

Fleksibilnost in konformacijske spremembe

Konformacijska fleksibilnost (sposobnost spreminjanja konformacij) je intrinzična lastnost praktično vseh proteinov.

Konformacija proteina se lahko spremeni kot odziv na:

- spremembo okolja
- kovalentno modifikacijo
- proteolitsko cepitev
- vezavo liganda
- alosterično regulacijo (prenos informacije v obliki konformacijske spremembe med dvema ali več mesti v proteinu)

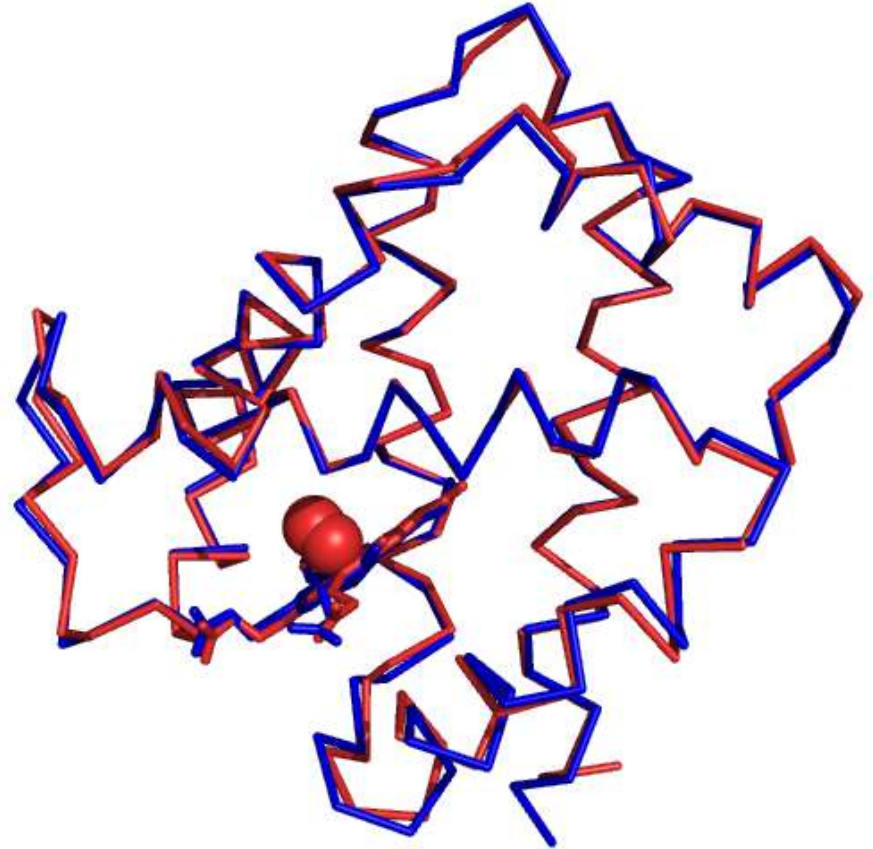
Konformacijske spremembe

Glede na obsežnost konformacijske spremembe ločimo 4 razrede konformacijskih sprememb.

1. razred – brez konformacijskih sprememb

Oblika regulacije, kjer se alosterična komunikacija po proteinu prenese brez konformacijskih sprememb glavne verige proteina (spremeni se konformacija največ 1% oz. 3 ostankov), preko spremenjene dinamike proteina ali preko manjših preureditev stranskih verig proteina.

Primer: vezava kisika na hemoglobin



moder – deoksihemoglobin (PDB 2HHB)
rdeč – oksihemoglobin (PDB 1HHO)

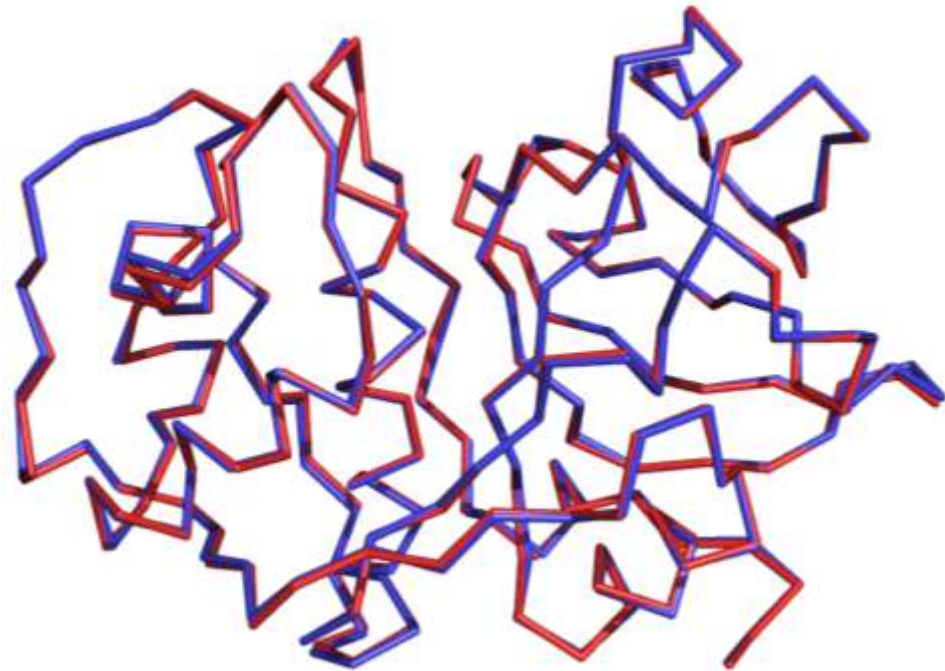
Konformacijske spremembe

Glede na obsežnost konformacijske spremembe ločimo 4 razrede konformacijskih sprememb.

1. razred – brez konformacijskih sprememb

Oblika regulacije, kjer se alosterična komunikacija po proteinu prenese brez konformacijskih sprememb glavne verige proteina (spremeni se konformacija največ 1% oz. 3 ostankov), preko spremenjene dinamike proteina ali preko manjših preureditev stranskih verig proteina.

Primer: aktivacija katepsina K s hondroitinsulfatom



moder – catK brez CS (PDB 1ATK)

rdeč – catK s CS (PDB 3C9E)

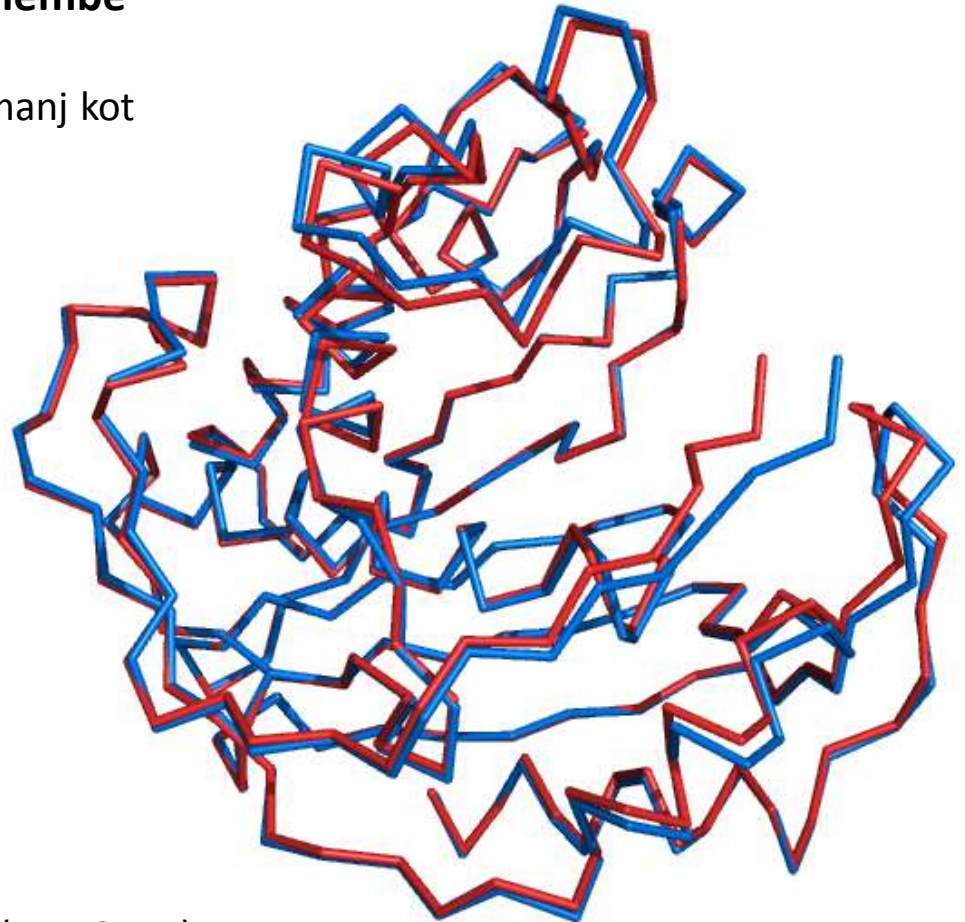
Konformacijske spremembe

Glede na obsežnost konformacijske spremembe ločimo 4 razrede konformacijskih sprememb.

2. razred – drobne konformacijske spremembe

Spremeni se konformacija manj kot 10% (ali manj kot 10) ostankov.

Primer: timidilat sintaza



moder – timidilat sintaza z vezanim substratom (PDB 2VET)

rdeč – timidilat sintaza z vezanima substratom in kofaktorjem (PDB 1TSN)

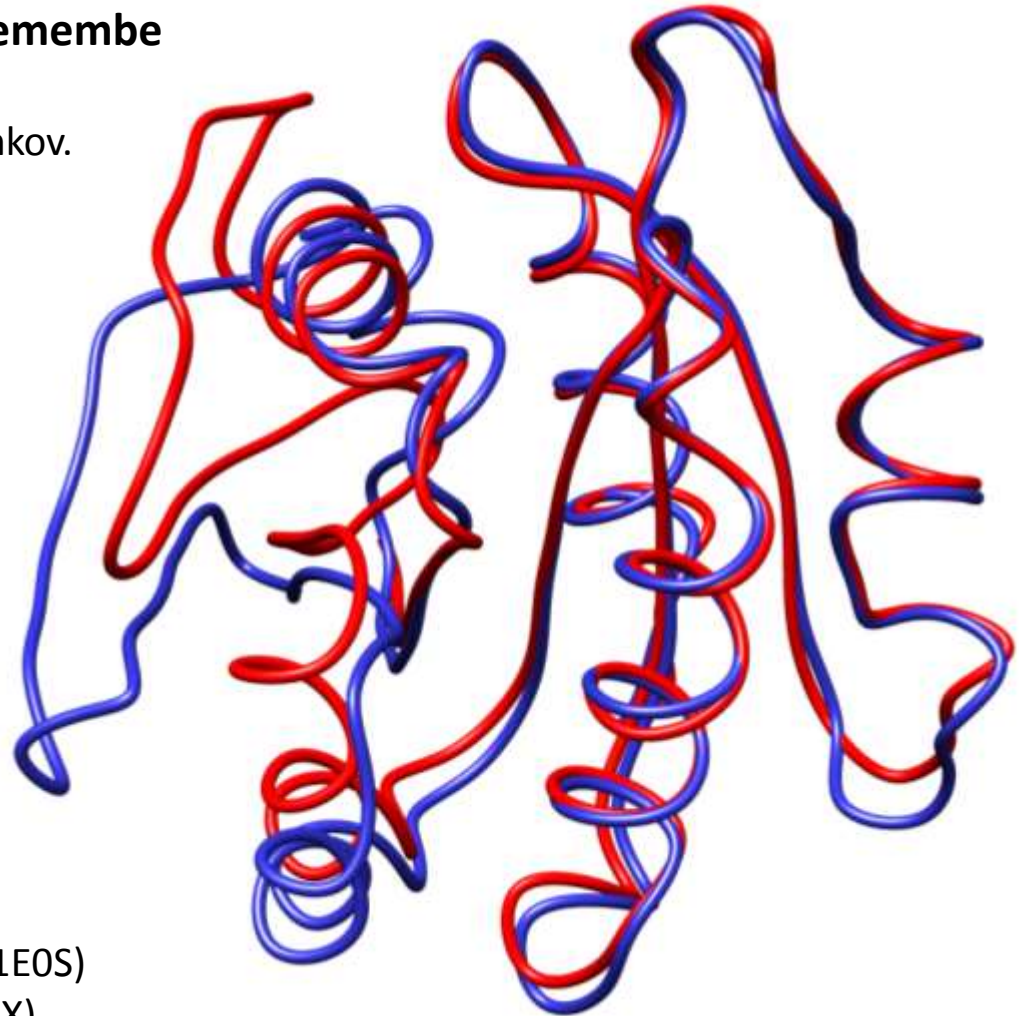
Konformacijske spremembe

Glede na obsežnost konformacijske spremembe ločimo 4 razrede konformacijskih sprememb.

3. razred – majhne konformacijske spremembe

Spremeni se konformacija 10% do 35% ostankov.

Primer: ADP ribozilacijski faktor 6 (Arf6)



moder – Arf6-GDP (PDB 1E0S)
rdeč – Arf6-GTP (PDB 2J5X)

Konformacijske spremembe

Glede na obsežnost konformacijske spremembe ločimo 4 razrede konformacijskih sprememb.

4. razred – premik domen

Spremeni se konformacija nad 35% (oz nad 60) ostankov.

Primer: GroEL



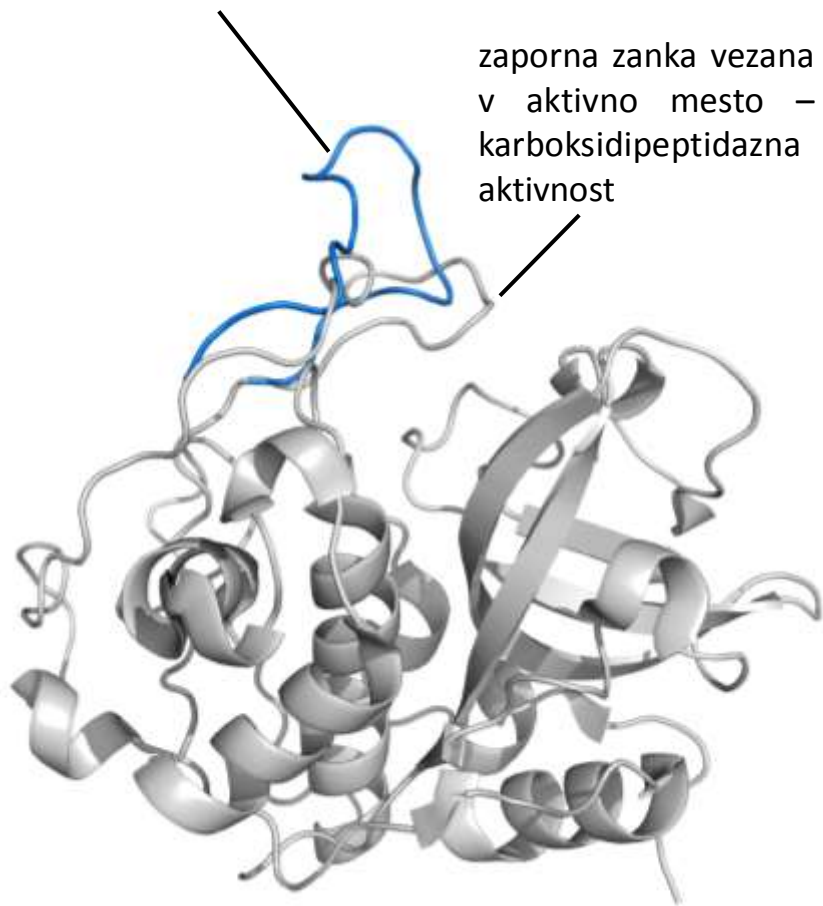
modra – GroEL brez GroES
oranžna – GroEL z GroES

Katepsin B

Katepsin B v primerjavi z ostalimi člani družine papainu podobnih peptidaz vsebuje insercijo, imenovano zaporna zanka. Konformacija zaporne zanke regulira endo/eksopeptidazno aktivnost encima, odvisna pa je od pH.

zaporna zanka odprta – endopeptidazna aktivnost

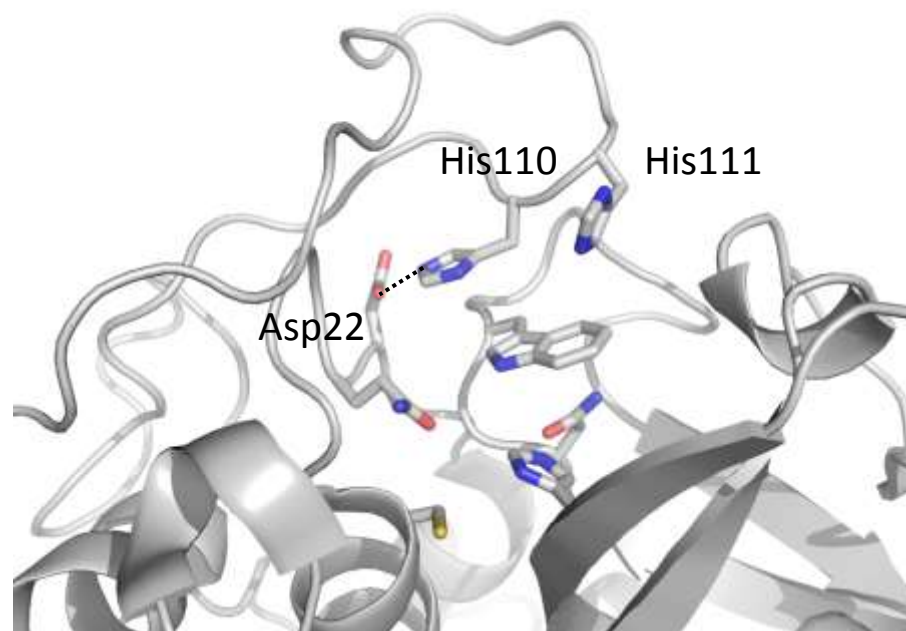
zaporna zanka vezana
v aktivno mesto –
karboksidi-peptidazna
aktivnost



pKa (His) = 6

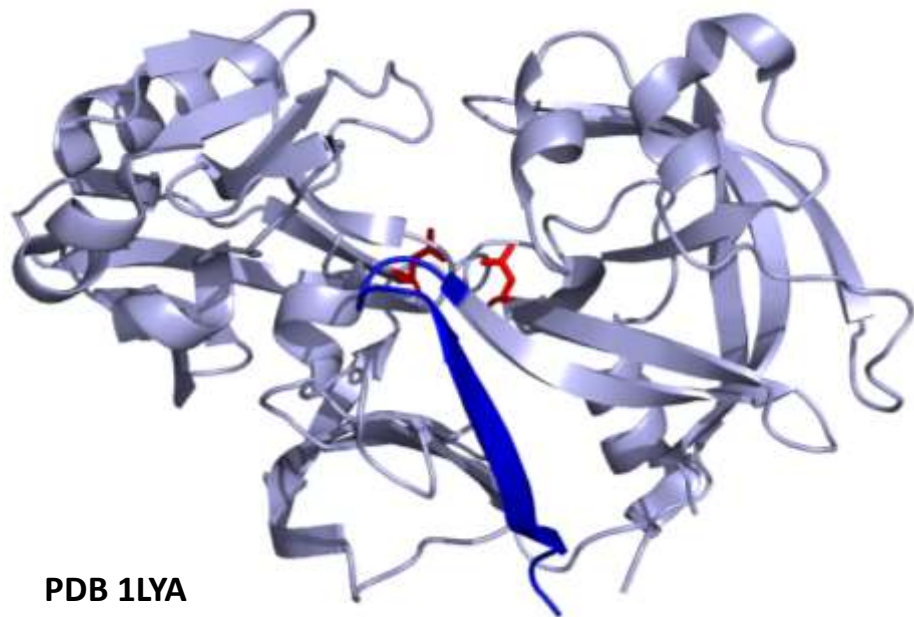
pri pH < 6 sta His protonirana – zanka
vezana v aktivno mesto

pri pH > 6 sta His deprotonirana – zanka
odprta

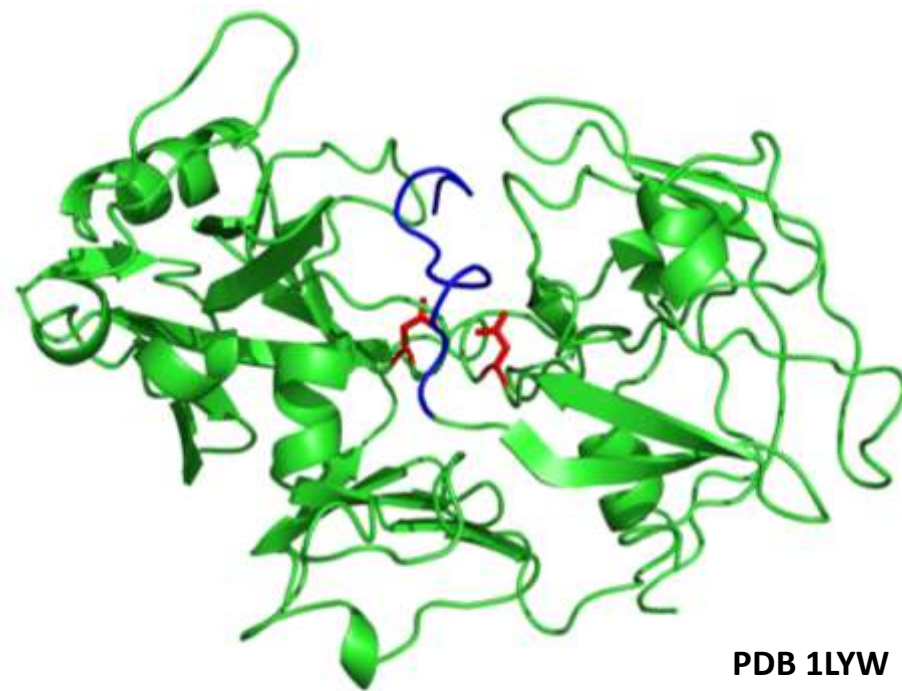


Katepsin D

Katepsin D je aspartatna peptidaza. Pri povišanem pH (nad 6) se reverzibilno inhibira s spremembo konformacije N-končnega dela molekule.



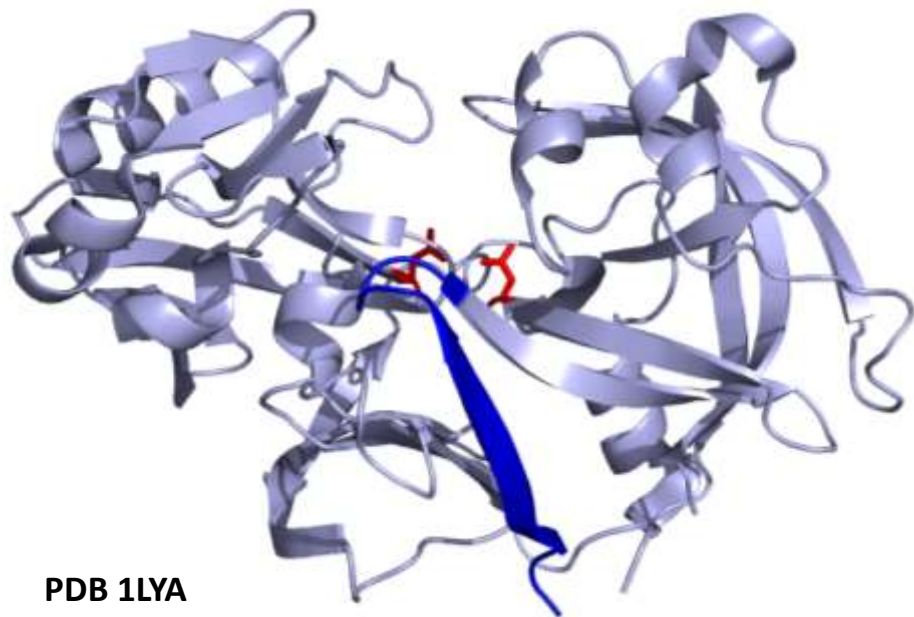
nizek pH



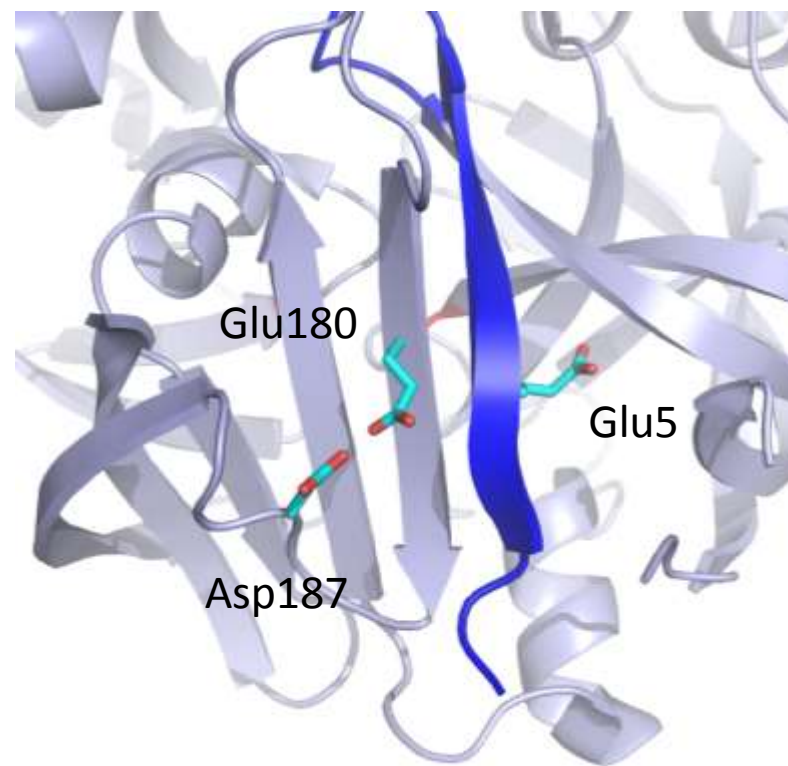
nevtralen pH

Katepsin D

Katepsin D je aspartatna peptidaza. Pri povišanem pH (nad 6) se reverzibilno inhibira s spremembo konformacije N-končnega dela molekule.



nizek pH

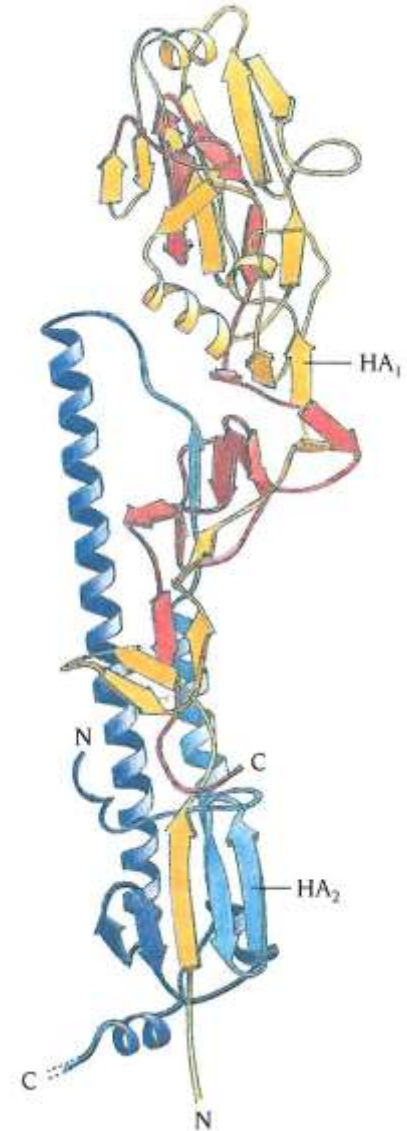
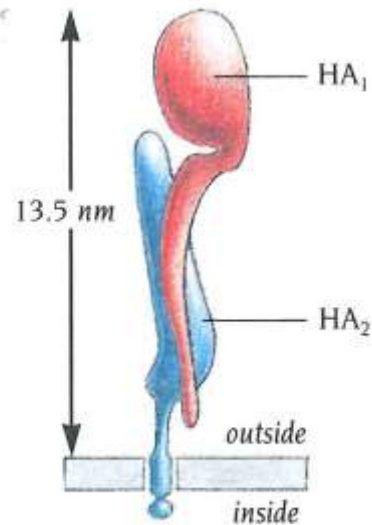
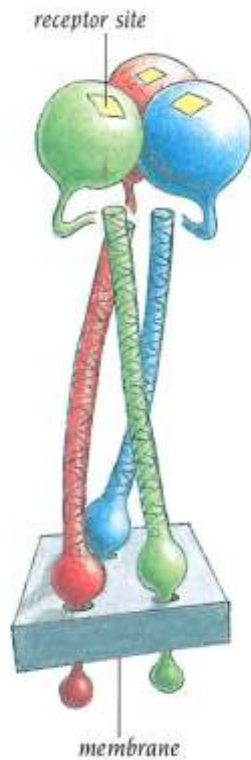


stikalo naj bi predstavljali trije ionizabilni ostanki

Hemagglutinin

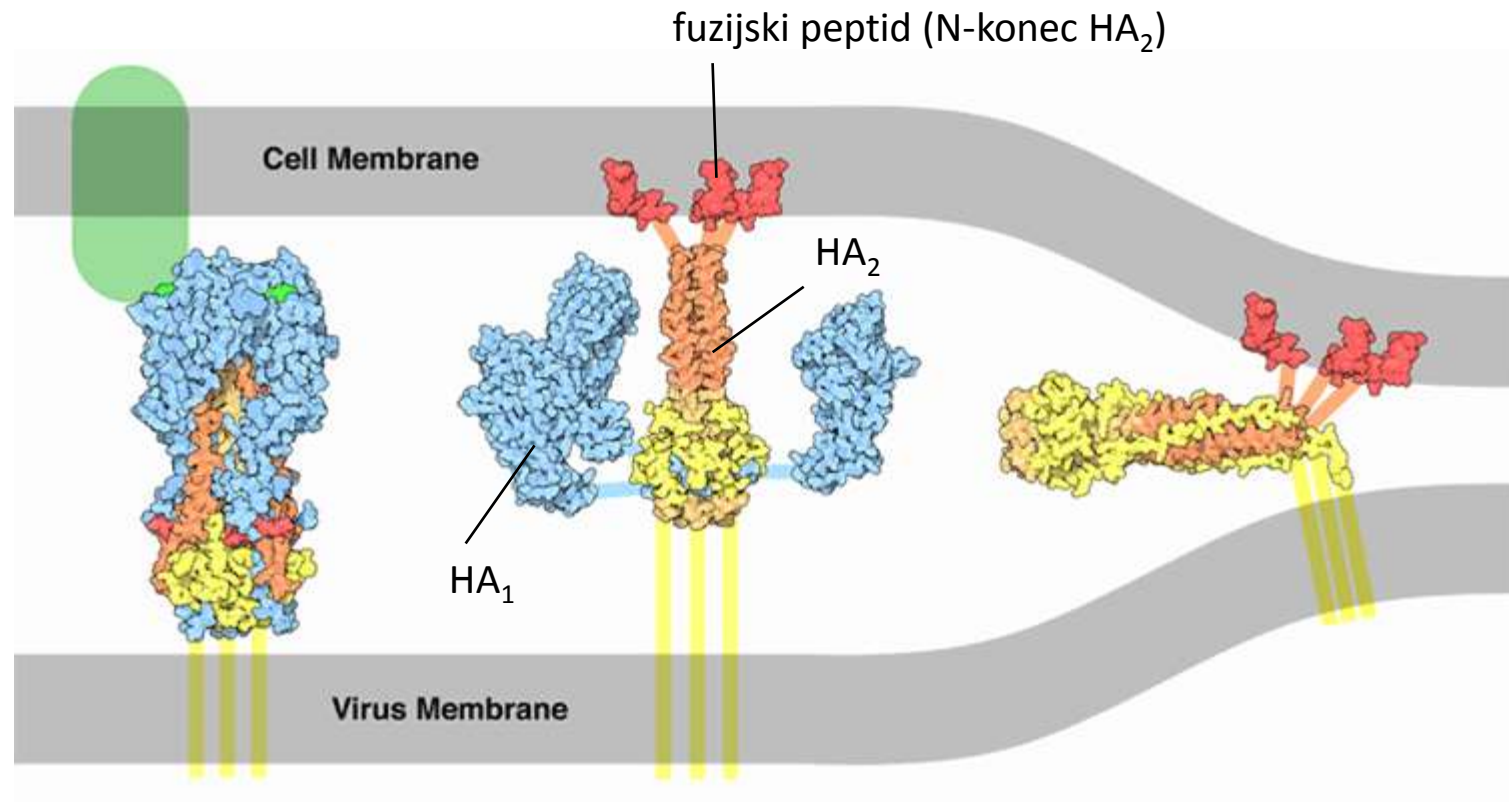
Konformacijska sprememba molekule hemaglutinina omogoči zlitje virusa gripe z membrano endolizosoma. Sprememba je ireverzibilna.

Struktura hemaglutinina pri nevtralnem pH



Hemagglutinin

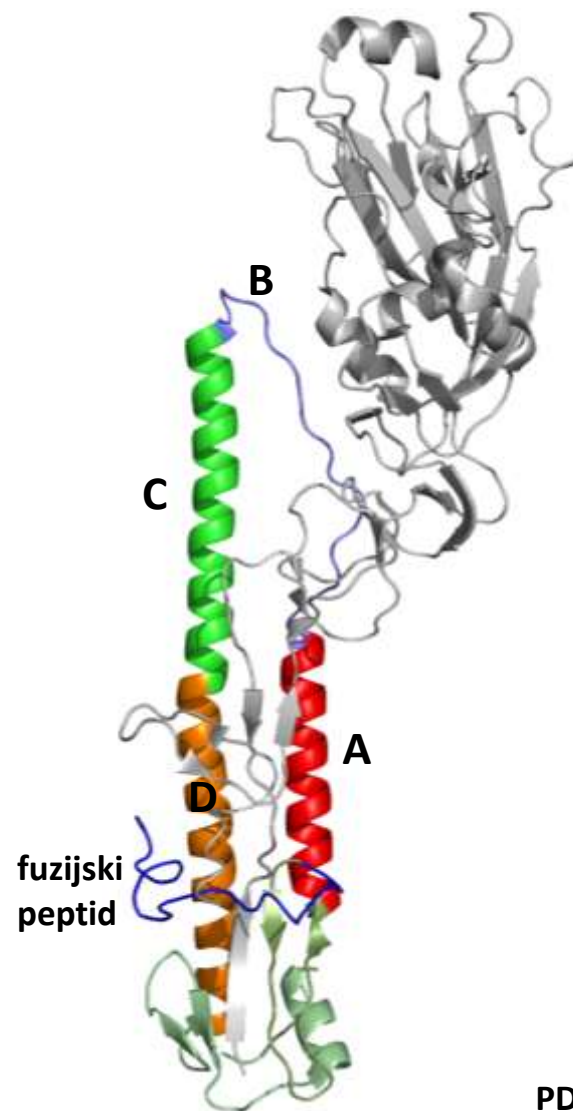
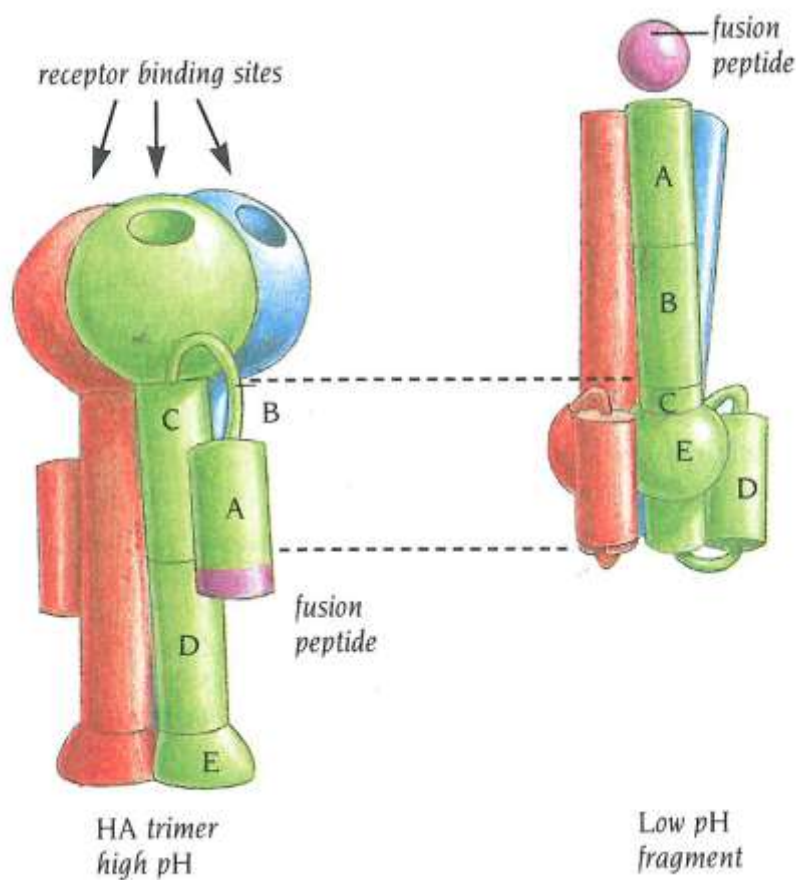
Konformacijska sprememba molekule hemaglutinina omogoči zlitje virusa gripe z membrano endolizosoma. Sprememba je ireverzibilna.



Hemagglutinin

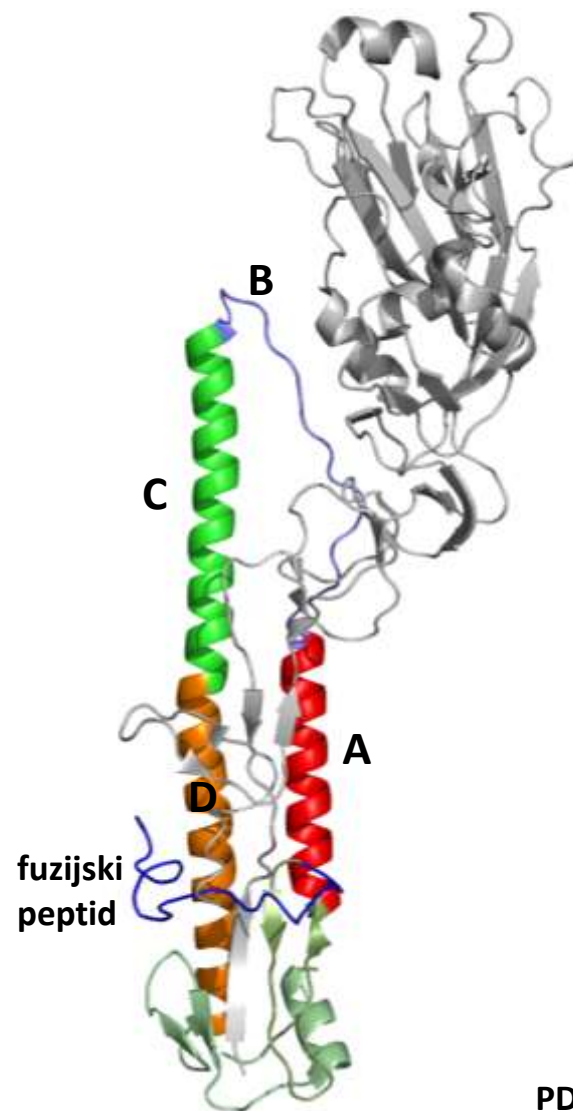
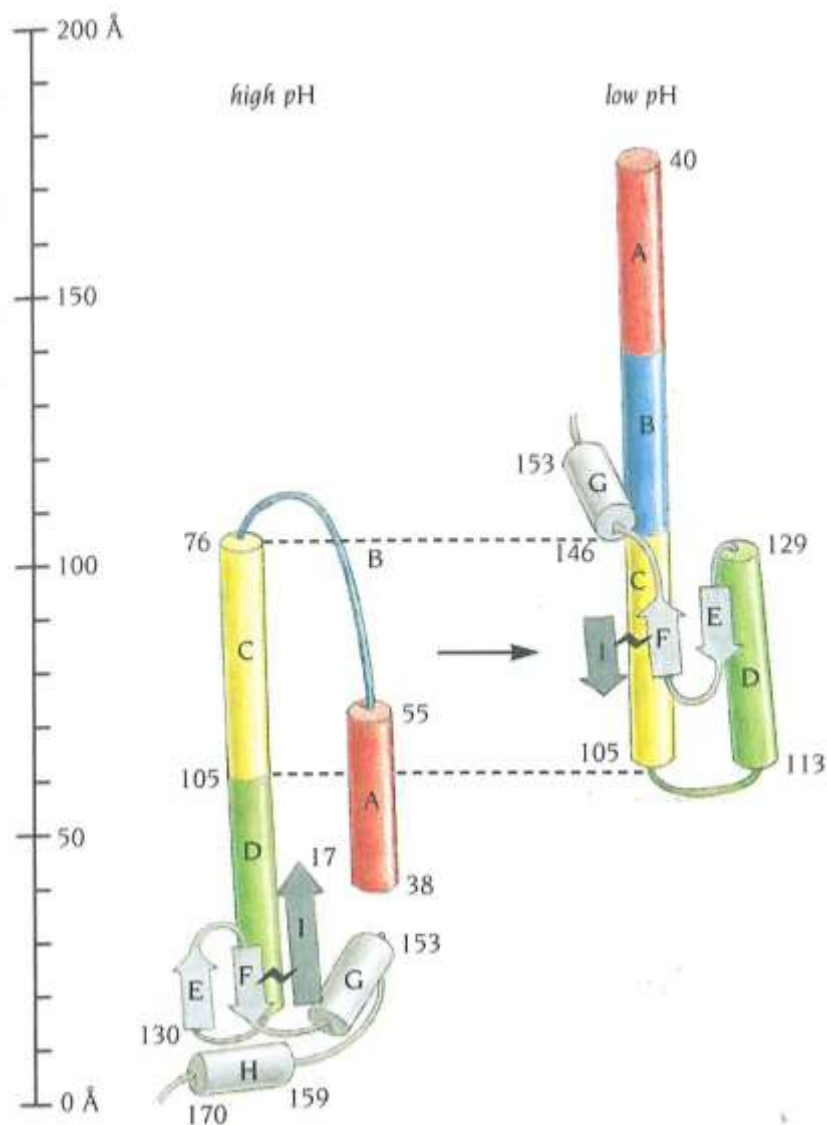
Konformacijska sprememba molekule hemaglutinina omogoči zlitje virusa gripe z membrano endolizosoma. Sprememba je ireverzibilna.

Konformacijska sprememba hemaglutinina v kislem pH



Hemaglutinin

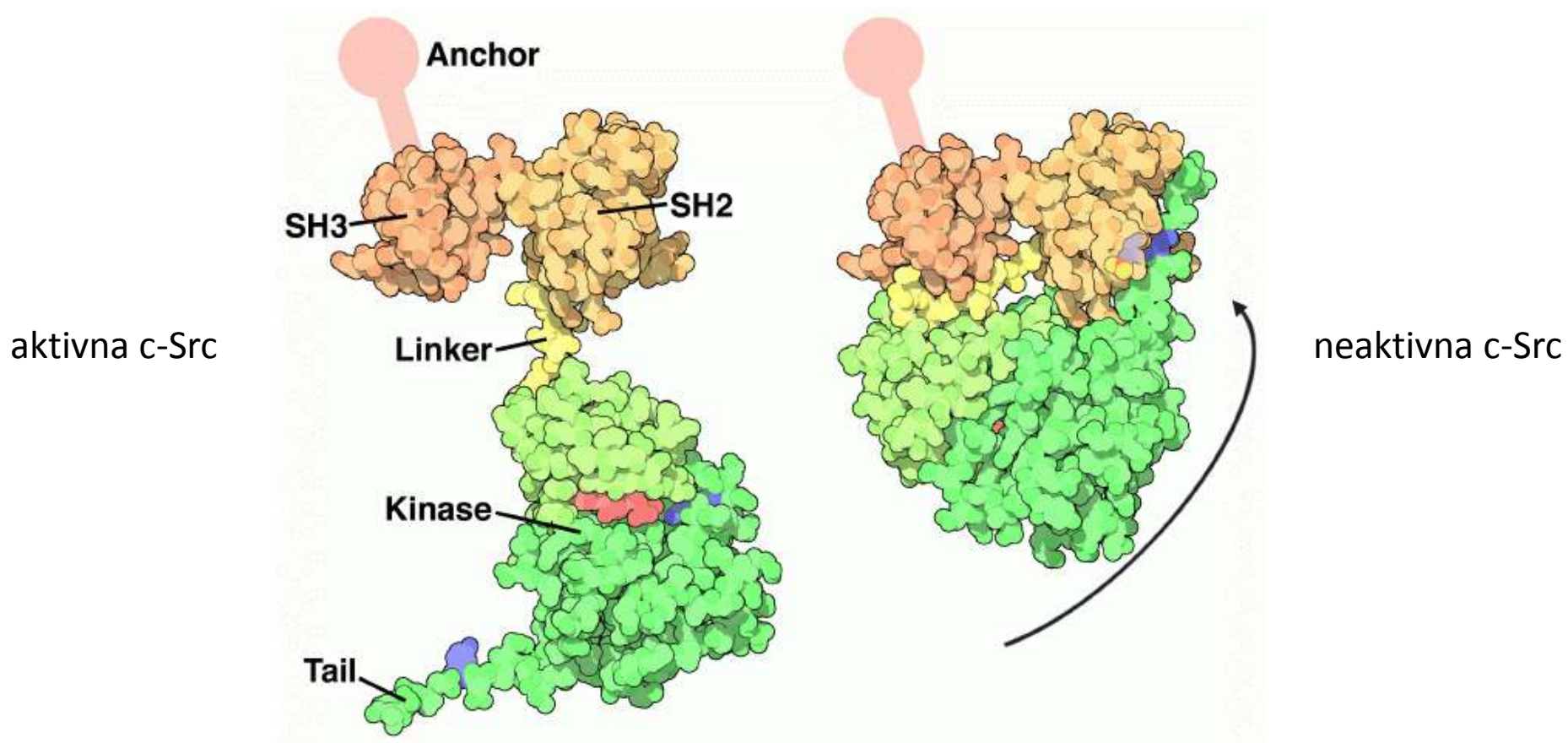
Konformacijska sprememba molekule hemaglutinina omogoči zlitje virusa gripe z membrano endolizosoma. Sprememba je ireverzibilna.



PDB 1RUZ

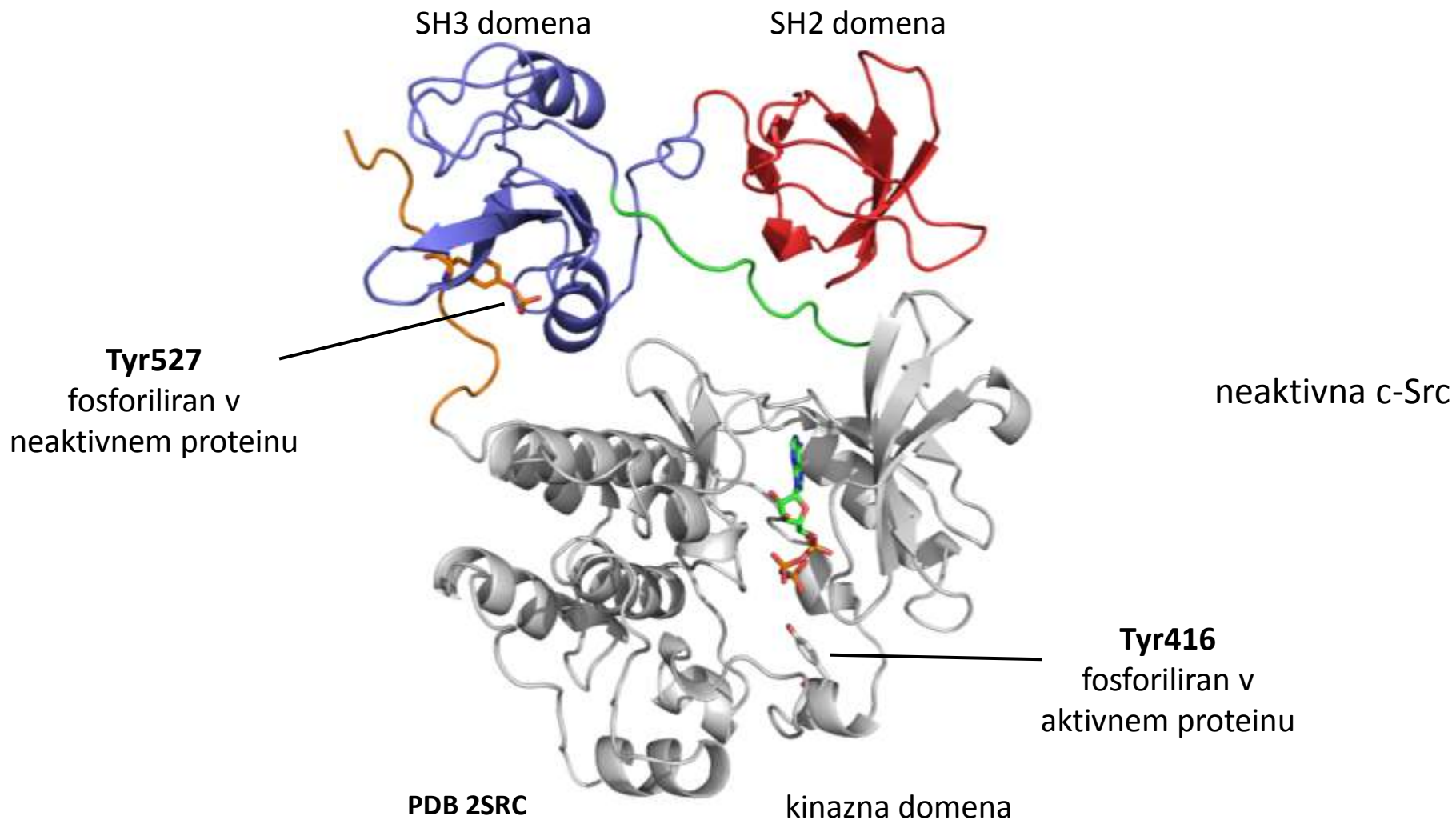
c-Src kinaza

c-Src kinaza je proto-onkogen z aktivnostjo tirozinske kinaze. Verjetno regulira embrionalni razvoj in celično rast. Prehod med aktivno in neaktivno konformacijo je reguliran s fosforilacijo dveh Tyr ostankov.



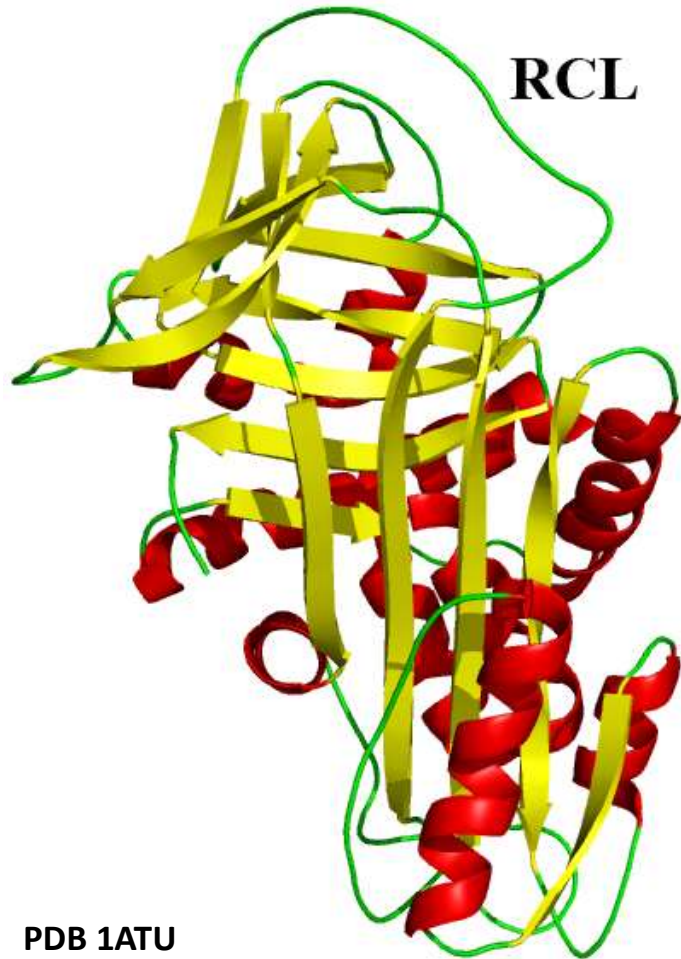
c-Src kinaza

c-Src kinaza je proto-onkogen z aktivnostjo tirozinske kinaze. Verjetno regulira embrionalni razvoj in celično rast. Prehod med aktivno in neaktivno konformacijo je reguliran s fosforilacijo dveh Tyr ostankov.



Serpini

Serpini so zunajcelični inhibitorji serinskih peptidaz, ki jih najdemo pretežno v serumu.

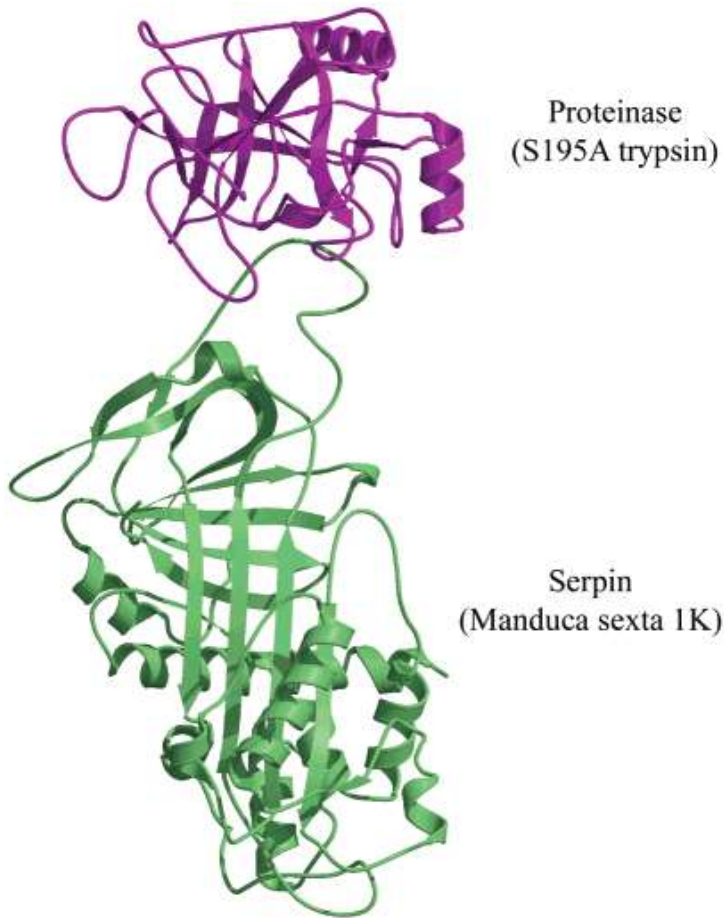


Reactive Center Loop interagira z aktivnim mestom peptidaze. Lahko tvori nekovalenten ali kovalenten kompleks. Pri tvorbi kovalentnega kompleksa pride do cepitve in konformacijske spremembe serpina.

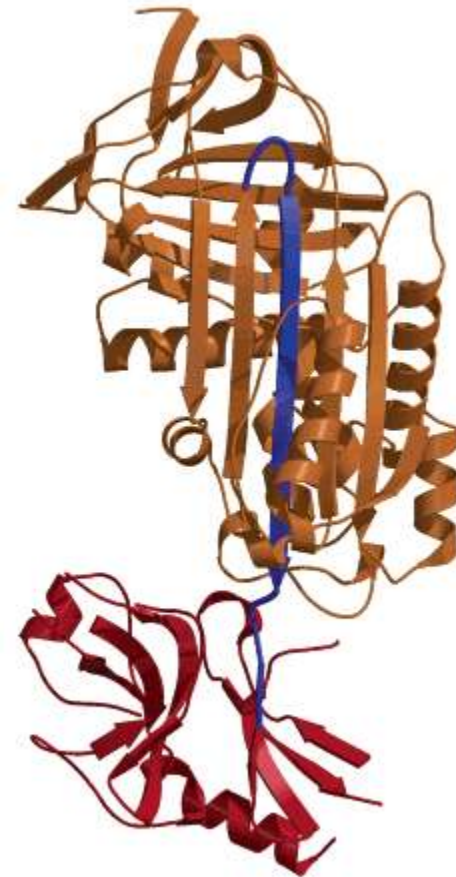
PDB 1ATU

Serpini

Serpini so zunajcelični inhibitorji serinskih peptidaz, ki jih najdemo pretežno v serumu.



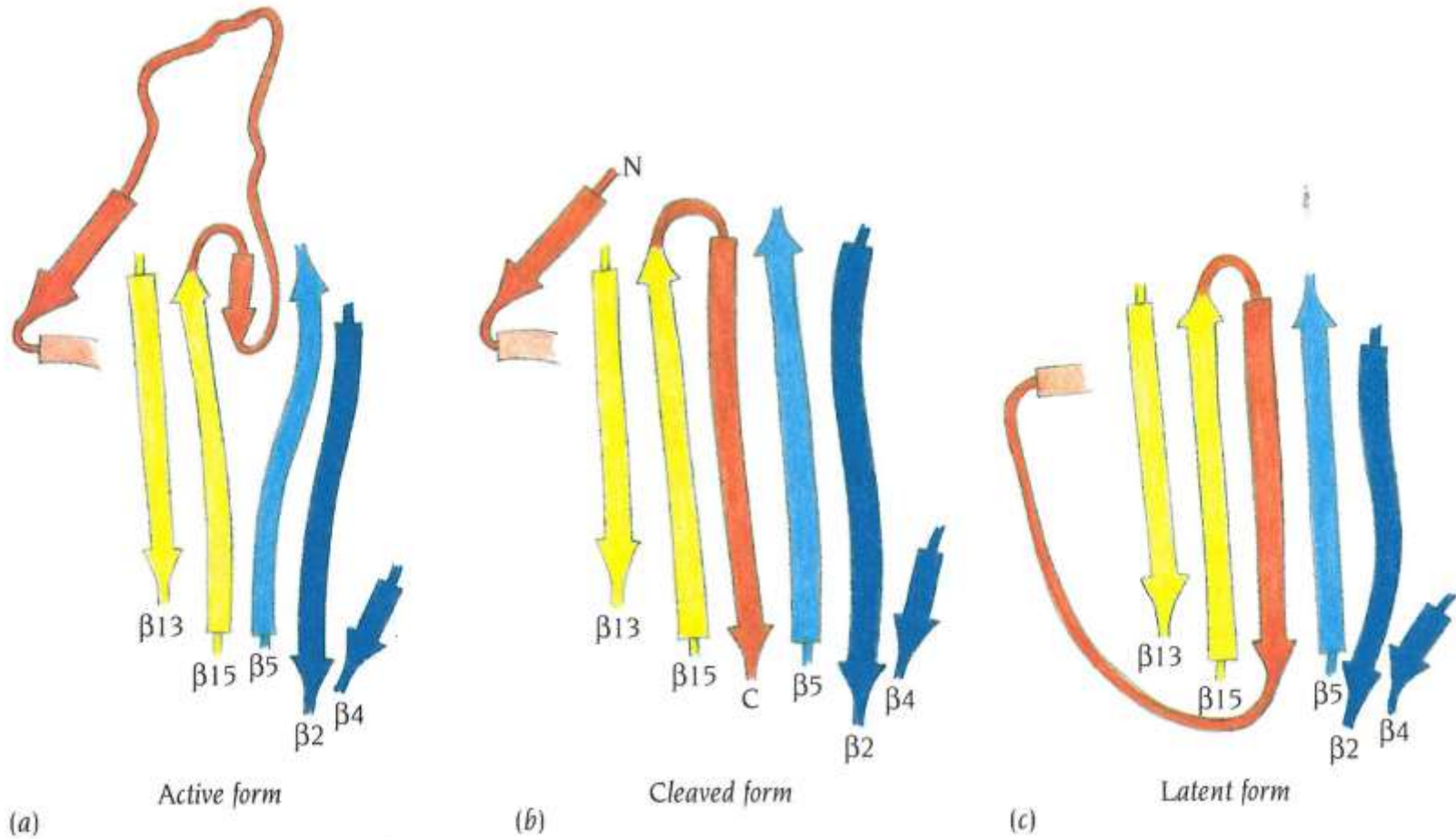
nekovalenten kompleks



kovalenten kompleks

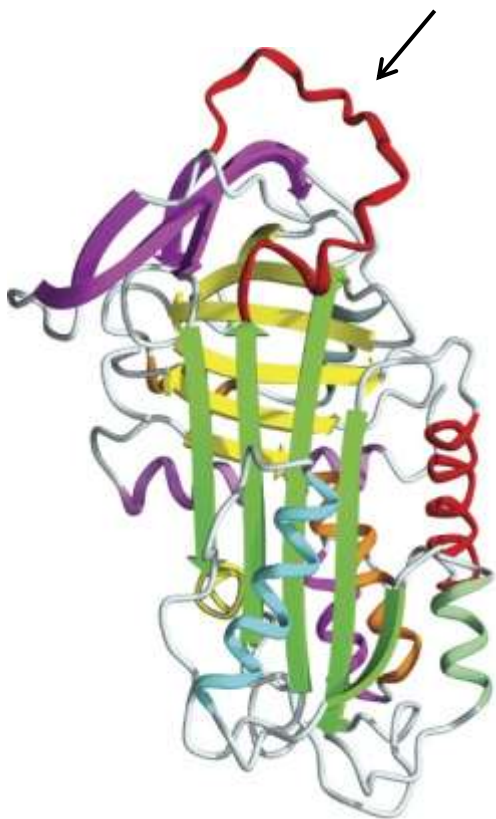
Serpini

Serpini so zunajcelični inhibitorji serinskih peptidaz, ki jih najdemo pretežno v serumu.

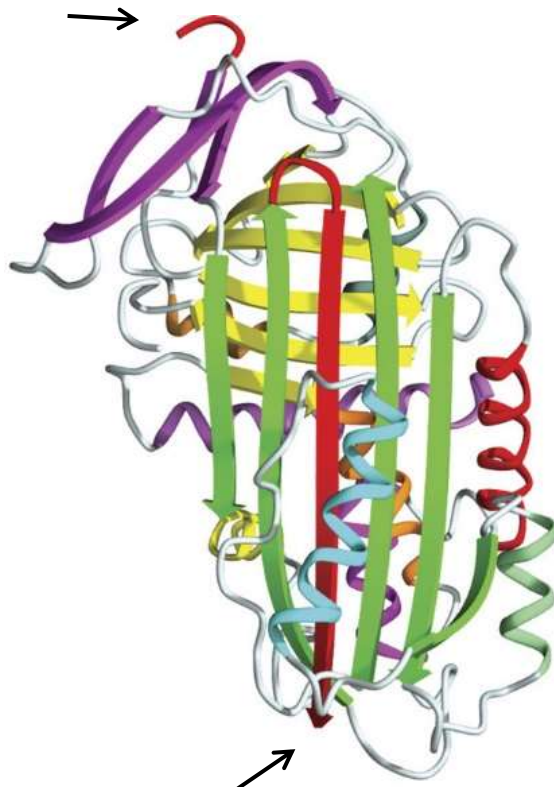


Serpini

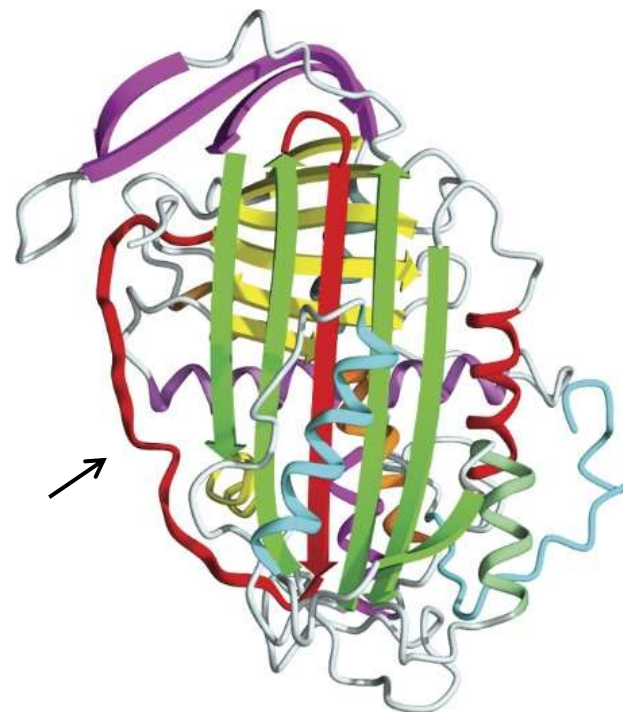
Serpini so zunajcelični inhibitorji serinskih peptidaz, ki jih najdemo pretežno v serumu.



aktivna oblika
 α 1-antitripsina



cepljena oblika
 α 1-antitripsina

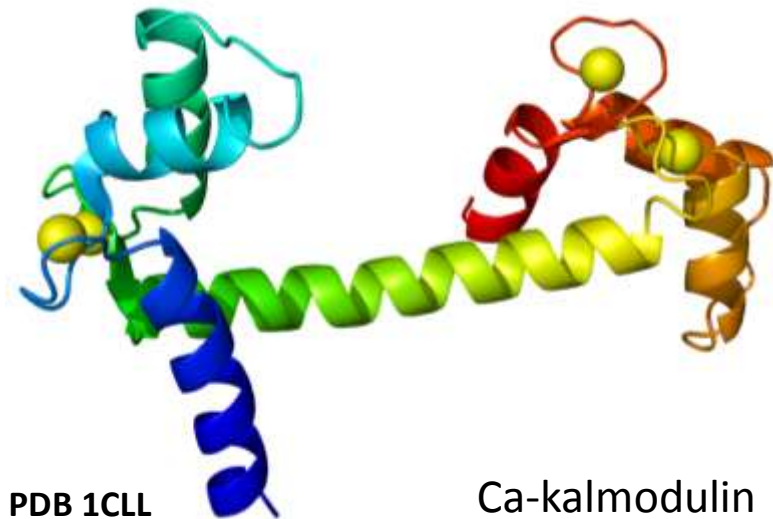
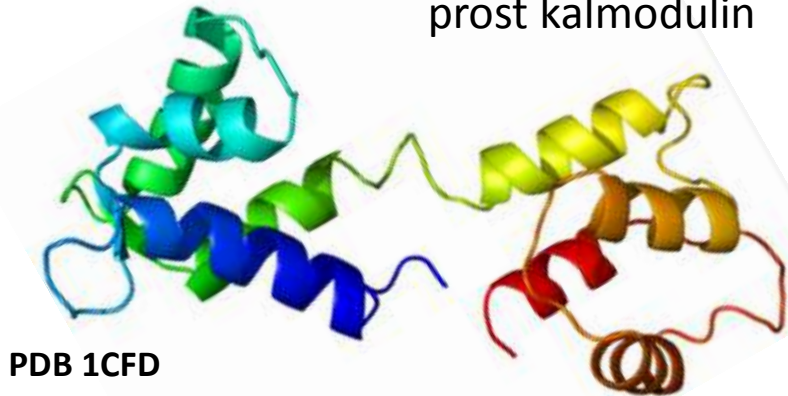


Latentna oblika
antitrombina

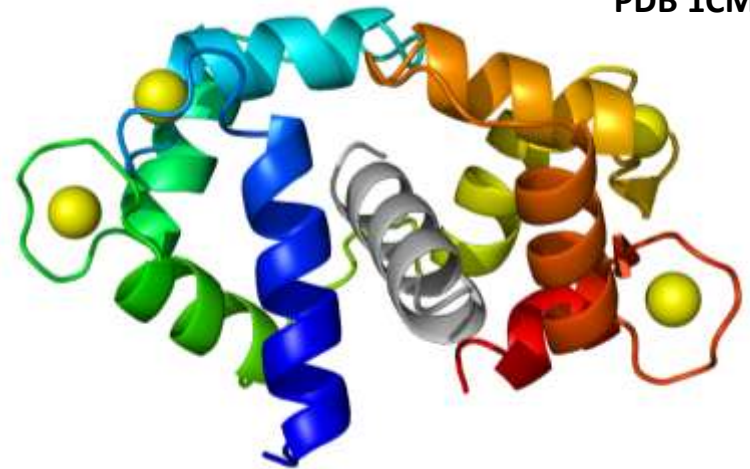
Kalmodulin

Molekula kalmodulina lahko zavzame več različnih konformacij, odvisno od vezave kalcijevih ionov in vezavnih proteinov.

prost kalmodulin

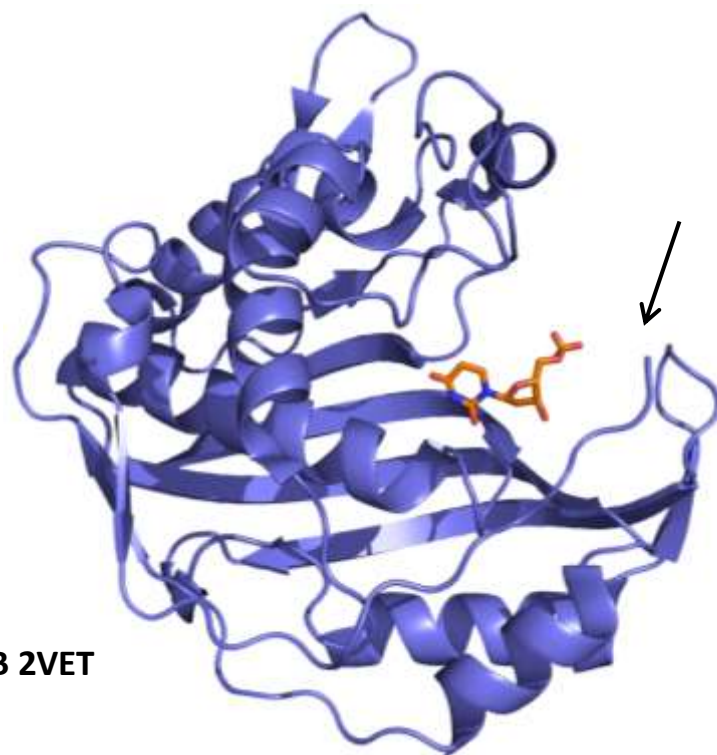
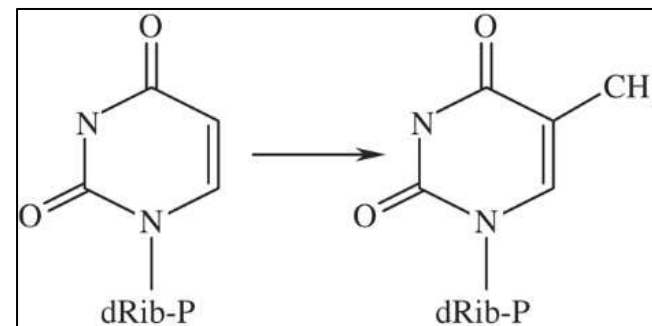


PDB 1CM1



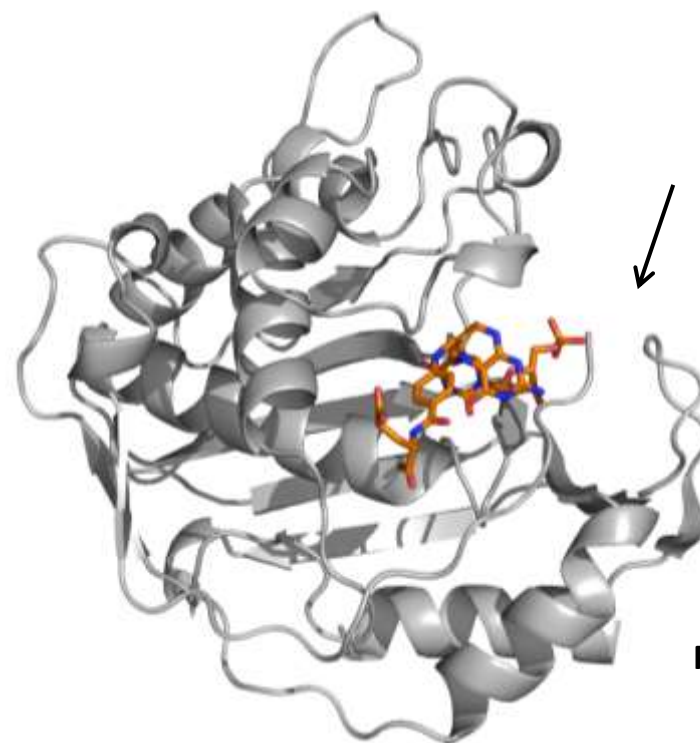
Timidilat sintaza

Timidilat sintaza katalizira metilacijo dUMP v dTMP. Kofaktor pri reakciji je metilen-tetrahidrofolat. Encim iz *E. coli* deluje tako, da ob vezavi obeh potrebnih komponent v aktivno mesto (deluje po urejenem zaporednem bi-bi mehanizmu) pride do konformacijske spremembe encima v aktivno konformacijo. Sprememba obsega zlasti C-končno zanko.



PDB 2VET

binarni E-dUMP kompleks

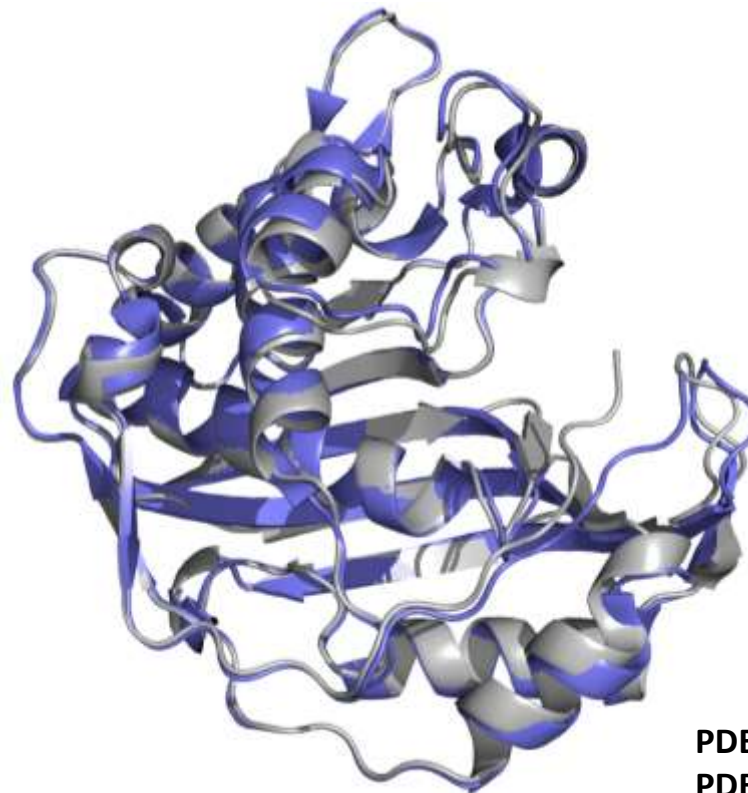
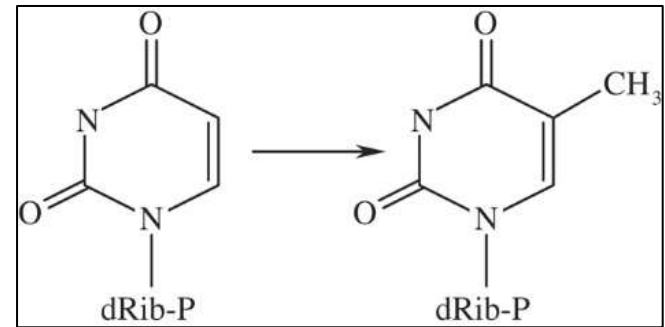


PDB 1TSN

ternarni kompleks E-dUMP-kofaktor

Timidilat sintaza

Timidilat sintaza katalizira metilacijo dUMP v dTMP. Kofaktor pri reakciji je metilen-tetrahidrofolat. Encim iz *E. coli* deluje tako, da ob vezavi obeh potrebnih komponent v aktivno mesto (deluje po urejenem zaporednem bi-bi mehanizmu) pride do konformacijske spremembe encima v aktivno konformacijo. Sprememba obsega zlasti C-končno zanko.

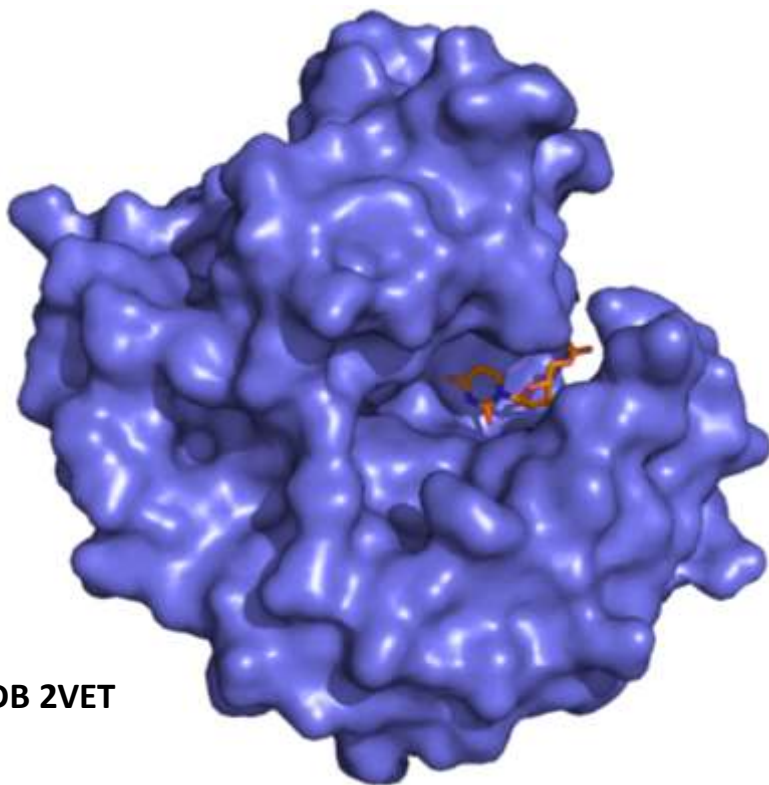
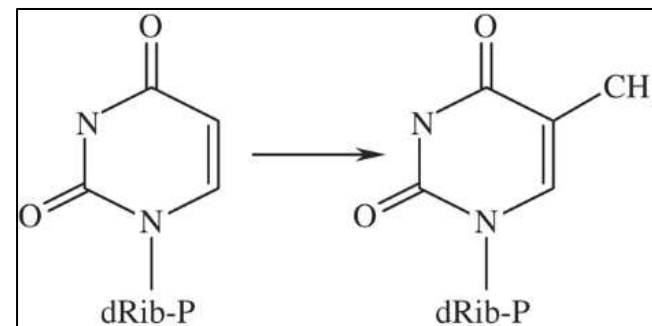


superpozicija binarnega
(moder) in ternarnega (siv)
kompleksa

PDB 2VET
PDB 1TSN

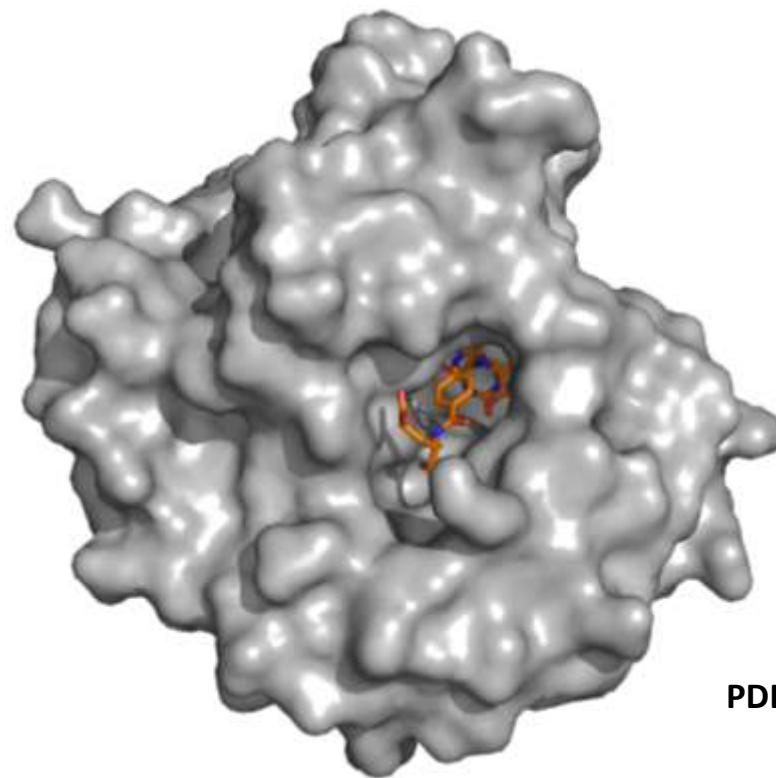
Timidilat sintaza

Timidilat sintaza katalizira metilacijo dUMP v dTMP. Kofaktor pri reakciji je metilen-tetrahidrofolat. Encim iz *E. coli* deluje tako, da ob vezavi obeh potrebnih komponent v aktivno mesto (deluje po urejenem zaporednem bi-bi mehanizmu) pride do konformacijske spremembe encima v aktivno konformacijo. Sprememba obsega zlasti C-končno zanko.



PDB 2VET

binarni E-dUMP kompleks

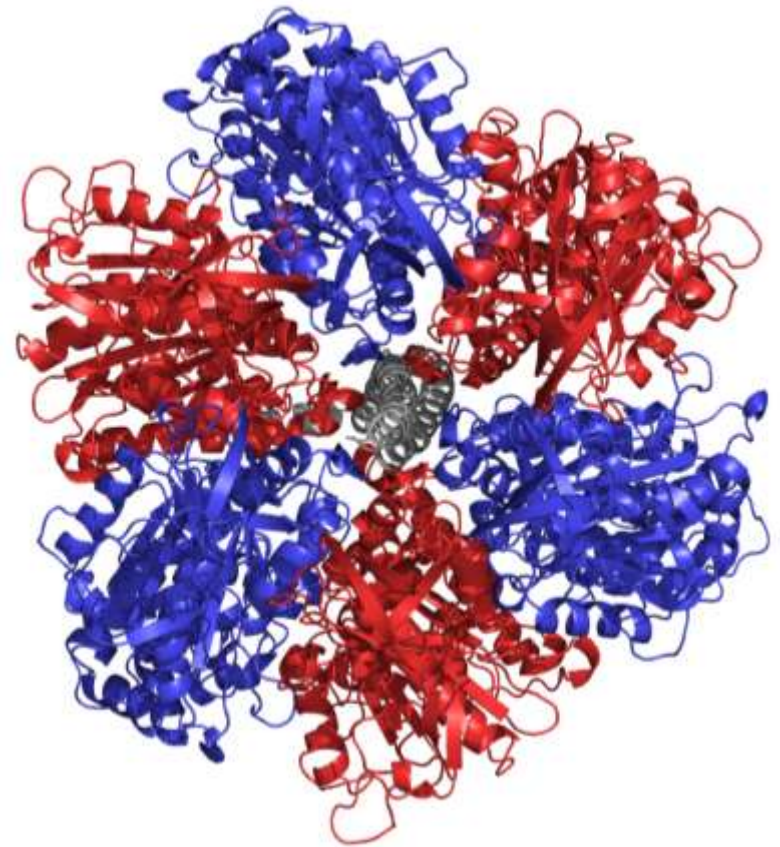
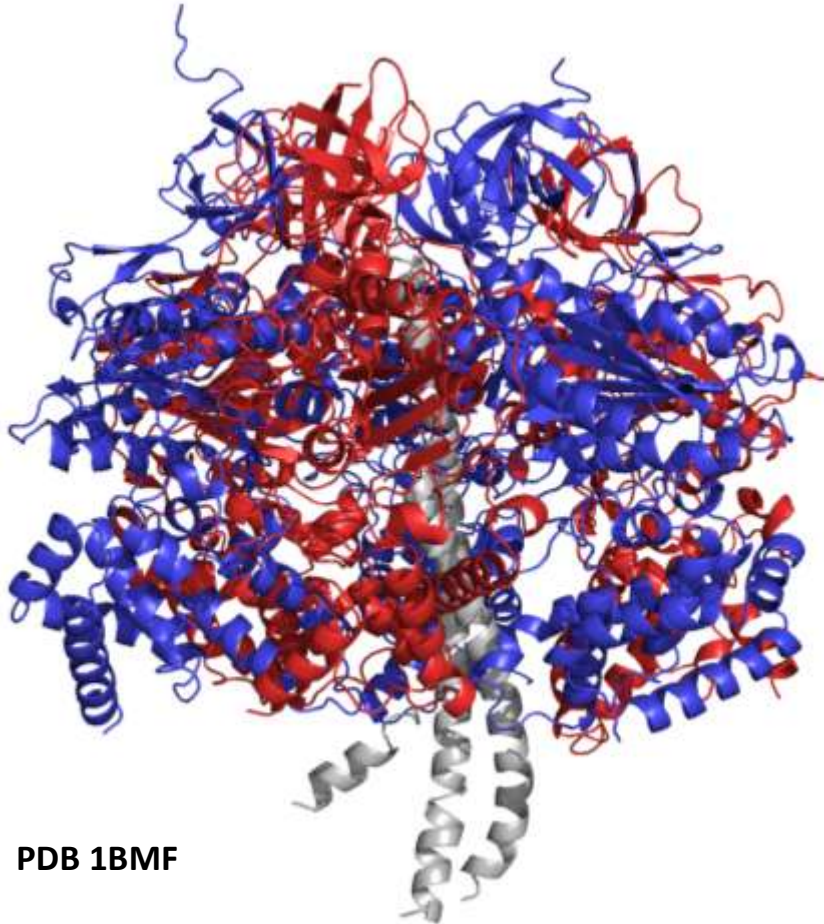


PDB 1TSN

ternarni kompleks E-dUMP-kofaktor

Mitohondrijska ATPaza

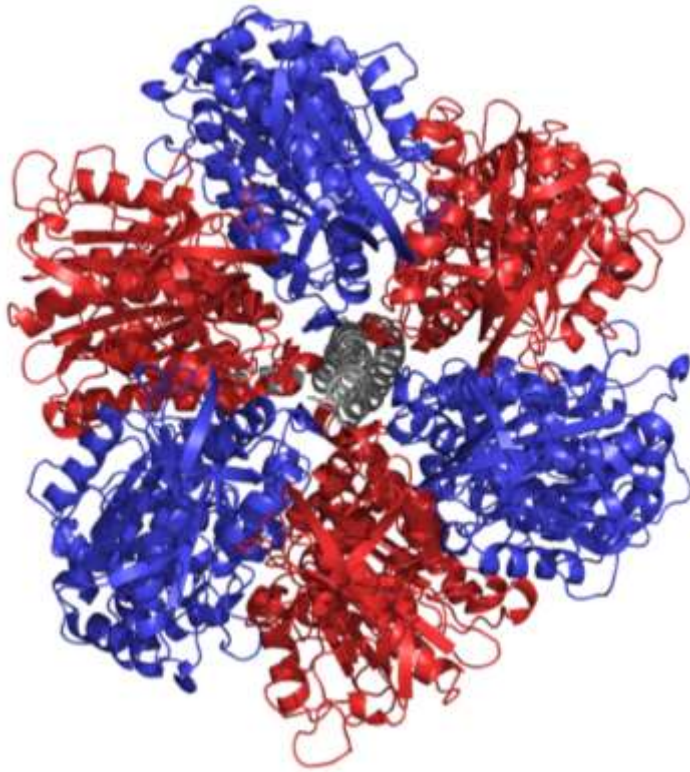
Mitohondrijska ATPaza je sestavljena iz treh dimerov $\alpha\beta$ podenot in γ podenote. Pri delovanju se $\alpha\beta$ podenote vrtijo okoli γ podenote in alternirajo med tremi konformacijskimi stanji.



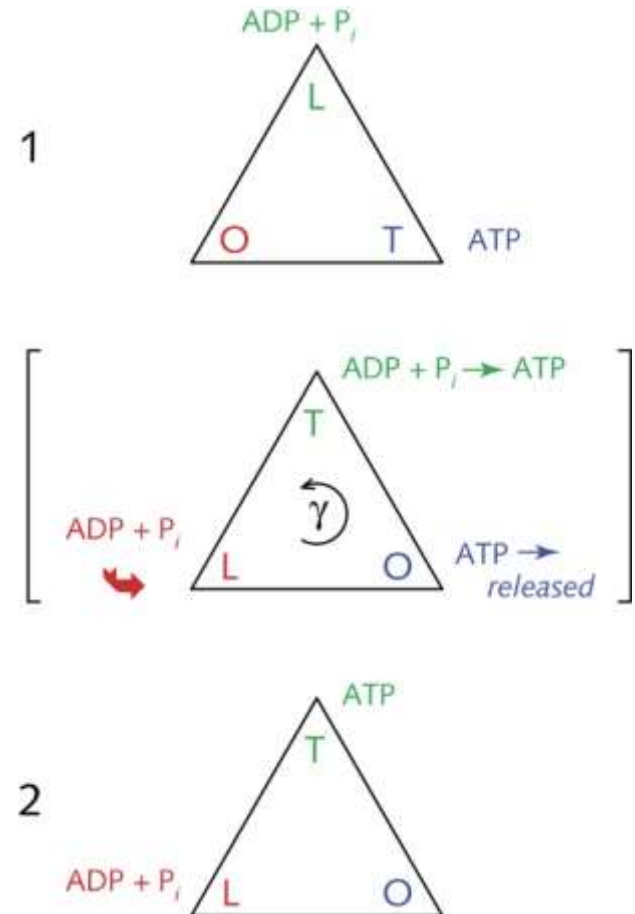
α podenote so obarvane modro, β podenote rdeče, γ podenota pa sivo.

Mitohondrijska ATPaza

Mitohondrijska ATPaza je sestavljena iz treh dimerov $\alpha\beta$ podenot in γ podenote. Pri delovanju se $\alpha\beta$ podenote vrtijo okoli γ podenote in alternirajo med tremi konformacijskimi stanji.



PDB 1BMF

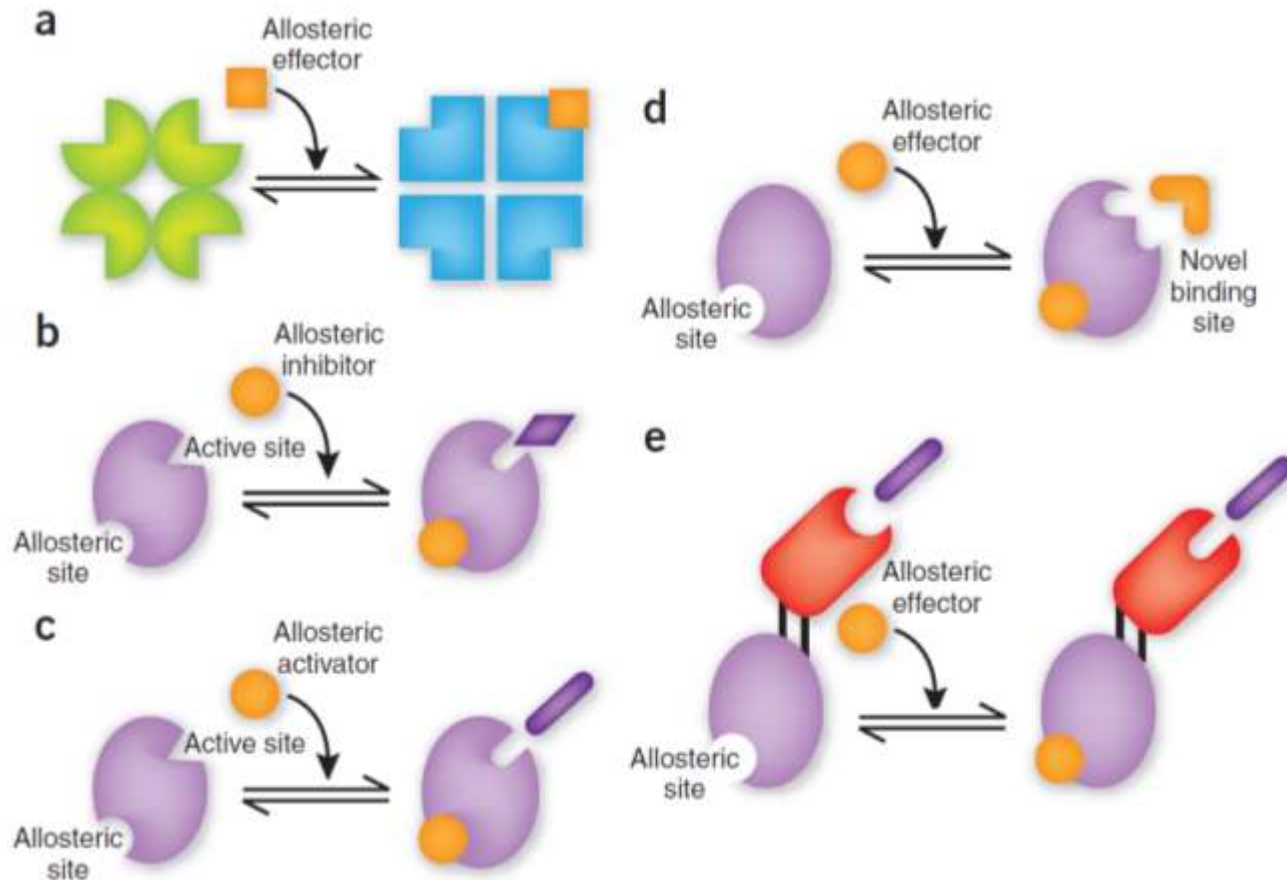


L stanje veže ADP in P_i , T stanje katalizira sintezo ATP, O stanje sprosti nastali ATP

Alosterična regulacija

Alosterija je prenos informacije v obliki konformacijske spremembe med dvema ali več mesti v proteinu. Je pogost način regulacije aktivnosti tako monomernih kot oligomernih proteinov. Na strukturnem nivoju so alosterični efekti lahko zelo raznoliki.

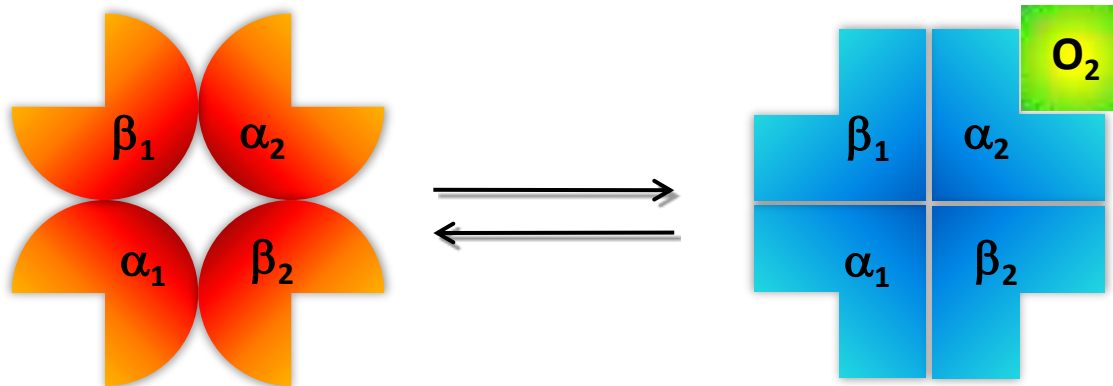
Nekaj primerov mehanizmov alosterične regulacije:



Hemoglobin

Hemoglobin je tetramer s sestavo $\alpha_2\beta_2$. Njegova značilnost je kooperativna vezava štirih molekul kisika. Ob vezavi kisika ne pride do znatnih sprememb v terciarni strukturi podenot, pride pa do razlik v kvartarni strukturi, katerih posledica je kooperativna vezava liganda.

Mehanizem delovanja hemoglobina: Monod-Wyman-Changeux-ov (MWC) model



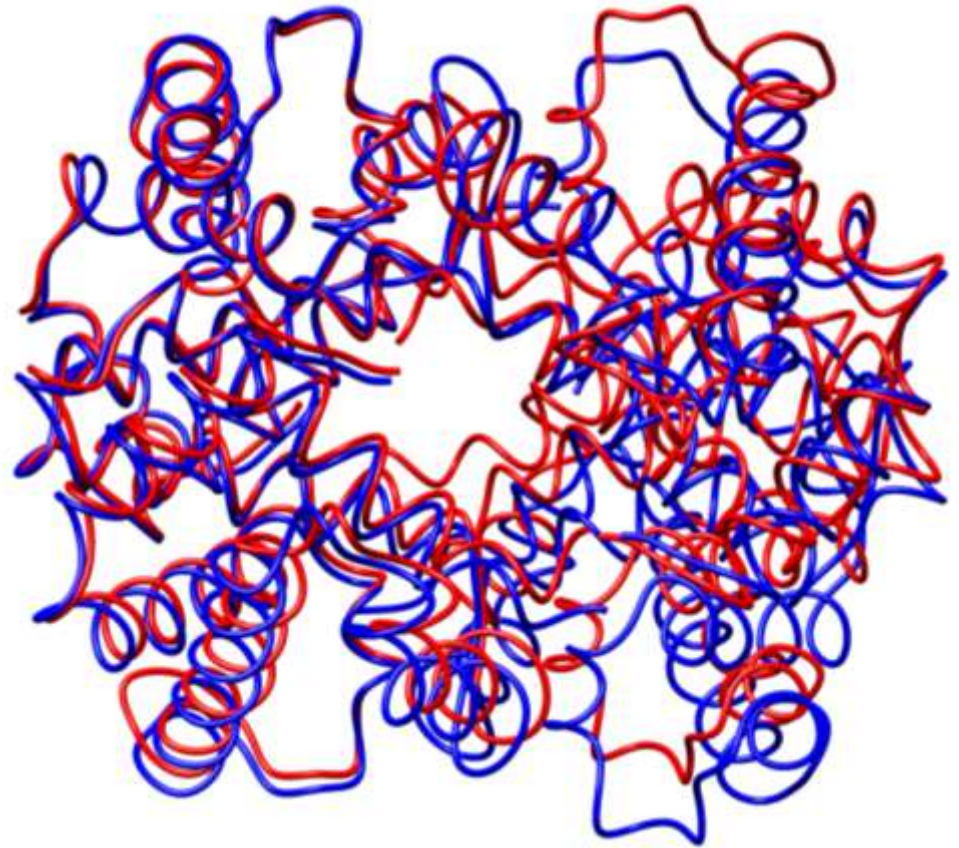
Hemoglobin

Hemoglobin je dimer dveh $\alpha\beta$ dimerov. Z notraj dimera ne pride do konformacijskih sprememb. Pride pa do premika enega dimera glede na drugega za okoli 15° .

dimer



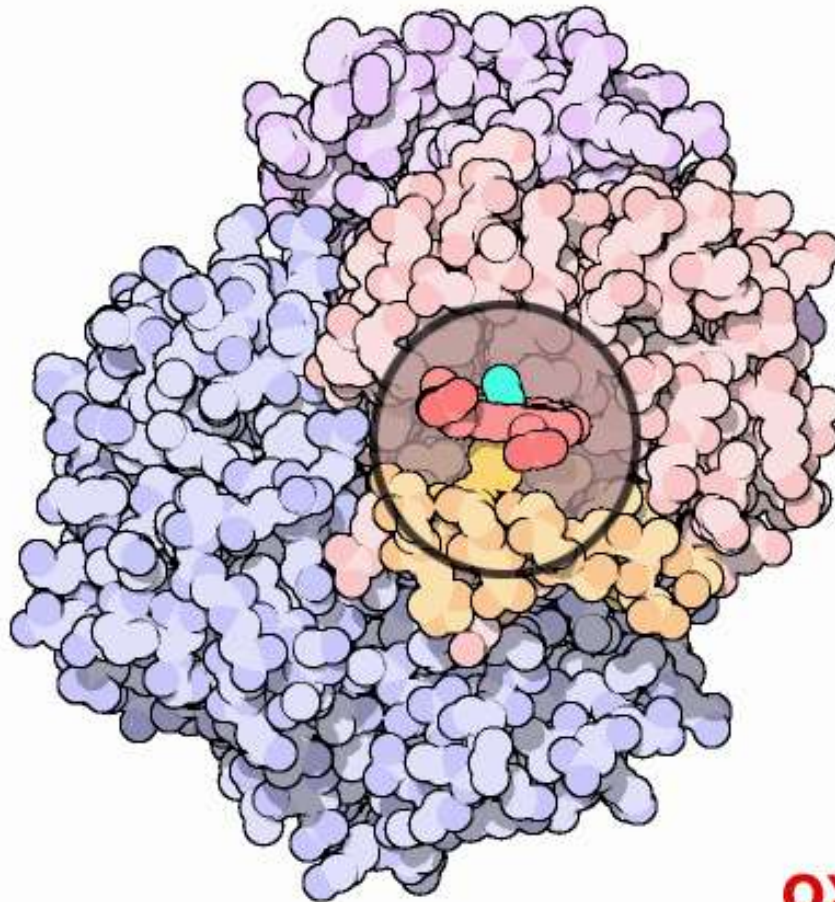
tetramer



moder – deoksihemoglobin (PDB 2HHB)
rdeč – oksihemoglobin (PDB 1HHO)

Hemoglobin

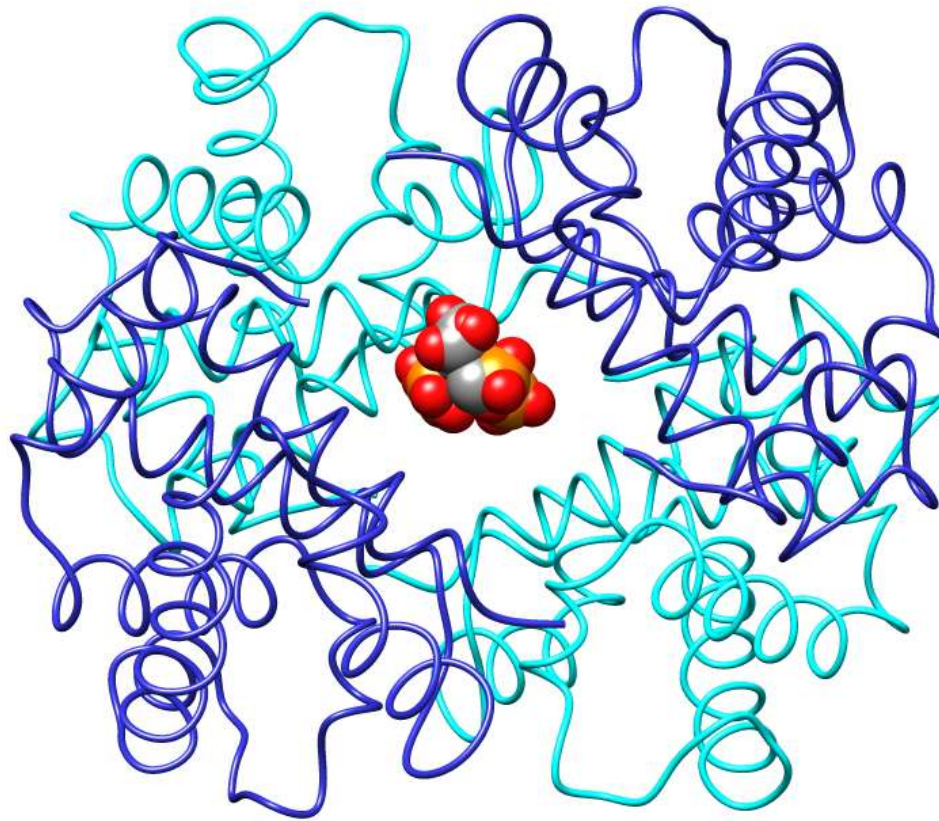
Hemoglobin je dimer dveh $\alpha\beta$ dimerov. Z notraj dimera ne pride do konformacijskih sprememb. Pride pa do premika enega dimera glede na drugega za okoli 15° .



oxy

Hemoglobin

2,3-bisfosfoglicerat je naravni alosterični regulator hemoglobina. Deluje tako, da zniža afiniteto hemoglobina do kisika. Veže se med obe β podenoti.

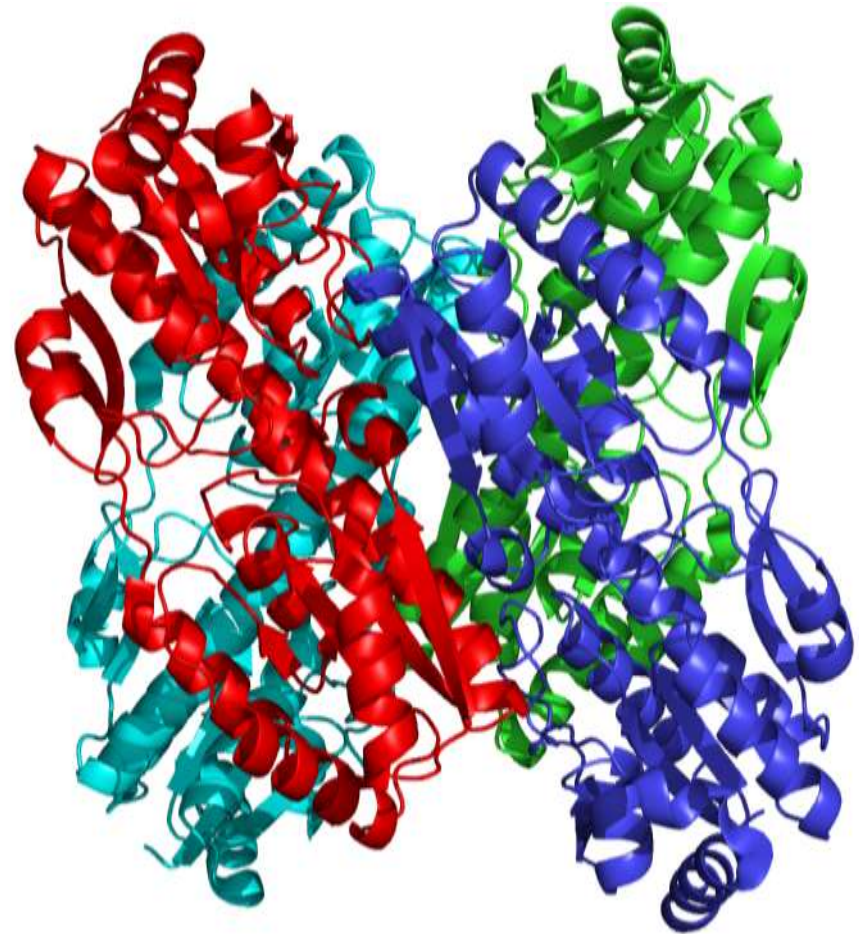
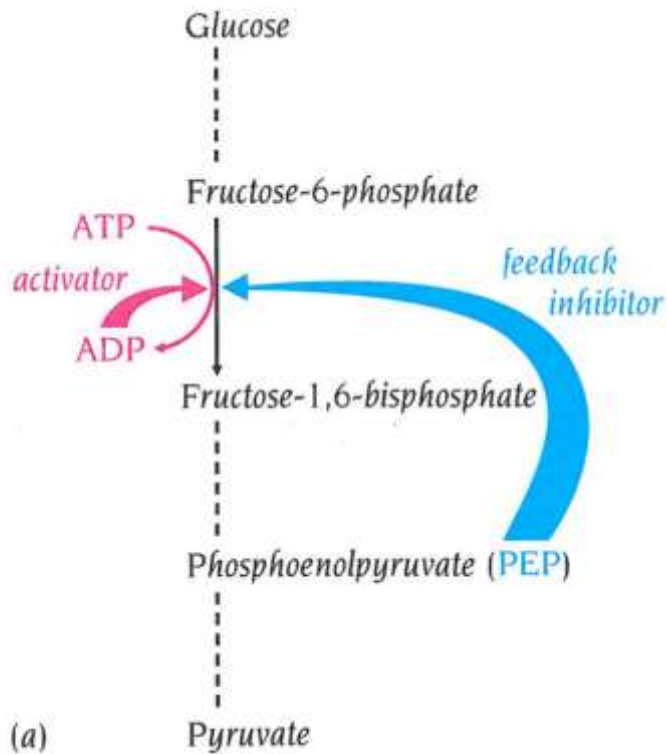


α podenoti - ciano
 β podenoti – modri

PDB 4L7V

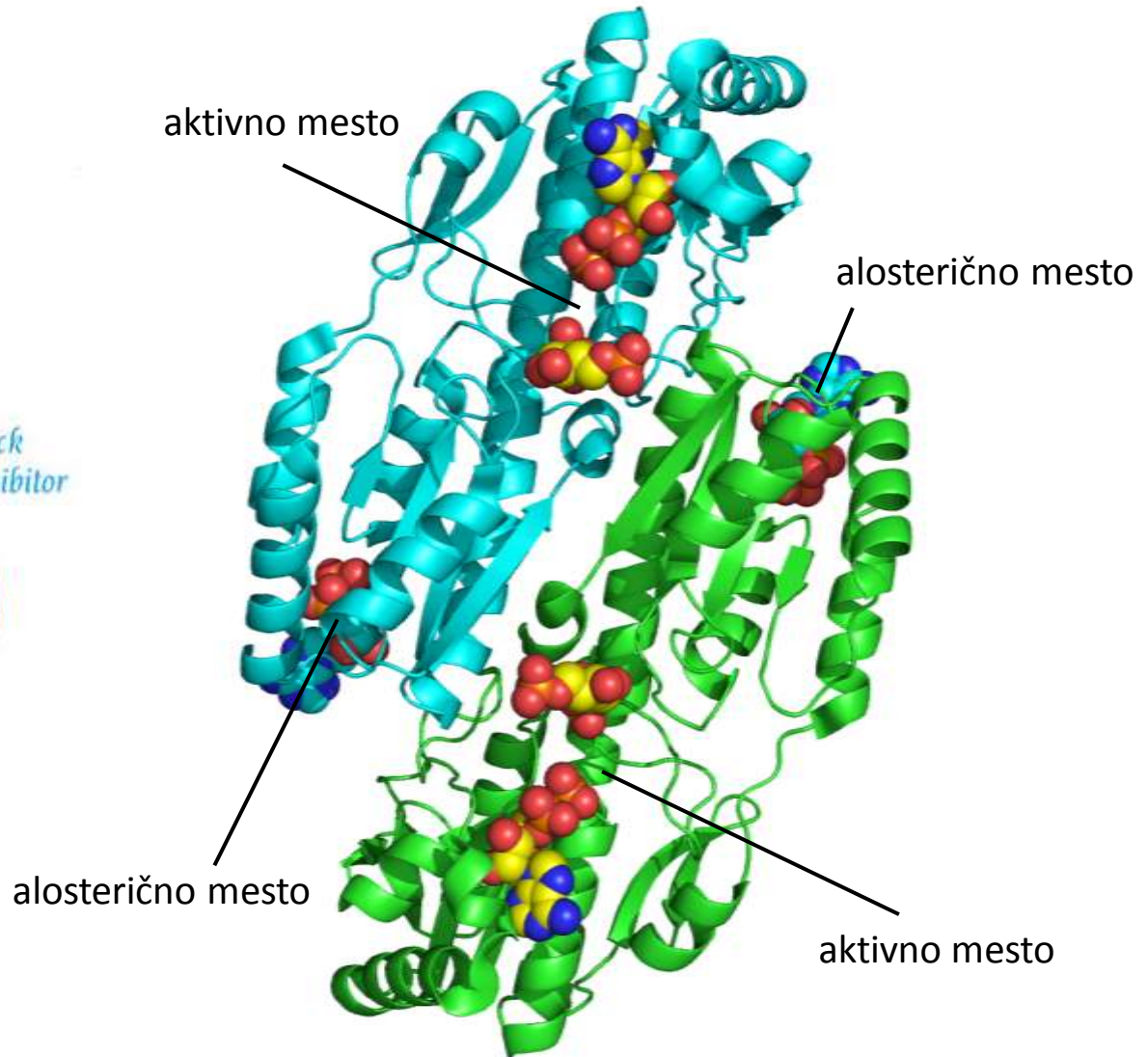
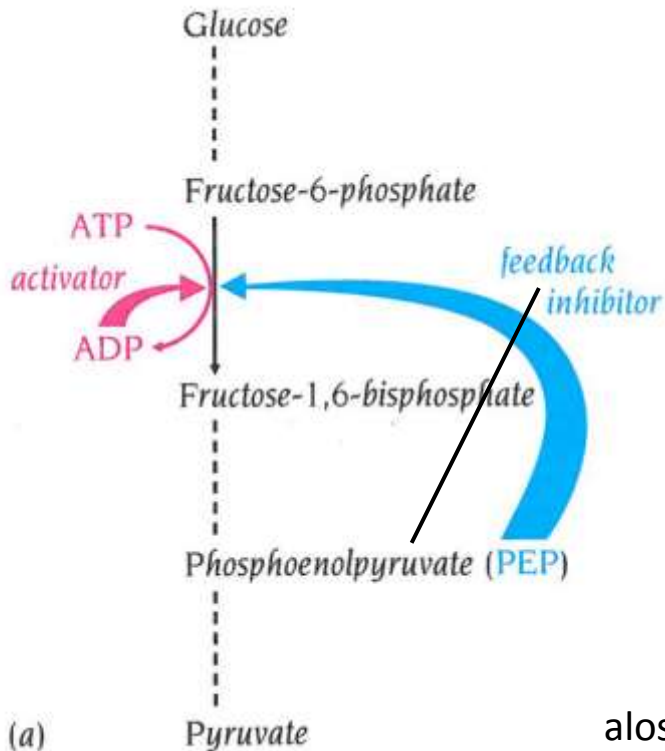
Fosfofruktokinaza

Fosfofruktokinaza je glikolitičen encim, zgrajen iz štirih enakih podenot organiziranih v dimer dimerov.



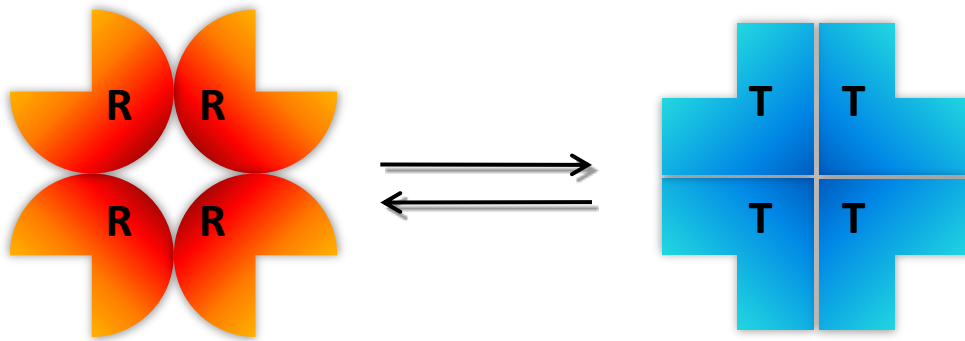
Fosfofruktokinaza

Fosfofruktokinaza je glikolitičen encim, zgrajen iz štirih enakih podenot organiziranih v dimer dimerov.

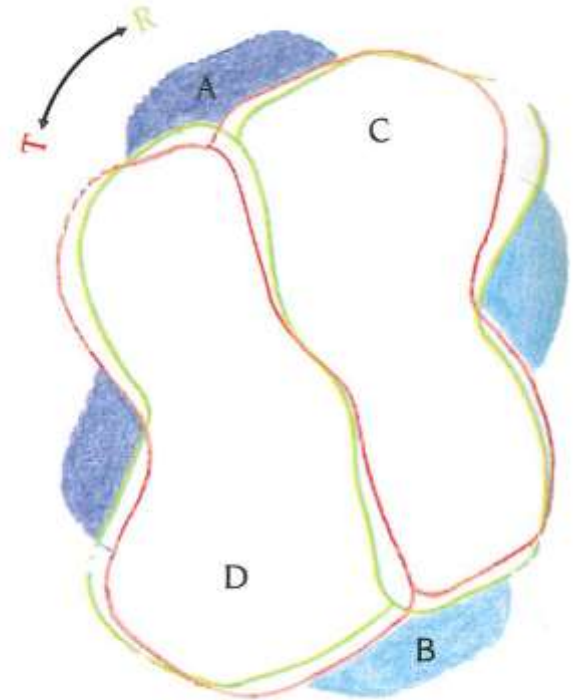


Fosfofruktokinaza

Podenote PFK obstajajo v dveh konformacijskih stanjih - R in T. Prehod med konformacijskima stanjema je skladen z MWC modelom – vse podenote so hkrati v istem stanju.

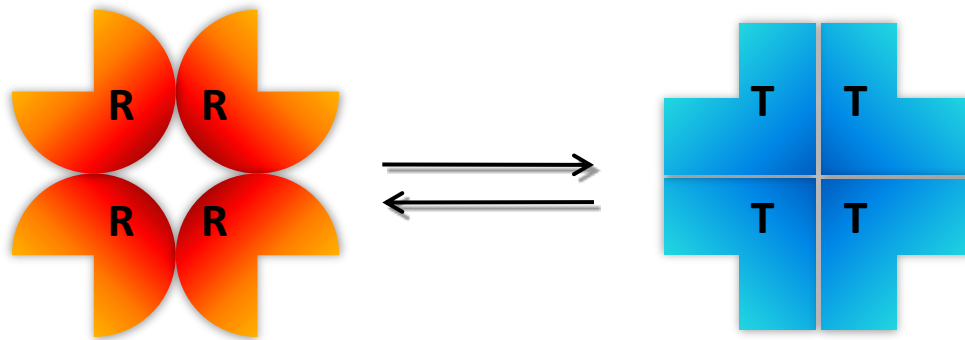


Pri spremembi konformacije pride do premika enega dimera glede na drugega za 7° .

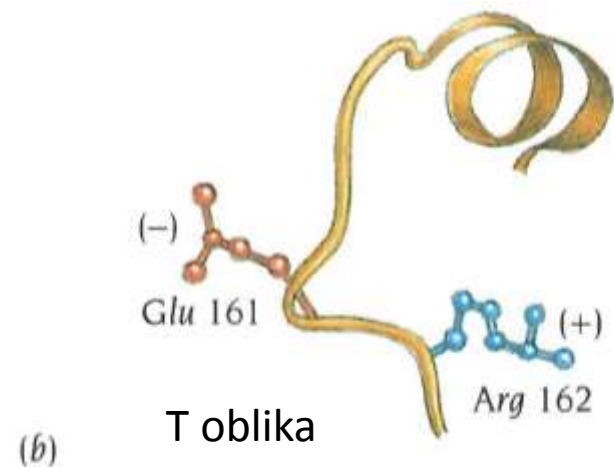
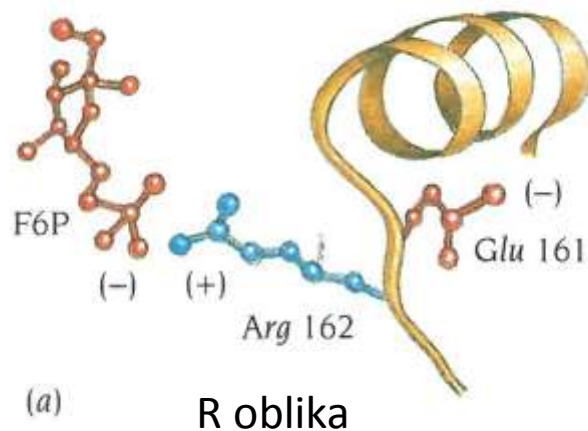


Fosfofruktokinaza

Podenote PFK obstajajo v dveh konformacijskih stanjih - R in T. Prehod med konformacijskima stanjema je skladen z MWC modelom – vse podenote so hkrati v istem stanju.



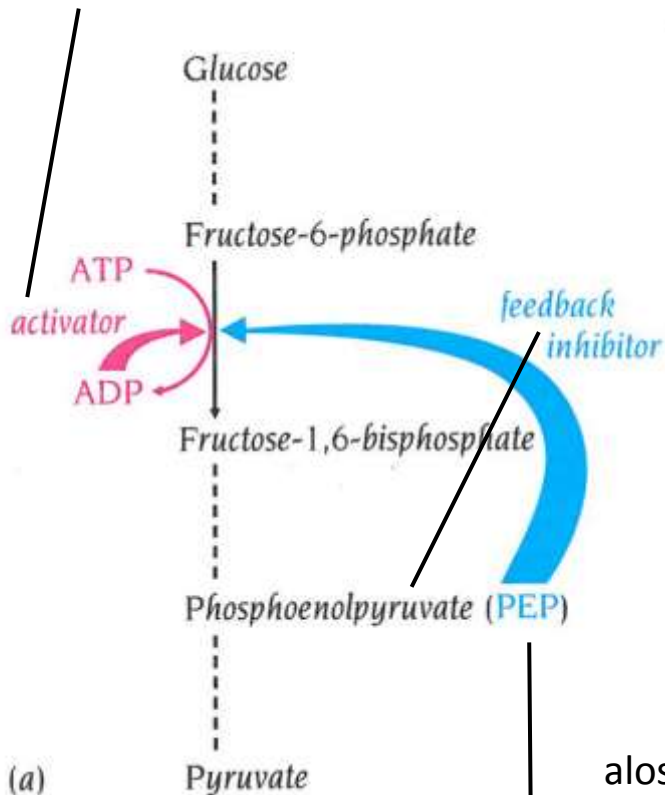
R oblika ima 1000x večjo afiniteto do F6P kot T oblika.



Fosfofruktokinaza

Fosfofruktokinaza je glikolitičen encim, zgrajen iz štirih enakih podenot organiziranih v dimer dimerov.

stabilizira R obliko



stabilizira T obliko

