungují přes cAMP.²⁰

17: Nejsou to jediné hormony, které metabolismus glukózy ovlivňují. Z dalších můžeme zmínit např. adrenalin, kortizol nebo hormony štítné žlázy.

Játra obecně slouží jako velký „zásobník“ glukózy – ukládají ji, když jí máme moc, a uvolňují ji do krve, když je jí málo.

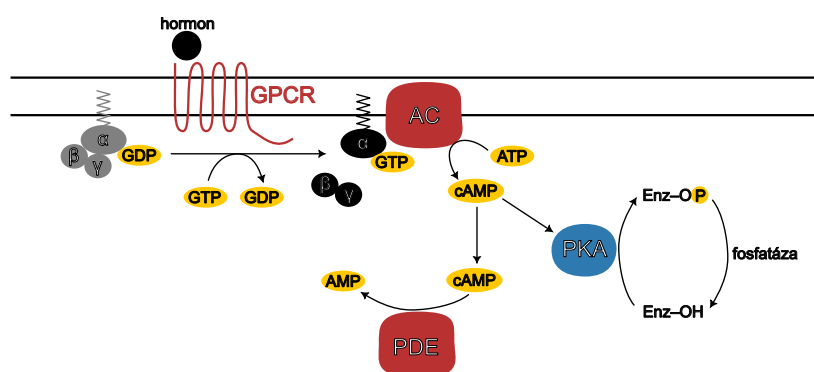
18: Aktivní transport glukózy je také možný – používají ho střevní buňky, aby glukózu „vychytávaly“ z potravy.

19: Jako polární molekula by se glukóza přes buněčnou membránu sama nedostala.

Speciálním případem jsou hormony, které vedou k regulaci transkripce – ty fungují trochu jinak.

20: Účinek těchto hormonů na jiné orgány než játra se liší – to je dané mj. tím, že jiné orgány mají jiný druh receptorů pro adrenalin.

Oba tedy nakonec způsobí uvolňování glukózy do krve – glukagon ale v případě hladovění, zatímco adrenalin tehdy, když budeme potřebovat energii na nějakou fyzickou aktivitu.



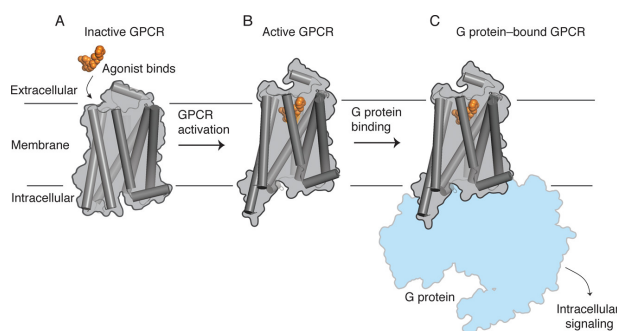
Obrázek 6: Schéma signalizace pomocí G proteinů. Jednotlivé kroky jsou podrobně vysvětleny v textu níže.

Receptory

Molekula hormonu neproniká dovnitř do buňky, ale musí nějakým způsobem aktivovat nitrobuněčné procesy. Tento problém řeší speciální proteiny, kterým říkáme receptory. Ty se nachází v buněčné membráně a mají tedy dvě strany – na vnější (extracelulární) stranu se váže hormon, zatímco vnitřní (cytosolická) strana může aktivovat další reakce v buňce.

Známe různé typy receptorů – pro nás nejdůležitější ale budou *receptory spřažené s G proteinem*, neboli GPCR.²¹ Receptory pro metabolické hormony glukagon a adrenalin jsou členy této třídy.²² Receptor pro inzulin je naopak tzv. *tyrosinkinázový receptor* – o těch se ale zmíníme jen letmo.

GPCR se aktivují *konformační změnou*. Jsou složeny z několika transmembránových alfa-helixů a když se zvenku naváže ligand, struktura enzymu se „posune“, což se projeví i na vnitřní straně buňky (viz obrázek 7). Takto aktivovaný GPCR pak bude interagovat s *G proteinem* (viz níže). Když se ligand odváže, tak se GPCR vrátí zpátky do původní konformace, a tím se deaktivuje.



21: Zkratka GPCR je z angl. *G protein-coupled receptor*.

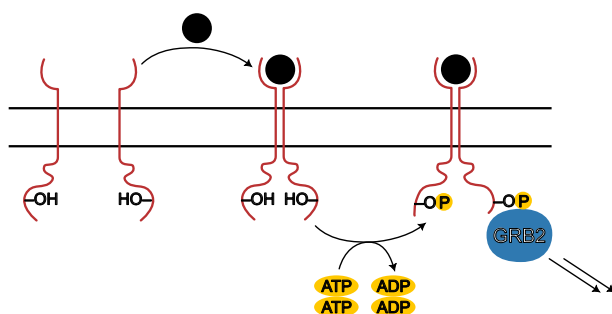
22: Zajímavým příkladem GPCR je *rhodopsin*, díky kterému vůbec můžete číst tento text. Ten se neaktivuje vazbou ligandu, nýbrž absorpcí světla.

Obrázek 7: Vazba ligandu na GPCR způsobí pohyb na intracelulární straně receptoru. Tato změna tvaru pak umožní navázání G proteinu a jeho následnou aktivaci. Zdroj: Latorraca, N. R., Venkatakrishnan, A. J., & Dror, R. O. (2017). *GPCR dynamics: structures in motion*. Chemical reviews, 117(1), 139-155.

Oproti tomu tyrosinkinázy se aktivují dimerizací. Ligand je zvládne přiblížit k sobě, a to způsobí, že si navzájem nafosforylují své tyrosinové zbytky.²³ Fosforylovaný tyrosin je pak rozpoznán dalšími rozličnými proteiny.

Tyrosinkinázové receptory se v ChO neobjeví – tento odstavec je zde jen pro vaše potěšení.

23: Tyrosin je jedna ze tří aminokyselin s –OH skupinou, o nichž jsme se zmínili u fosforylace enzymů.



Obrázek 8: Aktivace tyrosinkinázového receptoru pomocí dimerizace a následné autofosforylace. Fosforylovaný tyrosin je dále rozpoznán specifickými proteiny (zde GRB2) a ty aktivují rozličné signální kaskády.

G proteiny a cAMP jako druhý posel

G proteiny (nebo přesněji *heterotrimerické G proteiny*) se skládají ze tří podjednotek, $G\alpha$, $G\beta$ a $G\gamma$. Jejich název je odvozený od toho, že umí samovolně hydrolyzovat GTP na GDP. G protein s navázaným GTP je aktivní, zatímco s GDP je neaktivní. Hydrolýzou se tedy za nějakou dobu sám deaktivuje.

Signalizace pomocí G proteinů probíhá cyklem aktivace a deaktivace. Začneme neaktivním G proteinem s navázaným GDP. Aktivovaná konformace GPCR (tedy pokud je na něm navázaný hormon) umí katalyzovat výměnu GDP za GTP,



čímž G protein aktivuje. Aktivovaný G protein se rozpadne na dvě části – $G\alpha$ a $G\beta\gamma$, které běží aktivovat další buněčné procesy (viz obrázek 6). GTP zůstane navázané na $G\alpha$ podjednotce. Za nějakou dobu ale dojde k hydrolýze GTP na GDP, tím se $G\alpha$ deaktivuje a spojí se zase zpátky s $G\beta\gamma$. Tím získáme neaktivní G protein s navázaným GDP připravený na další cyklus aktivace.

$G\alpha$ podjednotka aktivuje enzym *adenylátcyklázu*, jejímž úkolem je výroba cAMP z ATP.²⁴ Tato aktivace probíhá (snad už to není překvapení) díky konformační změně po tom, co se $G\alpha$ podjednotka naváže na adenylátcyklázu.

Všechny tyto kroky vedou k zesílení signálu – jeden aktivovaný GPCR aktivuje několik molekul G proteinů a každá aktivovaná adenylátcykláza vyrobí mnoho molekul cAMP, než se zase deaktivuje.

Zvýšená koncentrace cAMP aktivuje klíčový regulační enzym, *protein-kinázu A* (PKA). Ta je normálně držena v neaktivním stavu pomocí tzv. regulačních podjednotek. Když se na ně ale naváže cAMP, tak se oddělí a PKA může volně fosforylovat proteiny v cytoplazmě (a dokonce i v jádře).

Pojďme se nakonec ještě trochu zamyslet nad deaktivací této signální dráhy – zatím totiž víme, jak se deaktivuje GPCR, G protein a adenylátcykláza. To ale nestačí; pořád by nám zbyla vysoká koncentrace cAMP, a tedy i aktivovaná PKA. Naštěstí máme enzym *fosfodiesterázu* (PDE), která konstantně hydrolyzuje cAMP na AMP. Zvýšená koncentrace cAMP tedy bude přetrvávat jen v případě, kdy ho aktivně vyrábíme.

24: Jsou různé druhy $G\alpha$ podjednotek, které umí dělat i jiné věci – pro letošní ročník ChO to ale nebude důležité.

Cvičení 2 I když se koncentrace cAMP vrátí zpátky, pořád nám v buňce zůstanou fosforylované enzymy. Jakým způsobem se vrátí zpátky do nefosforylované formy?

Hormonální regulace transkripce

Některé hormony nefungují na základě alosterické regulace nebo fosforylace, nýbrž umí aktivovat transkripci určitých genů.

Typickým příkladem jsou steroidní hormony. Ty nemají receptor na buněčné membráně, ale v cytosolu, protože jako nepolární molekuly mohou přes membránu procházet. Komplex hormon–receptor se pak přesune do jádra, kde funguje jako transkripční faktor.

Steroidní hormony mají často i vývojové funkce, které způsobují dlouhodobé změny – v takovém případě nepotřebují žádné deaktivční kroky. Naopak bychom nechtěli, aby se z diferencované buňky stala zpátky buňka kmenová.

Citlivost a kooperativita

V této části začneme nad regulací přemýšlet jako nad systémem, který má „vstup“ a „výstup“. Jednoduchým příkladem může být vazba ligandu na enzym, kterou jsme popsali rovnicí (1). Vstupem do tohoto systému je koncentrace ligandu, $[L]$ – ta je řízená externě. Výstupem je poměr f , množství „aktivovaného enzymu“. Výstup je zde už normalizovaný – nabývá hodnot mezi nulou a jedničkou, kde nula je úplně neaktivní a jedna maximálně aktivovaný.

Citlivost systému nám říká, jak moc musíme změnit vstup, abychom výstup posunuli z neaktivního do aktivního stavu. Určíme, že „neaktivní“ stav je, když je výstup menší než 0,1, a „aktivní“ stav naopak znamená, že výstup je vyšší než 0,9.²⁵

Pro náš systém tedy spočítáme koncentrace $[L]_{0,9}$ a $[L]_{0,1}$ řešením rovnice (1) pro vhodnou hodnotu f , jako např.

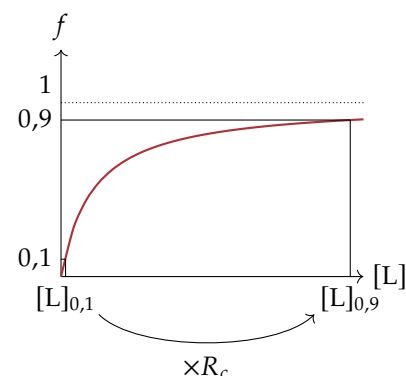
$$0,9 = \frac{[L]_{0,9}}{K_d + [L]_{0,9}}.$$

Citlivost pak spočítáme jako (to vás čeká v domácím kole)

$$R_c = \frac{[L]_{0,9}}{[L]_{0,1}}. \quad (3)$$

Čím vyšší R_c , tím méně citlivý systém je. Můžete si všimnout, že jednoduchá vazba ligandu moc citlivá není – potřebujeme vysokou koncentraci ligandu, abychom enzym plně převedli do aktivní formy. To je občas to, co chceme – hodí se to, když systém musí odpovídat na vysoký rozsah koncentrací, jako např. enzym glukokináza, který ve slinivce funguje jako senzor koncentrace glukózy.

25: Tyto hodnoty nemají samy o sobě žádný reálný význam; mohli bychom klidně použít 0,05 a 0,95. Citlivost tak má význam jen pro porovnávání různých systémů.



Pro jiné procesy ale chceme, aby systém šel rychle „přepínat“ mezi dvěma stavy. Závislost výstupu na vstupu by tak měla mít spíše *sigmoidní* tvar. Je mnoho funkcí, které takový tvar mají. Pokud jste fanoušci strojového učení a neuronových sítí, nejspíše jste slyšeli o funkci

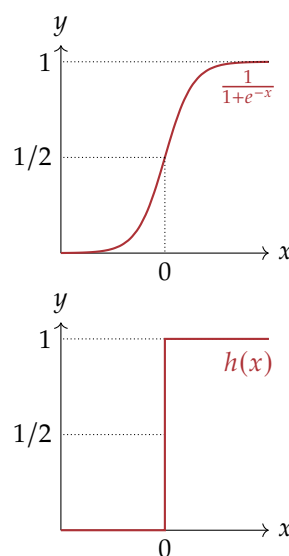
$$f(x) = \frac{1}{1 + e^{-x}}.$$

Pokud je závislost velmi citlivá, můžeme ji dokonce zjednodušeně popsat tzv. Heavisideovou (skokovou) funkcí,

$$h(x) = \begin{cases} 0 & x < 0 \\ 1 & x > 0 \end{cases}$$

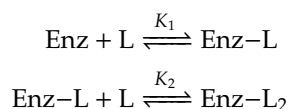
To uvidíme níže v systémové biologii – je ale vždy potřeba si uvědomit, že realistické funkce nikdy nemají takto náhlý „skok“. Je to tedy jen aproximace, která nám dělá život o něco jednodušší.

Biochemicky nejrelevantnější je ale tzv. *Hillova funkce* – ta totiž vychází z typického mechanismu pro zvýšení citlivosti, a to kooperativní vazby.



Kooperativita – Hillova funkce

Kooperativita nastává v případě, kdy se na jeden enzym (nebo sekvenci DNA) může ligand navázat více než jednou. Pojďme se podívat na příklad, kdy máme dvě vazebná místa. Můžeme tedy napsat rovnováhy



Pokud by na sobě vazebná místa byla nezávislá, platilo by

$$K_1 = 2K_2,$$

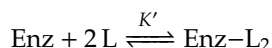
protože komplex Enz-L má dvě možnosti, kde může ligand být.

Pokud je ale $K_1 > 2K_2$, znamená to, že komplex Enz-L₂ je nějak znevýhodněný – např. proto, že si v něm ligandy navzájem překáží. V takovém případě mluvíme o *negativní kooperativitě*.

V opačném případě, $K_1 < 2K_2$, je tvorba komplexu Enz-L₂ podporovaná a mluvíme o *pozitivní kooperativitě*.

Pro nás bude mnohem důležitější pozitivní kooperativita. Je zřejmé, že bychom ji mohli plně popsat pomocí rovnovážných konstant K_1 a K_2 . Pokud by se ale na enzym vázaly čtyři ligandy (jako např. na hemoglobin), pak bychom potřebovali čtyři rovnovážné konstanty. To je ale zbytečně složité (a navíc se hodnoty těchto konstant i špatně zjišťují experimentálně) – líbil by se nám tedy nějaký jednodušší model, který kooperativitu zachycuje.

Pokud je kooperativita silně pozitivní, pak v podstatě můžeme komplex Enz–L úplně zanedbat a uvažovat jen rovnovážnou reakci



s rovnovážnou konstantou $K' = K_1K_2$. Taková rovnovážná konstanta má ale jednotky M^{-2} , což se nám nelíbí – budeme tedy psát $K_d = 1/\sqrt{K'}$, a dostaneme tak disociační konstantu v biochemicky přijatelných jednotkách.

Podobným argumentem jako pro rovnici (1) získáme

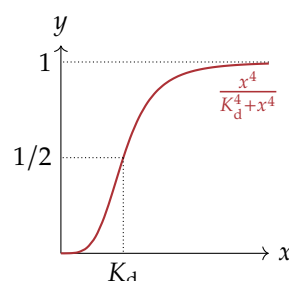
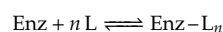
$$f = \frac{[\text{L}]^2}{K_d^2 + [\text{L}]^2}.$$

Tento model můžeme jednoduše rozšířit i na vazbu n ligandů, kdy dostaneme

$$f = \frac{[\text{L}]^n}{K_d^n + [\text{L}]^n}. \quad (4)$$

Této rovnici pak říkáme *Hillova rovnice*. Je zřejmé, že na rozdíl od jednoduché vazby ligandu (1) nám rovnice (4) dá sigmoidní vazebnou křivku, a tedy i zvýšenou citlivost. To uvidíte kvantitativně v domácím kole.

Existují i lepší modely než tento, který bychom mohli nazvat „všechno-nebo-nic“. Typickými příklady jsou MWC a KNF model. Druhý z nich dokonce umí popsat i negativní kooperativitu – to třeba Hillova rovnice nemůže. Tyto modely se v olympiádě neobjeví, ale můžete se na ně pro zajímavost podívat – jedná se v podstatě o rozšíření T/R modelu, který jsme si představili výše.



Systémová biologie

Systémová biologie je obor, který se zabývá matematickým popisem interakcí v biologických systémech. V naší malé exkurzi do světa systémové biologie se zaměříme hlavně na „transkripční sítě“ – tedy soubory genů, které se ovlivňují navzájem. Neznamená to, že by systémová biologie neuměla nic jiného – naopak, můžeme se dostat klidně až k popisu celých orgánů – ale právě soubory genů jsou asi nejjednodušší a nejlépe studované systémy.

Cílem této části je podívat se na pár konkrétních matematických modelů, které vám představí základy systémově-biologické analýzy. V ChO na vás čekají jiné modely; jejich popis je ale založený na úplně stejných principech.

Budeme matematicky popisovat změny určitých veličin v čase. K tomu se standardně využívají tzv. *diferenciální rovnice*. Příkladem může být rovnice

$$\frac{dP}{dt} = \lambda P, \quad (5)$$

která popisuje růst populace bakterií v čase. Co rovnice (5) ale vůbec znamená?

Veličina $P(t)$ je množství bakterií v čase t . Zápis $\frac{dP}{dt}$ označuje *derivaci* – tedy rychlost změny veličiny P .

Rovnice (5) nám tedy říká, že rychlost změny populace je přímo úměrná množství bakterií. To dává biologický smysl – bakterie se množí dělením, kdy se z jedné bakterie stanou dvě. Čím více bakterií máme, tím rychleji jejich populace roste. Pokud začneme s 1000 bakteriemi, za chvíli jich bude 2000, 4000, 8000, 16000, atd. To označujeme jako exponenciální růst. A vskutku, řešením rovnice (5) je exponenciála,

$$P(t) = P_0 e^{\lambda t},$$

kde P_0 je počet bakterií v čase $t = 0$. Hodnota λ udává „rychlost růstu“ – lépe představitelný je ale čas $\tau = \ln 2 / \lambda$, který nám říká, za jak dlouho se populace zdvojnásobí.

Jednoduchý model transkripce a fázové portréty

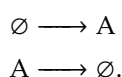
Začneme nejjednodušším případem transkripce – genem A, jehož promotor není nijak regulovaný. Takový promotor budeme značit zjednodušeným schématem vpravo, kde barevný obdélník označuje gen A a šipka jeho transkripci. Podobná schémata budeme využívat i dále ve studijním textu a v samotné ChO.



Předpokládejme, že transkripce probíhá konstantní rychlostí α . Výsledný protein ale v buňce nevydrží věčně; jeho koncentrace postupně klesá degradací.²⁶ To popíšeme lineární závislostí $-\gamma A$ – skoro jako rovnice (5), jen se záporným znaménkem. Rovnice pro změnu koncentrace proteinu A tak bude

$$\frac{dA}{dt} = \alpha - \gamma A. \quad (6)$$

Pro trochu více chemický pohled na tento případ bychom si mohli napsat transkripci a degradaci jako dvě „chemické reakce“,



Transkripce je syntéza A z „ničeho“, a můžeme ji tak popsat kinetikou nultého řádu, $\frac{dA}{dt} = \alpha$. Transkripce je samozřejmě enzymatická reakce – její rychlost bychom správně měli popisovat pomocí kinetiky Michaelise a Mentenové s celkovou koncentrací $[\text{RNAP}]_{\text{tot}}$ a koncentrací substrátů DNA a nukleotidů. Tyto koncentrace jsou ale v buňkách víceméně konstantní – pokud tedy předpokládáme, že i $[\text{RNAP}]_{\text{tot}}$ je konstanta, pak konstantní rychlost transkripce snad dává smysl.

Oproti tomu degradaci můžeme popsat jako reakci prvního řádu a její rychlost je tedy přímo úměrná koncentraci reaktantu, $\frac{dA}{dt} = -\gamma A$.

Nyní bychom ale chtěli pochopit, jak se koncentrace proteinu A mění v čase. Mohli bychom rovnici (6) vyřešit přímo, ale to je pro naše účely zbytečně složité. Lepší bude, když se trochu zamyslíme nad tím, co nám rovnice vlastně říká.

K tomu nám slouží *fázové portréty*. Pojďme se zamyslet nad konkrétní situací, kdy $\alpha = 3 \mu\text{M s}^{-1}$ a $\gamma = 1 \text{ s}^{-1}$. Spočítáme si, jak rychle se A mění

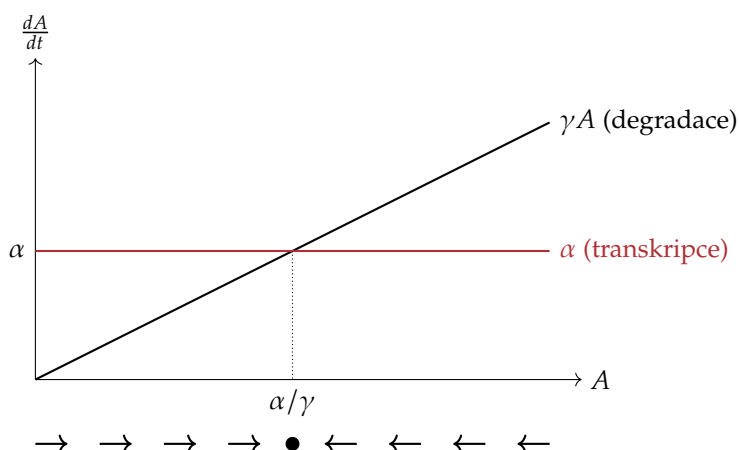
26: Degradace proteinu je obecně snižování koncentrace – buďto v důsledku proteolýzy, kdy buňka enzym aktivně ničí, nebo i v důsledku buněčného dělení. Když se buňka rozdělí na dvě, zvýší se celkový objem, zatímco počet molekul proteinu zůstane stejný.

při různých hodnotách A – stačí prostě dosadit hodnotu A do rovnice (6). Např. pro $A = 0 \mu\text{M}$ je $\frac{dA}{dt} = \alpha = 3 \mu\text{M s}^{-1}$. Můžete se přesvědčit, že to nám dá hodnoty v tabulce 1.

Vidíme tedy, že pokud je koncentrace A malá, má tendenci se zvyšovat, zatímco pokud je moc velká, bude se snižovat. Nakonec dosáhne *stacionárního stavu*, který nastane pro

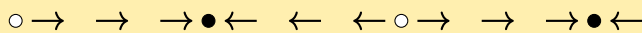
$$\frac{dA}{dt} = 0.$$

To v našem případě odpovídá hodnotě $A = \alpha/\gamma = 3 \mu\text{M}$. Fázový portrét nám tyto informace podává v grafické formě.



Nejprve si můžeme načrtnout rychlosti transkripce a degradace v závislosti na A . Fázový portrét nám pak ukazuje, kterým směrem se bude A vyvíjet. Pro malé A si tedy nakreslíme šipku doprava – transkripce bude rychlejší než degradace, a A se tedy zvyšuje. Pro velké A ale vyhraje degradace, A se bude snižovat, a my musíme kreslit šipky doleva. V bodě $A = 3 \mu\text{M}$ si nakreslíme černou tečku, což znamená *stabilní stacionární bod*. Stabilní znamená, že šipky míří *dovnitř* a ne *ven*. Pokud se tedy koncentrace trochu změní, bude mít tendenci se zase vrátet zpátky. Můžeme mít i nestabilní stacionární body – ty budeme značit bíle vyplněnou tečkou.

Cvičení 3 Představte si, že máme systém, jehož fázový portrét vypadá takto:



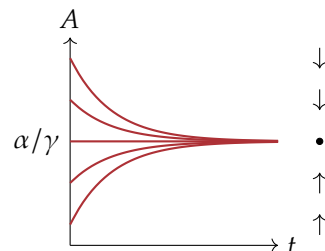
Vysvětlete, proč jeho vývoj v čase pro různé počáteční koncentrace bude vypadat jako graf vpravo.

Tabulka 1: Závislost $\frac{dA}{dt}$ na A .

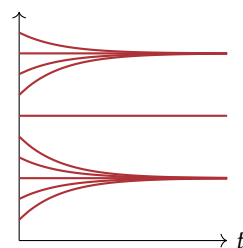
$A / \mu\text{M}$	$\frac{dA}{dt} / \mu\text{M s}^{-1}$
0	3
1	2
2	1
3	0
4	-1
5	-2

Fázový portrét jsou pouze šipky, které nám říkají, jakým směrem se bude A měnit. Graf rychlostí degradace a transkripce je jen pomůcka, která nám umožňuje ho sestavit.

Obrázek 9: Fázový portrét pro jednoduchý model transkripce (6). Rychlost transkripce má konstantní hodnotu α , zatímco rychlost degradace je přímo úměrná množství proteinu A . Pro $A < \alpha/\gamma$ se tak A bude zvyšovat (vyhraje transkripce), zatímco pro $A > \alpha/\gamma$ se bude A snižovat (vyhraje degradace). Pro libovolnou počáteční hodnotu A se nakonec dostaneme do stacionárního bodu $A = \alpha/\gamma$.

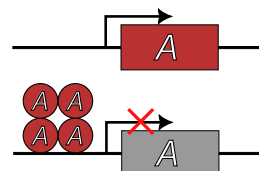


Obrázek 10: Časový vývoj koncentrace proteinu A pro různé počáteční koncentrace. Všimněte si, že vždy dosáhneme stabilního stacionárního bodu. Pokud v něm už začneme, koncentrace A se nemění.



Negativní zpětná vazba – robustní regulace

Regulované promotory nejsou o moc složitější. Pojďme se zkusit zamyslet nad případem *negativní zpětné vazby*. To znamená, že protein A inhibuje svoji vlastní transkripci – buď přímo, nebo přes nějaký další transkripční faktor.

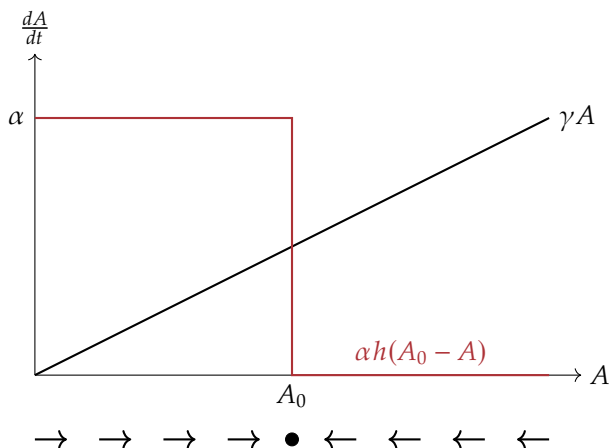


Případ, kdy se samotný protein A váže na gen A si zkusíte vyřešit v domácím kole. My se zde podíváme na *kooperativní* regulaci, kterou zjednodušeně popíšeme Heavisideovou (skokovou) funkcí,

$$\frac{dA}{dt} = \alpha h(A_0 - A) - \gamma A. \quad (7)$$

Tento předpis nám říká, že rychlost transkripce závisí na tom, jestli je A vyšší než „limitní koncentrace“ A_0 . Pokud je $A < A_0$, transkripce probíhá rychlostí α . Pokud je ale $A > A_0$, transkripce neprobíhá vůbec.

Fázový portrét je ukázán na obrázku 11. Pro $A < A_0$ je rychlost transkripce vyšší než rychlost degradace, a koncentrace A se tak bude zvyšovat (šípky „doprava“). Pro $A > A_0$ ale převládá degradace, a koncentrace se tak naopak bude snižovat (šípky „doleva“). Fázový portrét nám tedy říká, že stacionární bod je $A = A_0$.²⁷ Vidíme také, že stacionární bod je stabilní, protože šípky míří „dovnitř“.



27: Alespoň v případě, kdy $\alpha > \gamma A_0$. V opačném případě ale negativní zpětná vazba poněkud ztrácí smysl.

Obrázek 11: Fázový portrét pro rovnici (7). Transkripce probíhá rychlostí α pro $A < A_0$; v opačném případě neprobíhá vůbec. Degradace proteinu je opět přímo úměrná koncentraci. Vidíme, že v tomto případě je stacionární bod daný hodnotou A_0 , která je závislá na chemických vlastnostech enzymů (a ne na jejich koncentraci jako α a γ v prvním modelu).

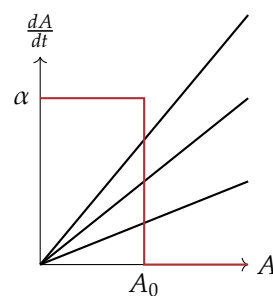
Systém s negativní zpětnou vazbou má oproti neregulovanému genu dvojí výhodu – může dosáhnout stacionárního stavu rychleji a zároveň je *robustní* vůči změnám parametrů.

Můžete si všimnout, že pokud budeme měnit parametry α a γ , stacionární bod bude vždy $A = A_0$ (viz obrázek 12). Tyto parametry se mohou mezi buňkami značně lišit – rychlost transkripce i degradace záleží na tom, co se v buňce zrovna děje. Tento systém nám ale umožní mít stabilní hladinu A i za takto variabilních podmínek – tomu říkáme robustní systém.

Systém může dosáhnout stacionární stavu rychleji, protože můžeme libovolně zvýšit hodnotu α , aniž bychom posunuli stacionární koncentraci. (To je samozřejmě artefakt Heavisideovy funkce – v realistickém případě, např. s Hillovou funkcí, bychom narazili na nějaké limity.)

Feedforward loop

Častým motivem v biochemii je tzv. *feedforward loop*. Ta zahrnuje tři geny – A , B a C – kdy pro aktivaci genu C potřebujeme jak protein A , tak protein B . Protein A ale zároveň slouží i jako aktivátor genu B . Ukážeme si, že tento transkripční motiv umožňuje rozpoznat délku vstupního signálu – to je důležité, protože buňka chce odpovídat jen na opravdové změny a ne na náhodné fluktuace.



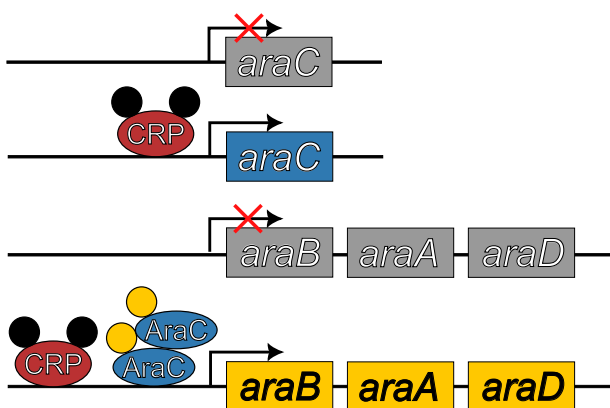
Obrázek 12: Změna parametru γ (tři černé křivky) neovlivní polohu stacionárního bodu. Systém je tedy *robustní*. Podobný graf lze nakreslit i pro změnu parametru α .

V přírodě tento systém využívá např. bakterie *E. coli* na regulaci metabolismu arabinózy.²⁸ *E. coli* chce metabolizovat arabinózu jen když nemá dostatek glukózy. Geny příslušného *ara* operonu tak budou aktivovány jen v případě, že glukózy je málo, ale arabinózy dostatek.²⁹

U *E. coli* nedostatek glukózy způsobí zvýšení koncentrace cAMP, a to následně aktivuje protein CRP. Protein CRP aktivuje transkripci genu *araC*. Protein AraC je transkripční faktor, který je ale aktivní jen v přítomnosti arabinózy. Geny pro metabolismus arabinózy, souhrnně značené *araBAD*, potřebují pro transkripci jak CRP, tak AraC. Schéma těchto vztahů je na obrázku 13. Všimněte si, že pro systémovou biologii nejsou důležité molekulární detaily aktivace jednotlivých genů.

Cvičení 4 Systém, který jsme popsali, není úplně kompletní – gen *araC* je navíc regulován i negativní zpětnou vazbou (tedy protein AraC inhibuje transkripci *araC*). Vysvětlete, proč to je důležité.

Nápověda: Co by se stalo v případě, že by buňka neměla ani glukózu, ani arabinózu?



Budeme předpokládat, že oba aktivační kroky se opět dají popsat Heavisideovou funkcí. Např. aktivaci *araC* při nízké koncentraci glukózy (Glc) popíšeme vztahem

$$h([Glc]_0 - [Glc])$$

To je zjednodušení realističtější Hillovky funkce – kritická koncentrace $[Glc]_0$ pak odpovídá disociační konstantě K_d (zamyslete se proč).

Předpokládejme, že v médiu je dostatek arabinózy a mění se jen koncentrace glukózy – protein AraC tak bude vždy aktivovaný.³⁰ Rovnice pro koncentrace proteinů AraC a AraBAD pak můžeme zapsat podobně jako pro případ negativní zpětné vazby. Konečný výsledek je³¹

$$\frac{d[AraC]}{dt} = \alpha_{AraC} h([Glc]_0 - [Glc]) - \gamma_{AraC}[AraC]$$

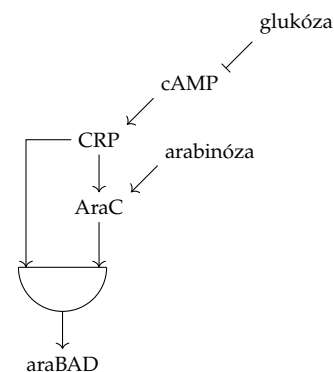
$$\frac{d[AraBAD]}{dt} = \alpha_{AraBAD} h([Glc]_0 - [Glc]) h([AraC] - [AraC]_0) - \gamma_{AraBAD}[AraBAD]$$

Cvičení 5 Vysvětlete jednotlivé členy v rovnicích výše. Co reprezentují parametry $[Glc]_0$ a $[AraC]_0$? Pomoci vám může i obrázek 15.

Ukažte, že stacionární hodnota $[AraC]$ je $\alpha_{AraC}/\gamma_{AraC}$, pokud je pro-

28: Můžete to srovnat s regulací metabolismu laktózy, o níž se dozvíte v domácím kole. V něm také hraje roli protein CRP (občas se mu také říká CAP), který je aktivován nedostatkem glukózy.

29: Pro více informací se můžete podívat např. na Schleif, R. (2000). *Regulation of the L-arabinose operon of Escherichia coli*. Trends in genetics, 16(12), 559–565 a Mangan, S., Zaslaver, A., & Alon, U. (2003). *The coherent feedforward loop serves as a sign-sensitive delay element in transcription networks*. Journal of molecular biology, 334(2), 197–204..



Obrázek 13: Schéma interakcí regulujících metabolismus arabinózy. Oba proteiny – CRP i AraC – jsou potřeba pro aktivaci metabolických genů *araBAD*.

Obrázek 14: Schéma feedforward loop regulující metabolismus arabinózy. CRP váže jako ligand cAMP (černá) a AraC váže arabinózu (žlutá).

30: V opačném případě bychom ještě museli přidat člen $h([Ara] - [Ara]_0)$ závislý na koncentraci arabinózy $[Ara]$.

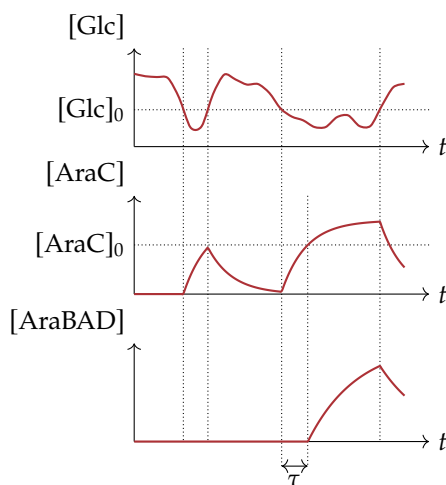
31: Hodnota výrazu $h(x)h(y)$ je jedna jen když $x > 0$ a zároveň $y > 0$. V jakémkoliv jiném případě je nulová.

motor pro *araC* aktivovaný (tedy $[Glc] < [Glc]_0$). Jaká je stacionární hodnota $[AraC]$ pro $[Glc] > [Glc]_0$?

Proč musí platit $[AraC]_0 < \alpha_{AraC}/\gamma_{AraC}$?

Můžeme transkripci *AraBAD* aktivovat pomocí dvou krátkších období nízké koncentrace glukózy po sobě, namísto jednoho dlouhého?

Časová závislost koncentrací jednotlivých proteinů je ukázána na obrázku 15. Vidíme, že malá fluktuace koncentrace glukózy spustí transkripci *araC*, ale nikoli metabolických genů *araBAD*. Ty se aktivují, až když je koncentrace glukózy nízká po dobu delší než interval τ . Motiv feedforward loop nám tedy umožňuje rozlišit krátké fluktuace od dlouhodobých změn.



Obrázek 15: Vývoje koncentrací proteinů pro metabolismus arabinózy. Koncentrace arabinózy je konstantní, ale koncentrace glukózy se mění. Pokud klesne pod hodnotu $[Glc]_0$, aktivuje se transkripci *araC* a po čase τ i transkripci metabolických genů *araBAD*.

Inzulín, glukóza a glukotoxicita

Další příklad, který si ukážeme, bude trochu více fyziologický. Podíváme se totiž na to, jak hladina inzulínu ovlivňuje množství glukózy v krvi.

Víme, že když se zvýší množství glukózy, tělo (konkrétně slinivka) na to reaguje zvýšením množství inzulínu. Ten zvýší tok glukózy do buněk, a hladina krevní glukózy tak zase spadne. Tento systém je velmi přísně regulovaný, aby se hladina glukózy v krvi dlouhodobě držela na hodnotě 5 mM.

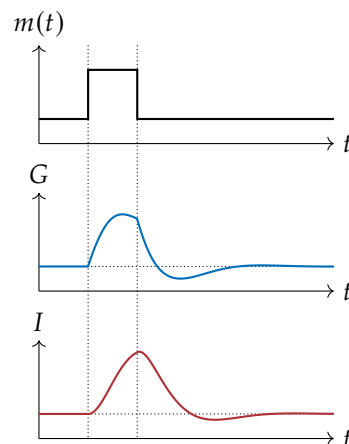
Tuto situaci lze popsat jednoduchým modelem. Označme si koncentraci glukózy jako G a koncentraci inzulínu jako I . Pak můžeme psát

$$\begin{aligned}\frac{dG}{dt} &= m(t) - sIG \\ \frac{dI}{dt} &= qBf(G) - \gamma I,\end{aligned}$$

kde $m(t)$ je množství přijaté glukózy v čase.

Parametr s je tzv. citlivost k inzulínu. První rovnice nám tedy říká, že glukózu přijímáme v jídle rychlostí $m(t)$ a odbouráváme ji rychlostí sIG – odbourávání to tedy „reakce prvního řádu“ vůči glukóze a její rychlost je přímo úměrná hladině inzulínu v krvi.

Tato diskuze byla z velké míry převzata z učebnice Alon, U. (2019). *An introduction to systems biology: design principles of biological circuits*. Chapman and Hall/CRC.



Obrázek 16: Časový vývoj koncentrací glukózy a inzulínu po jídle – to je reprezentováno jako pulz $m(t)$.

Druhá rovnice nám říká, že inzulin je produkován buňkami slinivky rychlostí $qBf(G)$ a je degradován rychlostí $-\gamma I$. Druhý člen už známe z předchozích modelů, ale první člen si asi zaslouží více vysvětlení. Parametr q je „rychlostní konstanta“ výroby inzulinu a B je množství buněk slinivky. Čím více buněk, tím více inzulinu vyrábíme. Tyto buňky ale odpovídají na koncentraci glukózy, G , a to jakousi aktivační funkcí $f(G)$. Typicky se bere $f(G) = G^2$. Pokud je koncentrace glukózy nulová, buňky nejsou aktivované vůbec; a čím více je glukózy, tím více aktivované jsou. Je poněkud nerealistické, že by se aktivace zvyšovala do nekonečna, ale pro tento model to není důležité. (Můžete se zamyslet na lepší funkci $f(G)$.)

Budeme nejprve uvažovat, že produkce glukózy je konstantní,³² $m(t) = m_0$. Pro tuto situaci si můžeme nakreslit fázový portrét a dokonce i vyřešit pro stacionární koncentrace G a I .

32: Konstantní produkci glukózy máme např. přes noc, když jsme se dlouho ne-najedli, a játra ji tak musí uvolňovat do krve ze svých zásob.

Protože máme dvě proměnné (G a I), budeme si muset nakreslit dvou-rozměrný fázový portrét. Opět ale chceme znát závislosti derivací dG/dt a dI/dt na hodnotách G a I .

Fázový portrét je nakreslen na obrázku 17. Vodorovná osa představuje koncentraci glukózy, G , zatímco hladinu inzulinu budeme kreslit na svislou osu. Pro každý bod v rovině se souřadnicemi (G, I) si spočítáme hodnoty derivací jako vektor $(dG/dt, dI/dt)$. Tento vektor pak nakreslíme jako šipku v konkrétním bodě.

Jako konkrétní příklad zkusme vzít $m_0 = s = q = B = \gamma = 1$ (zapomeneme výjimečně na jednotky), čímž dostaneme rovnice

$$\begin{aligned}\frac{dG}{dt} &= 1 - IG \\ \frac{dI}{dt} &= G^2 - I.\end{aligned}$$

Pokud si vybereme bod $(2,3)$, získáme

$$\frac{dG}{dt} = 1 - 3 \times 2 = -5$$

a

$$\frac{dI}{dt} = 2^2 - 3 = 1.$$

V tomto bodě tak dostaneme vektor $(-5, 1)$, který je reprezentován šipkou „doleva nahoru“ (přesvědčte se, že ji na fázovém portréту najdete).

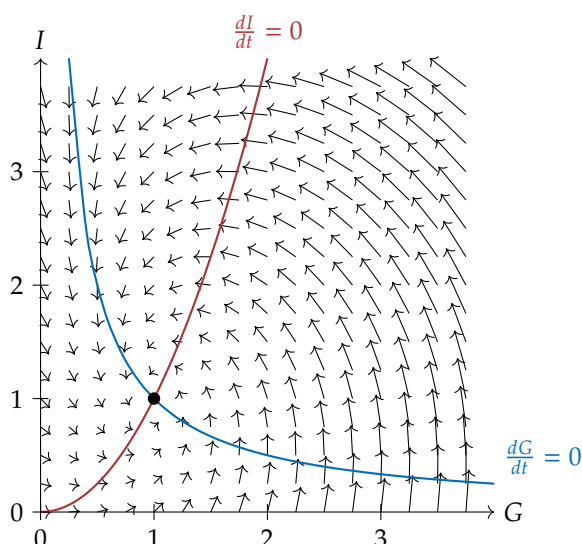
Stacionární bod je takový, kde se koncentrace G a I nemění. Musí tedy platit $dG/dt = 0$ a zároveň $dI/dt = 0$ – dostaneme tak soustavu dvou rovnic. Na fázovém portrétu ji můžeme zobrazit graficky pomocí *nulklin*. Nulklina je křivka, na které platí jedna z těchto rovnic. Dostaneme tak nulklinu pro $dG/dt = 0$ (modrá), která je popsána rovnicí

$$\frac{dG}{dt} = 1 - IG = 0,$$

neboli

$$I = \frac{1}{G}.$$

To znamená, že šipky začínající na modré křivce budou úplně svislé – můžete se přesvědčit, že to tak skutečně je.



Obrázek 17: Fázový portrét pro regulaci hladiny glukózy pomocí inzulinu. Červená a modrá křivka jsou jednotlivé nulklíny a jejich průsečík je stabilní stacionární bod.

Pro $dI/dt = 0$ podobně dostaneme druhou nulklinu (červená), která je popsána rovnicí

$$I = G^2.$$

Průsečík nulklin splňuje obě rovnice najednou, a bude to tedy hledaný stacionární bod. Určování stability ve 2D fázových portrétech je o něco složitější – v tomto případě to trochu vypadá, že se šípky „točí kolem dokola“, než že by mířily přímo dovnitř³³ – a proto bude v ChO vždy explicitně vyznačena.

33: To je vidět i jako oscilace G a I na obrázku 16.

Cvičení 6 Ukažte, že ve stacionárním stavu platí

$$G = \left(\frac{\gamma m_0}{s q B} \right)^{1/3}$$

a

$$I = \left(\frac{m_0^2 q B}{s^2 \gamma} \right)^{1/3}.$$

Tento model vypadá, že krásně vysvětluje regulaci hladiny glukózy v krvi. Máme stabilní stacionární bod, což znamená, že po zvýšení koncentrace glukózy se zase dostaneme zpátky na fyziologickou hodnotu, jak je ukázáno na obrázku 16.

Má ale jeden velký háček – ukazuje se, že parametr s se mezi různými lidmi značně liší, i když stacionární hodnota $G = 5 \text{ mM}$ je univerzální. V tomto modelu ale stacionární koncentrace glukózy závisí na s – nemůžeme tedy toto pozorování vysvětlit.

Pokud se ale podíváte na stacionární hodnotu G pořádně, zjistíte, že závisí na kombinaci sB – a vskutku, lidé s vyšší hodnotou s mají méně inzulin produkujících buněk ve slinivce. Tyto dva efekty se přesně „vykrátí“, aby hodnota stacionární koncentrace byla vždy 5 mM .

Abychom pochopili matematicky, jak lidské tělo zvládne takto přesně kompenzovat hodnoty s a B , musíme k našim rovnicím přidat ještě jednu,

a to rychlost množení buněk slinivky,

$$\frac{dB}{dt} = \mu(G)B.$$

Tato rovnice je podobná rovnici (5), ale rychlost růstu $\mu(G)$ závisí na koncentraci glukózy. Tento růst je velmi pomalý – adaptuje se jen na dlouhodobou hladinu glukózy. Rychlost růstu je ale daná mikroskopickými parametry, které se mezi lidmi moc nemění (na rozdíl od s) – to je podobný princip, jako jsme viděli u negativní zpětné vazby.

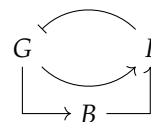
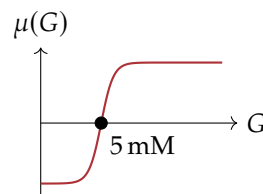
Pokud je G dlouhodobě menší než 5 mM, pak bude počet buněk klesat – tím se sníží množství inzulínu a zvýší G – pokud větší, tak naopak stoupat. Ve stacionárním stavu bude platit

$$\frac{dB}{dt} = \mu(G)B = 0,$$

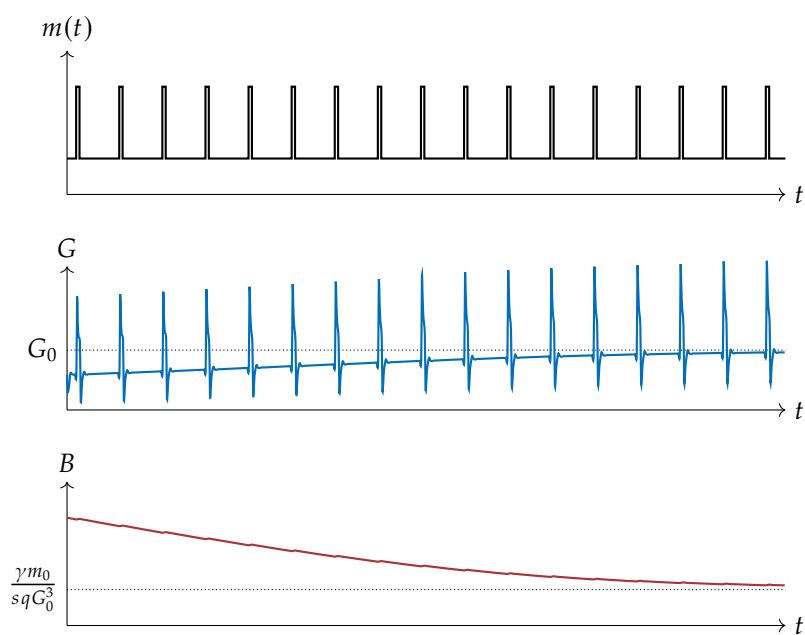
což nastane v případě, kdy $\mu(G) = 0$. Vidíme tedy, že $\mu(G)$ musí mít hodnotu nula právě při $G = 5$ mM. Můžete se přesvědčit, že abychom dostali stabilní stacionární bod, musí v něm být $\mu(G)$ rostoucí. (Zamyslete se, co se stane, když dlouhodobá koncentrace glukózy trochu klesne.)

Tomuto mechanismu říkáme *dynamická kompenzace*. Jeho principem jsou dvě negativní zpětovazebné smyčky – jedna rychlá, mezi inzulínem a glukózou, a druhá pomalá, mezi glukózou a množením buněk slinivky. Rychlá smyčka udržuje glukózu na konstantní hladině, zatímco ta pomalá způsobuje adaptaci počtu buněk na konkrétní hodnotu s .

Jak dynamická kompenzace vypadá v čase je ukázáno na obrázku 18. Grafy ukazují, co se stane, když se najednou zvýší hodnota s . Po každém jídle (zvýšení $m(t)$) se hladina glukózy G rychle ustálí na „kvazistacionární“ hodnotě.³⁴ Tato hodnota je ze začátku nižší než G_0 – zvýšili jsme s , takže vyrábíme až moc inzulínu, a tedy máme málo glukózy. Postupem času ale pomalu klesá počet buněk slinivky, B , a hladina glukózy v krvi se vrací na hodnotu G_0 .



34: Tuto hodnotu lze spočítat pomocí cvičení výše – hodnota B se mění velmi pomalu, takže ji pro výpočet můžeme považovat za konstantní.

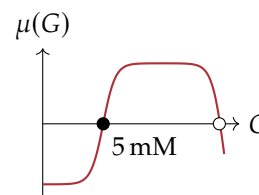


Obrázek 18: Dynamická kompenzace. Po snížení senzitivity k inzulínu, s , se hladina glukózy v krvi dočasně sníží – to je ale postupně kompenzováno snížením počtu buněk slinivky, a stacionární hladina glukózy se tak postupně vrátí na správnou hodnotu G_0 .

Ukazuje se ale, že tato regulace je zajímavější, než jsme zatím viděli. Křivka pro $\mu(G)$ totiž má i nestabilní stacionární bod – pokud tedy přesáhneme kritickou koncentraci glukózy v krvi, počet buněk slinivky se začne rapidně snižovat a nakonec se dostaneme do situace, kdy hladina glukózy v krvi vůbec není regulovaná. Tomuto jevu se říká *glukotoxicita* a je spojený s diabetem 2. typu.

Mohli byste se ptát, proč křivka $\mu(G)$ vůbec má takovýto tvar. Je pro to dobrý důvod – chrání nás před zmutovanými buňkami slinivky. Představte si, že máme zmutovanou buňku, která je pětikrát citlivější na glukózu než normální buňka. Při $G = 5 \text{ mM}$ se tedy chová, jako by $G = 25 \text{ mM}$. Taková buňka by se bez glukotoxicity rychle množila a nakonec bychom skončili s buňkami pětikrát citlivějšími na glukózu než by měly být – ale tím pádem by stacionární koncentrace glukózy v krvi byla jen letálně nízkých 1 mM . Tvar křivky pro $\mu(G)$ je tak balance mezi glukotoxicitou a ochranou před zmutovanými buňkami.

Následující dva odstavce jsou nad rámec úloh ChO a jsou zde opět jen pro vaše potěšení.



Biologický oscilátor

V některých případech by se buňce hodilo, aby se hladiny proteinů měnily cyklicky v čase – můžete si představit, že na podobném principu by mohly být založeny jakési „biologické hodiny“.

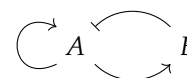
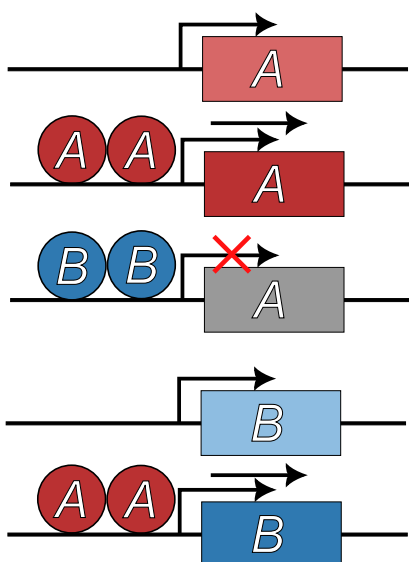
Je mnoho různých způsobů, jak takový oscilátor sestavit – klíčovým prvkem je většinou negativní zpětná vazba „se zpožděním“. Jeden z nejjednodušších zahrnuje dva geny, A a B, kde A aktivuje sám sebe, ale zároveň aktivuje i svůj represor B.

Abychom tuto situaci popsali matematicky, musíme se zamyslet nad různými „stavy“ promotorů pro geny A a B. Promotor genu A má tři různé stavy – volný, s navázaným A a s navázaným B. Promotor genu B má jen dva stavy, a to volný, nebo s navázaným A.

Tato diskuze byla z velké míry převzata z učebnice Phillips, R., Kondev, J., Theriot, J., & Garcia, H. (2012). *Physical biology of the cell*. Garland Science.

Dalším známým modelem pro biologický oscilátor je tzv. *represilátor* – ten zahrnuje tři geny, ale nepotřebuje pozitivní zpětnou vazbu.

Podobné počítání stavů – ale o něco jednodušší – je součástí domácího kola.



Obrázek 19: Vazba transkripčních faktorů A a B na promotory jejich genů. Dvojitá šipka naznačuje, že transkripce je výrazně aktivovaná.

Předpokládejme, že jak A, tak B se na promotory vážou jako dimery, a pro zjednodušení můžeme říci, že všechny mají stejnou disociační

konstantu K_d . Vazbu jednoho dimeru transkripčního faktoru bychom tedy mohli popsat Hillovou funkcí,

$$\frac{x^2}{K_d^2 + x^2} = \frac{(x/K_d)^2}{1 + (x/K_d)^2}.$$

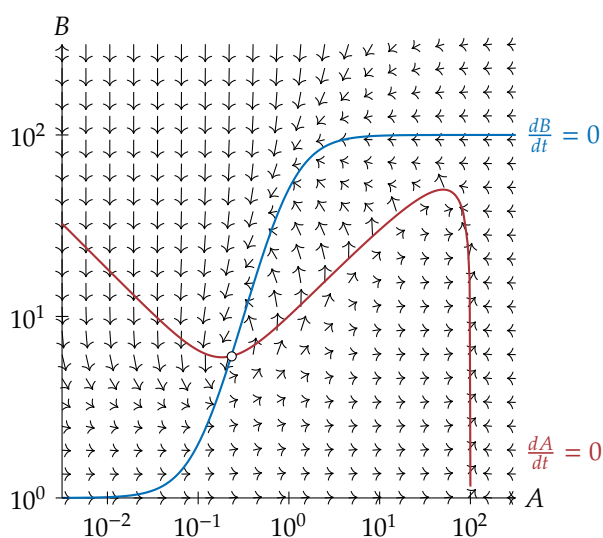
To si můžeme interpretovat tak, že stav s navázaným transkripčním faktorem má „váhu“ $(x/K_d)^2$, zatímco volný promotor má „váhu“ jedna.

Každý stav má svoji vlastní rychlost transkripce. Pokud je promotor pro gen A volný, transkripce probíhá rychlostí α_{0A} . Pokud ho ale aktivujeme (navázáním dimeru A), transkripce bude probíhat rychlostí $\alpha_A \gg \alpha_{0A}$. Oproti tomu inhibovaný promotor (s navázaným dimerem B) transkripci úplně zastaví.

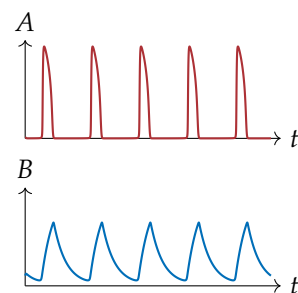
Celková rychlost transkripce pak bude vážený průměr těchto rychlostí. Rovnice pro koncentrace proteinů A a B tedy budou

$$\begin{aligned} \frac{dA}{dt} &= \frac{\alpha_{0A} + \alpha_A(A/K_d)^2}{1 + (A/K_d)^2 + (B/K_d)^2} - \gamma_A A \\ \frac{dB}{dt} &= \frac{\alpha_{0B} + \alpha_B(A/K_d)^2}{1 + (A/K_d)^2} - \gamma_B B \end{aligned}$$

Všimněte si, že jmenovatel zlomku v první rovnici má tři členy – ty odpovídají třem stavům příslušného promotoru. Čítec má jen dva členy, protože stav s navázaným B nepodléhá transkripci vůbec.



Z fázového portréту to není tolik jasné, ale průsečík nulklin je *nestabilní* stacionární bod. Co se ve skutečnosti stane je, že koncentrace proteinů A a B se budou cyklicky měnit v čase, což je ukázáno na obrázku 20. Vidíme, že koncentrace A začne rapidně stoupat, ale to zrychlí i transkripci represoru B. Když B dosáhne kritické koncentrace, transkripce A se zastaví, a množství A tak zase klesne. Ale pak už nic neaktivuje ani transkripci B, takže i protein B je degradován, a cyklus může pokračovat znovu.



Obrázek 20: Vývoj koncentrace proteinů A a B v čase.

Obrázek 21: Fázový portrét pro biologický oscilátor.

Shrnutí

Ukázali jsme si, že geny a proteiny musí v buňce být striktně regulované, aby se organismy mohly přizpůsobovat změnám prostředí. Tato regulace zahrnuje mnoho úrovní – od mezimolekulových interakcí po komunikaci mezi různými orgány.

Funkce proteinů je v buňkách regulovaná pomocí tří mechanismů – alosterické vazby, kovalentní modifikace (zejména fosforylace) nebo regulace transkripce. První dva mechanismy jsme popsali dvoustavovým R/T modelem.

V regulaci jednoho proteinu většinou hraje roli mnoho látek – hormonů, druhých posílů nebo regulačních proteinů. To jsme si ukázali konkrétně na příkladu signalizace pomocí receptorů spřažených s G proteinem (GPCR). Klíčové poznatky byly, že jednotlivé kroky signalizace musí původní signál zesílit (amplifikovat) a že všechny látky se musí po ukončení signálu vrátit do původního stavu.

Abychom regulační mechanismy popsali kvantitativně, seznámili jsme se se základy systémové biologie. Místo popisu všech mezimolekulových interakcí používáme zjednodušené modely jako Hillovu nebo Heavisideovu funkci. I to nám ale umožňuje zachytit hlavní principy biologické regulace.

Systémovou biologii jsme si představili na příkladech zahrnující transkripci. Ukázali jsme si, že negativní zpětná vazba umožňuje robustně regulovat množství konečného proteinu. Dále jsme si představili feedforward loop jako motiv umožňující rozeznat délku změn v čase.

Adaptaci na dlouhodobé změny jsme si ukázali na příkladu regulace hladiny glukózy v krvi, kde jsme využili 2D fázový portrét. Ten jsme si nakonec ukázali i na modelu biologického oscilátoru. Ten má nestabilní stacionární bod, a koncentrace proteinů se tak cyklicky mění v čase, místo aby se ustálily na jedné hodnotě.

Dodatek: numerické řešení diferenciálních rovnic

Pokud by vás zajímalo, jak jsme získali grafy v tomto textu (a v zadání ChO), odpověď je poměrně jednoduchá – použili jsme tzv. Eulerovu metodu. Principem je, že si čas rozdělíme na mnoho krátkých úseků o délce Δt . Pak můžeme přibližně psát

$$\frac{dA}{dt} \approx \frac{A(t + \Delta t) - A(t)}{\Delta t},$$

odkud dostaneme

$$A(t + \Delta t) \approx A(t) + \frac{dA}{dt} \Delta t.$$

Ale hodnotu derivace známe z diferenciální rovnice našeho modelu. Takto tedy můžeme postupně spočítat vývoj hodnoty A v čase. Volba intervalu Δt je klíčová – pro přesný výpočet musí být dostatečně malý, ale čím menší je, tím déle výpočet trvá.

Můžeme to zkusit např. pro inzulin a glukózu, kde jsme získali rovnice

$$\begin{aligned}\frac{dG}{dt} &= 1 - IG \\ \frac{dI}{dt} &= G^2 - I.\end{aligned}$$

Předpokládejme, že začneme s hodnotami $G = 5$, $I = 1$. Pak získáme

$$\begin{aligned}\frac{dG}{dt} &= 1 - 5 \times 1 = -4 \\ \frac{dI}{dt} &= 5^2 - 1 = 24.\end{aligned}$$

Pokud zvolíme $\Delta t = 0,01$, dostaneme

$$\begin{aligned}G(0,01) &= 5 - 4\Delta t = 4,96 \\ I(0,01) &= 1 + 24\Delta t = 1,24.\end{aligned}$$

Tyto hodnoty můžeme opět dosadit do původních rovnic a získat tak $G(0,02)$, $G(0,03)$, atd. Ruční řešení je zdlouhavé, ale počítač si s těmito výpočty hravě poradí.