

Hemoglobina, Cooperatividade e Alosteria

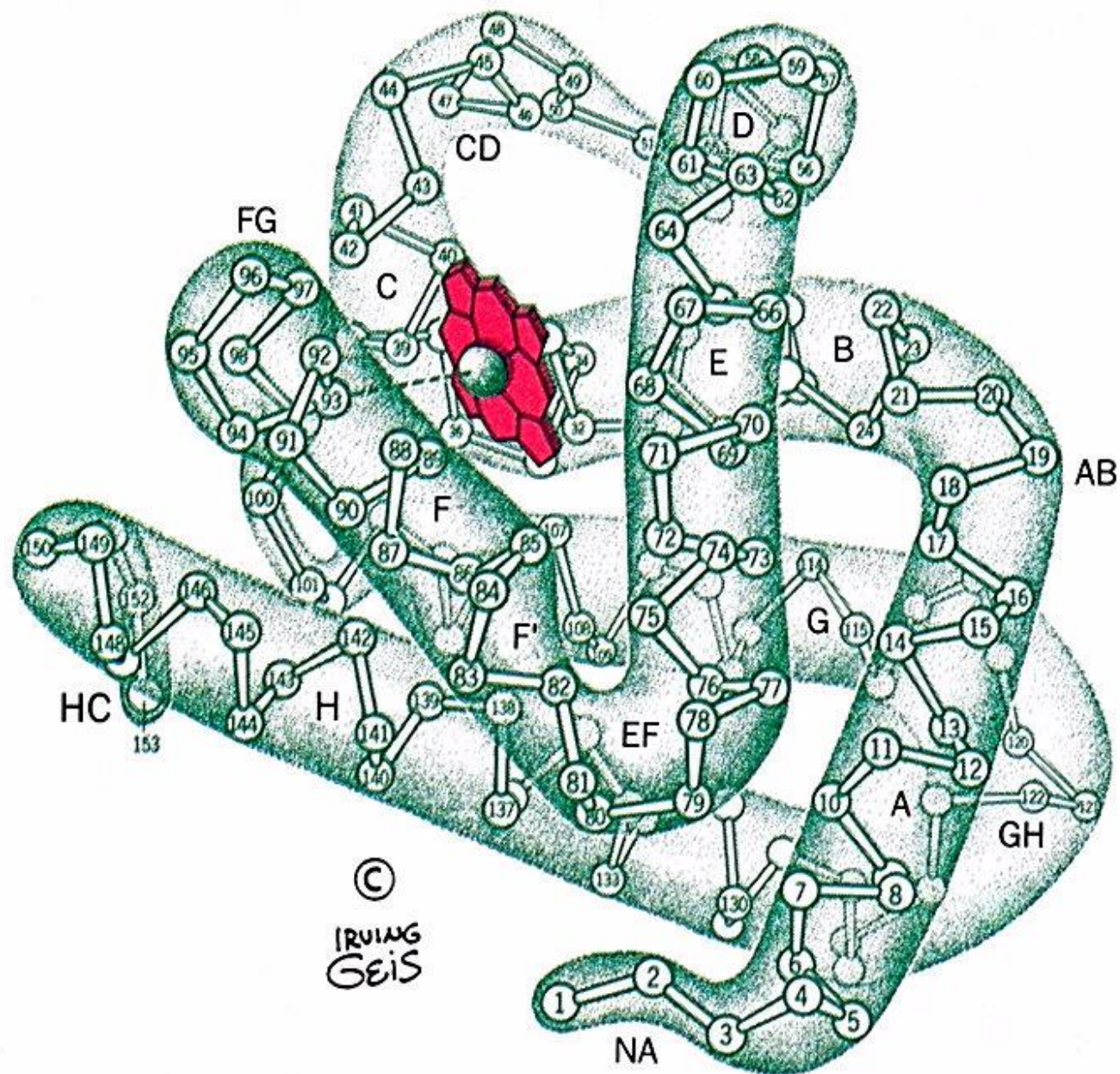
Capit. 10
de Voet e Voet

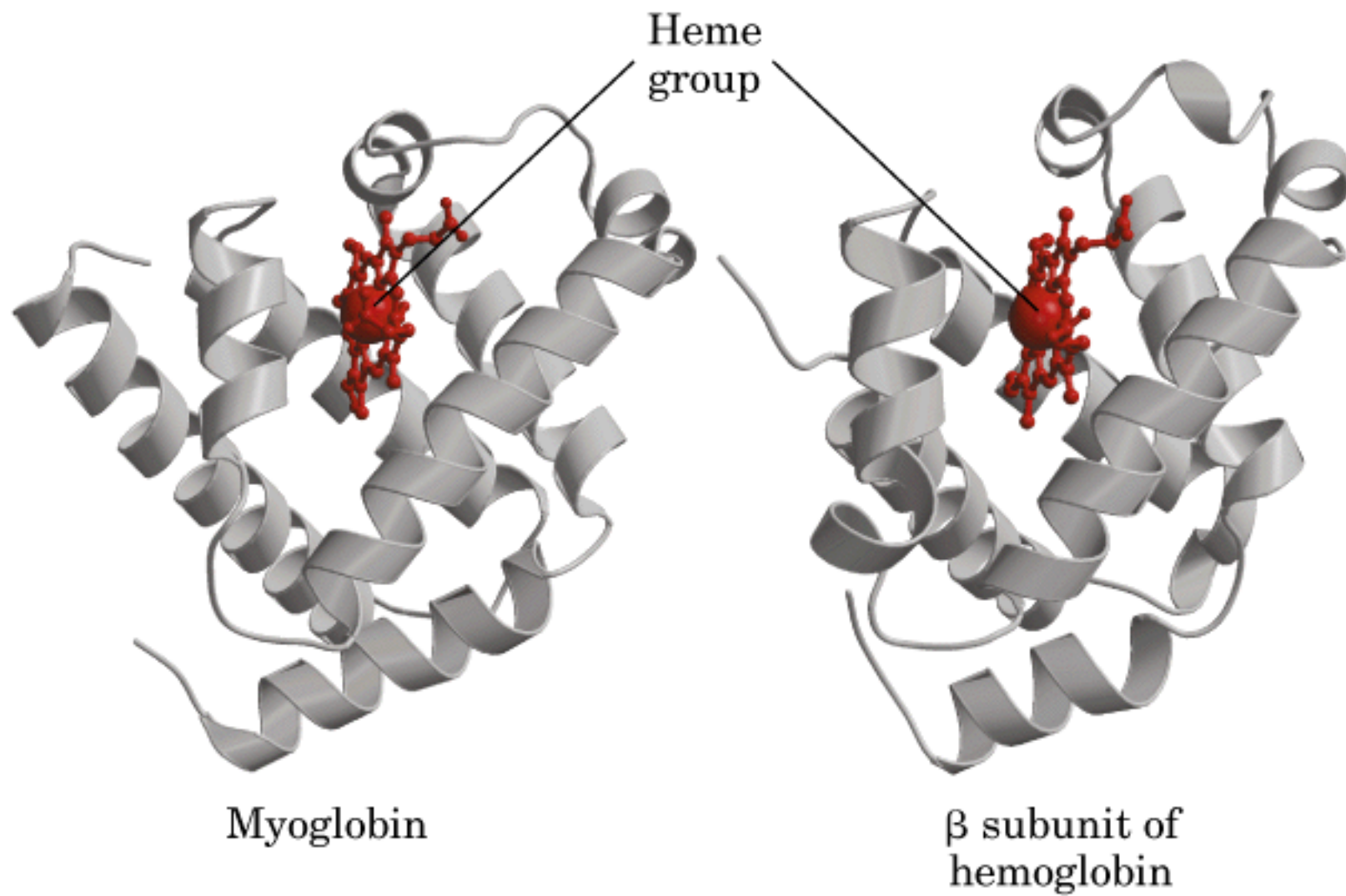


John Kendrew e seu modelo de mioglobina



Bror Strandberg and Richard Dickerson returning from the EDSAC II computing center (Cambridge, UK) carrying the paper tape sorting board for the myoglobin 2 Å dataset (1958).



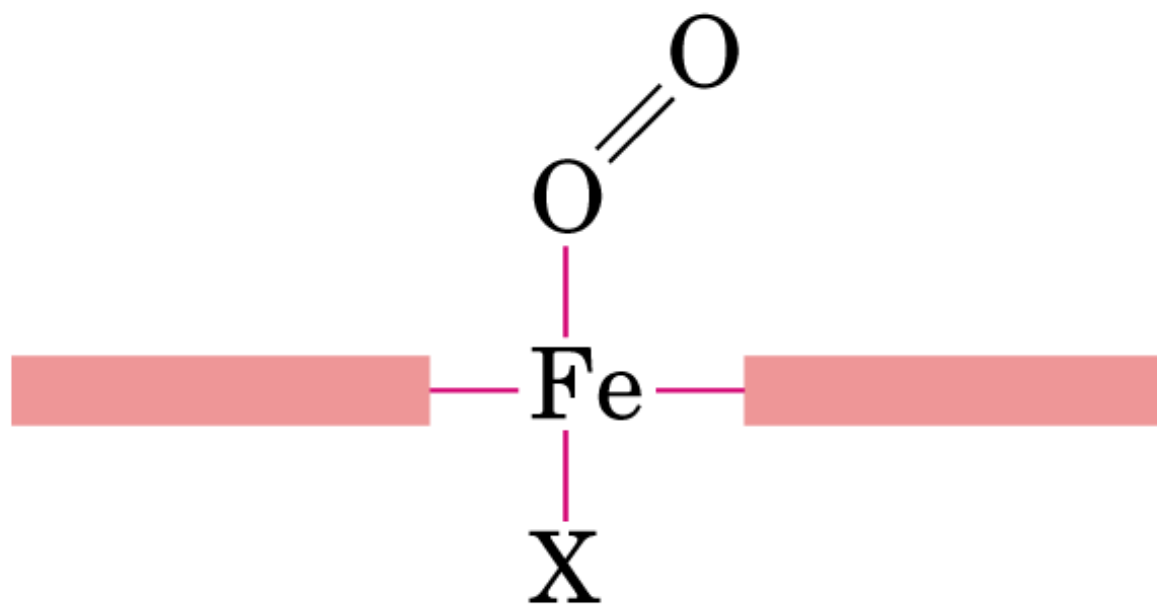


Helix Boundaries	A1	A16 B1	B16 C1	C7	D1	D7 E1																																																																			
Hb α	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65																																																											
	V	L	S	P	A	D	K	T	N	V	K	A	A	W	G	K	V	G	A	H	A	G	E	Y	G	A	E	A	L	E	R	M	F	L	S	P	T	T	K	T	Y	F	P	H	F	-	D	L	S	H	-	-	-	-	-	G	S	A	Q	V	K	G	H	G	K	K	V	A	D	A	L	T	
Hb β	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70																																																										
	V	H	L	T	P	E	E	K	S	A	V	T	A	L	W	G	K	V	-	-	N	V	D	E	V	G	G	E	A	L	G	R	L	L	V	V	Y	P	W	T	Q	R	F	E	S	F	G	D	L	S	T	P	D	A	V	M	G	N	P	K	V	K	A	H	G	K	K	V	L	G	A	F	S
Mb.....	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70																																																										
	G	-	L	S	D	G	E	W	Q	L	V	L	N	V	W	G	K	V	E	A	D	I	P	G	H	G	Q	E	V	L	I	R	L	F	K	G	H	P	E	T	L	E	K	D	K	F	K	H	L	K	S	E	D	E	M	K	A	S	E	D	L	K	K	H	G	A	T	V	L	T	A	L	G

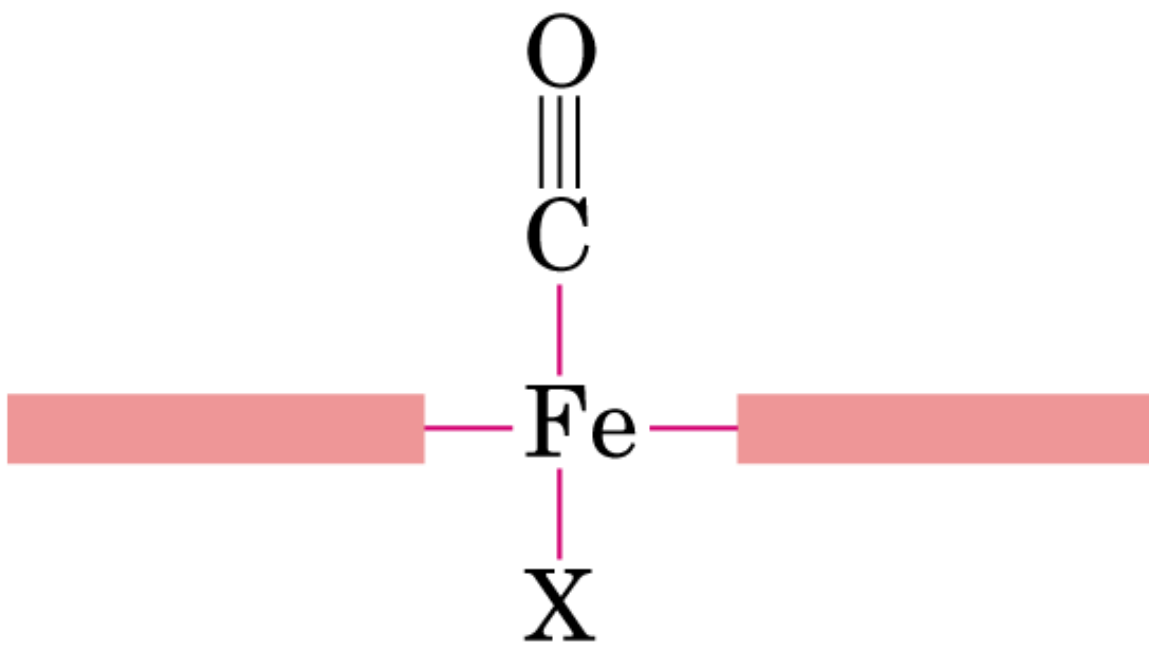
^a The residues have been aligned in structurally analogous positions. The blue boxes shade the residues that are identical in both Hb chains, the purple boxes shade the residues that are identical in both Hb chains and in Mb, and the dark purple boxes shade residues that are invariant in all vertebrate Hb and Mb chains (Thr C4, Phe CD1, Leu F4, His F8, and Tyr HC2). The one-letter amino acid symbols are defined in Table 4-1.

^b The first and last residues in helices A–H are indicated, whereas the residues between helices constitute the intervening “segments.” The refined Hb structure reveals that much of what is designated the EF segment is really helical in both chains: It encompasses residues EF4–F2 and is designated the F’ helix.

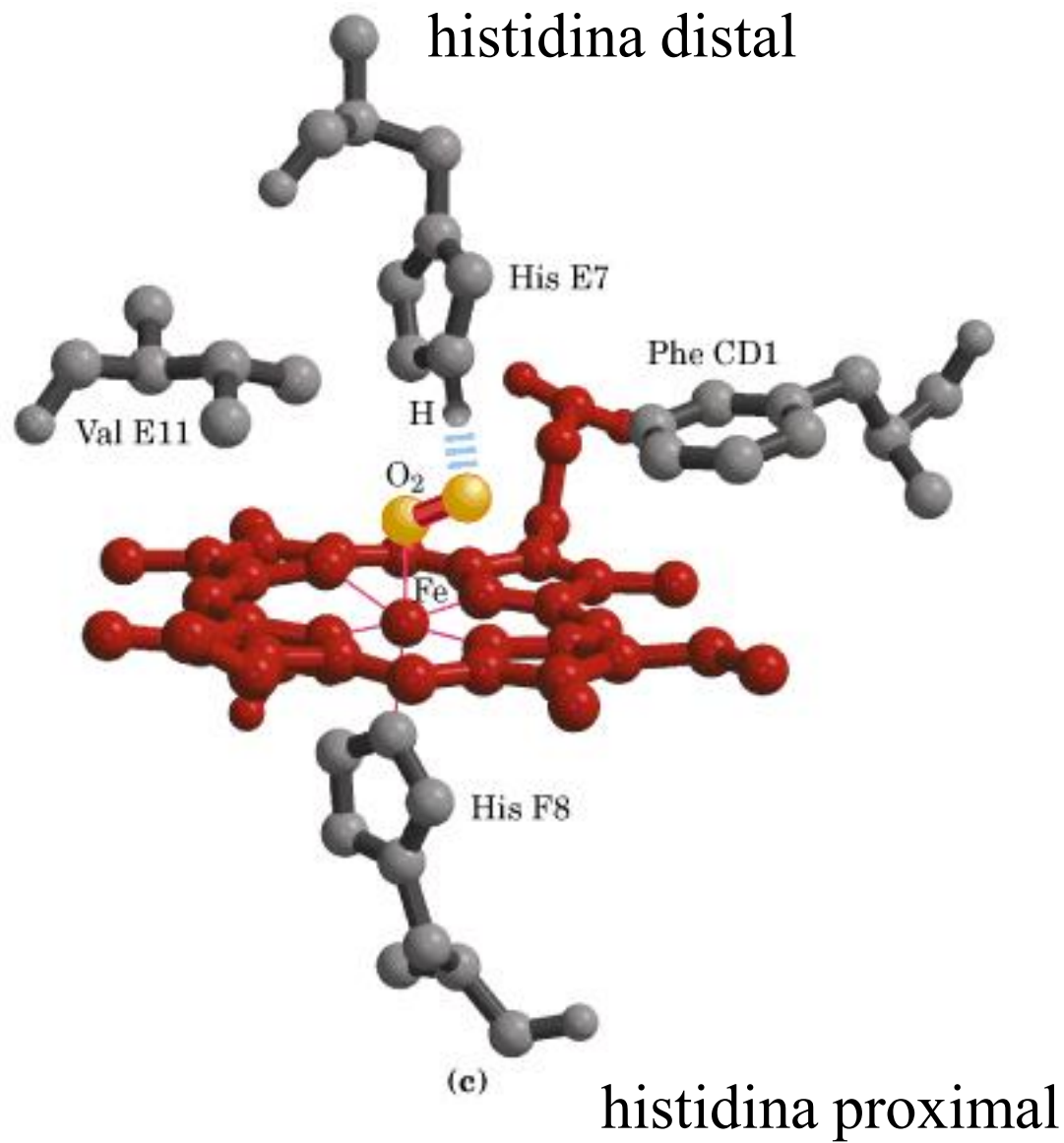
	E19	F1	F9	G1	G19	H1	H19	H21	H26																																																																			
Hb α	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140																																																													
Hb β	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140	145																																																													
Mb.....	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140	145	150																																																												
Hb α	N	A	V	A	H	V	D	D	M	P	N	A	L	S	A	L	S	D	L	A	H	K	L	R	V	D	P	V	N	F	K	L	L	S	H	C	L	L	V	T	L	A	A	H	L	P	A	E	F	T	P	A	V	H	A	S	L	D	K	F	L	A	S	V	S	T	V	L	T	S	K	L	R			
Hb β	D	G	L	A	H	L	D	N	L	K	G	T	F	A	T	S	E	L	H	C	D	K	L	H	V	D	P	E	N	F	R	L	L	G	N	V	L	V	C	V	L	A	H	H	F	G	K	E	F	T	P	P	V	Q	A	A	Y	Q	K	V	V	A	G	V	A	N	A	L	A	H	K	L	R			
Mb.....	G	I	L	K	K	K	G	H	E	A	E	I	K	P	A	Q	S	A	T	K	H	K	I	P	V	K	Y	L	E	F	I	S	E	C	I	I	Q	V	L	Q	S	K	H	P	G	D	F	G	A	D	A	Q	G	A	M	N	K	A	L	E	L	F	R	K	D	M	A	S	N	K	E	L	G	F	Q	G

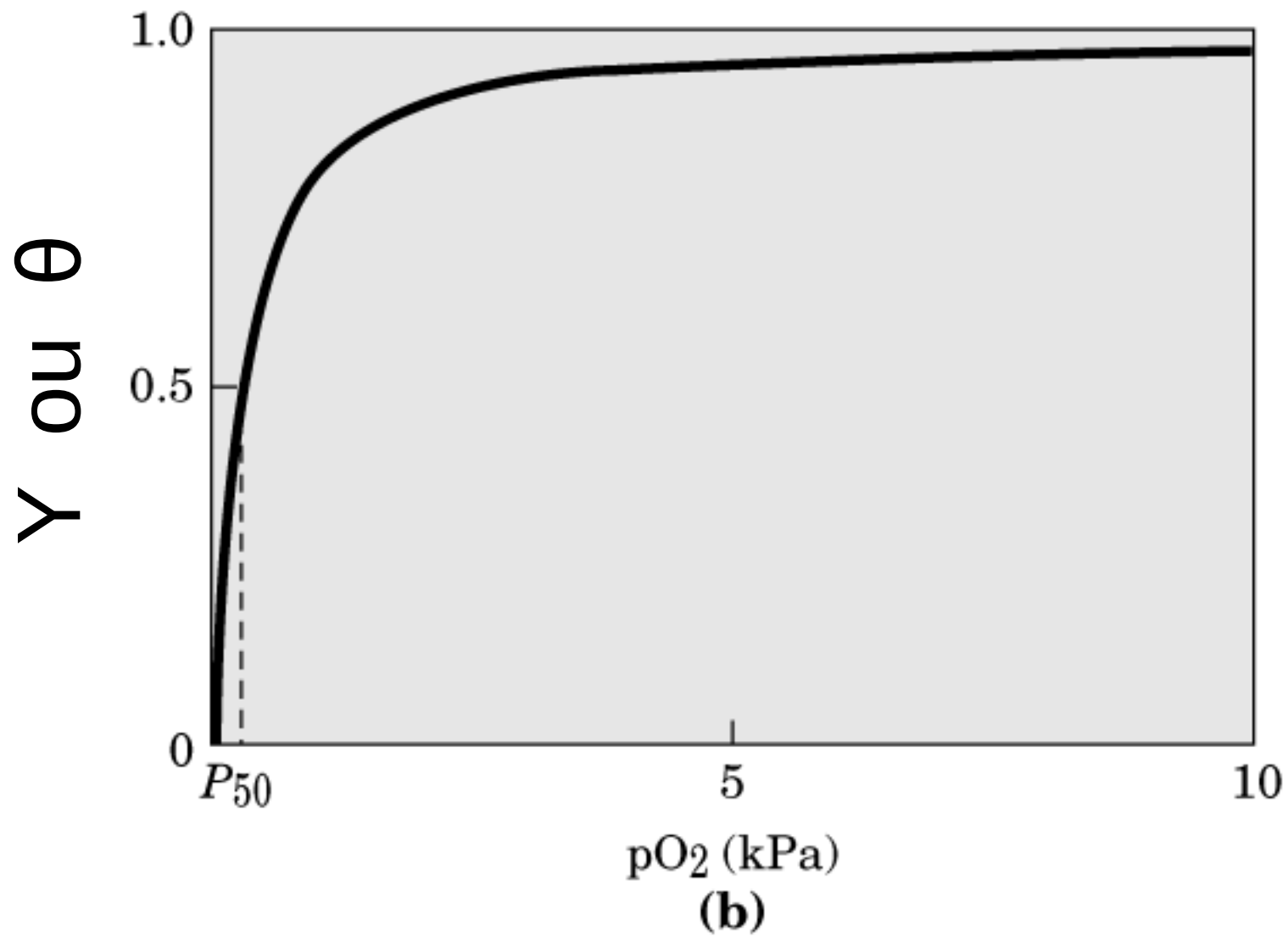


(a)



(b)



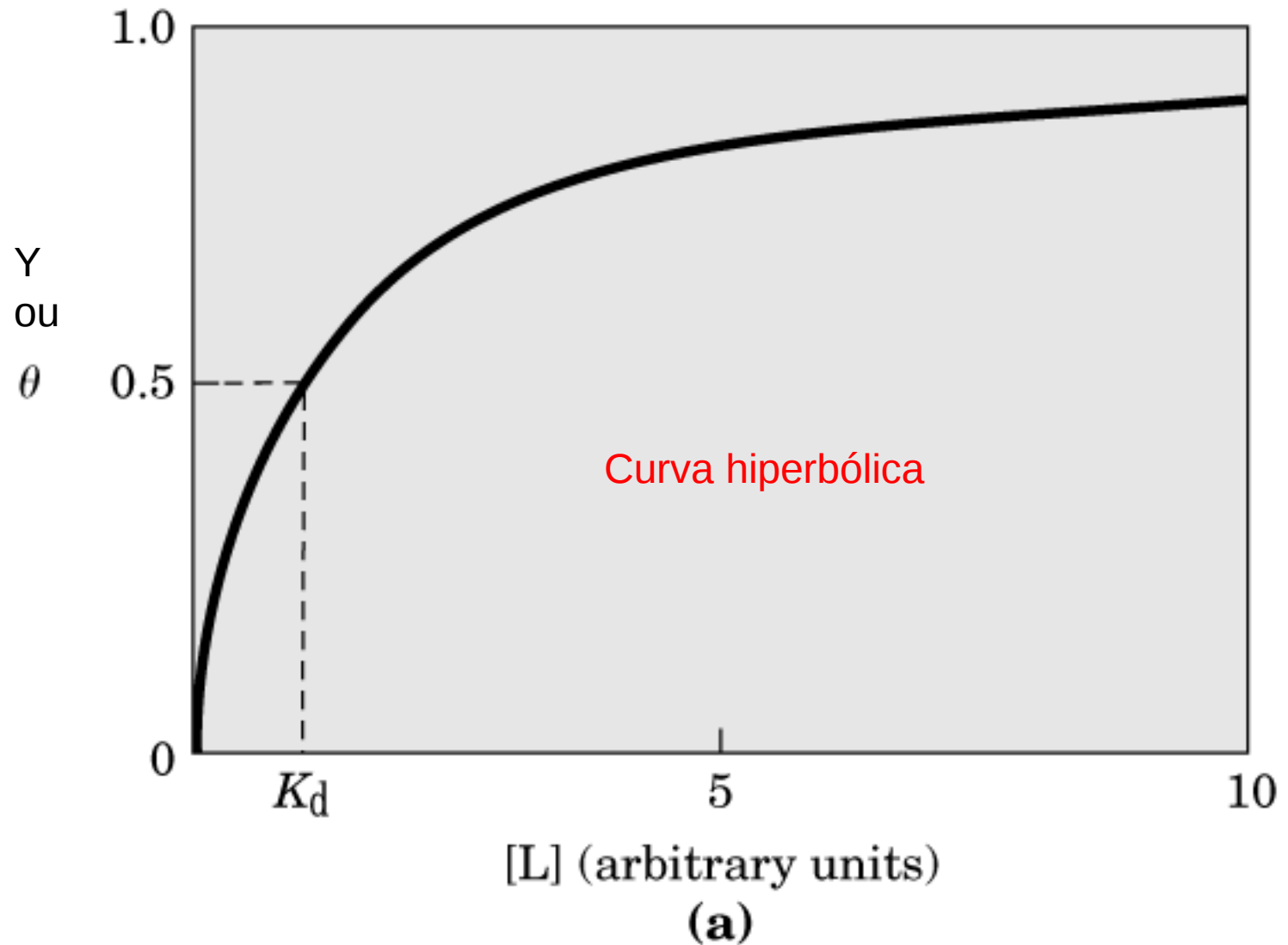




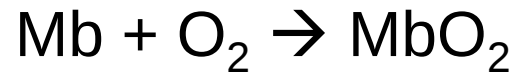
$$K_{\text{diss}} = [P][L]/[PL]$$

$$[PL] = [P][L]/K_{\text{diss}}$$

$$Y = \theta = [PL]/[P_{\text{total}}] = [PL]/([P] + [PL]) = [L]/(K_{\text{diss}} + [L])$$



Para Mioglobina:

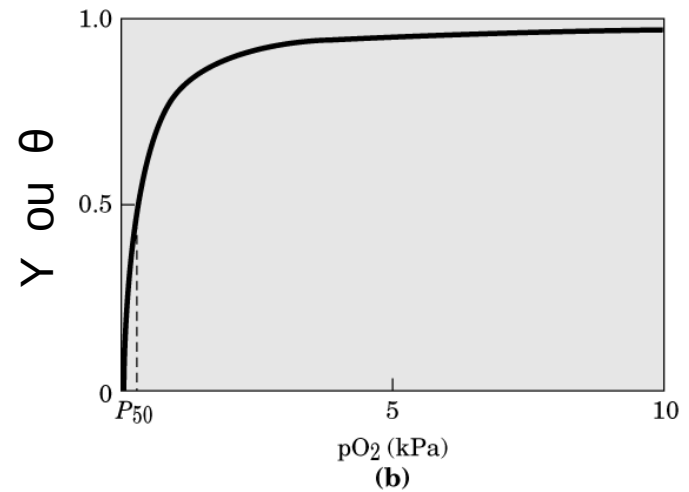


$$K_d = [\text{Mb}][\text{O}_2]/[\text{MbO}_2]$$

$$Y_{\text{O}_2} = \text{grau de saturação} = [\text{MbO}_2]/([\text{MbO}_2] + [\text{Mb}])$$

$$= [\text{O}_2]/([\text{O}_2] + K_d)$$

$$= p\text{O}_2/(p\text{O}_2 + K_d)$$



$$Y = [L]/([L] + K_d)$$

→ curva hiperbólica

table 7–1

Some Protein Dissociation Constants

Protein	Ligand	K_d (M)*
Avidin (egg white) [†]	Biotin	1×10^{-15}
Insulin receptor (human)	Insulin	1×10^{-10}
Anti-HIV immunoglobulin (human) [‡]	gp41 (HIV-1 surface protein)	4×10^{-10}
Nickel-binding protein (<i>E. coli</i>)	Ni ²⁺	1×10^{-7}
Calmodulin (rat) [§]	Ca ²⁺	3×10^{-6}
		2×10^{-5}

*A reported dissociation constant is valid only for the particular solution conditions under which it was measured. K_d values for a protein-ligand interaction can be altered, sometimes by several orders of magnitude, by changes in solution salt concentration, pH, or other variables.

Exercício #1

$$Y = [L]/(K_d + [L])$$

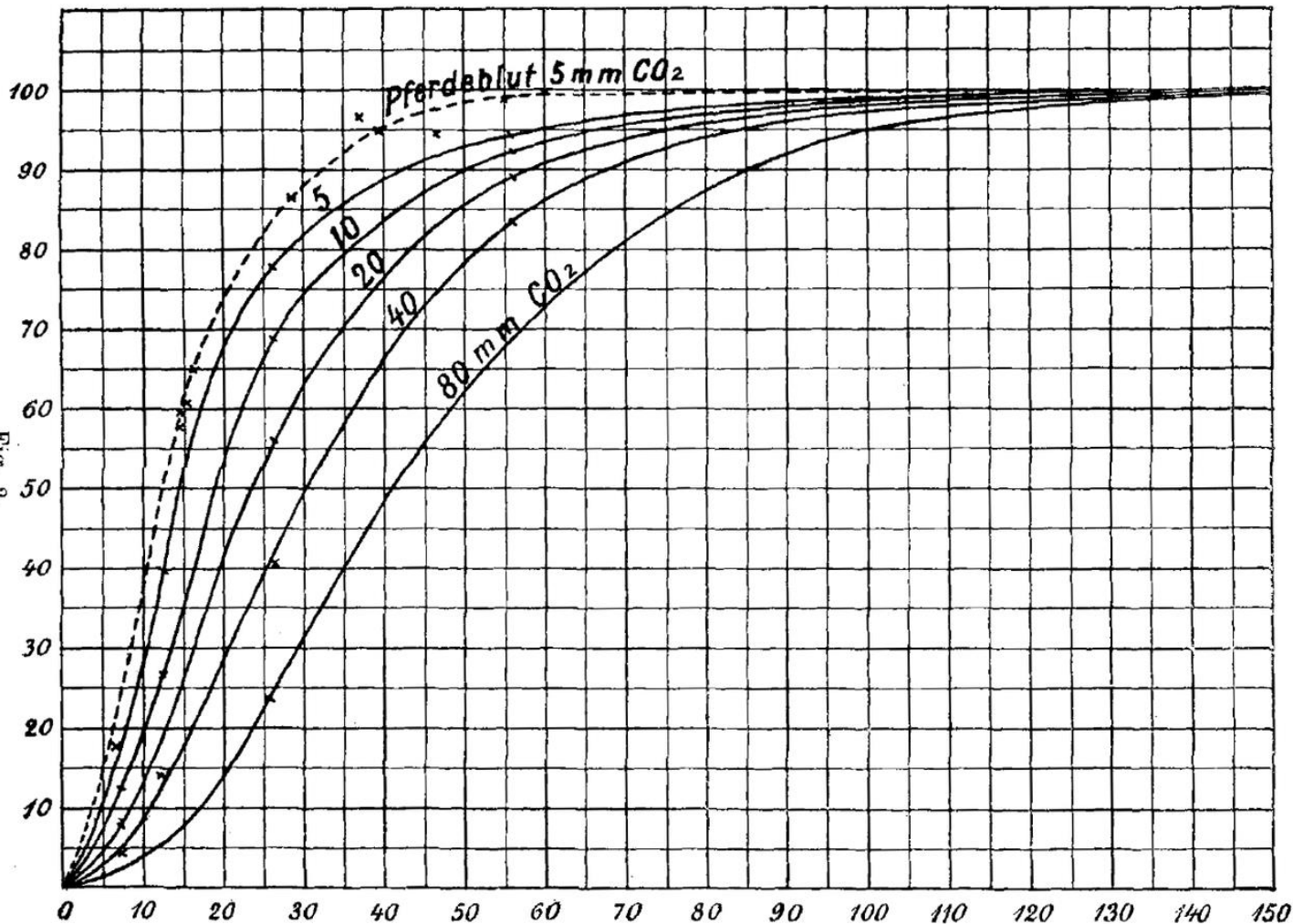
Responda:

Para uma proteína como mioglobina que tem um único sítio de ligação para um ligante (e sem reguladores alostéricos), calcule quantas vezes a concentração de ligante livre $[L]$ tem que aumentar para o grau de saturação aumentar de $Y = 0.1$ até $Y = 0.9$ (ou seja 10% saturada até 90% saturada). Sua resposta depende do valor de K_d ?

Confere a simulação
Y vs L
no arquivo EXCEL
mexendo com o valor de Kd

Fim da parte 1

Fig. 2.



$p_{50} \text{ Mb} = 2.8 \text{ torr}$

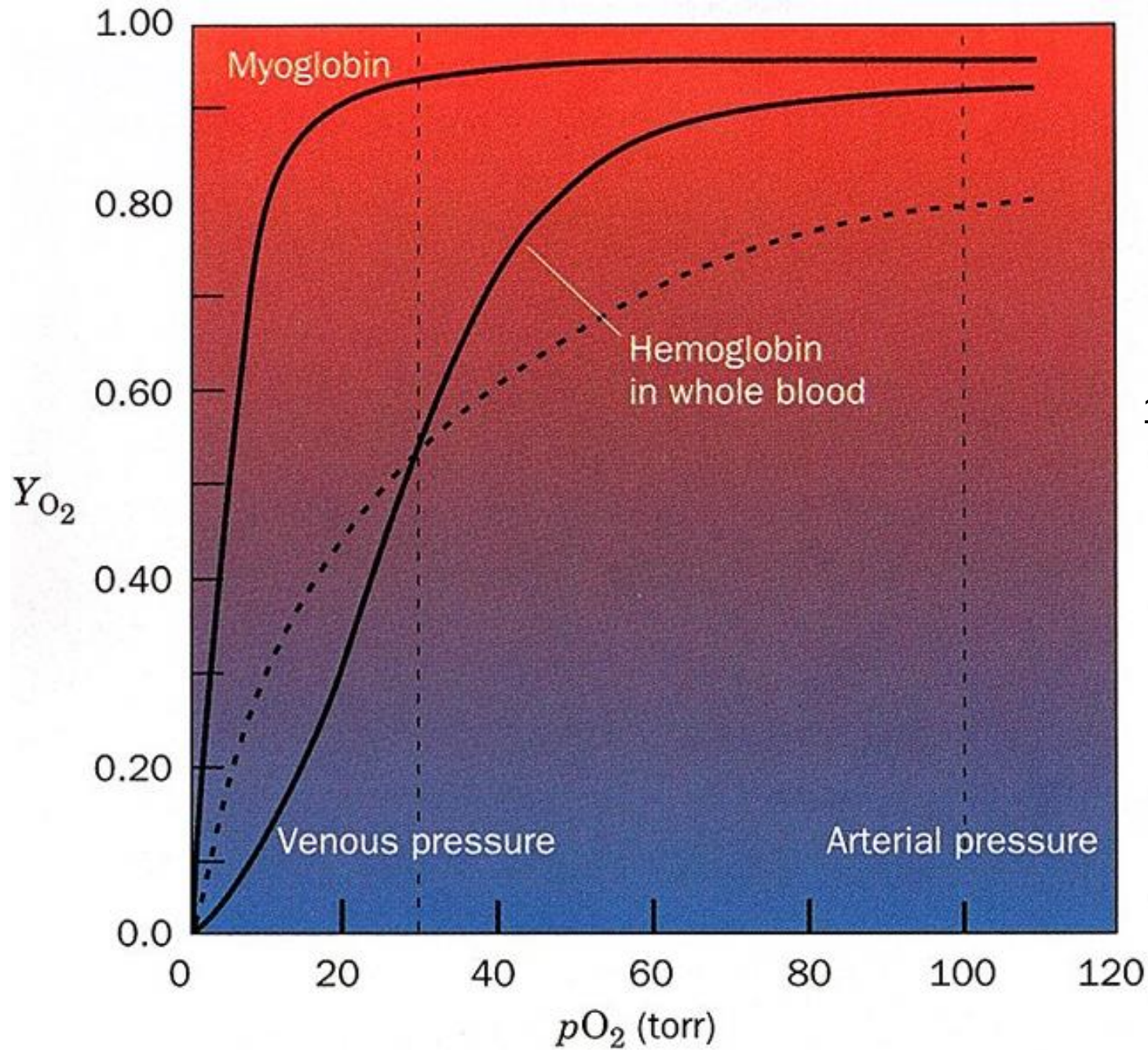
$p_{50} \text{ Hb} = 28 \text{ torr}$

1 atm = 760 torr
= 760 mmHg
= 101,3 kPa

$pO_{2 \text{ atm}} = 20\% \text{ atm}$
= 150 torr

Ligação de O_2 a Hb em pHs diferentes

(Christian Bohr, nomeado 3 vezes para o Prêmio Nobel)
(pai do Niels e avó do Aage)



$$p_{50} \text{ Mb} = 2.8 \text{ torr}$$

$$p_{50} \text{ Hb} = 28 \text{ torr}$$

$$1 \text{ atm} = 760 \text{ torr}$$

$$pO_{2 \text{ atm}} = 20\% \text{ atm} \\ = 150 \text{ torr}$$

Modelos para explicar as curvas de ligação de oxigênio a Hb

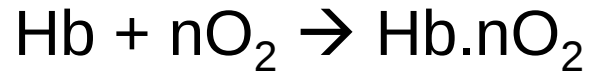
- Hill equation (1910, Archibald Hill) (“all or none” binding)**
- Adair equation (1924, Gilbert Adair) (sequential binding)
- MWC Model (1964, Monod, Wyman, Changeux) (symmetry model)
- KNF Model (Koshland, Nemethy, Filmer) (induced fit, sequential model)

Modelos para explicar as curvas de ligação de oxigênio a Hb

- Hill equation (1910, Archibald Hill) (“all or none” binding)**
- Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina para seus estudos sobre a produção de calor e trabalho mecânico em músculos.

Hill Equation

Para uma proteína que pode ligar mais de um (n) ligantes:



$$K_{\text{diss}} = [\text{Hb}][\text{O}_2]^n/[\text{Hb}.n\text{O}_2] \qquad [\text{Hb}.n\text{O}_2] = [\text{Hb}][\text{O}_2]^n/K_{\text{diss}}$$

$$Y_{\text{O}_2} = \text{grau de saturação} = n[\text{Hb}.n\text{O}_2]/n([\text{Hb}.n\text{O}_2] + [\text{Hb}])$$

$$= [\text{O}_2]^n/([\text{O}_2]^n + K_{\text{diss}})$$

$$= (p\text{O}_2)^n/((p\text{O}_2)^n + K_{\text{diss}})$$

$$= (p\text{O}_2)^n/((p\text{O}_2)^n + (p_{50})^n)$$

$$Y = [\text{L}]^n/([\text{L}]^n + K_{\text{diss}})$$

$$Y = [\text{L}]^n/([\text{L}]^n + [\text{L}_{50}]^n)$$

Curva sigmoidal

Exercício #2

$$Y = [L]^n / ([L]^n + K_{\text{diss}}) \text{ ou } Y = [L]^n / ([L]^n + [L_{50}]^n)$$

Responda:

Para uma proteína tetramérica com $N = 4$ sítios de ligação para um ligante e $n = 4$,

i) Calcular quantas vezes a concentração de ligante tem que aumentar para que o grau de saturação aumente de $Y = 0.1$ até $Y = 0.9$.

ii) Repetir o cálculo acima para o caso de $n = 2,0$

iii) Repetir o cálculo para o caso $n = 1,0$

Comparar as suas respostas com a resposta do caso da proteína monomérica.

- Quebra Cabeça: Para uma proteína com **n** sítios, calcular quantas vezes a concentração de ligante tem que aumentar para que o grau de saturação aumenta de $Y = \mathbf{a}$ até $Y = \mathbf{b}$.

Problemas com o modelo de Hill:

- Cooperatividade infinita ($n = N$ subunidades) é impossível
.... Logo o modelo está errado

Vantagens

- Modelo simples (apesar de errado)
- O parâmetro $n < N$ pode ser calculado empiricamente e usado como uma medida de “grau de cooperatividade” (neste caso é chamado $n_H = \text{coeficiente de Hill}$)
- Se $n_H = 1$, não há cooperatividade
- Se $n_H > 1$, há cooperatividade positivo
- Se $n_H < 1$, há cooperatividade negativo
- somente dois variáveis n_H e K_{diss} a serem calculados
para um conjunto de dados Y vs $[L]$

Modelos para explicar as curvas de ligação de oxigênio a Hb

- Hill equation (1910, Archibald Hill) (“all or none” binding)
- Adair equation (1924, Gilbert Adair) (sequential binding)**
- MWC Model (1964, Monod, Wyman, Changeux) (symmetry model)**
- KNF Model (Koshland, Nemethy, Filmer) (induced fit, sequential model)**

Modelos para explicar as curvas de ligação de oxigênio a Hb

- Adair equation (1924, Gilbert Adair) (sequential binding)**
- Observou que o “Hill Plot” de Hemoglobina não era uma linha reta

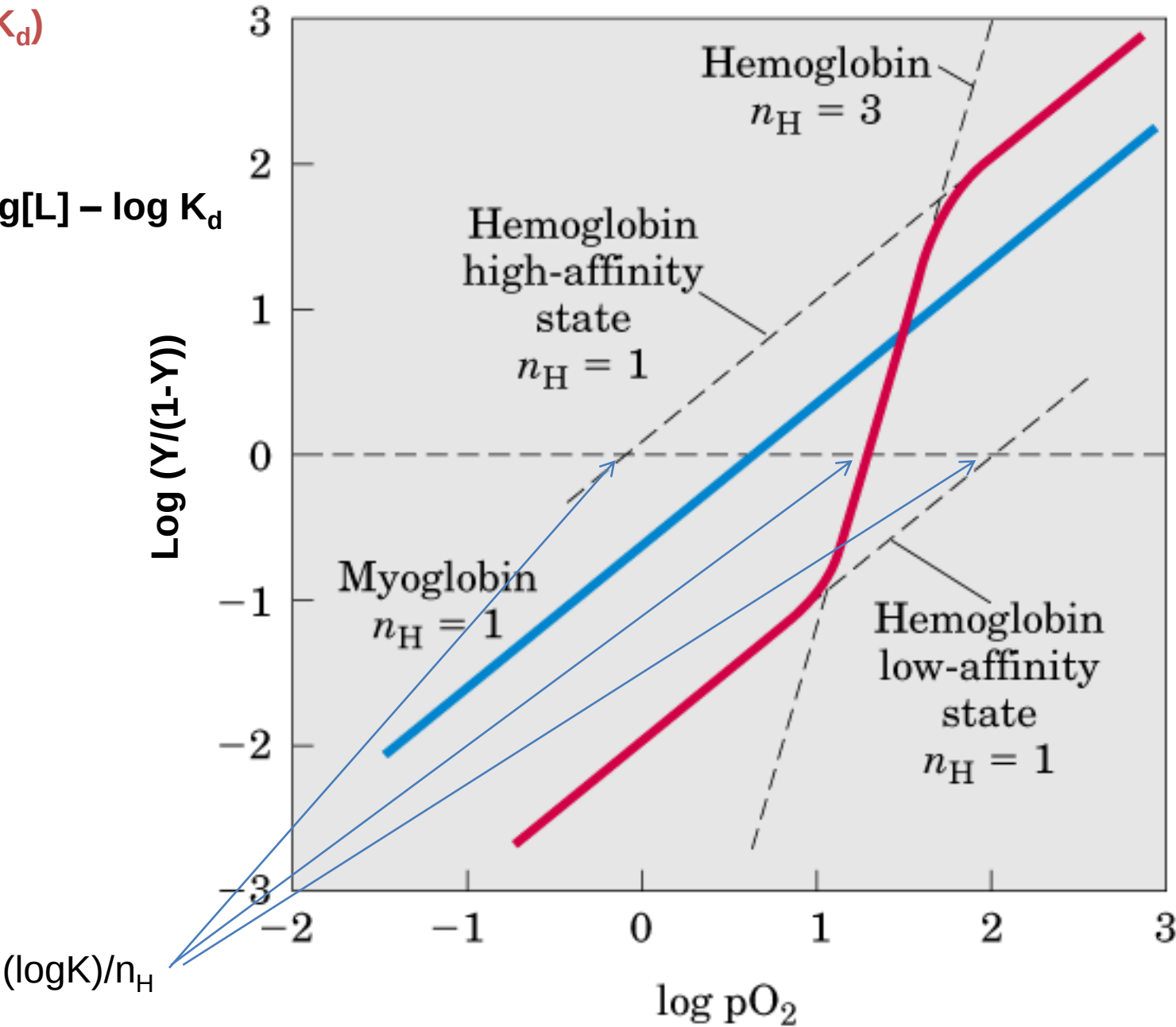
“Hill Plot” para Hemoglobina

$Y = [L]^{n_H}/([L]^{n_H} + K_d)$

$Y/(1-Y) = [L]^{n_H}/K_d$

$\text{Log}(Y/(1-Y)) = n_H \text{log}[L] - \text{log } K_d$

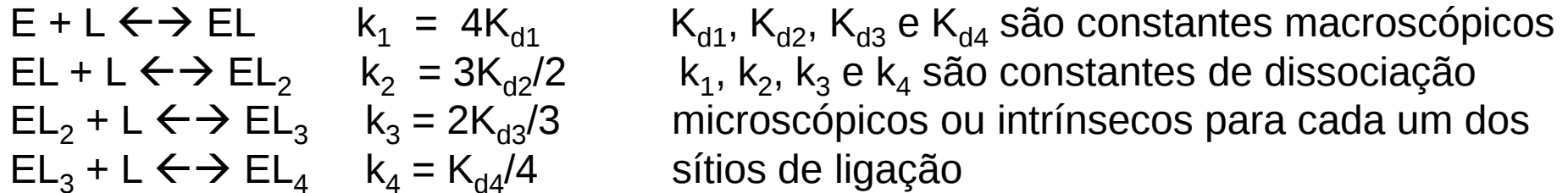
↑
Prove isso!!



Modelos para explicar as curvas de ligação de oxigênio a Hb

- Adair equation (1924, Gilbert Adair) (sequential binding)**
- Observou que o Hill Plot de Hemoglobina não era uma linha reta
- **Suguiu que a afinidade variava com saturação.**

Modelo de Adair: A ligação de ligantes pode acontecer sequencialmente com constantes de dissociação que não são necessariamente iguais



Adair equation:

$$Y = \frac{([EL] + 2[EL_2] + 3[EL_3] + 4[EL_4])}{4([E] + [EL] + [EL_2] + [EL_3] + [EL_4])}$$

$$[EL] = 4[E][L]/k_1$$

$$[EL_2] = 6[E][L]^2/k_1k_2$$

$$[EL_3] = 4[E][L]^3/k_1k_2k_3$$

$$[EL_4] = [E][L]^4/k_1k_2k_3k_4$$

$$Y = \frac{[L]/K_{d1} + 2[L]^2/K_{d1}K_{d2} + 3[L]^3/K_{d1}K_{d2}K_{d3} + 4[L]^4/K_{d1}K_{d2}K_{d3}K_{d4}}{4(1 + [L]/K_{d1} + [L]^2/K_{d1}K_{d2} + [L]^3/K_{d1}K_{d2}K_{d3} + [L]^4/K_{d1}K_{d2}K_{d3}K_{d4})}$$

Para Hb em pH 7.4, 0.1 M NaCl

$k_1 = 41$ torr, $k_2 = 13$ torr, $k_3 = 12$ torr, $k_4 = 0.14$ torr

$$Y = \frac{[L]/K_{d1} + 2[L]^2/K_{d1}K_{d2} + 3[L]^3/K_{d1}K_{d2}K_{d3} + 4[L]^4/K_{d1}K_{d2}K_{d3}K_{d4}}{4(1 + [L]/K_{d1} + [L]^2/K_{d1}K_{d2} + [L]^3/K_{d1}K_{d2}K_{d3} + [L]^4/K_{d1}K_{d2}K_{d3}K_{d4})}$$

Vantagens do Modelo do Adiar:

- Muito geral
- Cooperatividade explicada por diferenças nos valores de K_{d1} , K_{d2} , K_{d3} e K_{d4}
- Pode explicar cooperatividade positiva e negativa

Desvantagens

- muitos variáveis a serem calculados (K_{d1} , K_{d2} , K_{d3} e K_{d4} no caso de Hb)
- não explica porque** sítios equivalentes em proteínas oligoméricas tem afinidades diferentes

Apontou para a necessidade de desenvolver modelos alostéricos

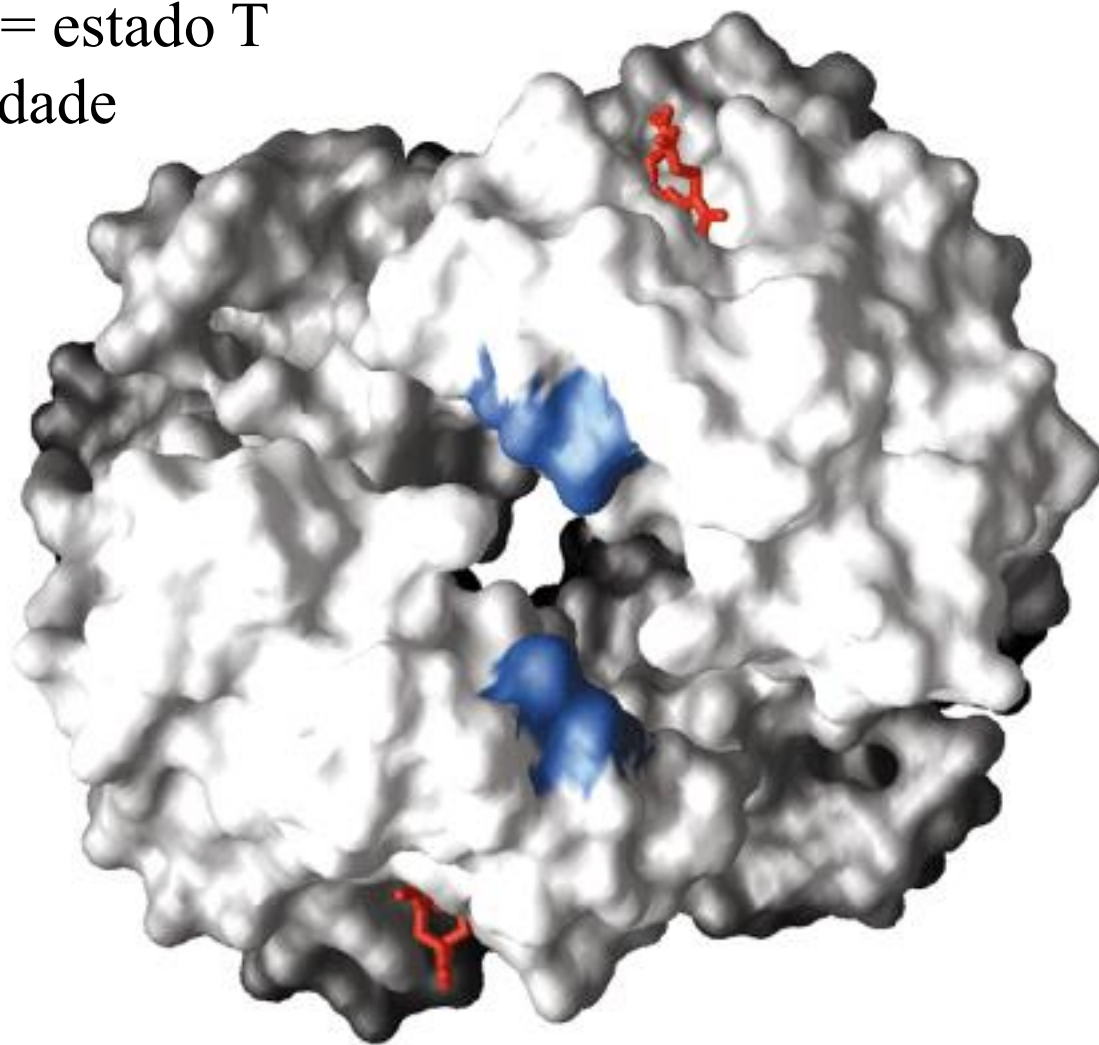
Fim da parte 2



Max Ferdinand Perutz
(b. 1914, d. 2002)

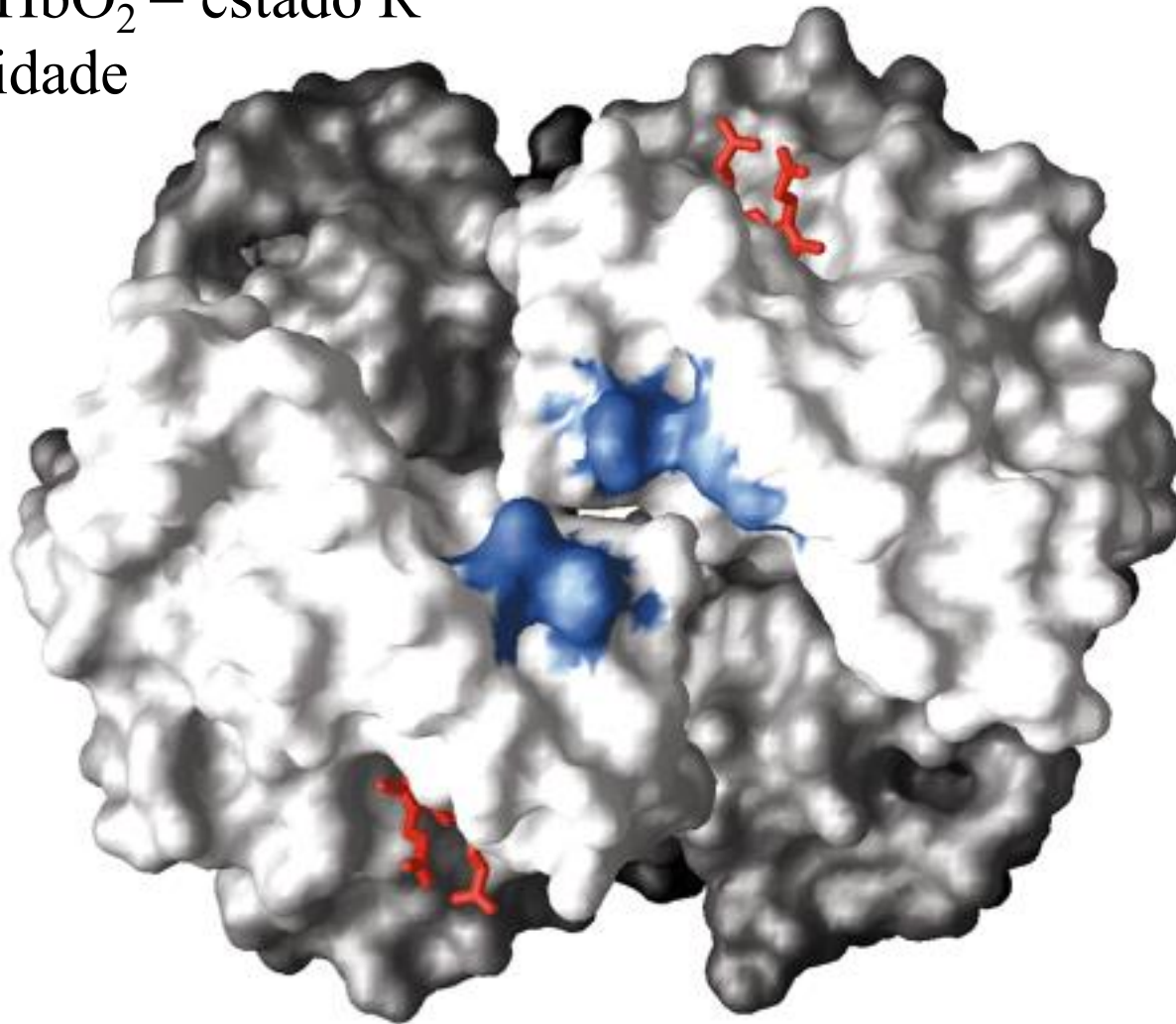


desoxiHb = estado T
Baixa afinidade



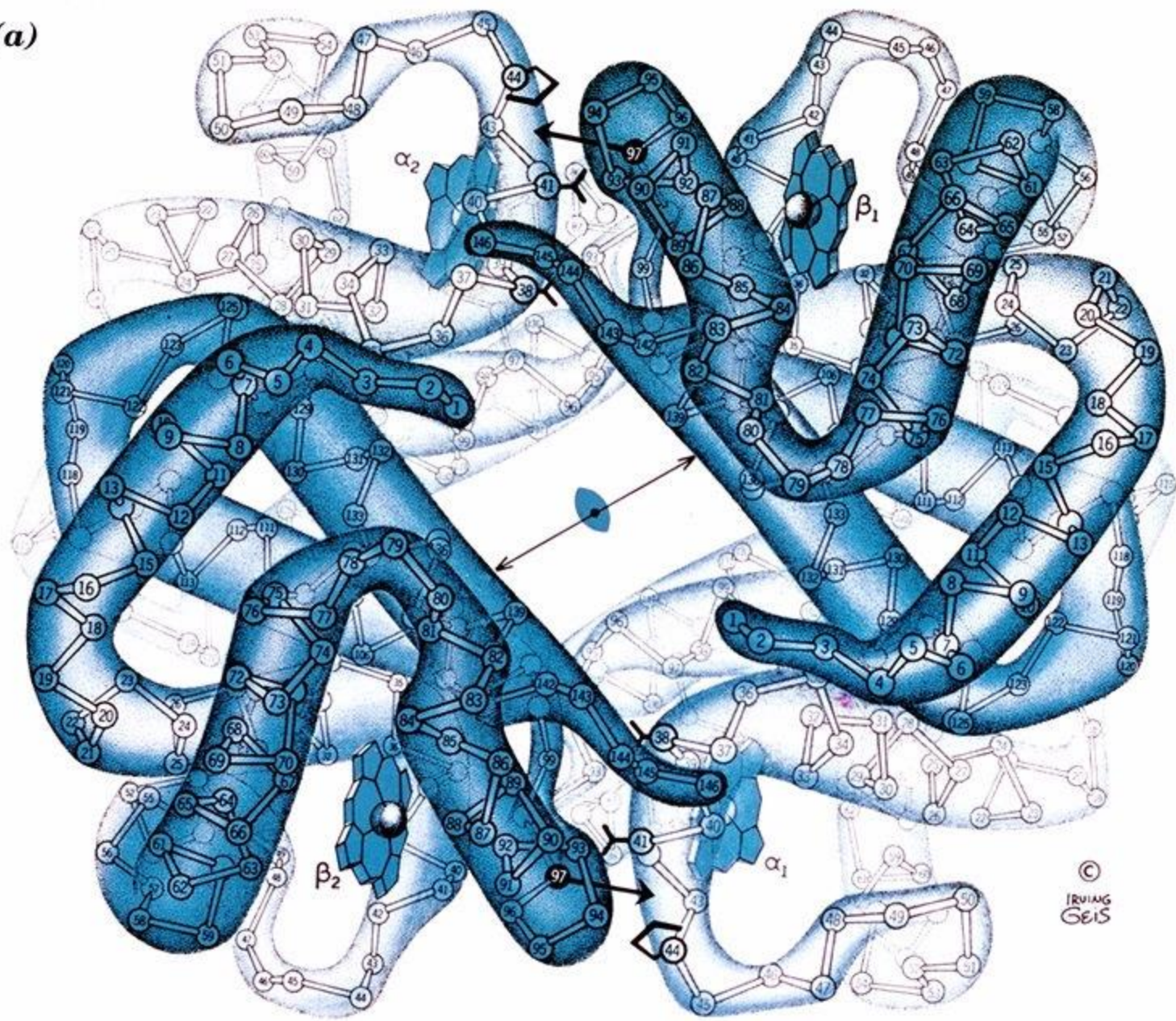
(b)

oxiHb = HbO₂ = estado R
Alta afinidade

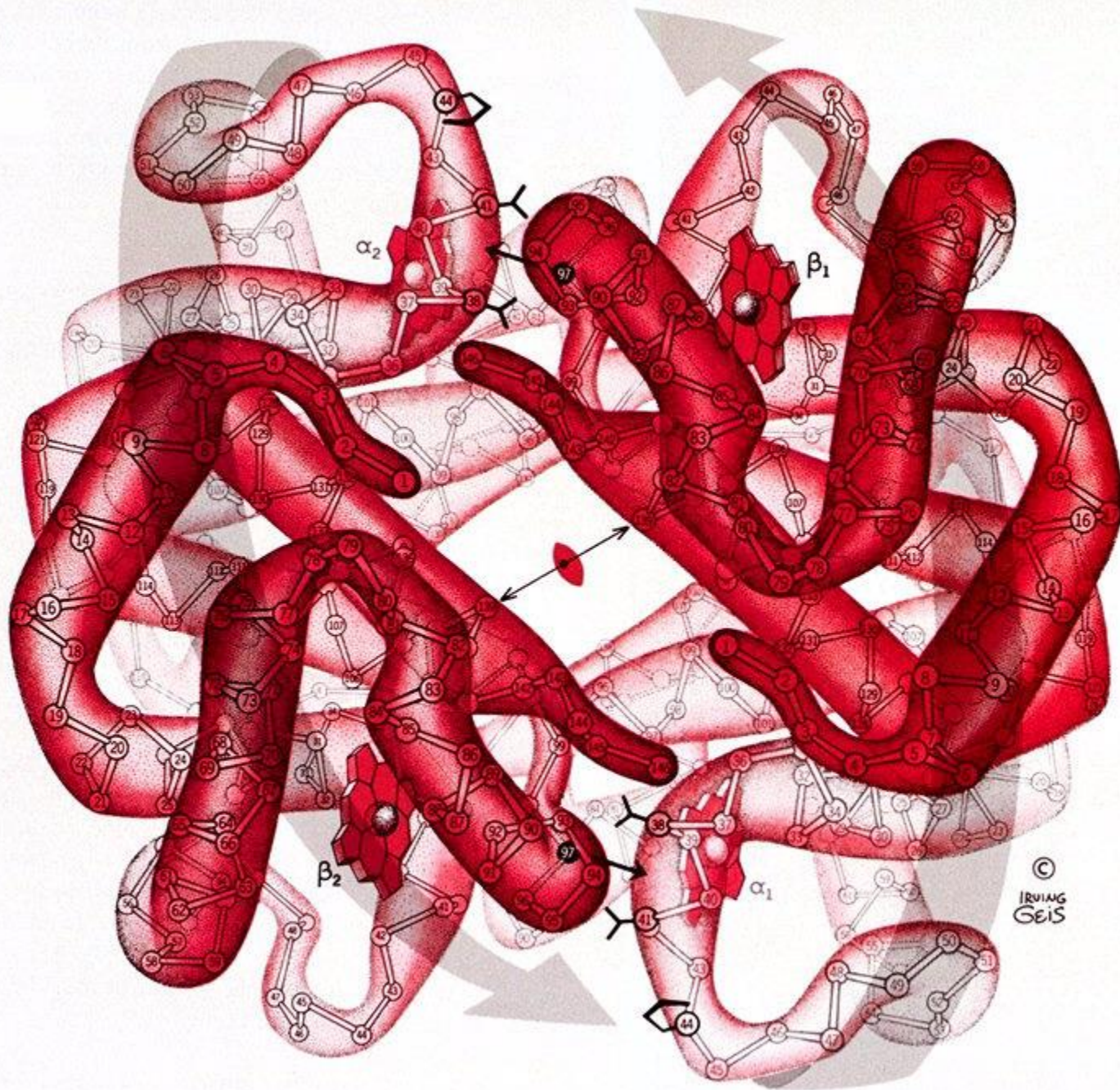


(c)

(a)

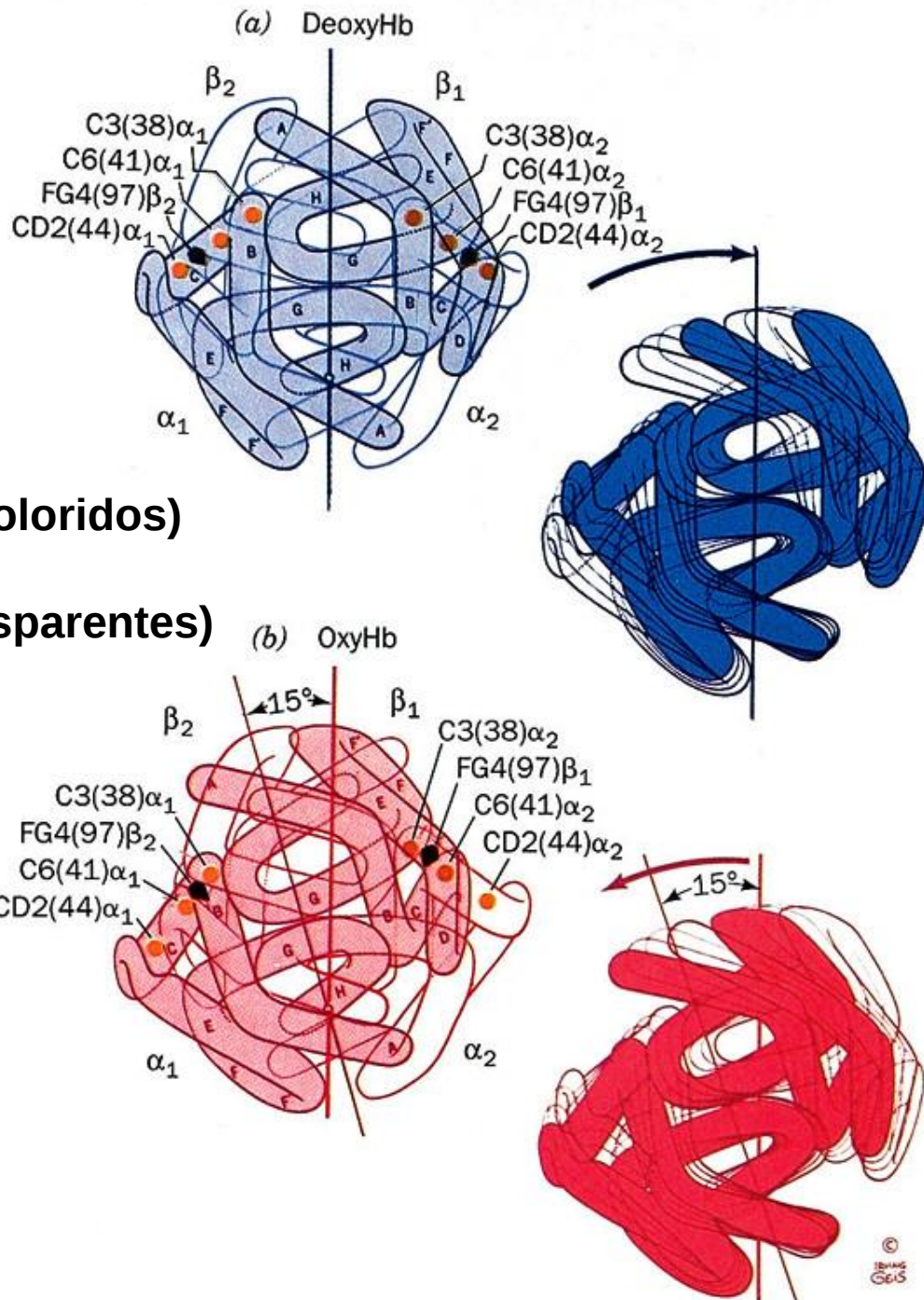


(b)



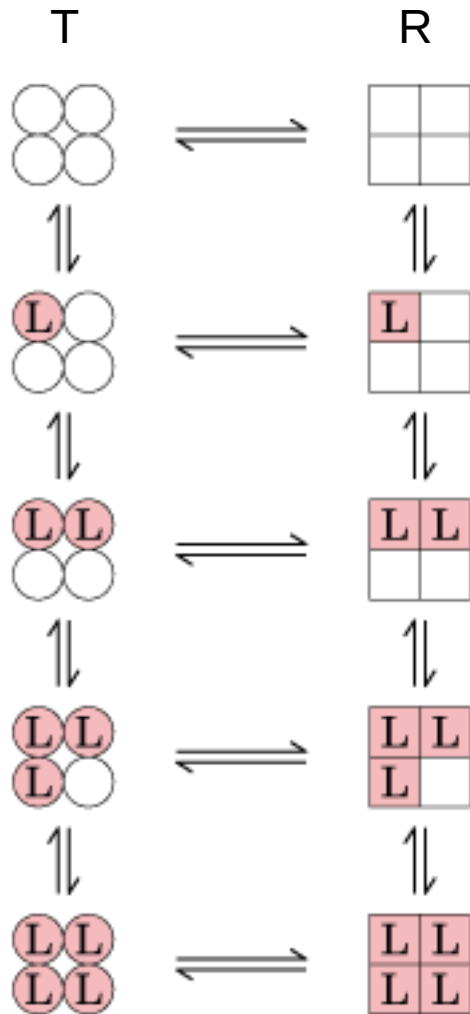
Na transição $T \rightarrow R$
 as subunidades α_1 e β_1 (coloridos)
 giram 15° em torno das
 subunidades α_2 e β_2 (transparentes)

-Mudanças nas
 interfaces entre
 subunidades;
 especialmente nas
 interfaces $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$



Modelos Alostéricos

Modelo de Simmetria (MWC = Jacques Monod, Jeffries Wyman, Jean-Pierre Changeux)



(a)

1) Proteína multimérica e **simétrica**

2) Cada tetrâmero pode existir em 2 **estados conformacionais (T e R)**.

Estes estados estão em equilíbrio

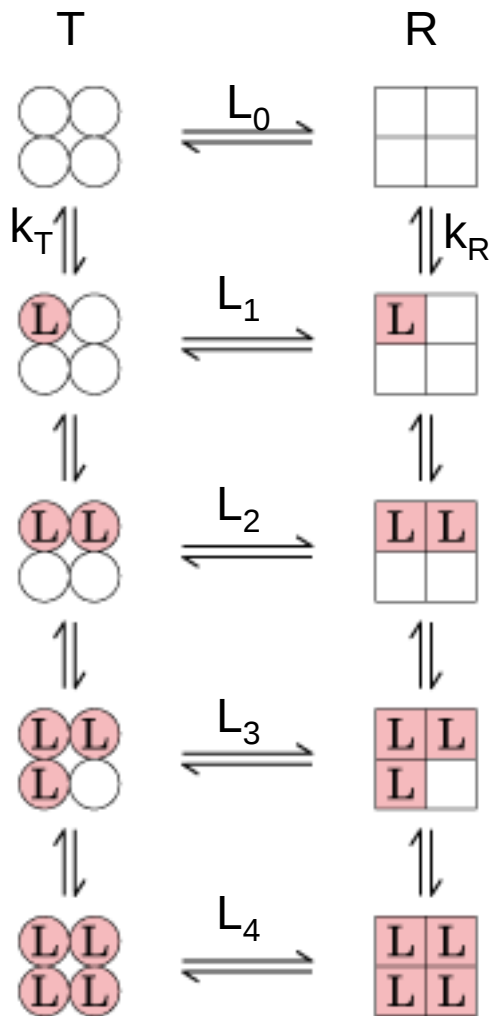
3) O ligante liga ao estado T com afinidade menor do que no estado R. Dentro de um estado (T ou R) a afinidade não depende de número de ligantes já ligados.

4) **Simetria é conservada** durante as mudanças conformacionais.

L_0 = constante de equilíbrio entre T e R
 $= [T_0]/[R_0]$

k_R e k_T são as constantes de dissociação (K_{diss}) dos estados R e T para o ligante

Cooperatividade se deriva do acoplamento energético dentro dos ciclos termodinâmicos:



(a)

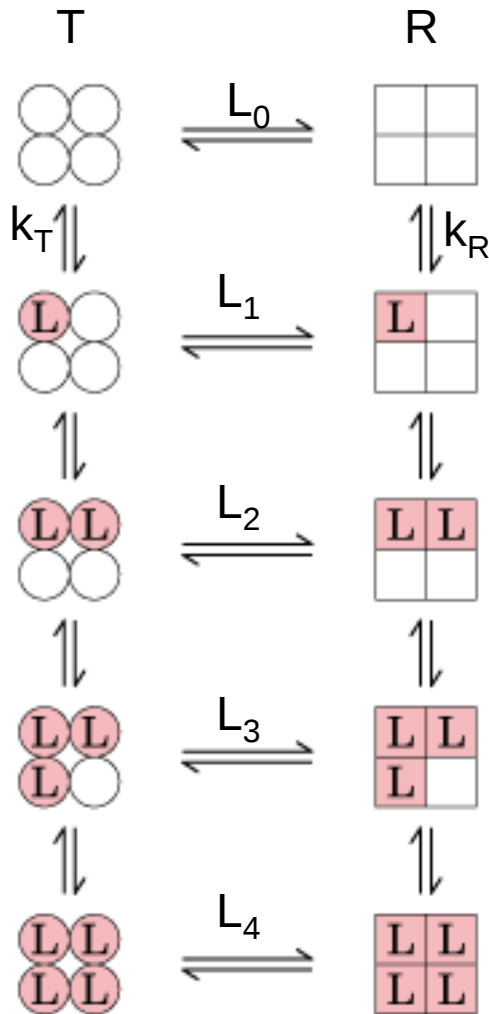
$$L_1 k_T = L_0 k_R$$



$$L_1 = L_0 k_R / k_T$$

L_0 = constante de equilíbrio entre T e R
 $= [T_0]/[R_0]$

k_R e $k_T = K_{\text{diss}}$ dos estados R e T para ligante



(a)

Exercício #3

Responda:

Mostrar que para uma enzima seguindo o modelo MWC:

$$L_n / L_0 = (k_R / k_T)^n$$

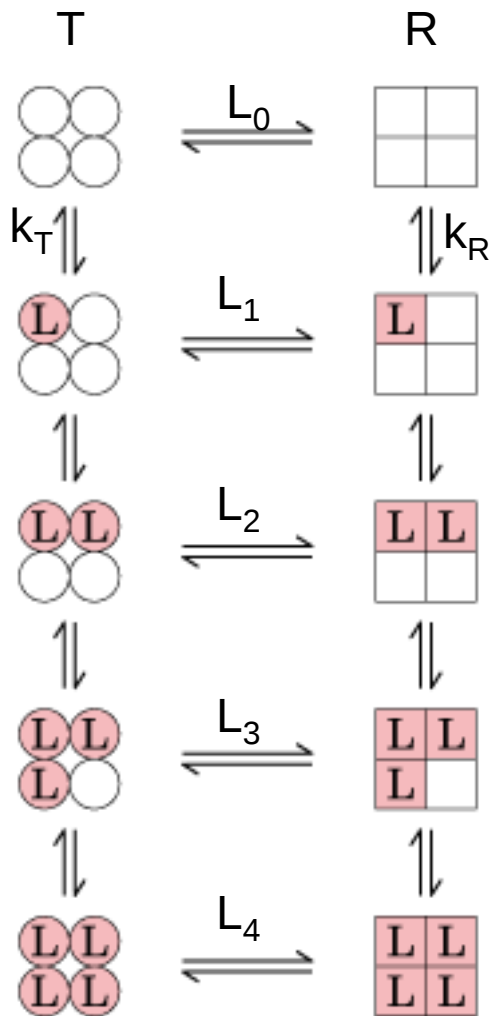
Discutir a significância desta relação

L_0 = constante de equilíbrio entre T e R
 $= [T_0]/[R_0]$

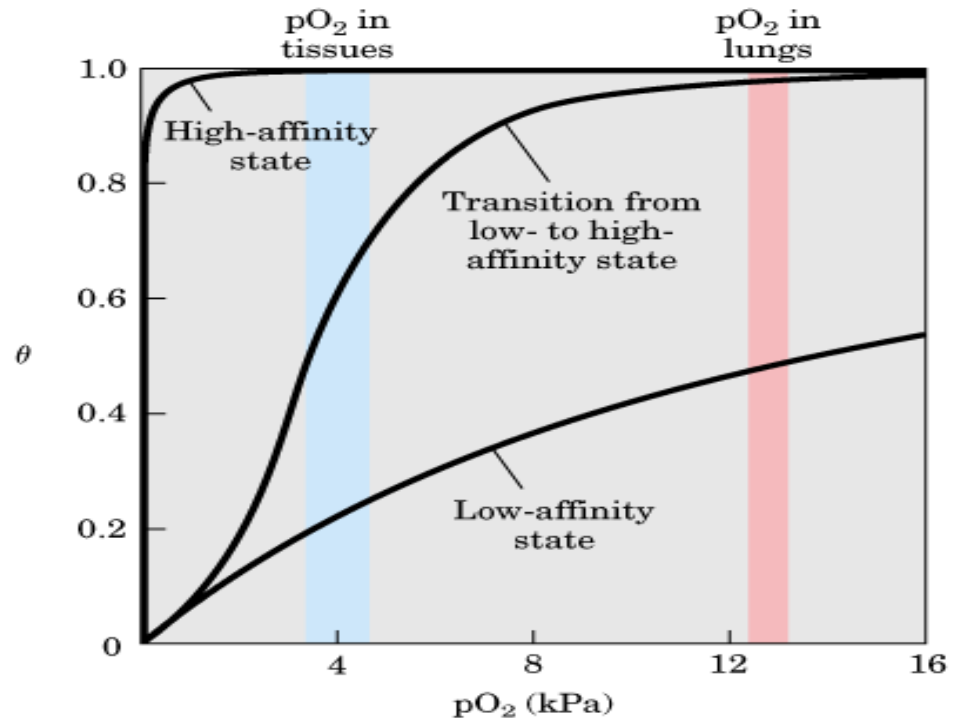
k_R e $k_T = K_{\text{diss}}$ dos estados R e T para ligante

Cooperatividade se deriva do acoplamento energético dentro dos ciclos termodinâmicos

$$L_{n+1} = L_n k_R / k_T$$



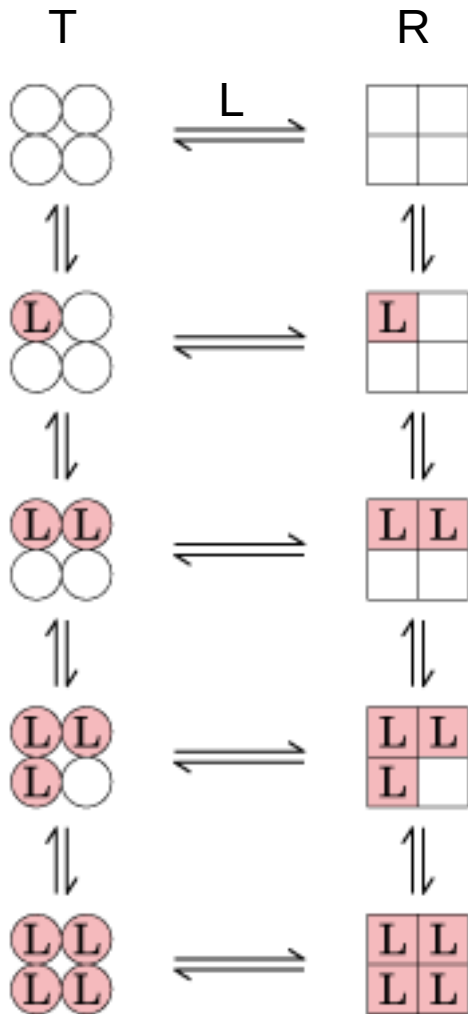
(a)



$$L = [To]/[Ro]$$

$$\alpha = [S]/k_R \quad \dots [S] \text{ em unidades de } K_R$$

$$c = k_R/k_T \quad \dots \text{ Normalmente } < 1 \text{ para cooperatividade positiva}$$



(a)

$$Y = [\alpha(1+\alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1+c\alpha)^{n-1}] / [(1+\alpha)^n + L(1+c\alpha)^n]$$

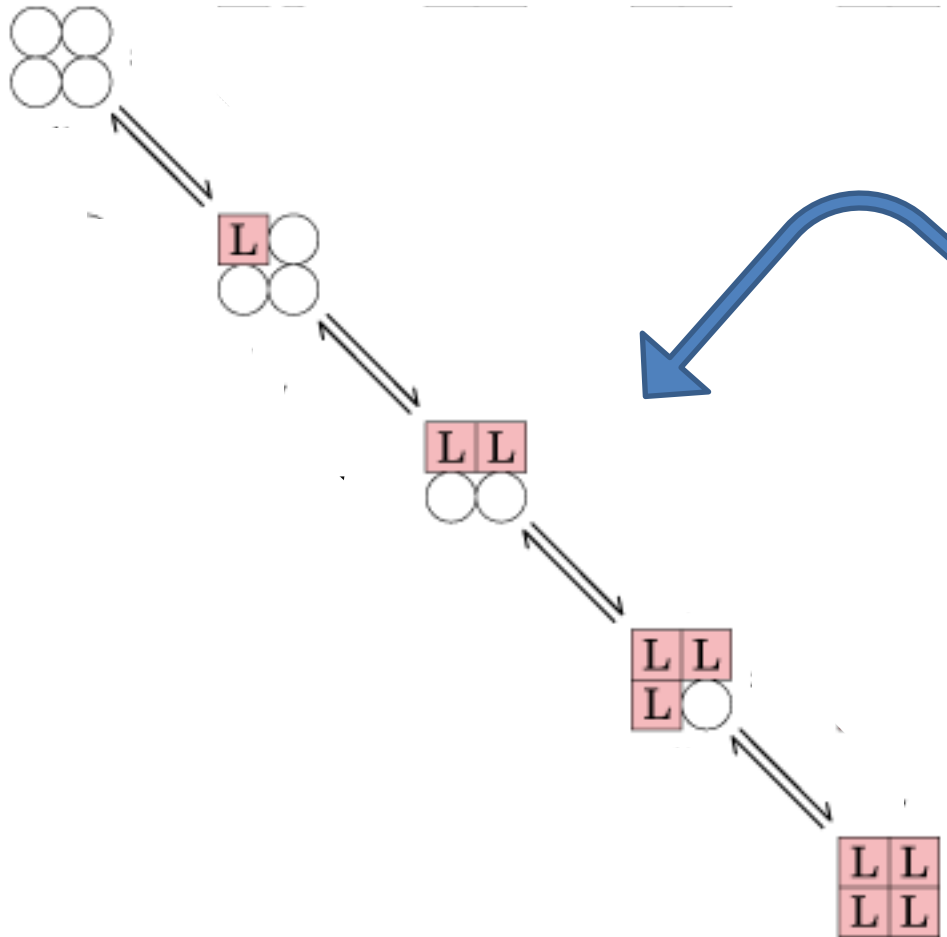
Vantagens:

- explica cooperatividade positiva
- explica diferenças em afinidades
- somente precisa 3 parametros L , k_R e k_T (ou L , α e c)

Desvantagens:

- Não há uma razão para acreditar que simetria é preservada
- Não explica cooperatividade negativa

Modelo Sequencial ou de “Induced Fit” (KNF = Koshland, Némethy, Filmer)



(b)

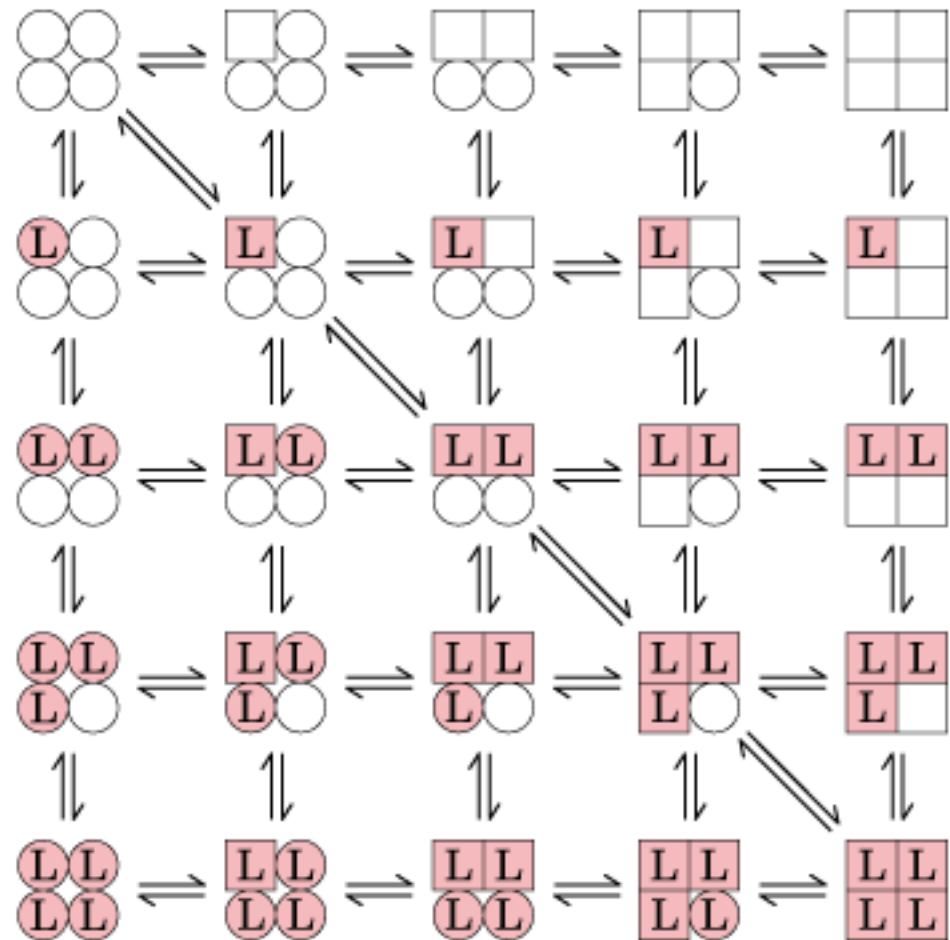
- 1) A ligação do ligante induz uma mudança conformacional em uma subunidade
- 2) Estas mudanças são transmitidas para outras subunidades, modificando sua afinidade para ligante.
- 3) Se o acoplamento é fraco, estados não simétricos podem existir
- 4) Se o acoplamento é forte, as mudanças conformacionais são simultâneas e o oligômero mantém sua simetria (aproxima modelo do MWC)
- 5) Acoplamento depende de arranjo dos monômeros dentro do oligômero
- 6) Uma extensão do modelo do Adair

KNF
(acop.
fraco)

MWC

MWC

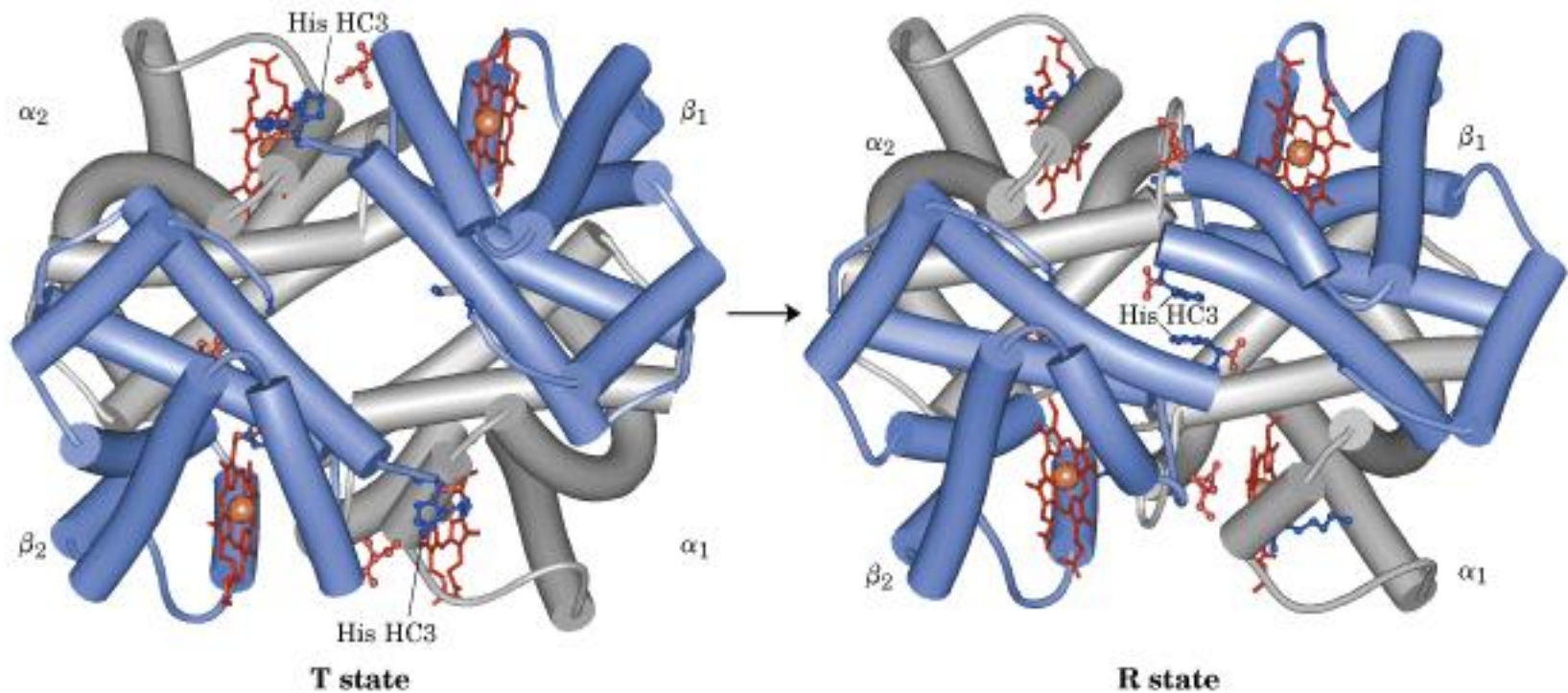
Modelo Combinado



(b)

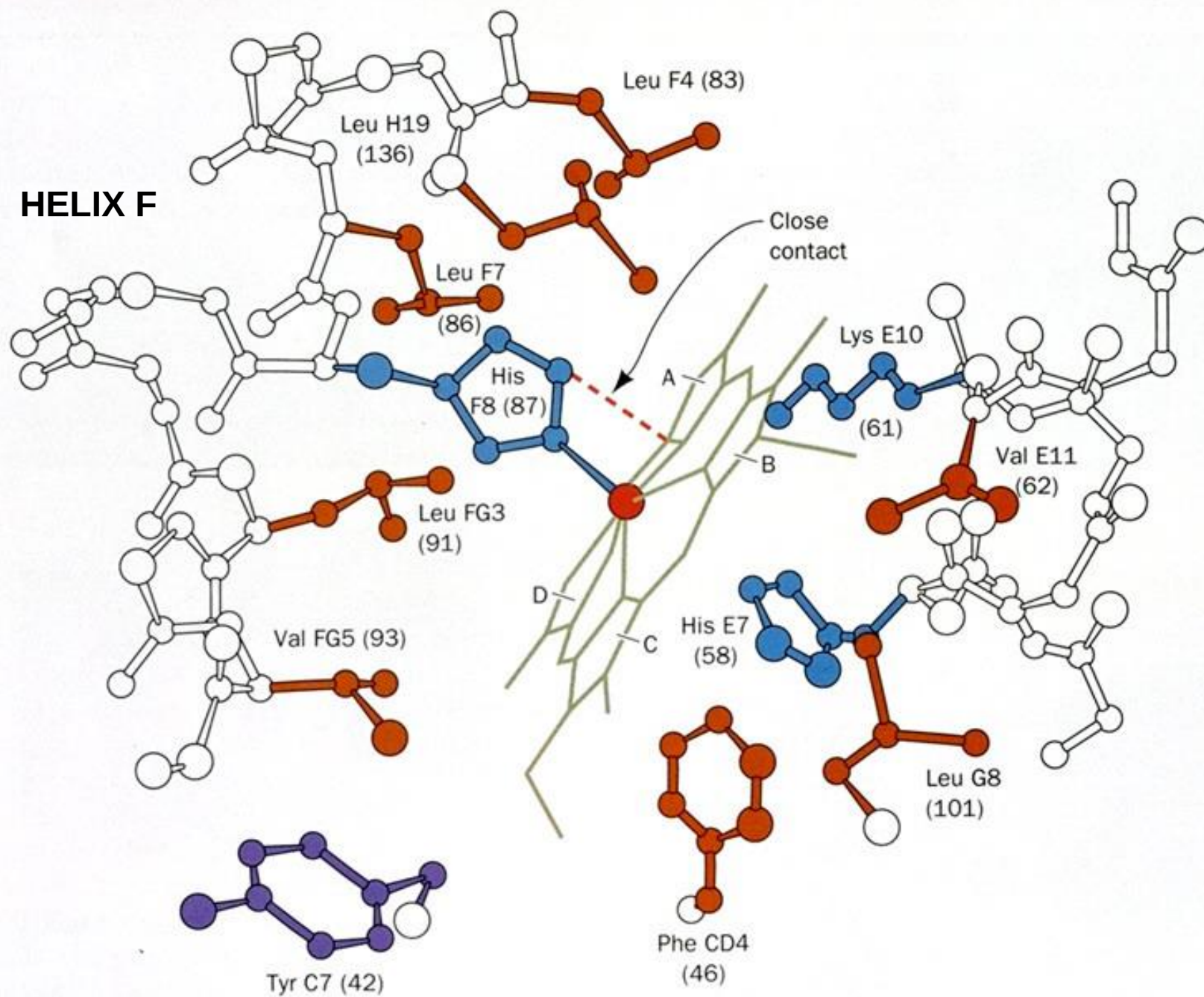
Fim da Parte 3

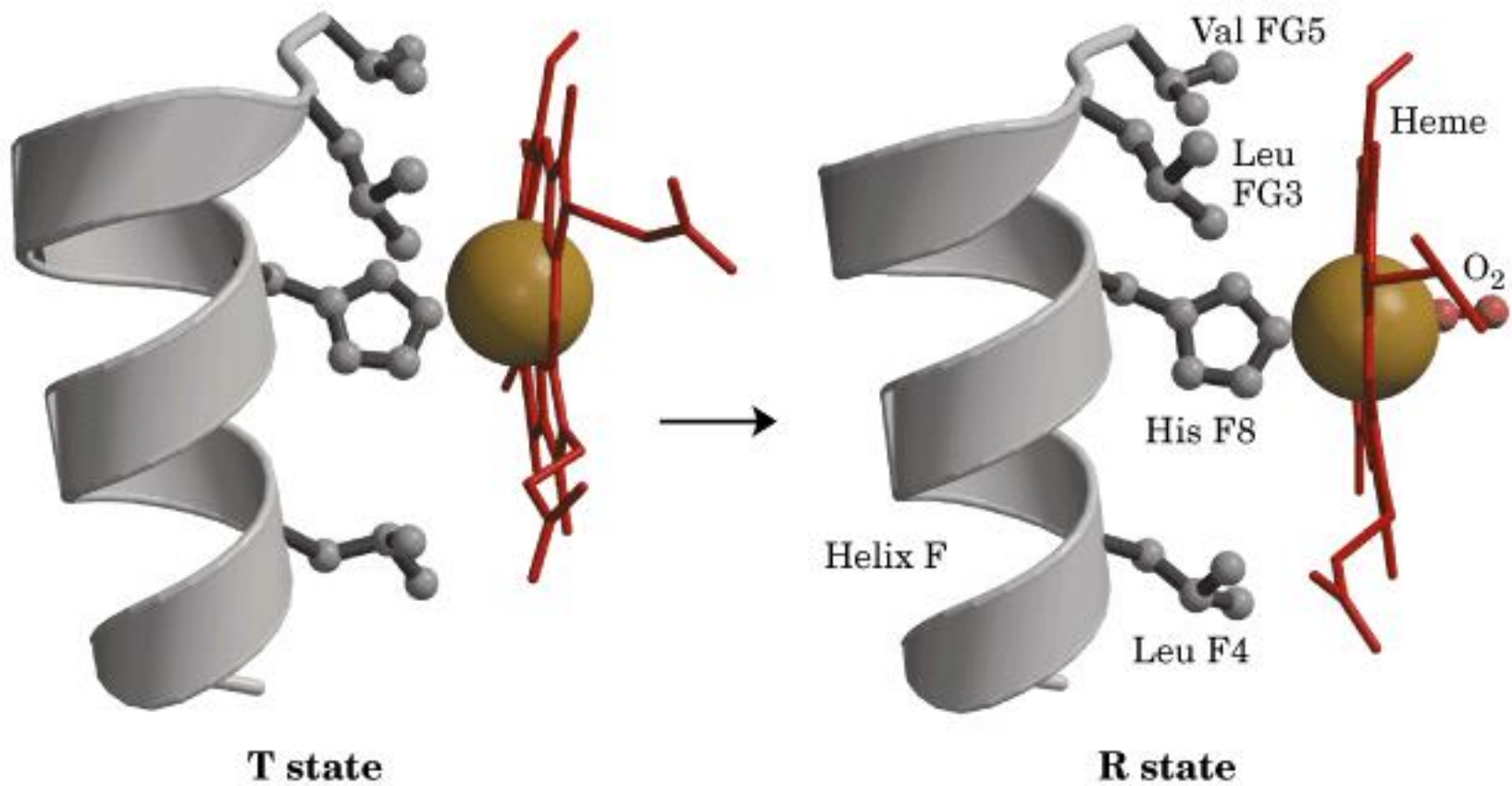
Modelo Estrutural de Perutz



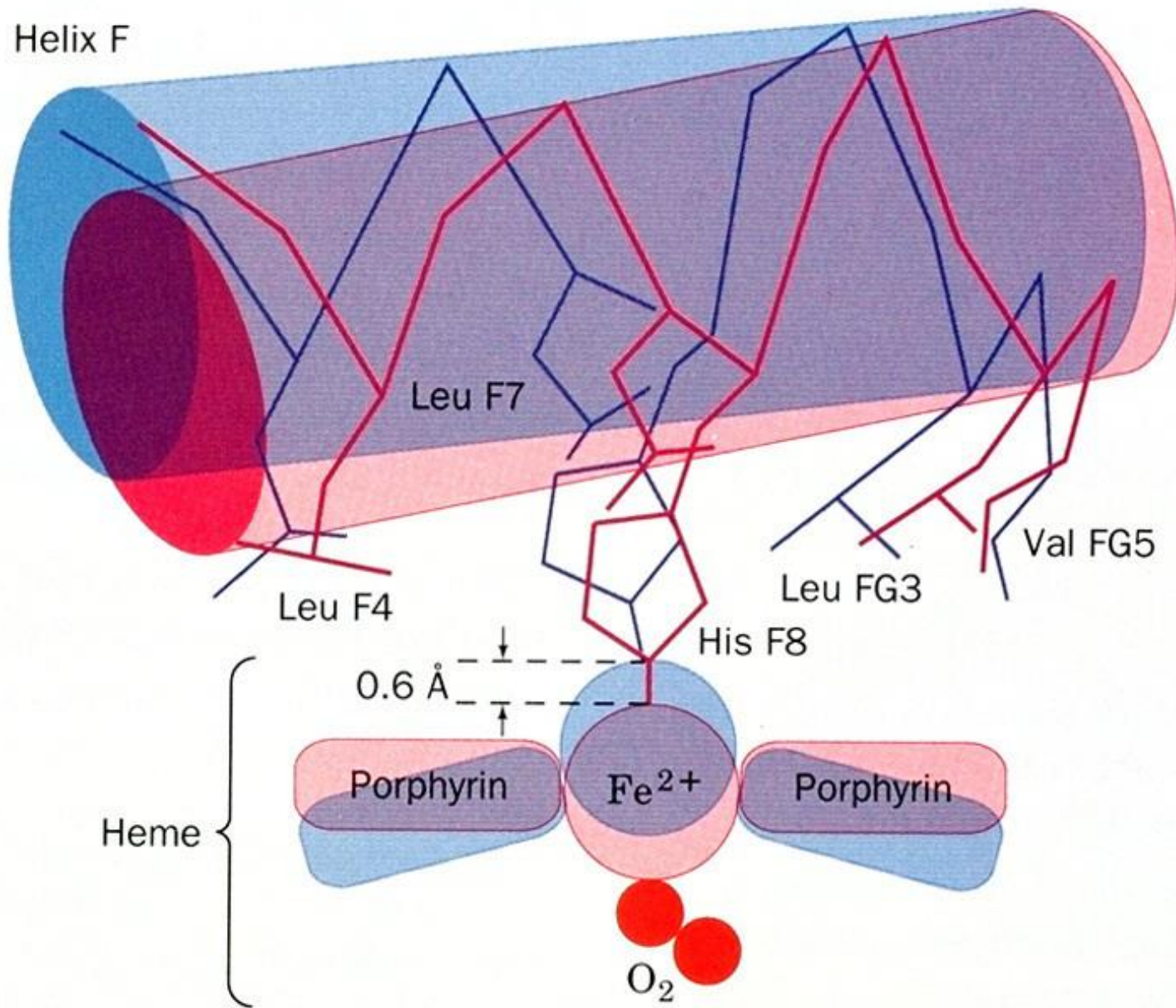
- 1) Ligação de O₂ causa Fe(II) mover para dentro do plano de heme.
- 2) Os contatos α_1 - β_2 e α_2 - β_1 tem duas posições estáveis.
- 3) O estado T é estabilizado por pontes salinas que tem que ser rompidas para formar o estado R (estabilizado pela energia de formação da ligação covalente Fe – O₂).
- 4) A cooperatividade se deriva da transição T $\rightarrow$ R, ambos simétricos.
- 5) A curva sigmoidal de ligação de O₂ e derivada de uma combinação das curvas hiperbólicas dos estados T e R.

HELIX F



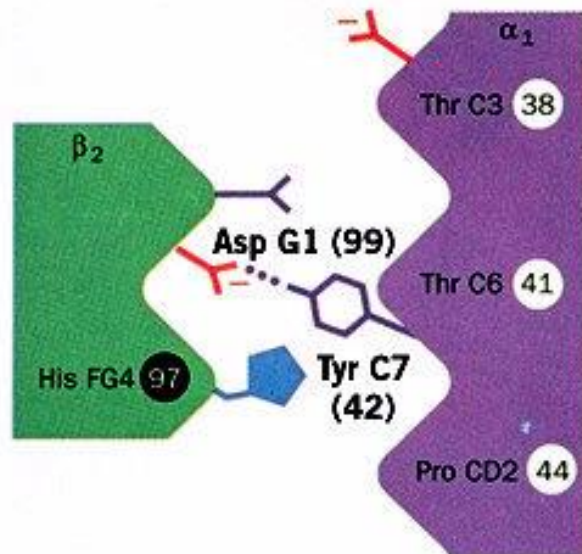
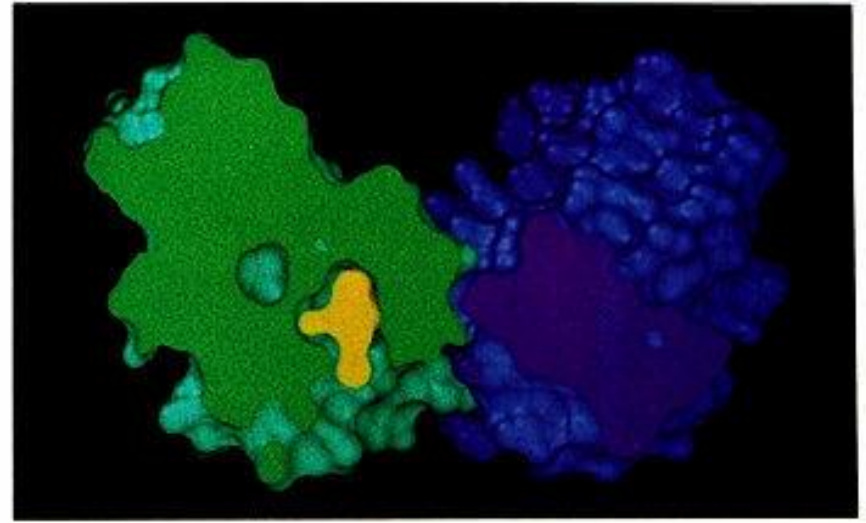
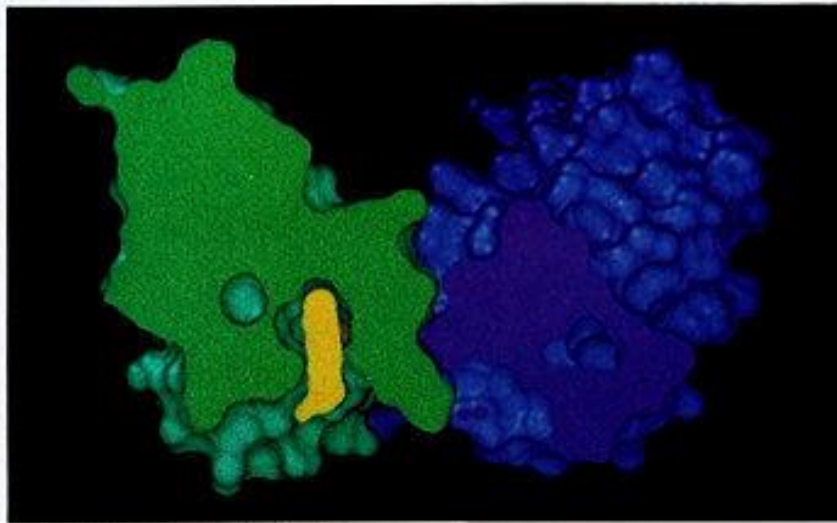


1) Ligação de O_2 causa Fe(II) mover para dentro do plane de heme.



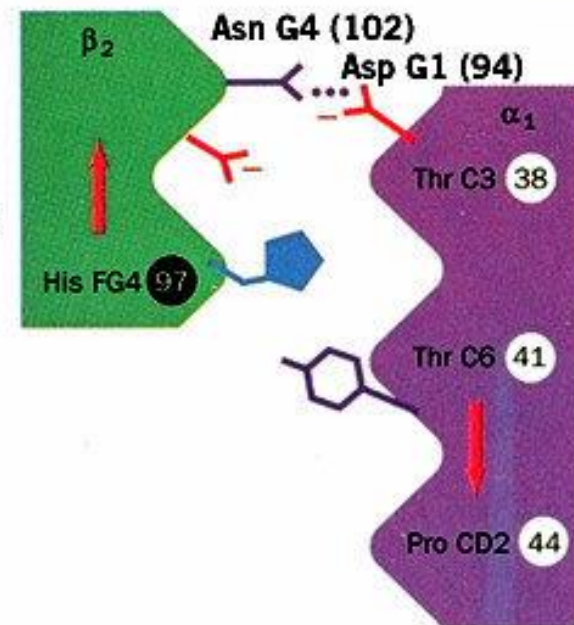
1) Ligação de O_2 causa Fe(II) mover para dentro do plane de heme.

2) Os contatos $\alpha 1$ - $\beta 2$ e $\alpha 2$ - $\beta 1$ tem duas posições estáveis.



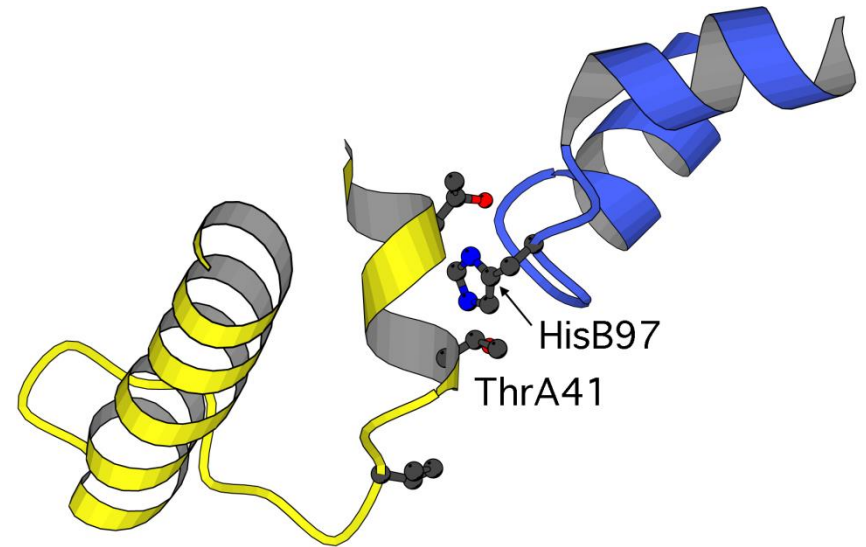
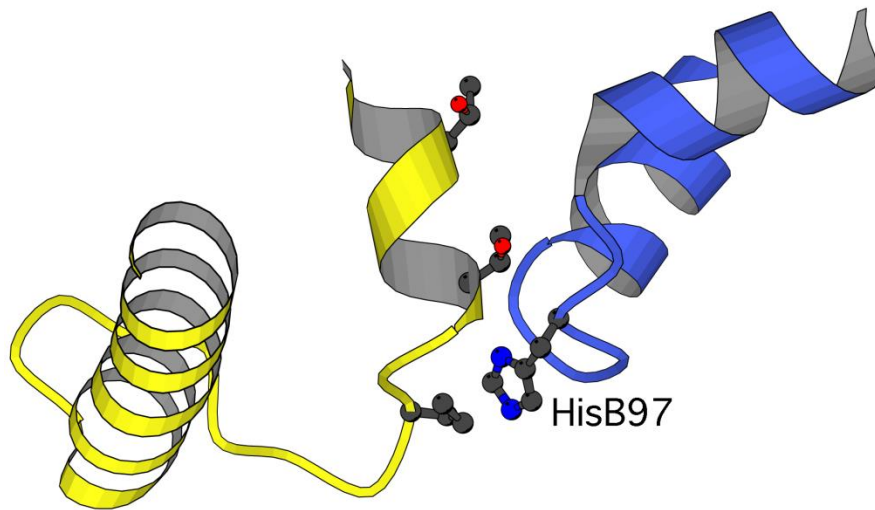
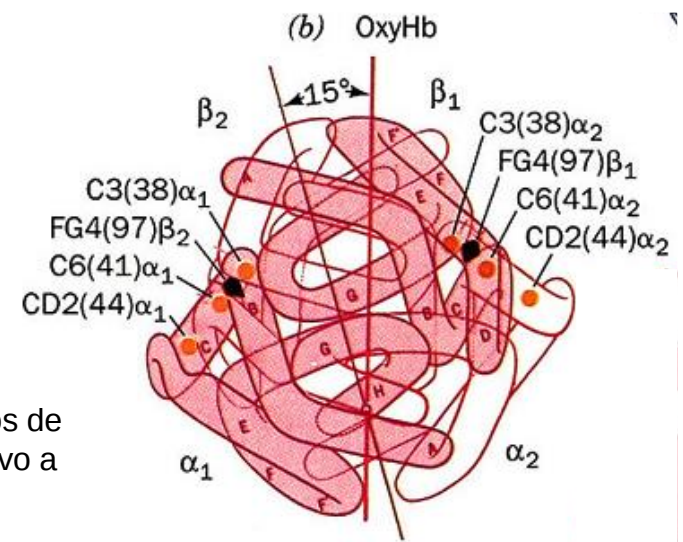
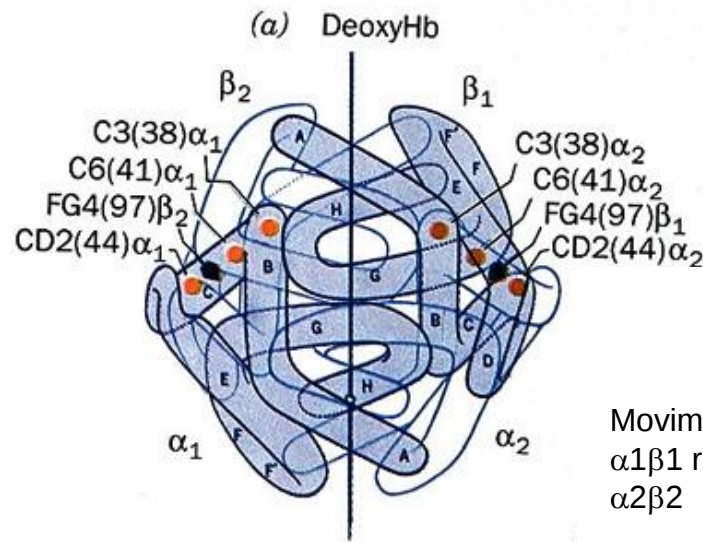
(a) T Form (deoxy)

oxygenation



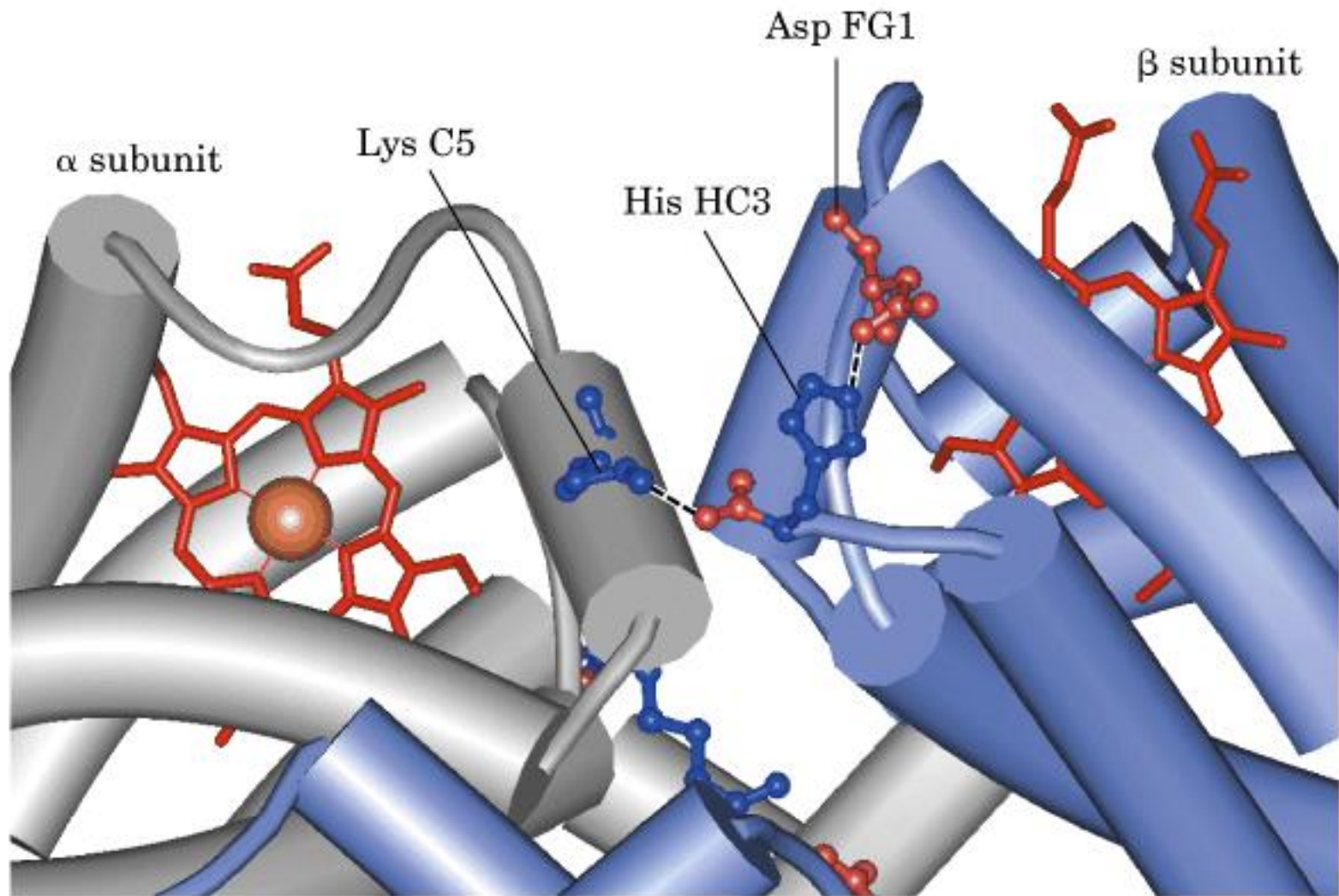
(b) R Form (deoxy)

- 2) Os contatos $\alpha 1\text{-}\beta 2$ e $\alpha 2\text{-}\beta 1$ tem duas posições estáveis.



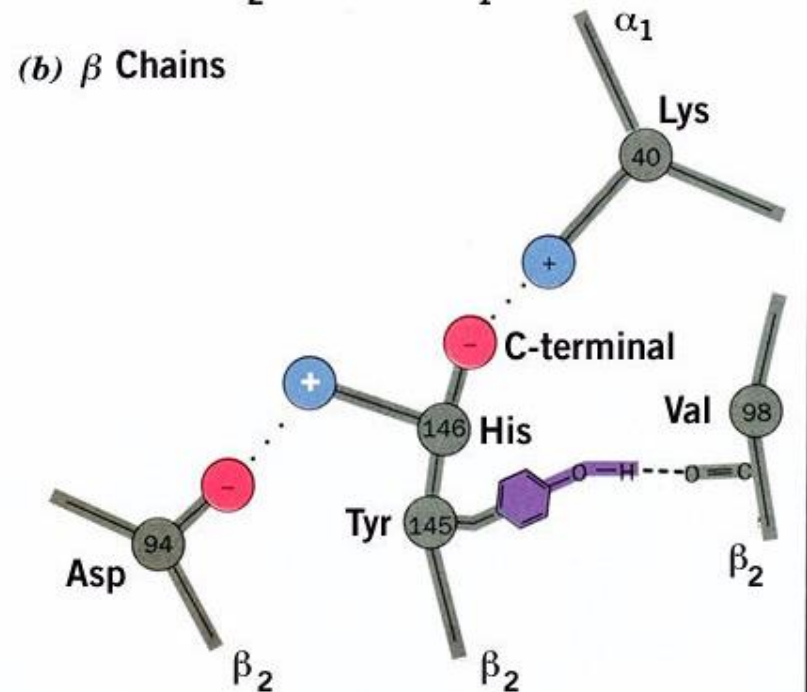
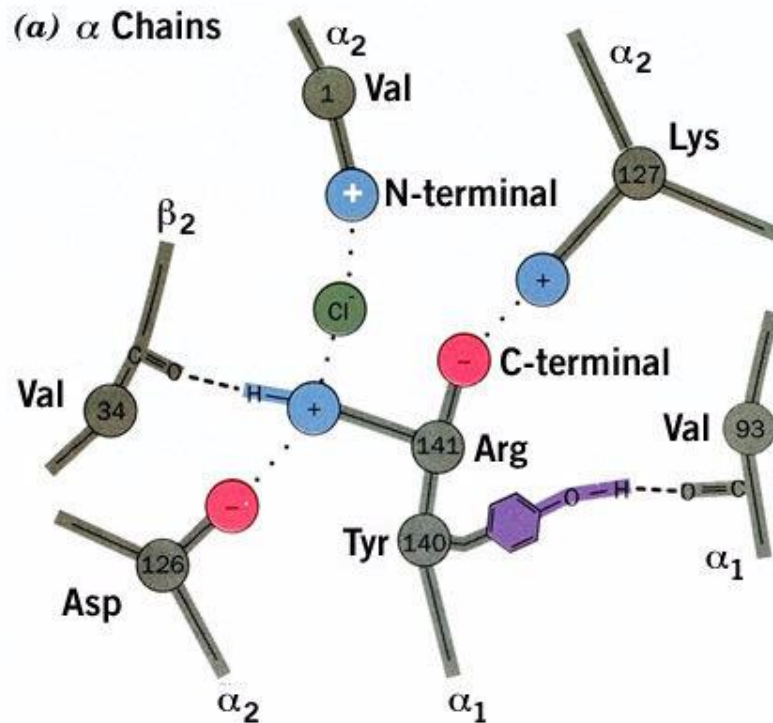
HisB97 tem que passar ThrA41 na transição da forma dessoxi (esquerda) para oxy (direita). As duas posições são “estáveis”, mas qualquer conformação intermediária será de alta energia

3) Pares iônicas que estabilizam o estado T da hemoglobina



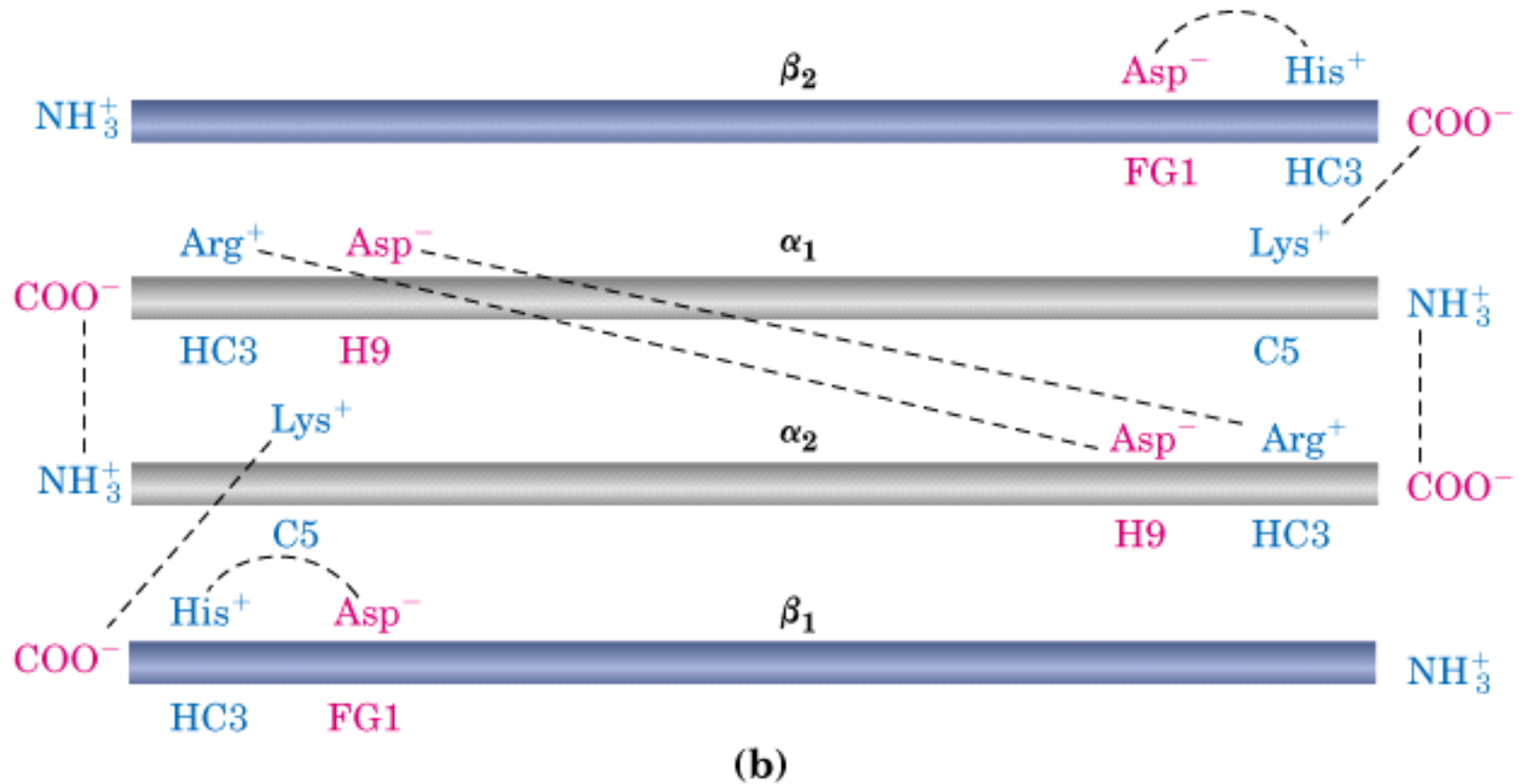
(a)

3) Pares iônicas que estabilizam o estado T da hemoglobina



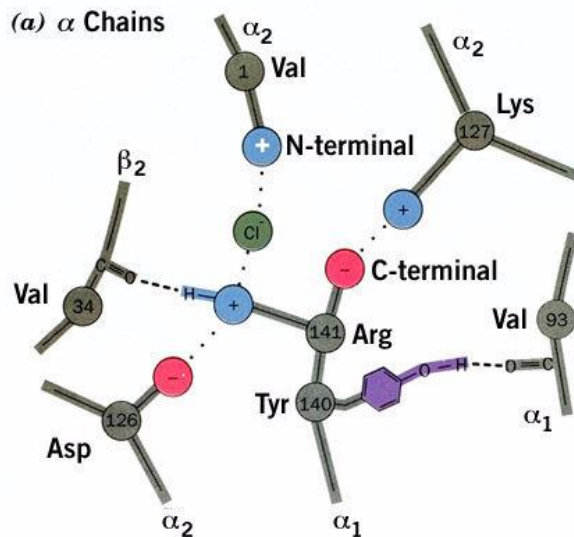
Envolvem, entre outros, resíduos nos C-terminais das cadeias alfa e beta

3) Pares iônicas que estabilizam o estado T da hemoglobina

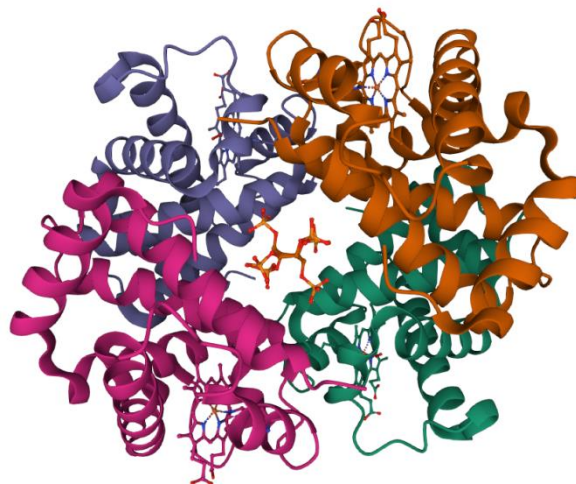


Testando o mecanismo de Perutz

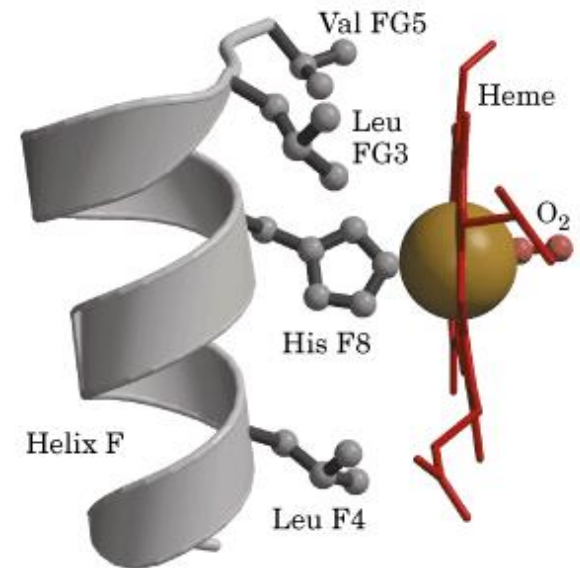
- 1) Remoção dos últimos aminoácidos das cadeias alfa e beta acaba com cooperatividade e estabiliza a forma R
- 2) Ligação simultânea de inositol hexafosfato (IHP) e NO à Hb gera tensão na ligação His_{prox} – Fe que resulta na sua quebra.
- 3) Mutação de His_{prox} a Glicina e substituindo ela com imidazol reduz a cooperatividade, aumenta a afinidade e estabiliza o estado R.
- 4) Explicação molecular do efeito Bohr



(1,4)



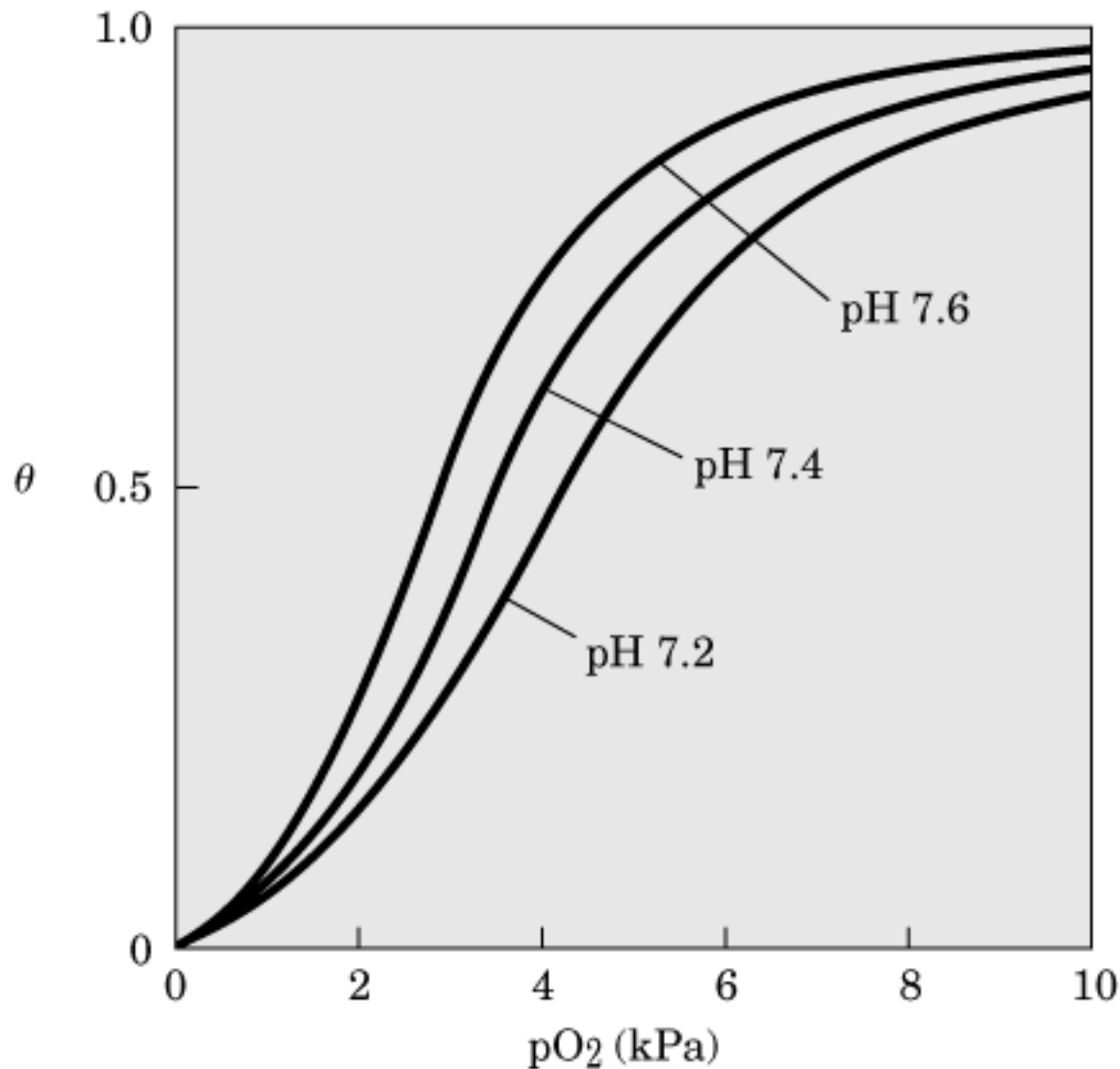
(2)



R state

(3)

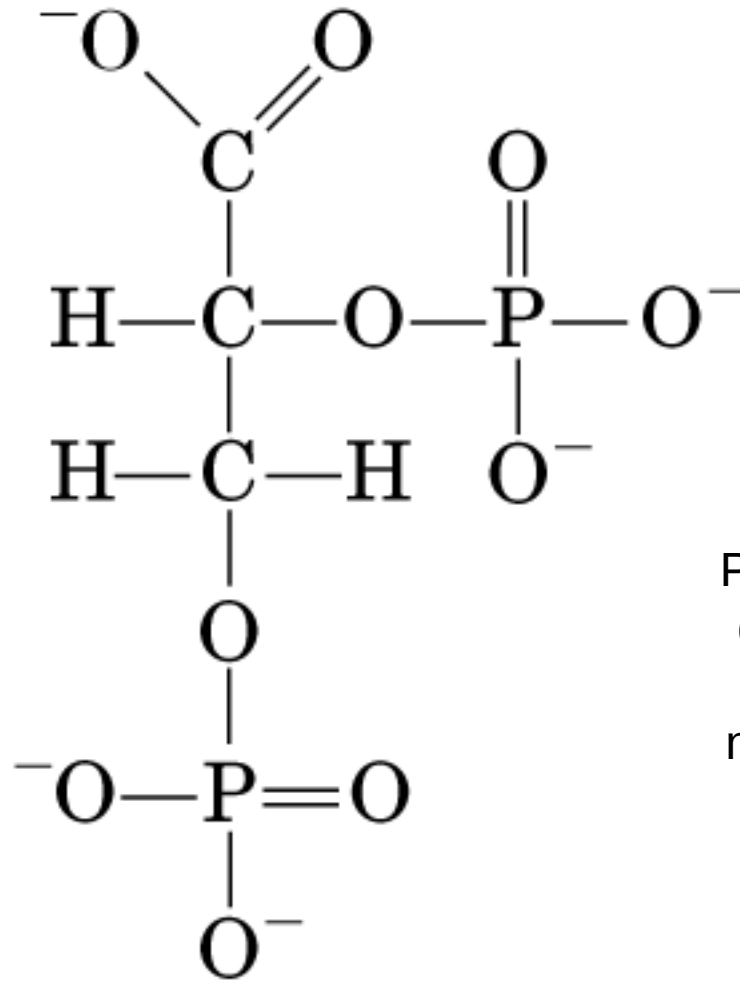
Efeito Bohr: em alta pH, a afinidade de Hb para O_2 aumenta
(ou seja: oxi-Hb é um ácido mais forte do que desoxi-Hb; Hb libera H^+ quando liga O_2)



Isso porque a ligação de O_2 no estado R reduz o pK_a de vários grupos que formam pontes salinas no estado T:

- i) grupos alfa amino das cadeias α formam pontes com o C-terminal das cadeias β
- ii) grupos $HisH^+$ 146 das cadeias β formam pontes salinas com Asp94-

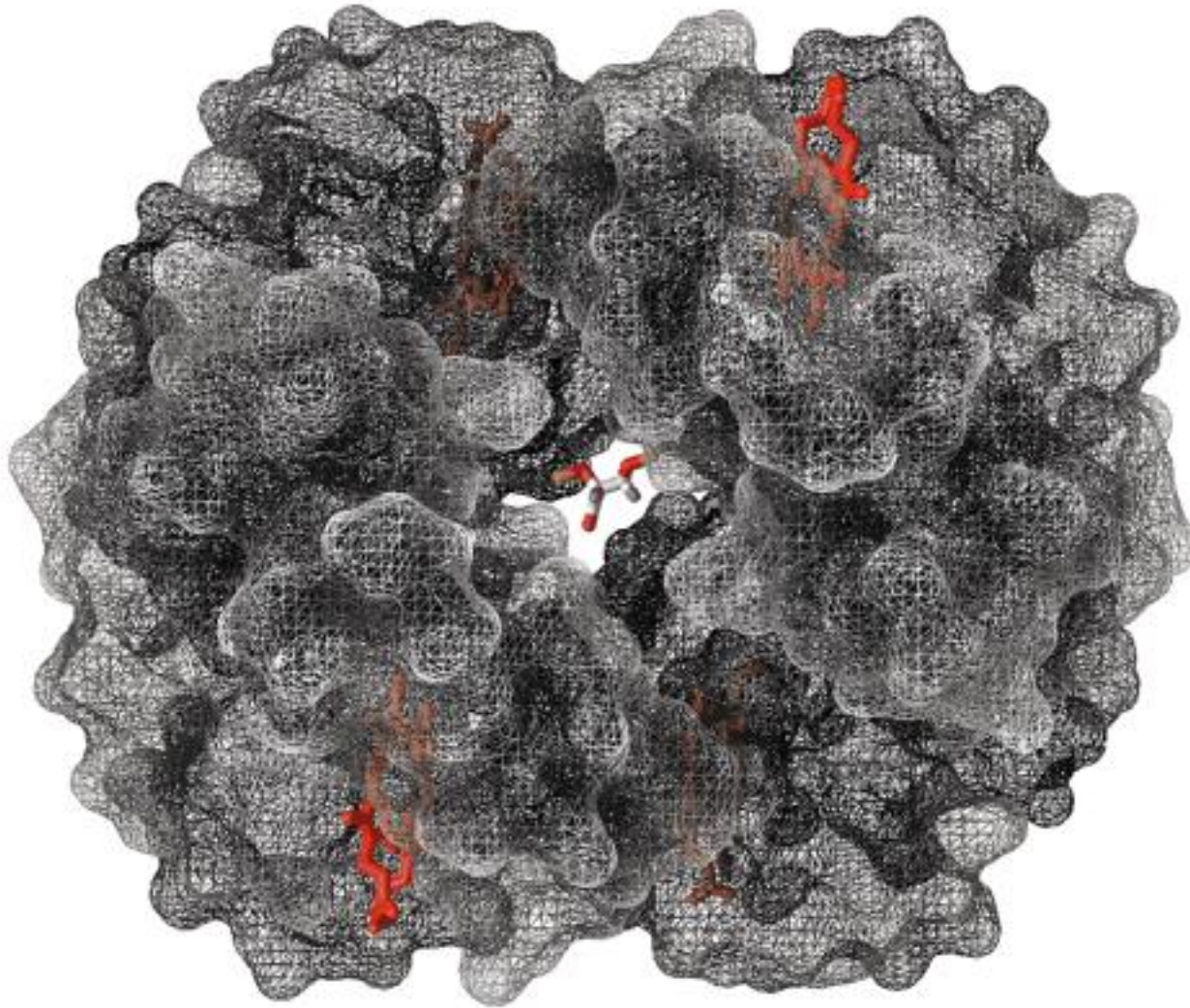
BPG diminui
afinidade de
Hb para O₂.



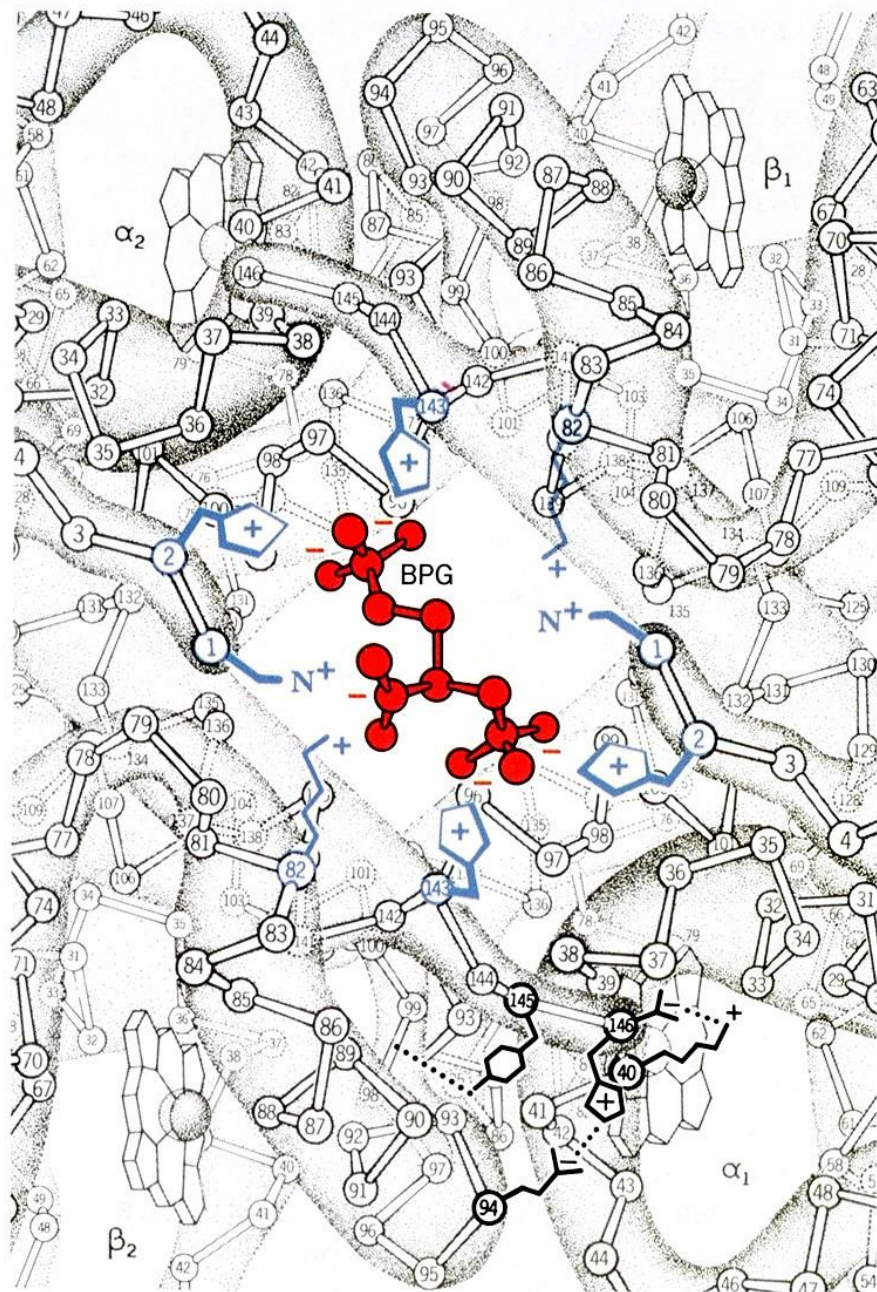
BPG:
Produzido em
quantidades
altas (mM)
nos eritrócitos

2,3 - bisfosfoglicerato

desoxiHb + BPG = estado T



(a)



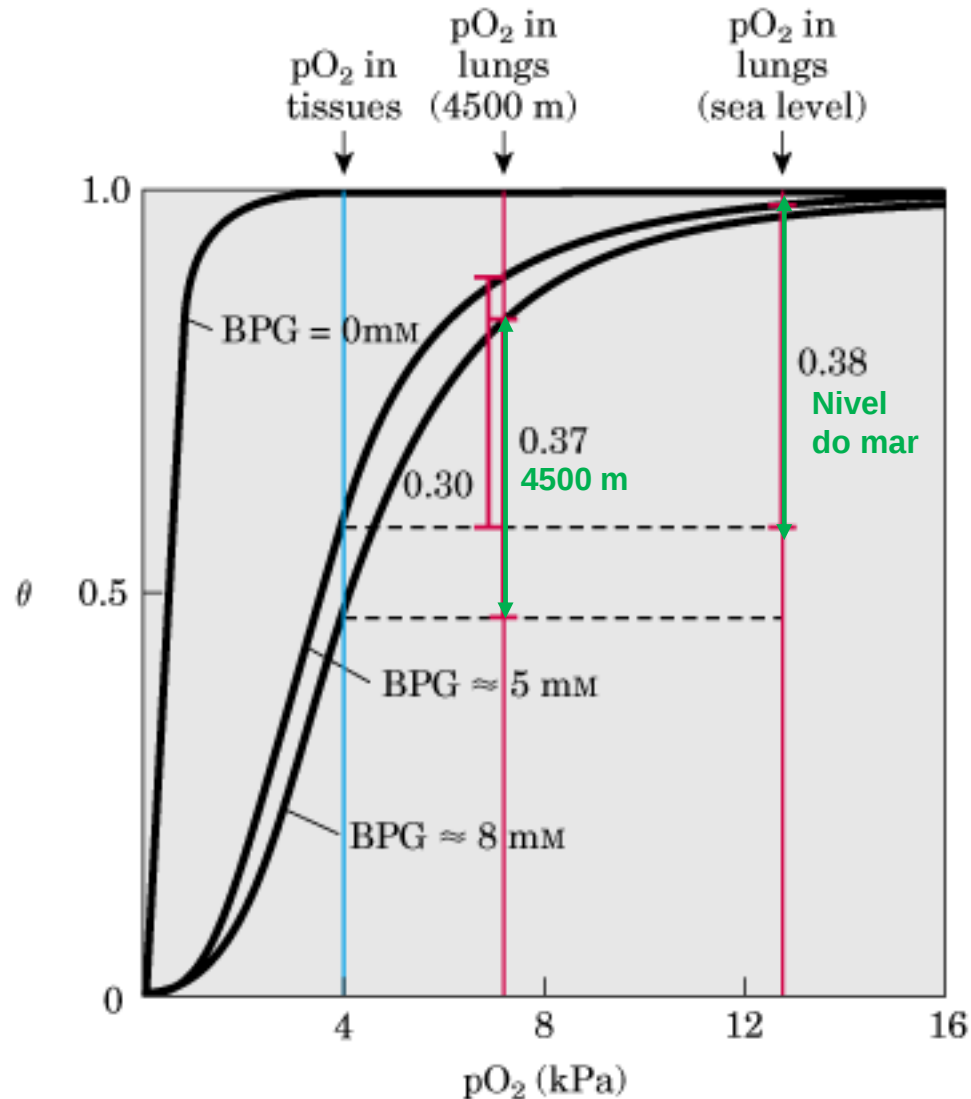
[BPG]
aumenta
em altas
altitudes

... A captação
de O_2 é reduzida

... mas a liberação
de O_2
aumenta.

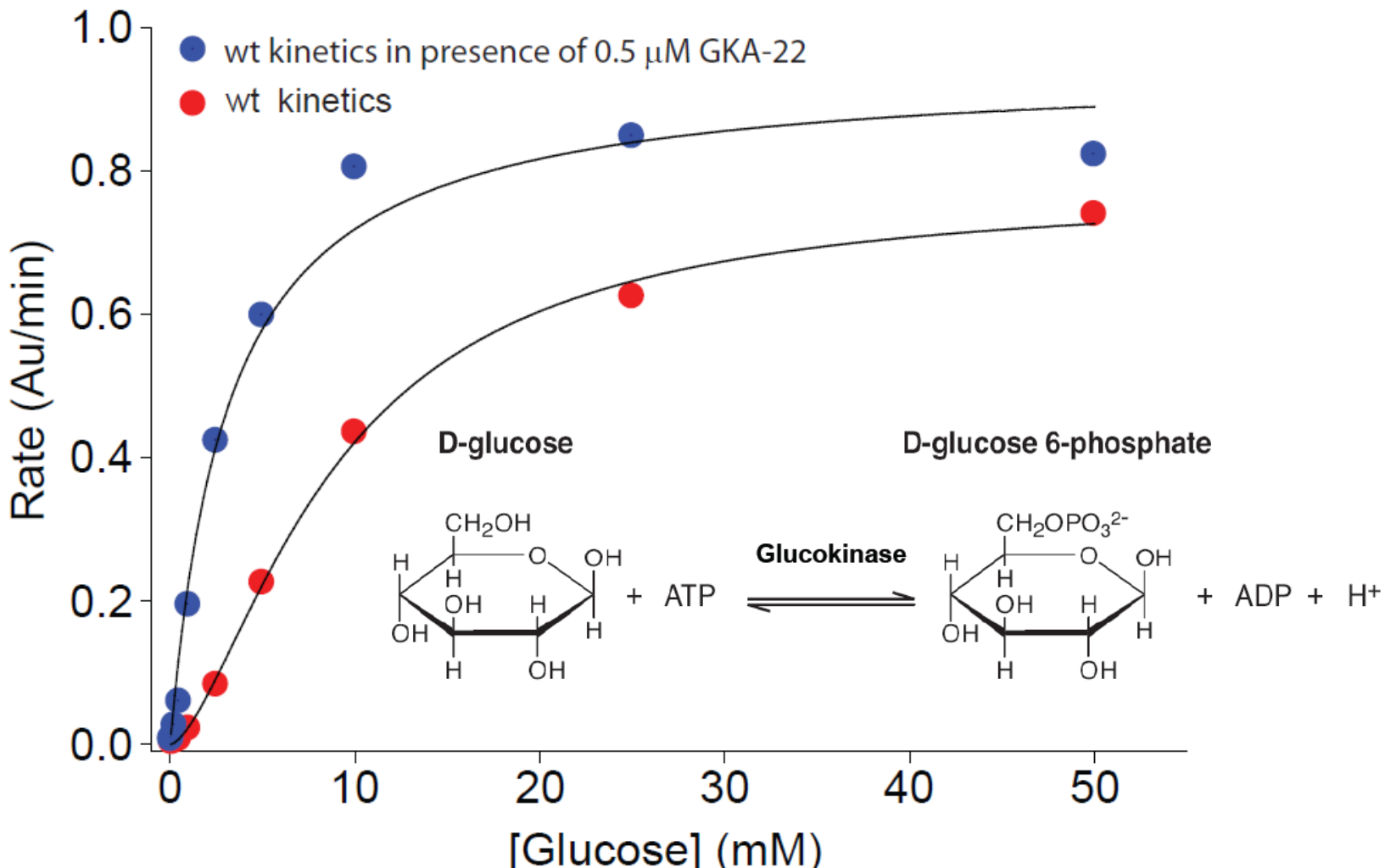
Isso mantém
constante a
quantidade
 O_2 liberado
na circulação

$$\Delta\theta = 0,37 - 0,38$$

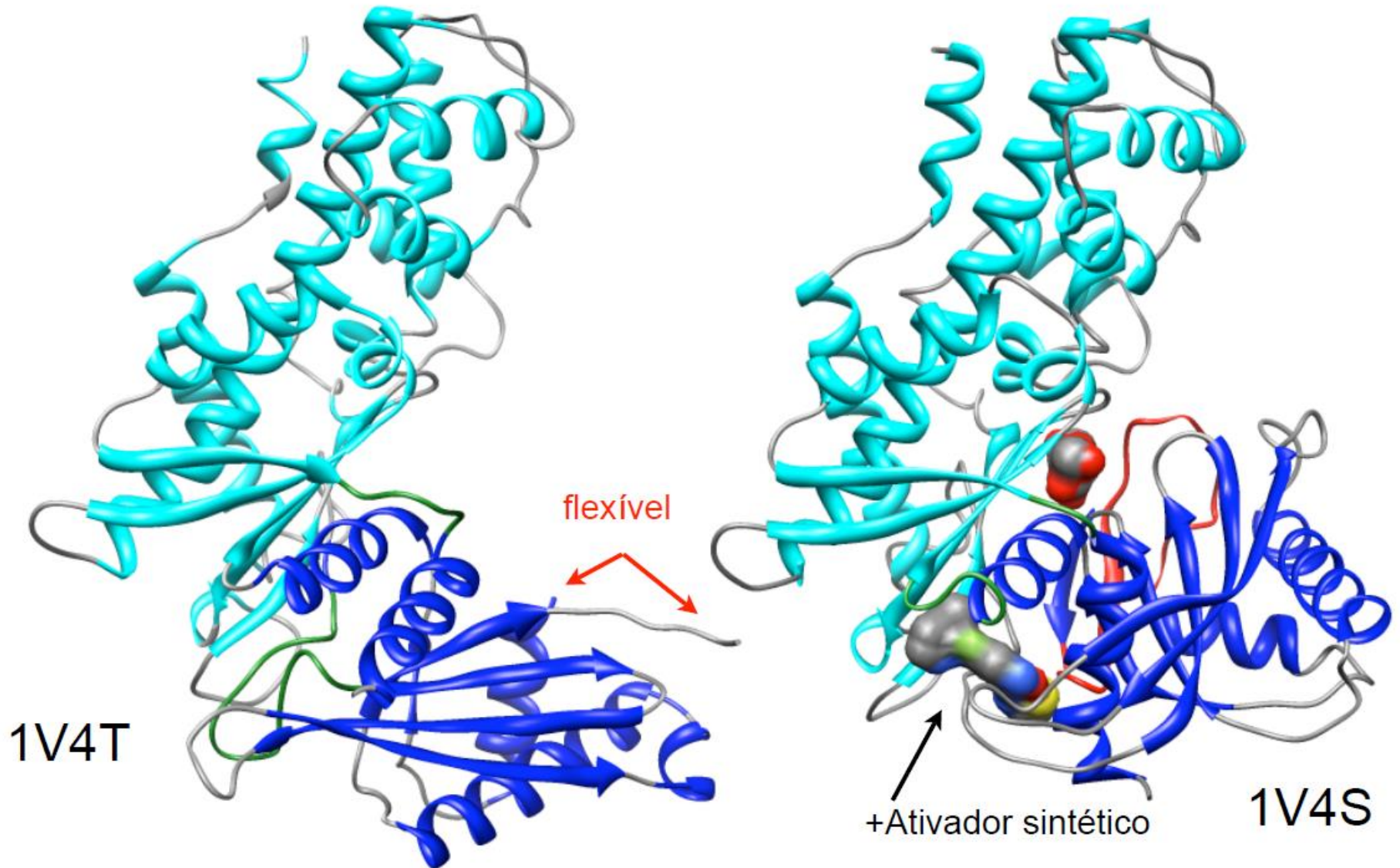


Podemos concluir que
Enzimas Cooperativas são
necessariamente “multiméricas”?

Glicoquinase apresenta curva cinética sigmoide, mas é uma enzima monomérica, com apenas um sítio de ligação ao substrato

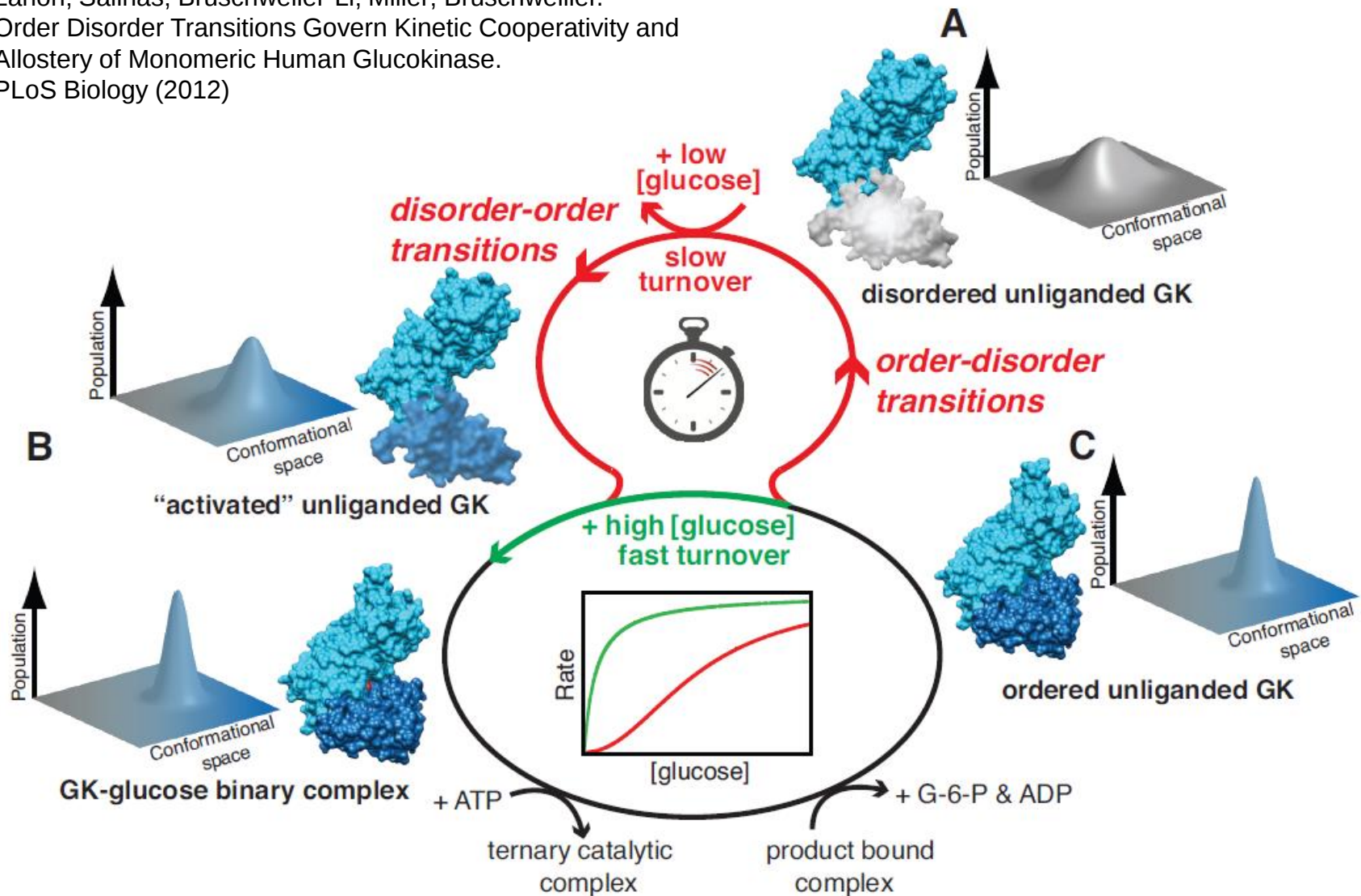


Estruturas cristalográficas mostram que glicoquinase experimenta diferentes conformações discretas na ausência e presença de glicose



Em baixas concentrações de glicose, a dinâmica do domínio menor ocorre na escala de tempo da mesma ordem que $1/k_{\text{cat}}$ (~ 12.5 ms), e retarda o *turnover* da enzima

Larion; Salinas; Bruschweiler-Li; Miller; Brüschweiler.
Order Disorder Transitions Govern Kinetic Cooperativity and
Allostery of Monomeric Human Glucokinase.
PLoS Biology (2012)



Fim da parte 4

Exercícios, tarefas de estudo e discussão:

- 1) Baixar os arquivos de coordenados das estruturas de mioglobina humana (3RGK.pdb), dessoxihemoglobina (2HHB.pdb) e oxihemoglobina (1HHO.pdb) providenciados n e-disciplinas ou diretamente do PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)
- 2) Abrir os arquivos .pdb em Chimera ou Pymol. Aprender como colorir átomos, resíduos de aminoácidos, trechos de sequência específicos, cadeias e representação de estruturas secundárias na forma de fitas (ribbons/cartoons) e superfícies.
- 3) Analisar as estruturas para identificar:
 - a) as alfa-hélices A-H das subunidades
 - b) os grupos heme e as histidinas proximais e distais
 - c) contatos que mantêm a estrutura quaternária na oxihemoglobina e dessoxihemoglobina com referência às interações importantes mencionadas na aula.
 - d) Procurar os aminoácidos com carga positiva que compõem o sítio de ligação do 2,3-BPG.
- 4) Delimitar todos os efetores alostéricos da hemoglobina e seus sítios de ligação
- 5) Ler o artigo de Goodey e Benkovic sobre a relação entre a dinâmica proteica e alosteria (até o primeiro parágrafo da página 479).
- 6) Ler os artigos de Changeaux e de Cornish-Bowden, prestando atenção aos sucessos e fracassos dos modelos MWC e KNF em explicar cooperatividade e alosteria em diferentes proteínas.
- 7) Definir alosteria e cooperatividade e descrever a relação entre os dois conceitos/fenômenos.
- 8) Comparar as semelhanças e diferenças entre os conceitos de "induced fit" e "conformational selection".

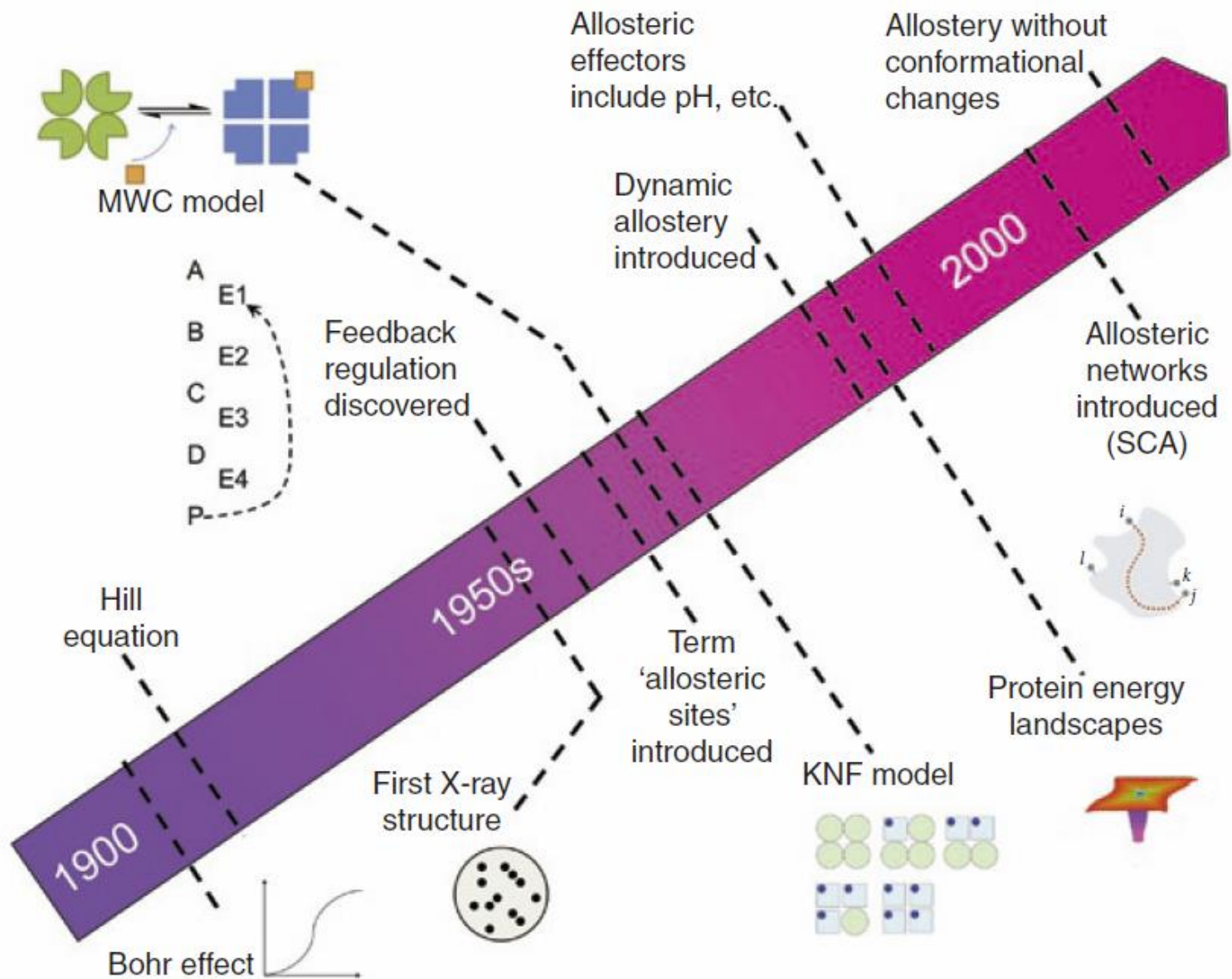


Figure 1 Timeline showing the discovery and progression of the concept of allosteric regulation in proteins.

Box 1 A timeline showing evolution of allostery as a concept

The timeline (**Fig. 1**) includes some of the key experiments and realizations of the field and some insight into how the mentality of the field has shifted.

1903—The Bohr effect (sigmoidal binding curve of hemoglobin to O_2 was observed).

1910—A. Hill formulates the Hill equation to describe the sigmoidal binding of O_2 to hemoglobin.

1958—First X-ray structure (sperm whale myoglobin) solved by M. Perutz and Sir J. Cowdery Kendrew⁷⁸.

1950s—Repression of gene expression, covalent modification of enzyme activity, and feedback inhibition of enzymes are discovered⁷⁹.

1963—J. Monod renames regulatory sites ‘allosteric sites.’

1965—J. Monod, J. Wyman and J.-P. Changeux propose a theoretical model of concerted allosteric transitions (MWC model)¹.

1966—D. Koshland, G. Nemethy and R. Filmer propose the sequential model for allosteric transitions (KNF model)⁸⁰.

1984—Allosteric regulation in the absence of conformational change is proposed¹².

1980s—Protein folding studies lead to the concept that proteins exist in different conformations in an “energy landscape”⁸¹.

1990s—Mutations, covalent modifications and changes in conditions such as pH are included as allosteric effectors.

1999—Allosteric networks in the PDZ domain proposed by R. Ranganathan⁵⁰.

2006—Negative allostericity reported in the absence of conformational changes⁵⁴.

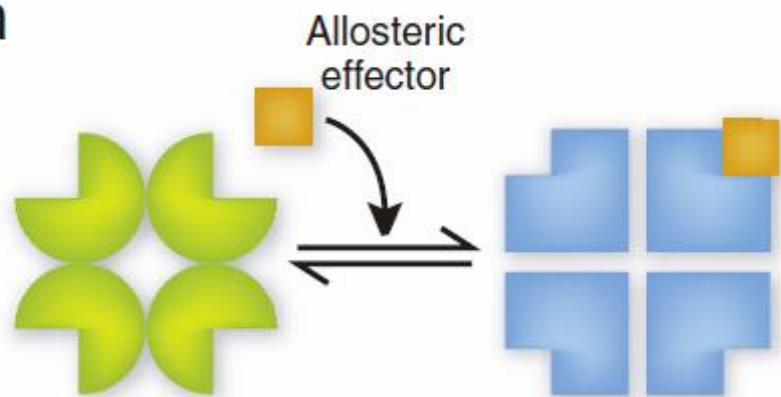
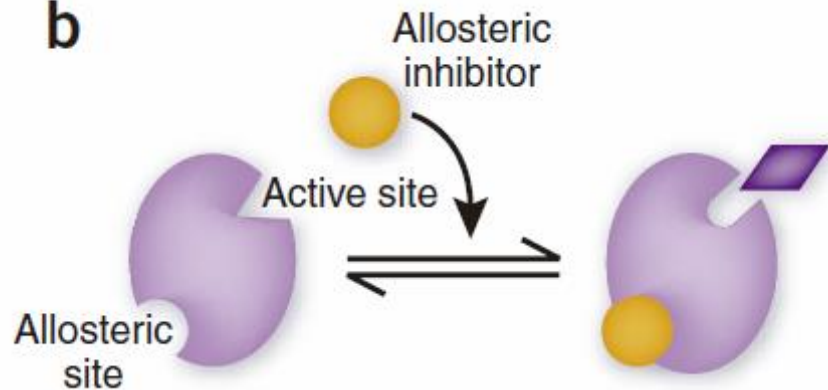
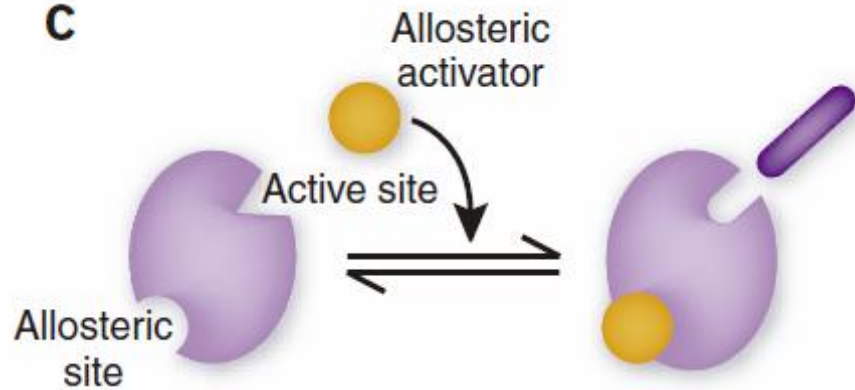
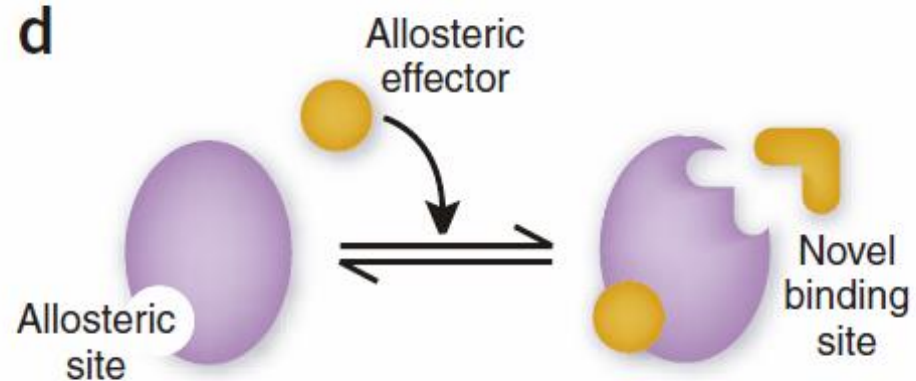
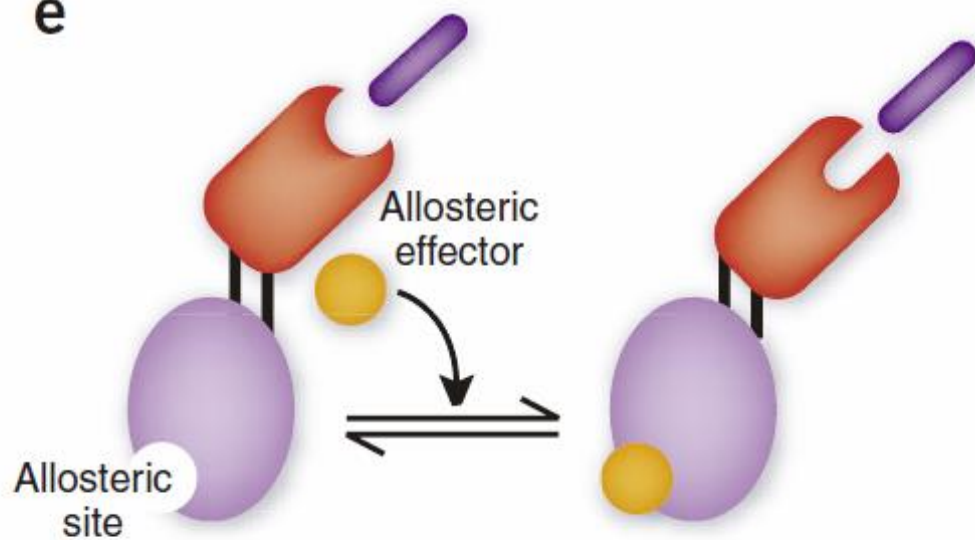
a**b****c****d****e**

Figure 2 Different modes of allosteric behavior.

(a) Cooperativity: a cartoon representation of the Monod-Wyman-Changeux (MWC) model of allosteric transitions. A symmetric, multimeric protein can exist in one of two different conformational states—the active and inactive conformations. Each subunit has a binding site for an allosteric effector as well as an active site or binding site. (b) A monomeric, allosterically inhibited protein. The binding of an allosteric inhibitor alters the active site or binding site geometry in an unfavorable way, thereby decreasing affinity or catalytic efficiency. (c) A monomeric, allosterically activated protein. The binding of an allosteric activator results in increased affinity or activity in the second site. (d) The binding of an allosteric effector might introduce a new binding site to a protein. Binding of a ligand to this new binding site could lead to changes in active site geometry, providing an indirect mechanism of allosteric control. This type of effect is of great interest in the design of allosteric drugs and can be considered a subset of the example shown in c. (e) The fusion of an enzyme (maroon) to a protein under allosteric control. This type of construct can act as an allosteric switch because the activity of the enzyme is indirectly under allosteric control via the bound protein with an allosteric site. Such constructs are both present in nature and the target of protein engineering studies.

