

Regulace metabolismu

Principy regulace metabolismu

**Obecné mechanismy účinku
hormonů a neurotransmiterů**

**Typy membránových receptorů
a intracelulární receptory**

Formálně je možné rozlišovat **tři úrovně regulace**:

- regulace dějů **v určitém buněčném kompartmentu** (organele) s jeho charakteristickou enzymovou výbavou,
- regulace **v rámci kompletní buňky**, významné úlohy nabývá **proteosyntéza a transport látek membránami** oddělujícími jednotlivé kompartmenty, neuplatňují se extracelulární signály,
- regulace vyplývající z **komunikace mezi buňkami** v určitém okrsku tkáně, orgánu nebo i celém organismu; metabolismus buněk ovlivňují **extracelulární signály** (neurotransmitery, hormony, cytokiny a mnoho dalších signálních molekul).

Mnoho metabolických drah je však regulováno jen **v jednom nebo v několika málo uzlových bodech** - v rychlost určujících krocích, a to obvykle více než na jedné z uvedených úrovní.

Uvedené tři formální úrovně regulace se překrývají.

Některé významné faktory

v regulaci metabolických pochodů v buňce:

- **buněčný proteom** (vybavení buňky enzymy a jinými proteiny) určený expresí genů v daném typu buňky a v daném čase;
- **výbava buňky specifickými receptory**, které umožňují rozpoznat extracelulární signální molekuly a reagovat tak na změny složení vnitřního prostředí nebo na faktory zevního prostředí obklopujícího organismus;
- **existence mnohotných forem enzymů** (izoenzymů) umožňuje, aby jediný typ reakce byl regulován odlišně v různých tkáních, v různých organelách nebo podle podmínek v různém čase;
- **dostupnost živin** a jiných esenciálních látek
- **energetický stav buňky.**

Tři hlavní způsoby

řízení metabolických pochodů v buňkách:

- 1 regulace **množství enzymu** (počtu molekul) nebo regulačních proteinů ovlivňujících aktivitu enzymů v buňce;
- 2 regulace **katalytické aktivity enzymu** nebo aktivity regulačních proteinů, které aktivitu enzymů ovlivňují;
- 3 regulace **transportu látek membránami** – jak cytoplazmatickou, tak membránami oddělujícími jednotlivé buněčné kompartmenty.

– Regulace **syntézy enzymů a regulačních bílkovin**

Některé enzymy jsou **konstitutivní** – jejich geny jsou exprimovány přibližně stálou rychlostí.

Mnohé **enzymy** jsou **adaptibilní** – exprese genu je určitým signálem **indukována** (transkripce zahájena aktivací enhanceru) nebo naopak utlumena. (aktivace silenceru).

Gen ovšem může být též amplifikován, regulována může být i rychlost transkripce, rychlost posttranskripčních úprav hnRNA, rychlost exportu mRNA z jádra, degradace mRNA v cytoplazmě, rychlost translace a posttranslačních úprav.

U eukaryontů je exprese genu nejčastěji indukována vazbou signální molekuly na specifický membránový receptor (např. růstové faktory, cytokiny, insulin), nebo u nepolárních signálních molekul vazbou se specifickými intracelulárními receptory (steroidní hormony, jodthyroniny, retinoáty).

1 Regulace množství enzymů

– **Regulovaná degradace proteinů**

Rychlost degradace enzymů je **selektivní**, zejména těch, které katalyzují reakce určující rychlost metabolických pochodů nebo jsou v jejich uzlových bodech. Mají zpravidla **krátký biologický poločas** (minuty až několik málo hodin) a bývají degradovány většinou v cytosolovými proteasomy po označování ubikvitinem.

- Rychlost odbourání enzymu (jejich biologické poločasy bývají velmi rozdílné) závisí jednak na větší či menší specifitě proteináz, jednak na přítomnosti určitých sekvencí v primární struktuře proteinu.

Významná je aktuální konformace enzymu a o tom zda podlehne proteolýze někdy rozhoduje nedostatek substrátu či koenzymu, přítomnost některých kovových iontů atd.

Enzymy s **dlouhým biologickým poločasem** bývají odbourávány vesměs neselektivně lyzosomalními katepsiny.

Dlouhodobé hladovění nebo buněčný stres zrychluje selektivně odbourání enzymů, které mohou být za daného stavu postrádány a nejsou nezbytné pro přežití buňky.

2 Regulace **katalytické aktivity enzymů**

Hlavní způsoby:

Využití Michaelisovy kinetiky (zvýšení rychlosti vyšší koncentrací substrátu) není příliš účinné, takto vyvolané změny rychlosti jsou poměrně malé;

- **aktivace proenzymu částečnou proteolýzou;**
- **alosterická regulace** aktivity u oligomerních enzymů;
- **interakce s regulačními proteiny**, častá je aktivace enzymu uvolněním inhibující podjednotky nebo jiného inhibujícího regulačního proteinu;
- **reverzibilní kovalentní modifikace** enzymu (nebo i regulačního proteinu);
nejrozšířenější jsou reverzibilní **fosforylace** katalyzované různými typy proteinkináz a fosfoproteinfosfatáz.

– Aktivace proenzymu částečnou proteolýzou

Aktivní enzym vzniká z proenzymu odštěpením určité sekvence polypeptidového řetězce.

Tento princip aktivace je zvláště častý u proteináz, chrání proteiny jiné než specifické substráty před nežádoucí proteolýzou.

Příklady:

- Extracelulární – velké proteinázy trávicího traktu
(pepsin, chymotrypsin, trypsin atd.),
- proteinázy koagulační kaskády
(faktory IX, X, XI a trombin),
- intracelulární – aktivace proteináz kaspáz v iniciaci apoptózy.

– **Alosterická regulace aktivity a kooperativní efekt**

Enzymy kontrolující metabolickou cestu jsou zpravidla oligomery s několika identickými podjednotkami (protomery). Saturační křivky těchto enzymů nebývají hyperbolické (neodpovídají Michaelisově kinetice), ale jsou sigmoidní.

Kooperativní efekt: U těchto oligomerních enzymů (podobně i u některých jiných bílkovin, např. hemoglobinu) navázání molekuly **substrátu** (příp. dikyslíku u hemoglobinu) **do aktivního centra** jedné z podjednotek mění afinitu k substrátu i v jiných podjednotkách. Usnadní-li tato indukovaná změna konformace vazbu substrátu, jde o **pozitivní kooperační efekt**.

Alosterické efekторы mají **strukturu podstatně jinou než substrát** (jsou alosterické) a proto se reverzibilně navazují se na enzym **jinde než v aktivním centru** (v alosterických regulačních místech). Výsledkem indukované konformační změny, kterou působí, je změna konformace aktivních center nebo uvolnění regulačních podjednotek – aktivita enzymu se zvýší nebo je naopak inhibována.

2 Regulace aktivity enzymů

Příklady regulace alosterických enzymů

Alosterický enzym	Kooperativní vliv substrátu	Alosterický aktivátor	Alosterický inhibitor
Glykogensyntáza	–	Glc-6-P	-
Glykogenfosforyláza	–	Glc-1-P, AMP	Glc-6-P
Fosfofruktokináza	Fru-6-P	Fru-2,6-P ₂ , ADP	citrát, ATP
Fru-1,6-P ₂ -fosfatáza	Fru-1,6-P ₂	fosfoenolpyruvát	Fru-2,6-P ₂ , AMP
Pyruvátkináza	fosfoenolpyruvát	Fru-1,6-P ₂	alanin
Pyruvátdehydrogenáza	–	-	acetyl-CoA, ATP, NADH
Isocitrátdehydrogenáza	–	ADP	ATP, NADH
Pyruvátkarboxyláza	–	acetyl-CoA	citrát

– Ovlivnění aktivity enzymu regulačním proteinem

Příklady: Proteinkináza A je inaktivní tetramer C_2R_2 . Navážou-li dvě regulační podjednotky R čtyři molekuly cAMP, uvolňují se aktivní katalytické podjednotky C. Pokles koncentrace cAMP obnovuje původní interakce C a R, vzniká inaktivní tetramer.

Fosfoproteinfosfatáza 1 má regulační podjednotku, která udržuje katalytickou podjednotku v aktivním komplexu s glykogenem. Je-li fosforylována účinkem PK A, málo aktivní katalytická podjednotka se uvolní a naváže ji podobně fosforylovaný inhibitor; je-li však fosforylována na jiném místě účinkem insulindependentní PK, fosfatázová aktivita katalytické podjednotky v komplexu se zvýší.

Proteinázy bývají často reverzibilně inhibovány interakcí s víceméně specifickým proteinem (proteinázovým inhibitorem); např. trombin je v plazmě inaktivován antitrombinem, serinové či cysteinové intracelulární proteinázy jsou inhibovány různými typy serpinů a cystatinů.

– **Reverzibilní kovalentní modifikace proteinů:**

- **fosforylace proteinů** katalyzovaná proteinkinázami (PK);
fosfátový ester vzniká přenosem γ -fosfátu z ATP,
hydrolytickou defosforylací katalyzují fosfoproteinfosfatázy;
- **acetylace** (např. histonů v nukleosomech) přenosem acetylu
z acetylkoenzymu A,
- **ADP-ribosylace** (např. $G\alpha_s$, EF-2, RNA-polymeráz) přenosem
ADP-ribosylu z NAD^+ za uvolnění nikotinamidu,
- **myristoylace, farnesylace** (prenylace) a některé další;

γ -Karboxylace glutamylových zbytků proteinu (např. protrombinu a dalších faktorů koagulační kaskády, závislá vitaminu K) je sice **ireverzibilní**, avšak nezbytná, vytváří vazebná centra pro reverzibilní navazování iontů Ca^{2+} po aktivaci proenzymu odštěpením části polypeptidového řetězce.

Fosforylace proteinů je intracelulární děj.

Donorem fosfátu je **ATP**.

Je katalyzovaná regulovatelnými *proteinkinázami* se značnou substrátovou specifikou; proteinkinázy jsou nejpočetnější známou rodinou homologních enzymů, u člověka známo více než 550 typů.

Proteiny jsou fosforylovány buď **na zbytcích serinu nebo threoninu**, nebo **na fenolickém hydroxylu zbytků tyrosinu**, a to na specifických místech polypeptidového řetězce.

Aktivace různých typů proteinkináz je **specifická**, např. cAMP, cGMP, komplexem Ca²⁺-kaldmodulin (v. další snímek).

Signál, který aktivuje proteinkinázy, je významně **amplifikován** (aktivace jedné molekuly enzymu umožní fosforylaci mnoha molekul proteinu).

Defosforylaci (hydrolýzu esterové vazby) katalyzují regulovatelné *fosfoproteinfosfatázy*.

Příklady *proteinkináz* (PK):

Fosforylace Ser/Thr

Aktivovány

Proteinkinázy **A**

cAMP

Proteinkinázy **G**

cGMP

Proteinkinázy **C**

diacylglycerolem (a Ca^{2+})

AMP-dependentní PK

AMP

Ca²⁺/CaM-dependentní PK

Ca^{2+} nebo Ca^{2+} -kalmodulem

PIP₃-dependentní PK

fosfoinositid-**3,4,5**-trisfosfátem

Mitogeny aktivované PK (MAP)

mitogeny, buněčným stresem

Cyklin-dependentní PK

regulačními proteiny cykliny

Fosforylace tyrosinu (zvané *tyrosinkinázy*)

- **receptorové typy** - např. insulinový receptor
nebo membránové receptory mnoha růstových faktorů,
- **intracelulární, nereceptorové** (např. JAK) - různými signály.

Příklad regulace reverzibilní fosforylací

Glukagon nebo adrenalin vyvolá aktivaci proteinkinázy A:

Fosforylací je **aktivována**

glykogenfosforyláza-b-kináza
glykogenfosforyláza
(**glykogenolýza**)

fruktosa-2,6-bisfosfatáza
(**glukoneogeneze**)

Fosforylací je **inhibována**

glykogensyntáza
(**glykogeneze**)

fruktosa-6-fosfát-2-kináza
pyruvátdehydrogenáza
(**glykolýza**)

acetyl-CoA-karboxyláza
(**syntéza mastných kyselin**)

HMG-CoA-reduktáza
(**syntéza cholesterolu**)

3 Regulace membránového transportu

Příklady:

- Insulin stimuluje glykolýzu též proto, že usnadňuje vstup glukosy z krve do svalů a tukové tkáně. Jedním z důsledků navázání insulinu na insulinový receptor je rychlé **vystavení transportérů GLUT4** do cytoplazmatické membrány rhabdomyocytů a adipocytů.
 - Syntéza mastných kyselin a jejich degradace β -oxidací je regulována tak, že současně je aktivován jen jeden z těchto pochodů. Malonyl-CoA, který je v cytosolu ve větším množství jen při hojném přívodu živin, **inhibuje karnitin-acyltransferázu I** a brání tak transportu nově syntetizovaných acyl-CoA do matrix mitochondrie, v níž by byly odbourávány.
- Naopak vyšší mastné kyseliny, které jsou v cytosolu ve větším množství jen během hladovění (mobilizace tukových rezerv), **inhibují transport trikarboxylových kyselin** z mitochondrie. Tím je bráněno výstupu citrátu, který by aktivoval acetyl-CoA-karboxylázu, první krok syntézy MK.

Obecné mechanismy účinku hormonů a neurotransmiterů

Typy signálních molekul v neurohumorálních regulacích:

HORMONY	vylučované endokrinními žlázami, rozptýlenými žlázovými buňkami, ikosanoidy mnoha jinými typy buněk
NEUROHORMONY	vylučované neurony do krevního oběhu
NEUROTRANSMITERY	vylučované na synaptických zakončeních
CYTOKINY	vylučované buňkami imunitního systému
RŮSTOVÉ FAKTORY	vylučované buňkami mimo imunitní systém

Signální molekuly mohou mít účinek

- endokrinní
- parakrinní
- autokrinní

Princip hierarchie v některých hormonálních regulacích a zesílení toku informací pomocí signálních molekul

Např.

Neurony mozkové kůry

NEUROTRANSMITERY

Denní produkce:
nejvýše nanogramy

Neurony jader hypotalamu

KORTIKOLIBERIN

mikrogramy

Buňky adenohypofýzy

KORTIKOTROPIN

stovky mikrogramů

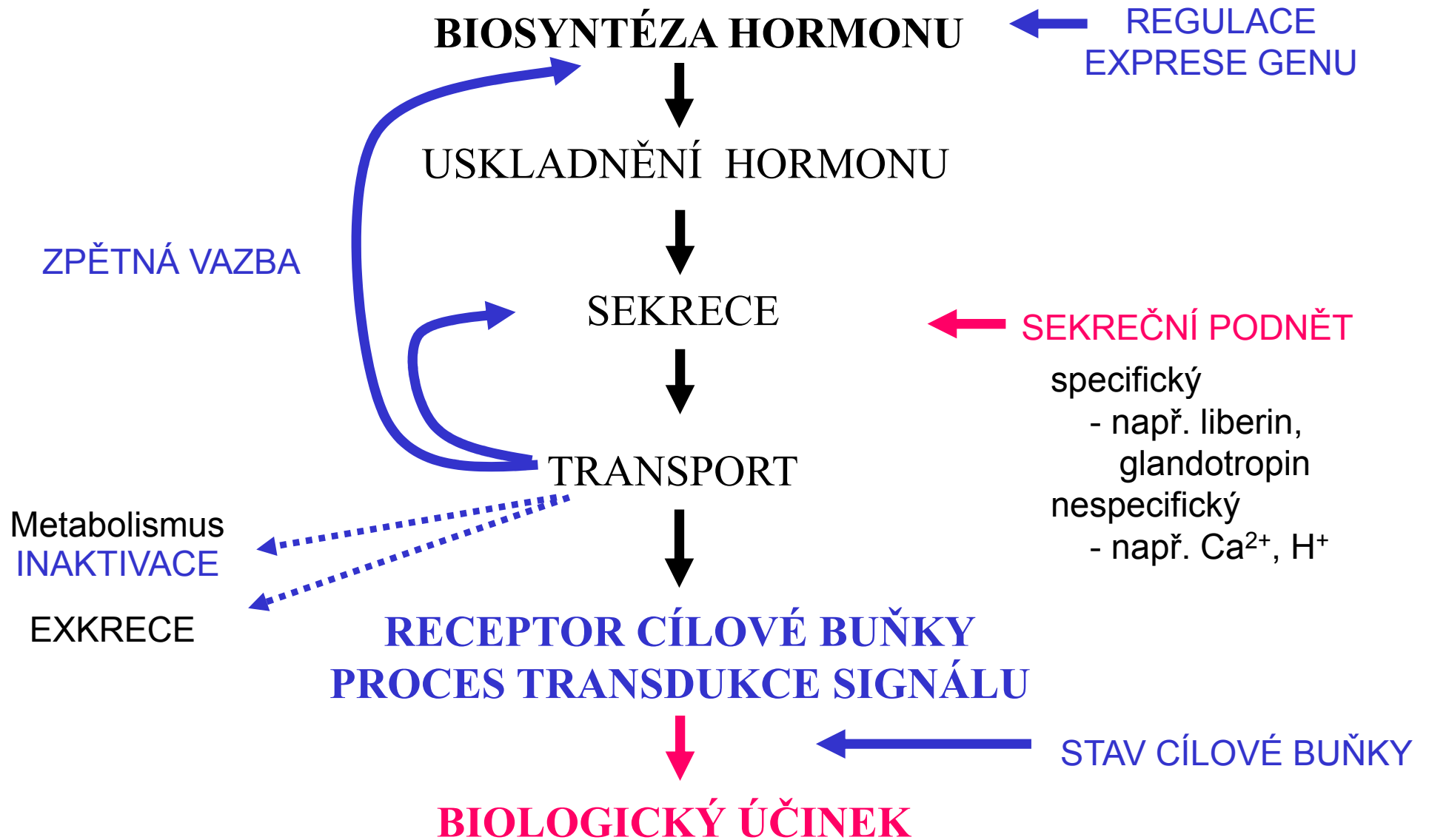
Buňky kůry nadledvin

KORTISOL

desítky miligramů

CÍLOVÉ BUŇKY PERIFERNÍCH TKÁNÍ

Faktory ovlivňující biologický účinek hormonu:



Koncentrace hormonu v plazmě vůbec nemusí odpovídat biologickému účinku!

Transdukce signálu

Jak buňka převezme informaci nesenou chemickým signálem?

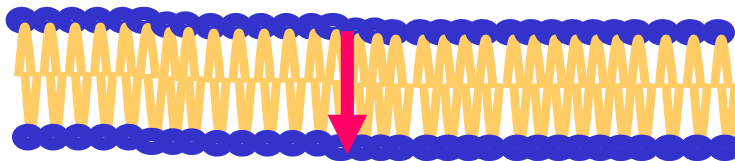
Rozhodující je **velikost a polarita** signální molekuly.

- **Proteiny a menší polární signální molekuly** (peptidy, aminokyseliny, biogenní aminy, ikosanoidy) nepronikají plazmatickou membránou. Navazují se na specifické **membránové receptory**, proteiny penetrující membránou. Jedná se o **iontové kanály** (u neurotransmiterů, ne u hormonů a růstových faktorů) a receptory, které vyvolají změnou konformace intracelulární domény v buňce buď změnu koncentrace malé **sekundární signální molekuly (druhého posla)**, nebo uplatní svou **vlastní enzymovou aktivitu**.
- **Nepolární signální molekuly** (steroidy, jodtyroniny, retinoáty) jsou přenášeny přes cytoplazmatickou membránu a navazují se na specifické **intracelulární receptory**, s nimiž v jádře buňky indukují **expresi určitých genů**.

Membránové a intracelulární receptory

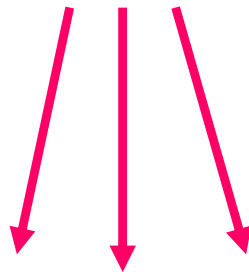
Polární signální molekula

Membránový receptor



Transdukce signálu

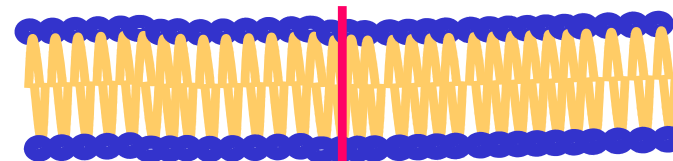
Amplifikace



Biologická odpověď
(rychlý účinek)

Nepolární signální molekula
navázaná na transportní protein plazmy

Přenos signální molekuly i transportního
proteinu pomocí megalinu (event. i kubilinu)



Intracelulární receptor

Interakce komplexu hormon- receptor
s hormonsenzitivním elementem DNA

Biologická odpověď
(účinek pomalejší, ať již časný nebo pozdní)

Hlavní typy membránových receptorů

Receptory - iontové kanály (ROC, ligand-gated channels) jsou pouze receptory pro některé neurotransmitery (viz přednáška 7).

Receptory interagující s G-proteiny (heterotrimerními), které existují v mnoha odlišných typech. Výsledkem navázání ligandu je nejčastěji

- aktivace nebo inhibice adenylátcyklázy,
- aktivace fosfolipázy C,
- aktivace fosfodiesterázy.

Receptory s vlastní katalytickou aktivitou

- **guanylátcyklázovou** - receptory pro natriuretické peptidy ANP, BNP
- **proteinkinázovou**
 - insulinový receptor, receptor pro IGF (insulin-like růstové faktory),
 - dimerizující receptor pro EGF (epidermal growth factor).

Receptory kooperující s nereceptorovými tyrosinkinázami

(např. JAK) – receptory pro somatotropin (GrH), prolaktin, erythropoetin, interferony, interleukiny a jiné cytokiny.

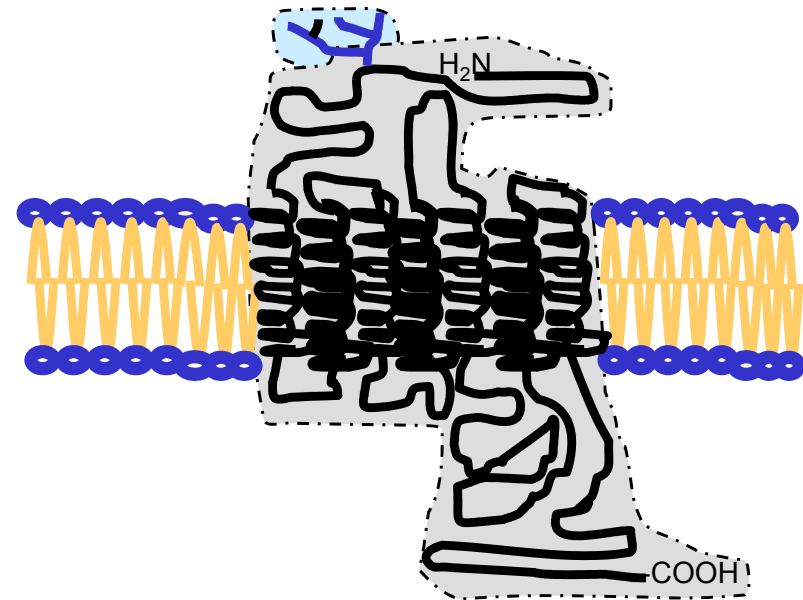
Receptory interagující s heterotrimerními G-proteiny

Všechny receptory této superrodiny mají **společné strukturní rysy**:

Extracelulární části proteinu (N-konec a hydrofilní kličky) jsou mírně glykosylovány; úseky α -helixů IV, VI a VII vytvářejí specifické **vazebné místo pro agonistu**, přítomna jsou i další vazebná místa pro antagonisty.

Všechny mají **sedm α -helikálních úseků**, které jsou hydrofobní, pronikají membránou a spojují extra- a intracelulární kličky.

Intracelulární domény představují vazebné místo pro **interakci s G-proteinem** jediného určitého typu.



G-proteiny

jsou proteiny **vázající GDP nebo GTP** (odtud jejich název), většinou poměrně volně navázané na cytoplazmatickou membránu – mohou se pohybovat podél jejího vnitřního povrchu.

Podílejí se na různých typech transdukce signálu.

Různé druhy G-proteinů mají velmi podobnou strukturu a shodný způsob aktivace.

Heterotrimerní G-proteiny se skládají z podjednotek α , β a γ .

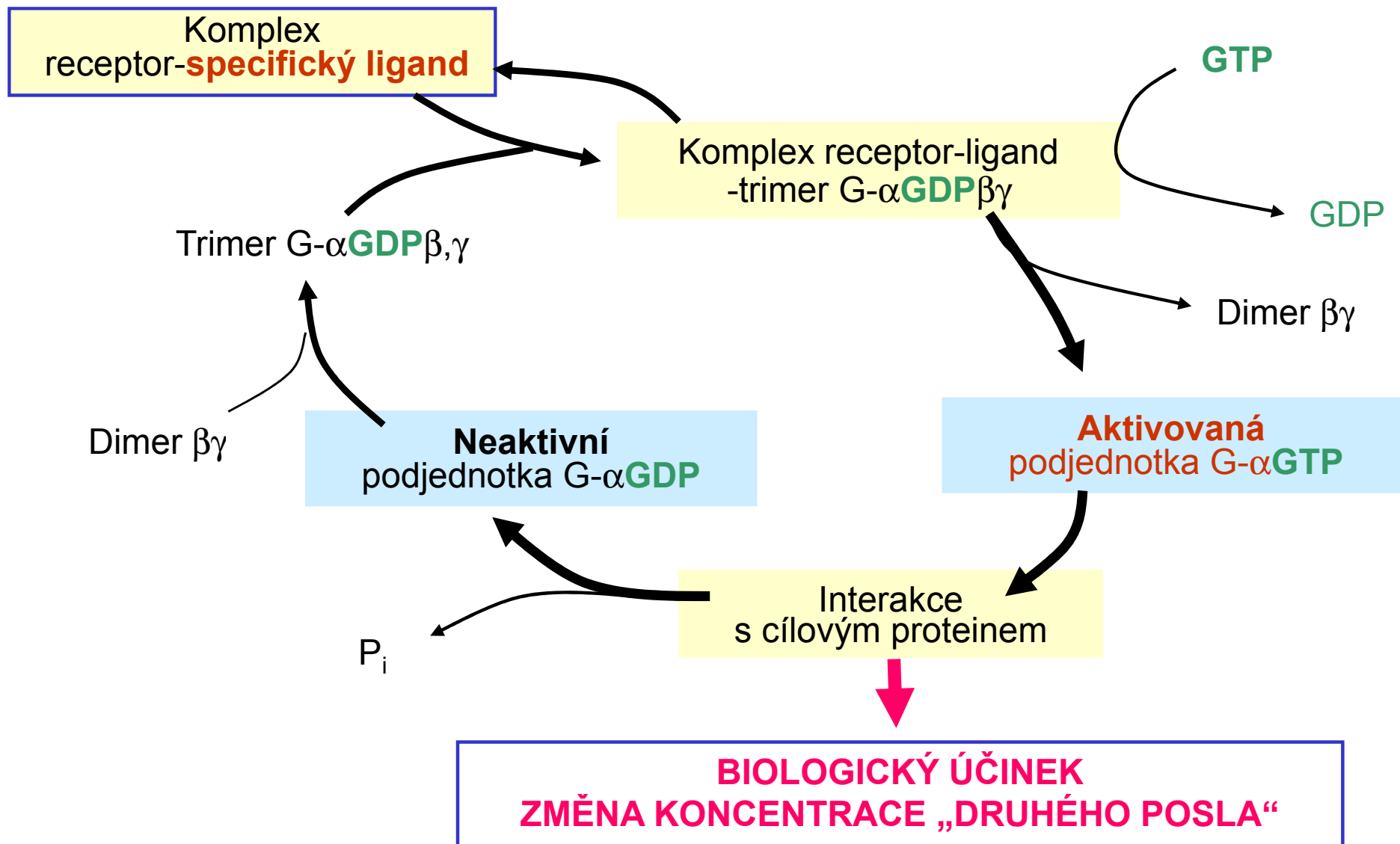
Podjednotky $G\beta$ a $G\gamma$ jsou hydrofobní a nespecifické.

Podjednotky $G\alpha$ jsou největší, hydrofilní, na ně se váže GDP nebo GTP a jsou specifické pro každý typ mechanismu transdukce.

Bylo identifikováno více než 20 druhů různých $G\alpha$ podjednotek.

Některé příklady – snímek 26.

Cyklus aktivace heterotrimerních G-proteinů interakcí s komplexem receptor-specifický ligand

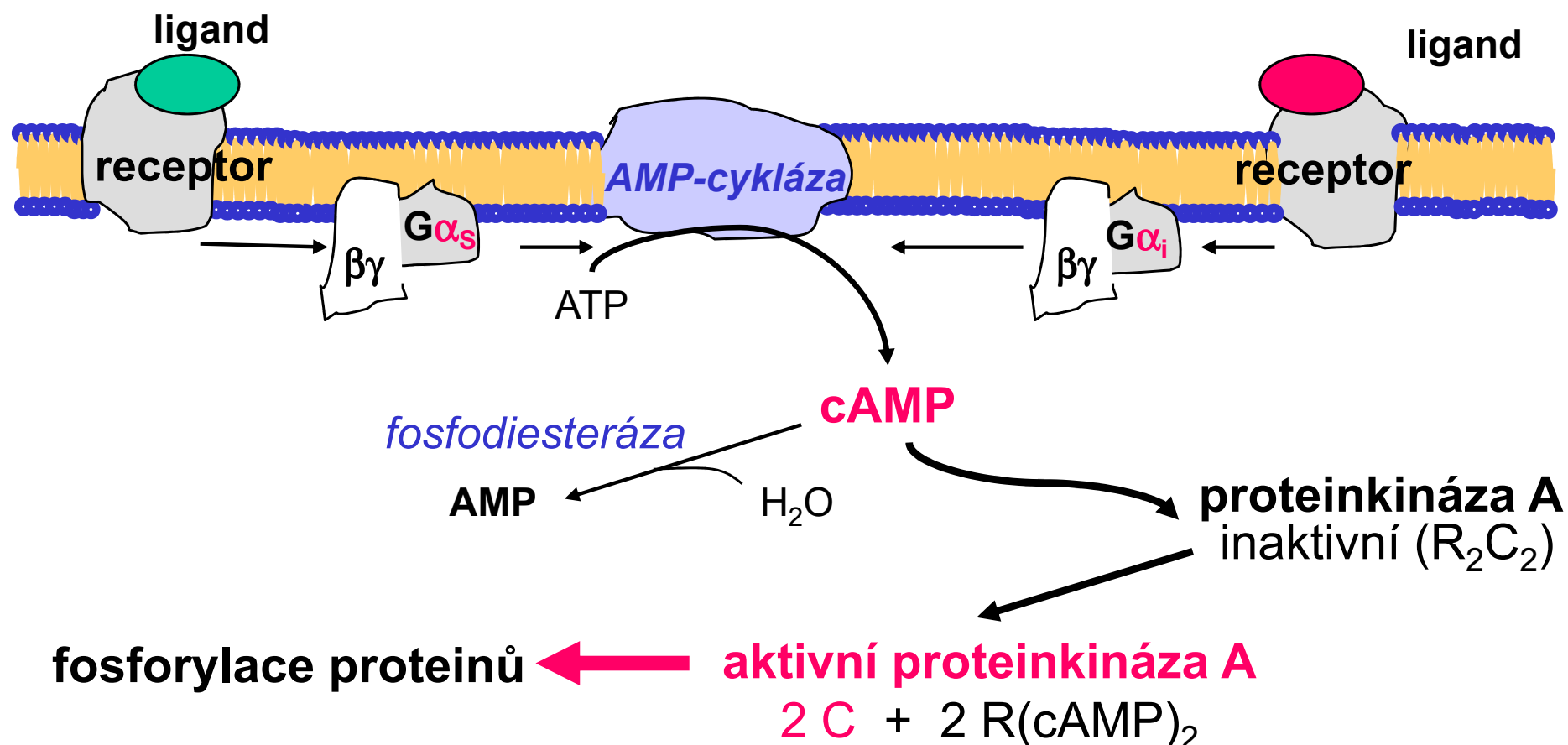


Vybrané typy G-proteinů

Typ podjednotky G α	Příklady aktivujícího receptoru	Účinek aktivovaného G α na cílový protein
Gα_s (stimulační)	glukagon parathyrin β -adrenergní	stimulace adenylátcyklázy
Gα_i (inhibiční)	somatostatin α_2 -adrenergní	inhibice adenylátcyklázy
Gα_q (aktivující PI kaskádu)	vazopresinový V ₁ endotelinové ET _{A,B} acetylcholinový M ₁ α_1 -adrenergní	stimulace fosfolipázy C
Gα_t (transducin)	rodopsin	stimulace fosfodiesterázy štěpící cGMP

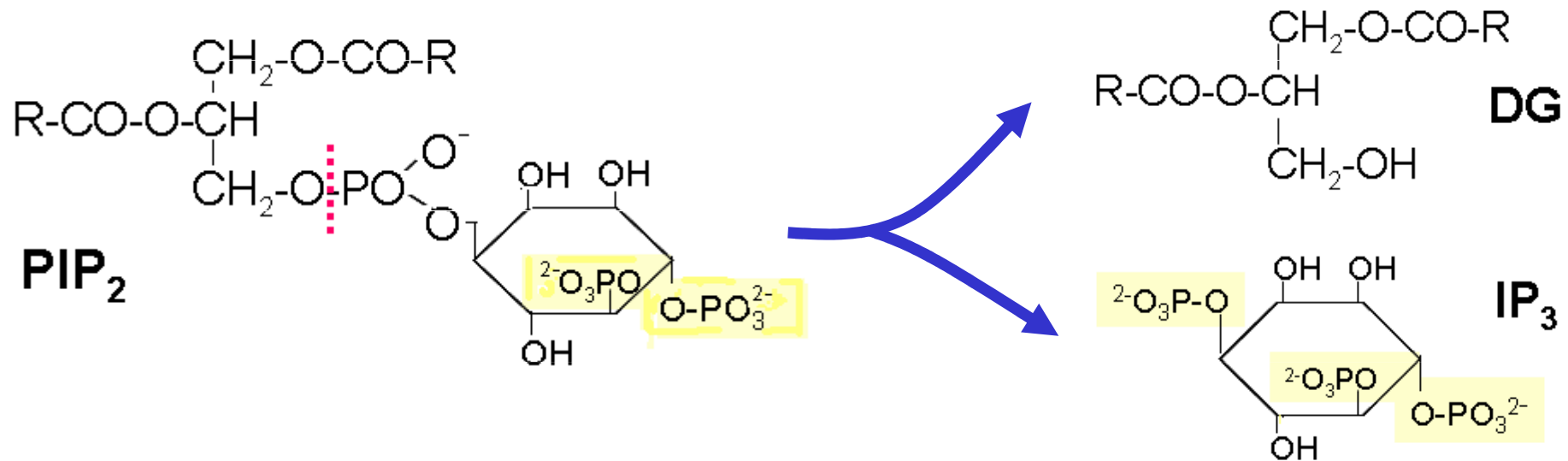
Receptory aktivující G_s a G_i stimulují nebo inhibují adenylátcyklázu

Adenylátcykláza je membránový enzym katalyzující reakci
 $ATP \rightarrow cAMP + PP_i$; druhým poslem je cAMP.



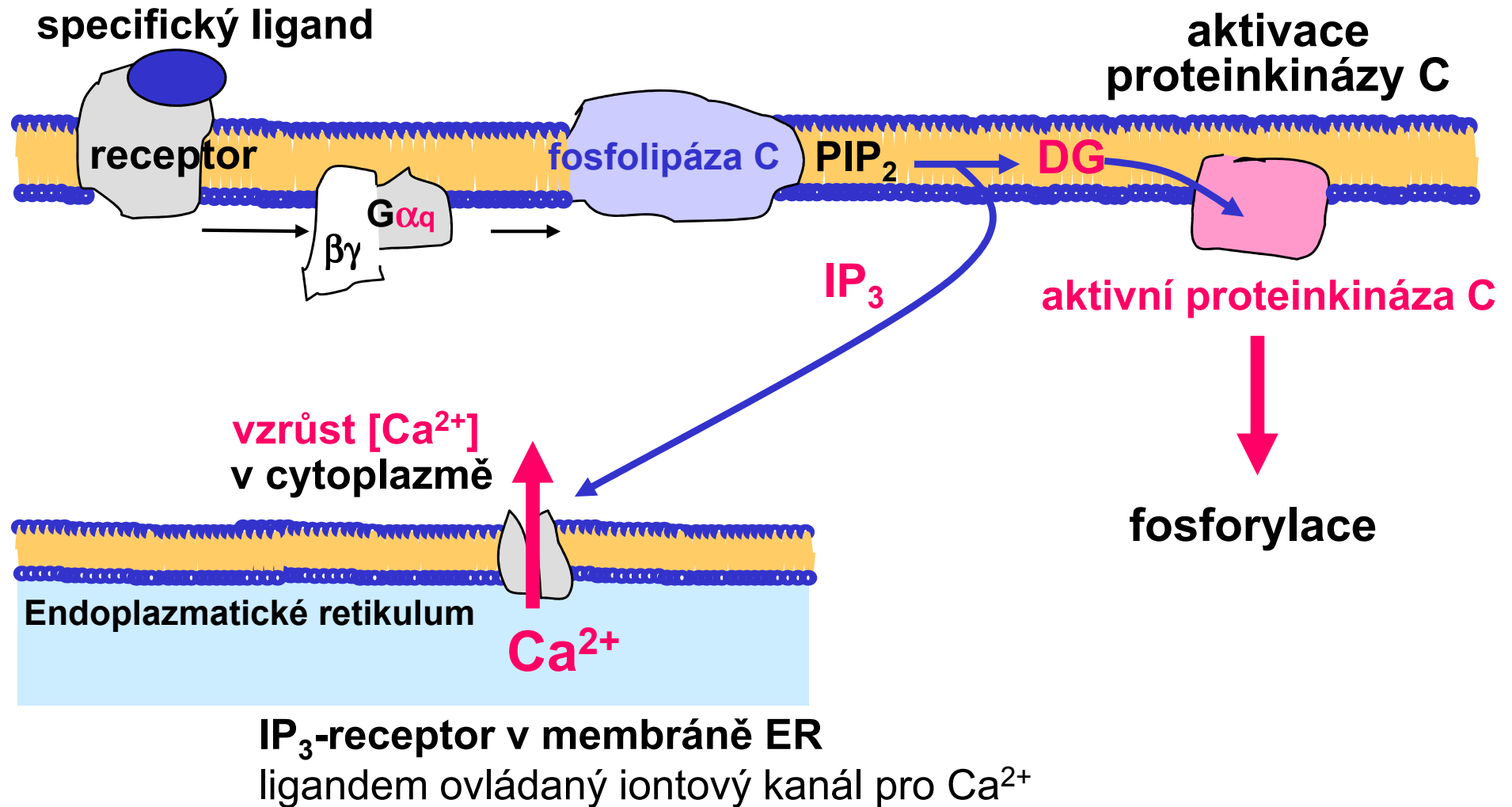
Receptory aktivující G_q protein stimuluji fosfolipázu C a spouštějí fosfatidylinositolovou kaskádu

Fosfolipáza C katalyzuje hydrolýzu fosfodiesterové vazby
fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu
na diacylglycerol a inositol-1,4,5- trisfosfát:



Oba produkty jsou sekundární „poslové“:
Inositol-1,4,5-trisfosfát otevírá kanál pro Ca^{2+} v membráně ER,
diacylglycerol aktivuje membránovou proteinkinázu C.

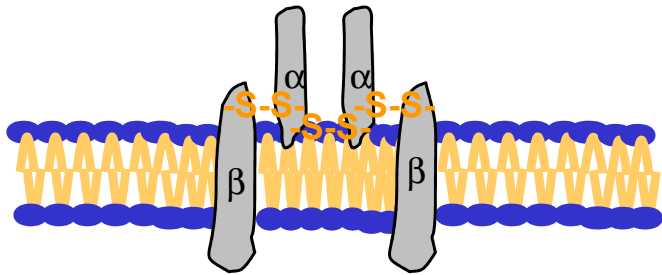
Fosfatidylinositolová kaskáda



Receptory s vlastní katalytickou aktivitou

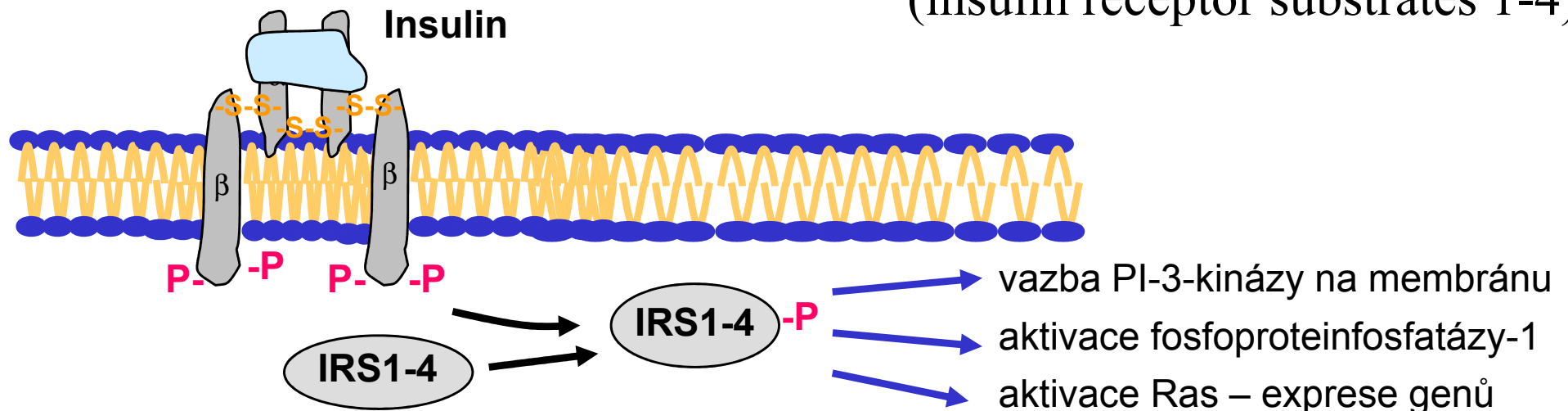
Insulinový receptor s tyrosinkinázovou aktivitou

v intracelulárních doménách svých β -podjednotek



Navázání insulínu na receptor vyvolá tyrosinkinázovou aktivitu katalyzující autofosforylaci β -podjednotek a fosforylaci proteinů IRS 1-4

(insulin receptor substrates 1-4).

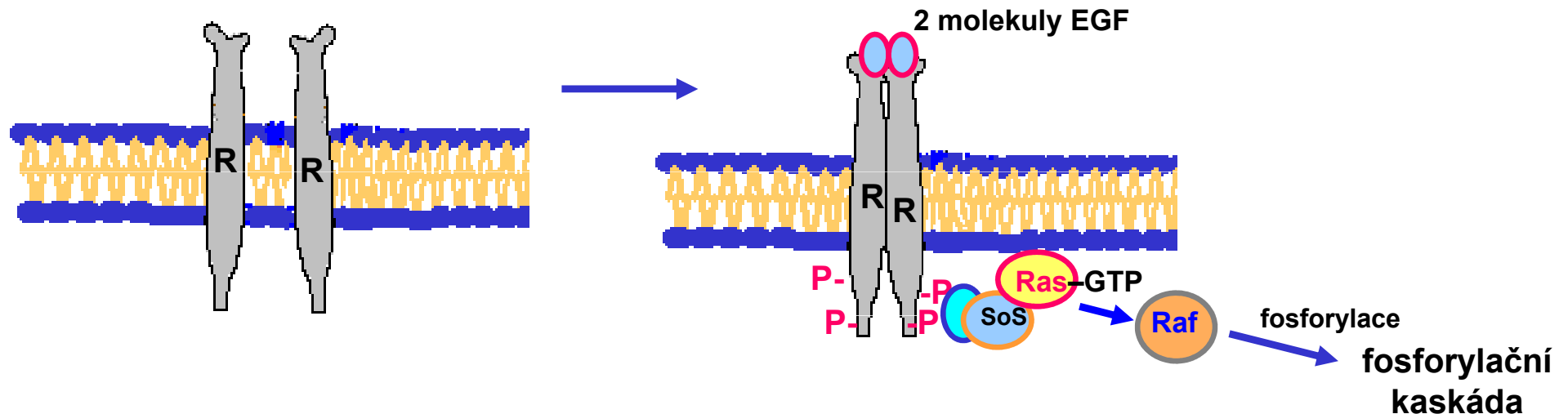


Substráty insulinového receptoru IRS1-4 jsou **adaptorové proteiny**. Jsou-li komplexem insulin-receptor fosforylovány, navazují se na další proteiny a aktivují je tak.

Mezi jiným

- umožní účinek **PI-3-kinázy** (PIP₂-3-kinázy), produkt PIP₃ aktivuje kinázu **PDK-1** (PIP₃-dependentní proteinkinázu), která fosforylací aktivuje další proteinkinázu **PK B**; důsledkem je expozice transportérů GLUT4 ve svalu a adipocytech do membrány;
- aktivuje **regulační podjednotku fosfoproteinfosfatázy-1**, čímž tuto fosfoproteinfosfatázu, která defosforyluje glykogensyntázu a glykogenfosforylázu, aktivuje;
- vazbou na proteiny Grb2 a SoS aktivuje malý **G-protein Ras**, který navázáním na proteinkinázu Raf spouští tzv. Ras signální cestu - kaskádu dalších fosforylačních reakcí vedoucích k expresi genů důležitých v regulaci proliferace některých typů buněk.

Dimerizující receptor s pro EGF (epidermal growth factor) s vlastní tyrosinkinázovou aktivitou



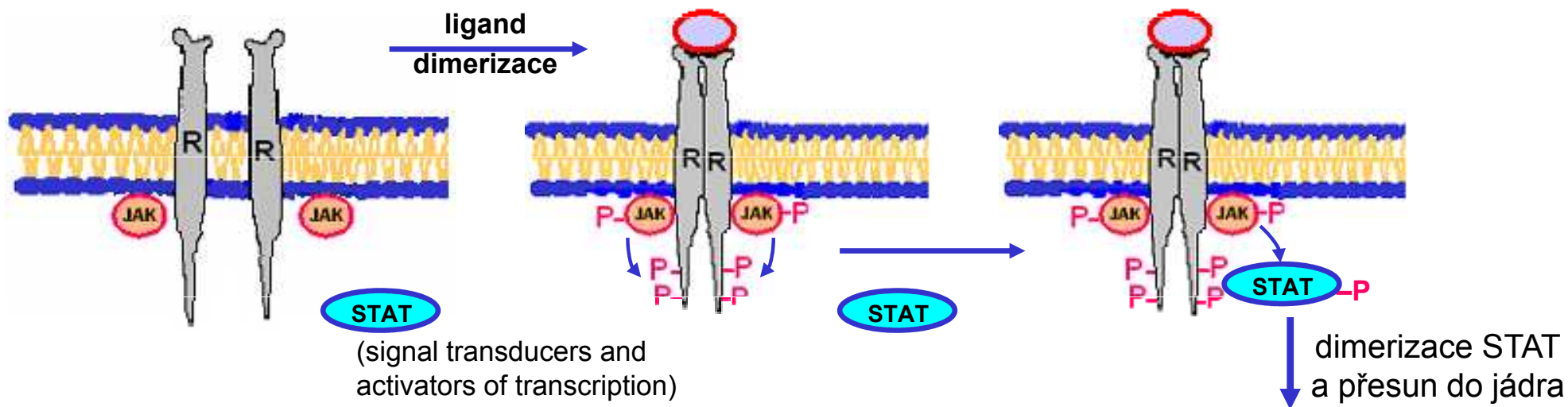
Autofosforylace receptoru umožní vazbu proteinů **Grb2** a **SoS**, které navážou a tak aktivují malý G-protein Ras s molekulou GDP.

Po výměně GDP za GTP se interakcí s Ras-GTP aktivuje serinová proteinkináza Raf a spouští kaskádu fosforylací, kterou katalyzují proteinkinázy MAPK (mitogenem aktivované PK) a ERK (extracelulárním signálem regulované PK).

Výsledkem je fosforylace transkripčních faktorů a **exprese některých genů**.

Receptory aktivující nereceptorové tyrosinkinázy

Dimerizující receptory aktivující tyrosinkinázy JAK (Janus kinázy) – např. receptory pro prolaktin, růstový hormon, erythropoetin, interferon, četné interleukiny a další cytokiny.



Po navázání ligandu receptor dimerizuje a interaguje s **tyrosinkinázou JAK**, která je tím schopna se aktivovat autofosforylací. Fosforyluje receptor, ten pak asociuje s **proteiny STAT**, navázané STAT jsou fosforylovány kinázou JAK.

Fosforylované proteiny STAT dimerizují, jsou translokovány do jádra buňky a navazují se na specifické elementy DNA a regulují transkripci.

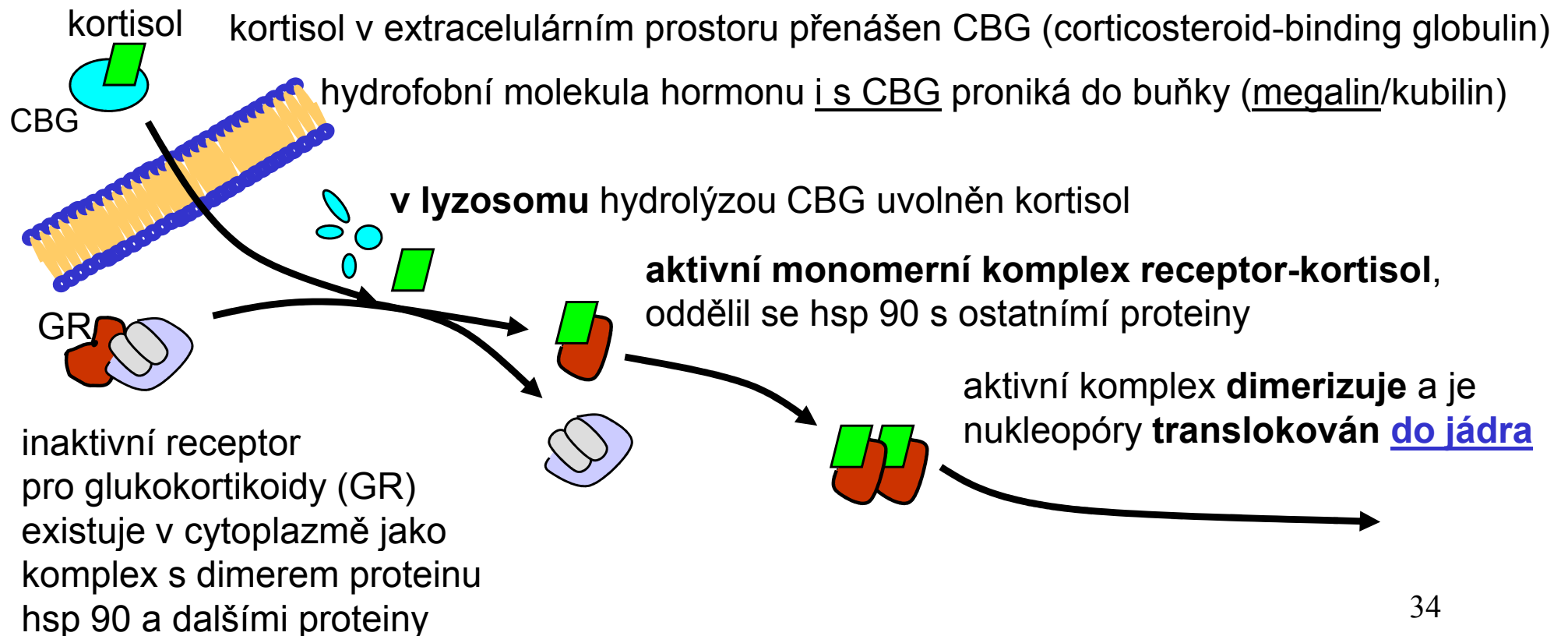
Podobným způsobem fosforylovaný receptor aktivuje kaskádu MAP kináz. 33

Intracelulární receptory

pro steroidní hormony, kalcitriol, jodované tyroniny a retinoáty

Všechny mají velmi podobný mechanismus účinku. Nazývají se často **jaderné hormonální receptory**, protože hormon-receptorové komplexy se vážou na specifická místa DNA (hormone response elements, HRE) a **aktivují nebo inaktivují transkripci specifických genů.**

Příklad kortisolu (glukokortikoidy GK, jejich receptory GR):



Po dlouho dobu platila představa (považována za dogma), že vazba steroidních hormonů a jiných hydrofobních signálních molekul (jodovaných tyroninů, retinoátů) na transportní bílkoviny v extracelulární tekutině znemožňuje jejich biologický účinek, a že biologicky aktivní jsou pouze volné signální molekuly, které difundují skrz cytoplazmatickou membránu.

Tato hypotéza volných hormonů byla překonána objevem bílkovin nazvaných **megalin** a **kubilin**, multiligandových receptorů cytoplazmatických membrán, které byly popsány téměř ve všech typech buněk. Nejvíce byly zpočátku studovány v proximálních ledvinových tubulech, v nichž zachycují vitamin B₁₂ a kalciole.

Membránové glykoproteiny **megalin a kubilin** mohou navazovat veliký počet nejrůznějších ligandů a zprostředkovat jejich transport přes cytoplazmatickou membránu - jsou schopny **internalizovat nepolární hormony i s jejich extracelulárními transportními bílkovinami**.

Mezi těmito ligandy jsou i globuliny transportující steroidní hormony v plazmě (SHBG, CBG, ABG). Po jejich internalizaci s navázaným hormonem je lze v cytosolu, dříve než jsou v lyzosomech odbourány, prokázat.

Megalin

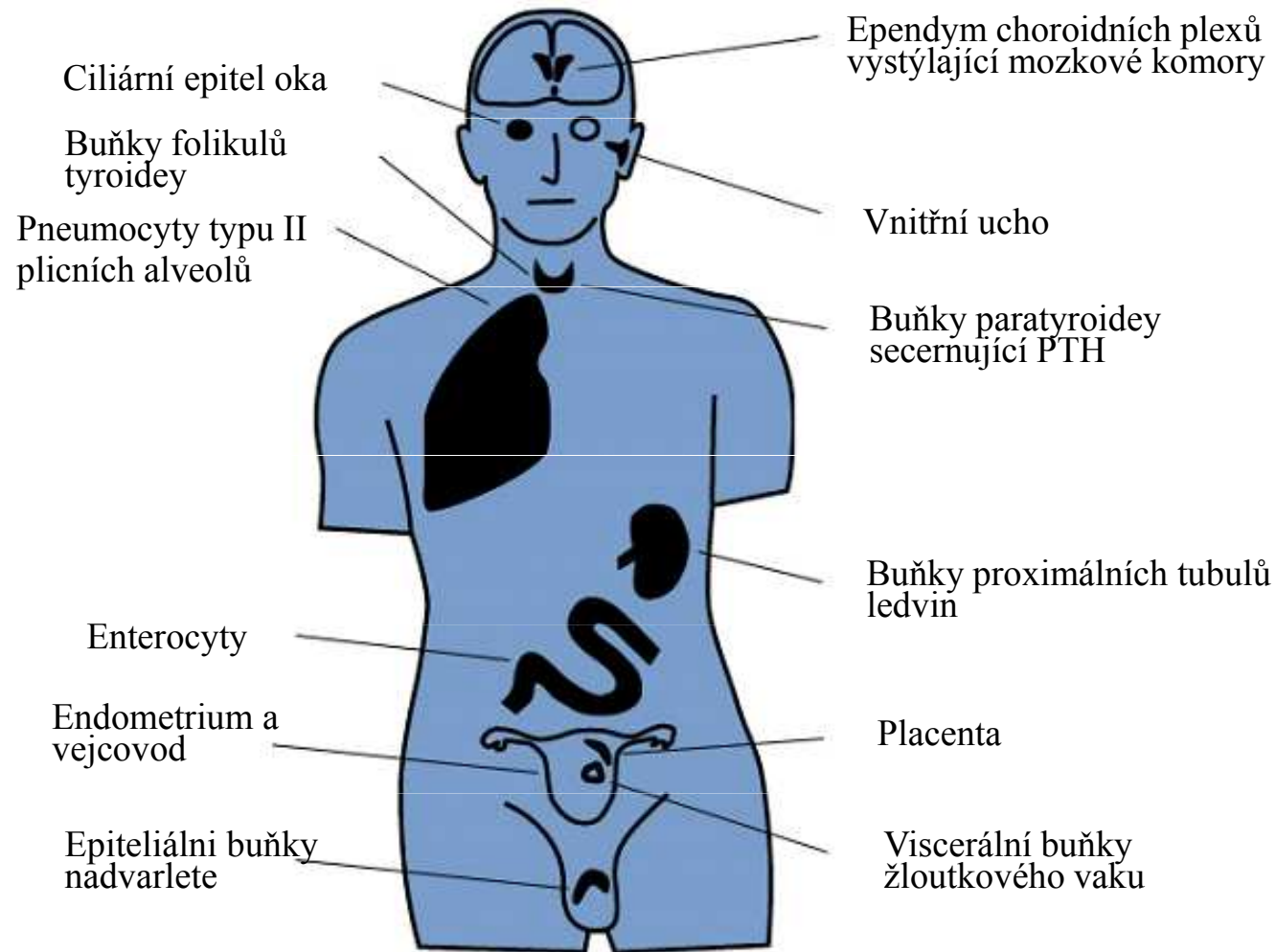
je transmembranový glykoprotein, $M_r \sim 600\ 000$, produkt genu z rodiny LDL-receptoru. Působí jako multiligandový endocytický receptor - umožňuje přenos proteinů nebo extracelulárních transportních proteinů i s navázanými ligandy přes cytoplazmatickou membránu do cytosolu.

Ligandů megalinu je velké množství:

Vitamin-binding proteins Transcobalamin-vitamin B 12 Vitamin-D-binding protein Retinol-binding protein	Lipoproteins Apolipoprotein B Apolipoprotein E Apolipoprotein J/clusterin Apolipoprotein H	Immune- and stress related proteins Immunoglobulin light chains PAP-1 $\beta 2$ -microglobulin
Steroid hormone binding proteins Sex hormone binding protein-estrogens Androgen binding protein-androgens	Hormones and precursors Parathyroid hormone Insulin Epidermal growth factor Prolactin Thyroglobulin	Enzyme and enzyme inhibitors PAI-1 urokinase-PAI-1 tPA-PAI-1 Pro-urokinase Lipoprotein lipase Plasminogen β -amylase $\beta 1$ -microglobulin Lysozyme
Other carrier proteins Albumin Lactoferrin Hemoglobin Odorant-binding protein Transthyretin	Drugs and toxins Aminoglycosides Polymyxin B Aprotinin Trichosanthin	Others RAP Ca 2+ Cytochrome c

Podkladem pro mnohočetnou vazebnou schopnost megalinu pro různé ligandy
Je několik opakování oblastí bohatých na zbytky cysteinu.

Výskyt megalinu je největší v polarizovaných epitelových buňkách:



Kubilin

je **periferní** membránový glykoprotein, $M_r \sim 456\ 000$.

V jeho struktuře se nachází několikrát sekvence EGF (epidermálního růstového faktoru) a téměř třicetkrát se opakující doména označovaná podle zkratek pro své sekvence CUB, podle níž byl vytvořen název proteinu kubilin (někdy též kubulin).

- C** pochází ze sekvencí shodných se složkami komplementu C1r/C1s,
- u** odvozeno od domény zvané uEGF, kde u je zkratka názvu mořského ježka (urchin) – nacházející se v „urchin protein with EGF-like domains“,
- B** z proteinu BMP-1, „bone morphogenetic protein 1“.

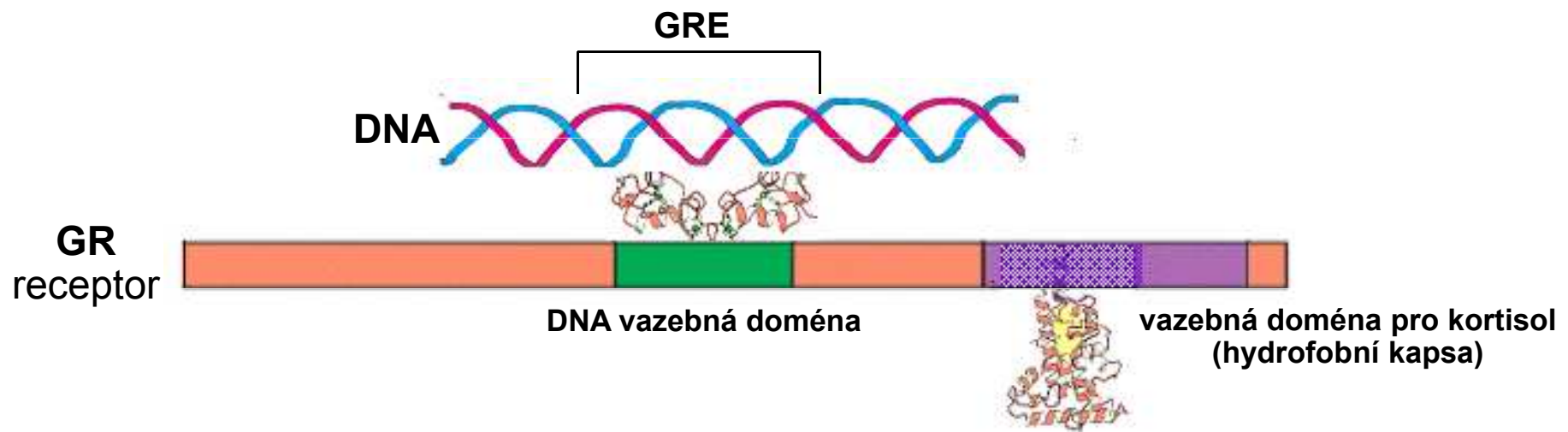
Kubilin je periferní protein cytoplazmatické membrány, nemá signální sekvenci pro endocytózu.

Internalizaci kubilinu (i s navázanými ligandy) **zprostředkuje megalin** vedle internalizace svých vlastních ligandů.

Je pravděpodobné, že vedle transportního systému s účastí megalinu/kubilinu existuje **i méně významný transport steroidů na megalinu a kubilinu nezávislý.**

Tato zjištění v podstatě převrací současný klinický pohled na význam plazmatických hladin volných a steroidů vázaných na transportní proteiny: Dosavadní rozlišování volné a vázané frakce hydrofobních hormonů v krevní plazmě tak zřejmě ztratí smysl – hormon vázaný na transportní protein může být transportován do buňky a uplatnit svůj biologický účinek.

Dimerní komplex kortisol-receptor se v jádře navazuje na dsDNA v místě **specifické sekvence GRE (glucocorticoid response element), tj. na HRE (hormone response element) specifické pro glukokortikoidy.**

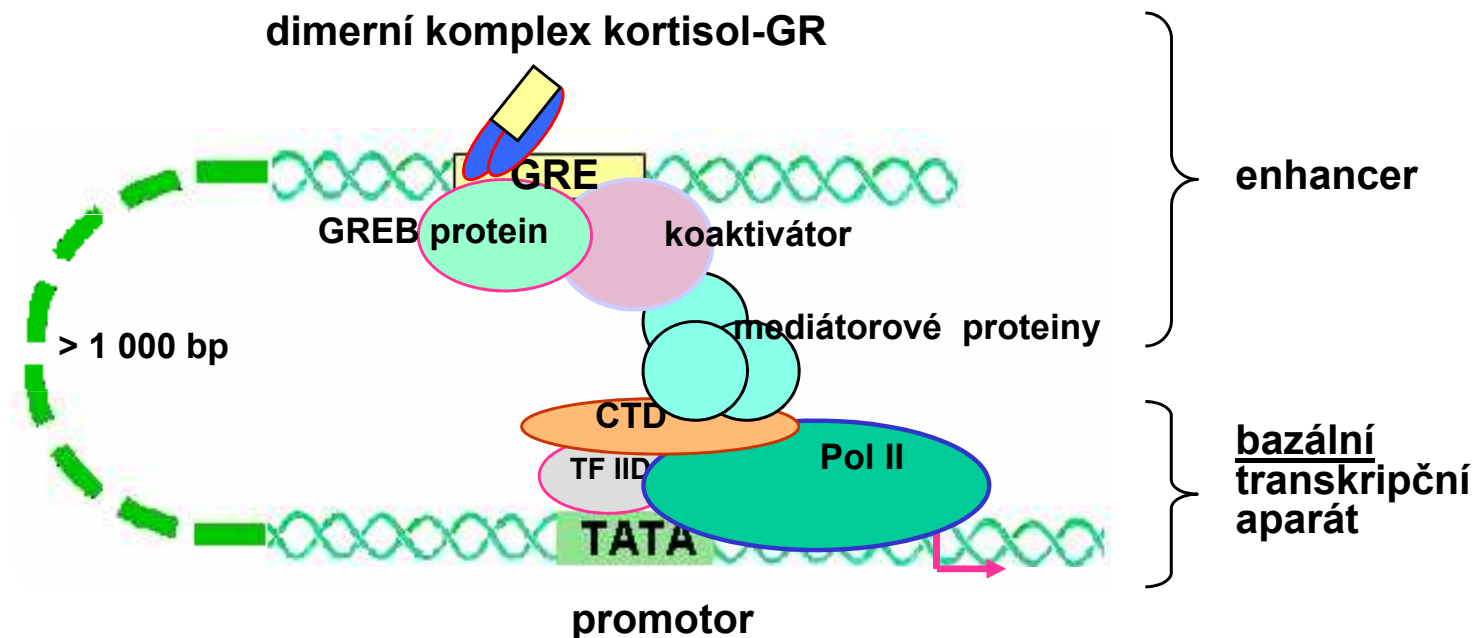


Samotný komplex hormon-receptor však vazby na DNA a ovlivnění transkripce není schopen. Teprve **vytvoření složitějšího komplexu** s dalšími proteiny, zejména koaktivátory a specifickými HREB-proteiny (HRE binding proteins, v případě glukokortikoidů GREB) **vazbu umožní a účinkuje jako enhancer**, podporující iniciaci transkripce na promotoru někdy i dosti vzdáleného genu.

Jaderné receptory jodthyroninů nebo retinoátů mohou i bez specifického ligandu (spolu s bílkovinnými korepresory a dalšími proteiny) na HRE expresi určitých genů znemožňovat..

Iniciace transkripce kortisolem

Aktivní komplex kortisol-receptor se **váže na DNA** d místě specifické sekvence **GRE** (glucocorticoid response element, jedné z mnoha HRE – hormone response elements). Připojuje se **koaktivátor** a specifické **GREB-proteiny** (glucocorticoid response element-binding proteins). Tento komplex nabývá schopnost účinkovat jako enhancer, který se prostřednictvím **mediátorových proteinů** navazuje na bazální transkripční aparát na promotoru a iniciuje transkripci.



- GR dimer** – intracelulární receptor pro glukokortikoidy (dimer)
- GRE** – glucocorticoid response element
- GREB protein** – GRE binding protein (specifický transkripční faktor)