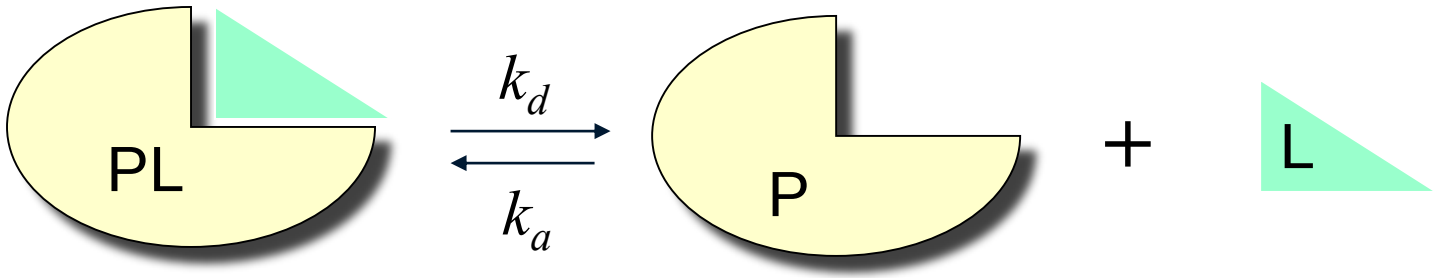
Estrutura e Função de Hemoglobina

Proteínas interagem com outras moléculas

- Processo transitório, reversível e específico
  - $A + B \leftrightarrow AB$
- Ligantes
  - Moléculas pequenas (ex: O_2, ATP, outros metabólitos)
  - Macromoléculas (ex: outras proteínas, DNA, RNA)
- Sítio de ligação
  - Região onde o ligante interage
- Sítio ativo de uma enzima
  - Região onde ocorre a catálise enzimática

Equações do equilíbrio de ligação entre proteína (P) e ligante (L)



- Taxa de associação = k_a[P]·[L]
  Taxa de dissociação = k_d [PL]

No equilíbrio:

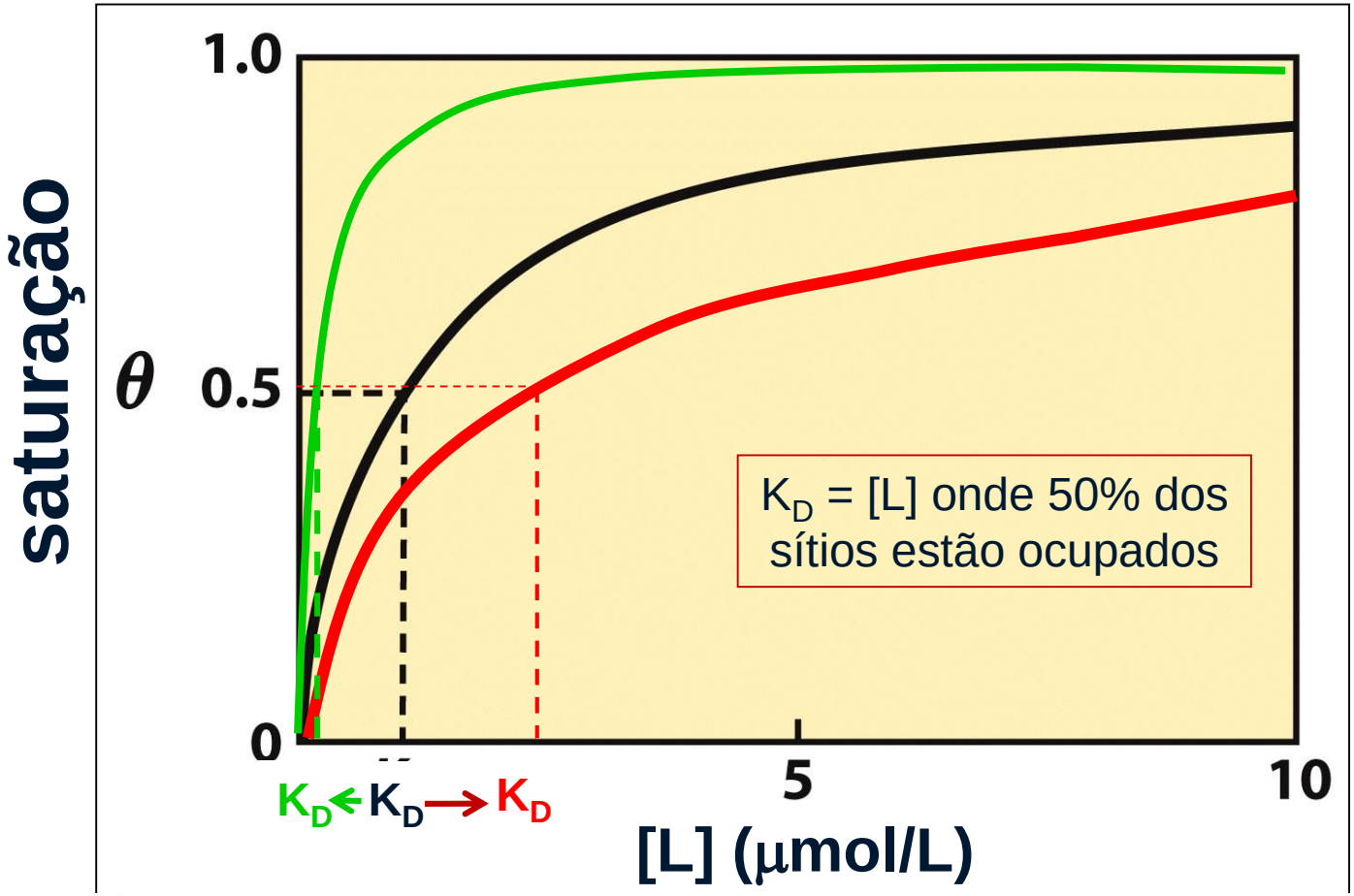
$$k_a[\mathrm{P}]\cdot[\mathrm{L}] = k_d[\mathrm{PL}]$$

$$\mathrm{PL} \leftrightarrow \mathrm{P} + \mathrm{L}$$

- A composição do equilíbrio é caracterizada pela constante de equilíbrio = constante de dissociação K_{Diss}

- $K_{Diss} = K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[P][L]}{[PL]}$

Representação gráfica da ligação



Θ = fração de sítios de ligação ocupados = $\frac{[PL]}{[P]+[PL]} = \frac{[L]}{K_D+[L]}$

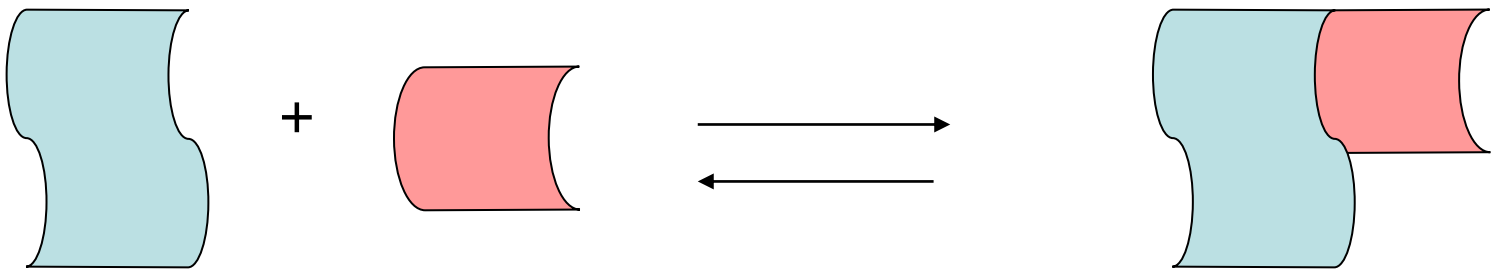
[L] = concentração do ligante livre

Especificidade de ligação

- Complementariadade proteína-ligante:
  - Tamanho
  - Forma
  - Carga
  - Hidrofobicidade/hidrofilicidade
- Modelos
  - chave-fechadura
  - encaixe induzido (induced fit)

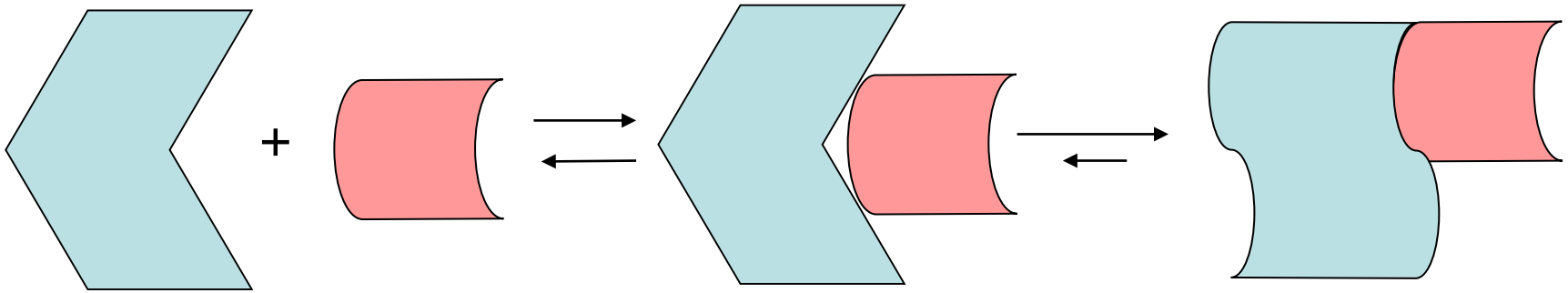
Modelos de ligação: chave e fechadura

- Emil Fischer, 1894
  - superfícies complementares são pré-formadas



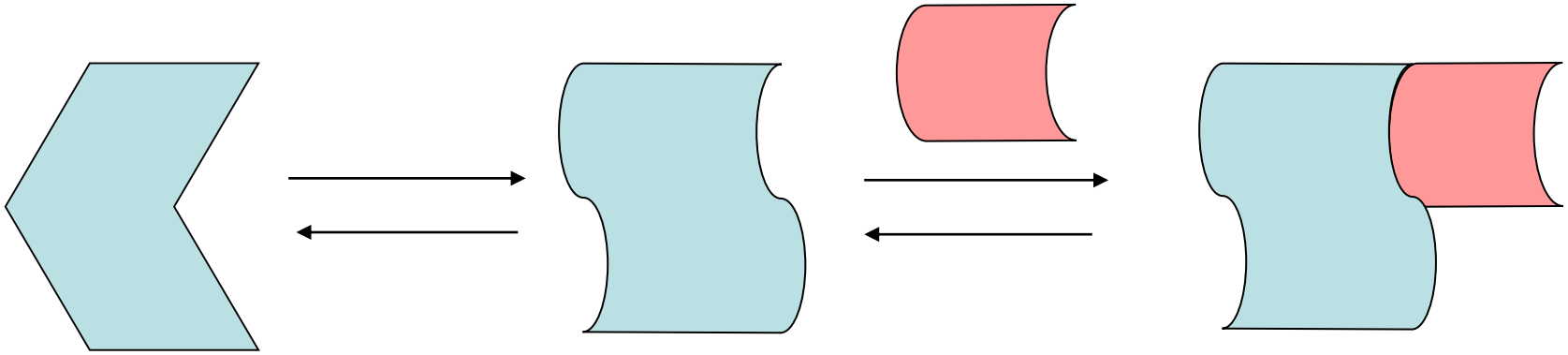
Modelo de ligação: *induced fit*

- Daniel Koshland, 1958
  - mudanças conformacionais ocorrem durante a ligação
  - Pode explicar mudanças na especificidade da proteína por um segundo ligante ou ativação/inibição de catálise de uma enzima
  - Compatível com o conceito de *alosteria*

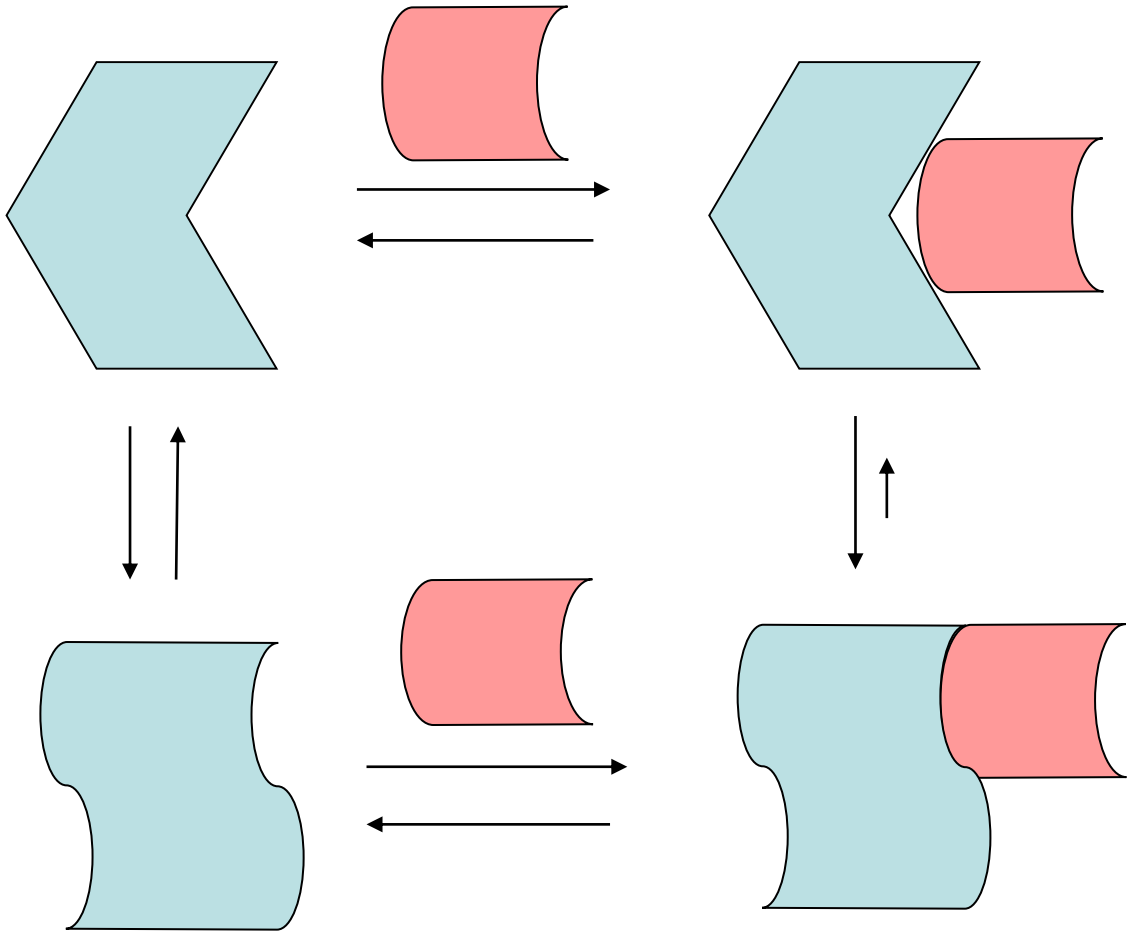


Modelo de ligação: *seleção conformacional*

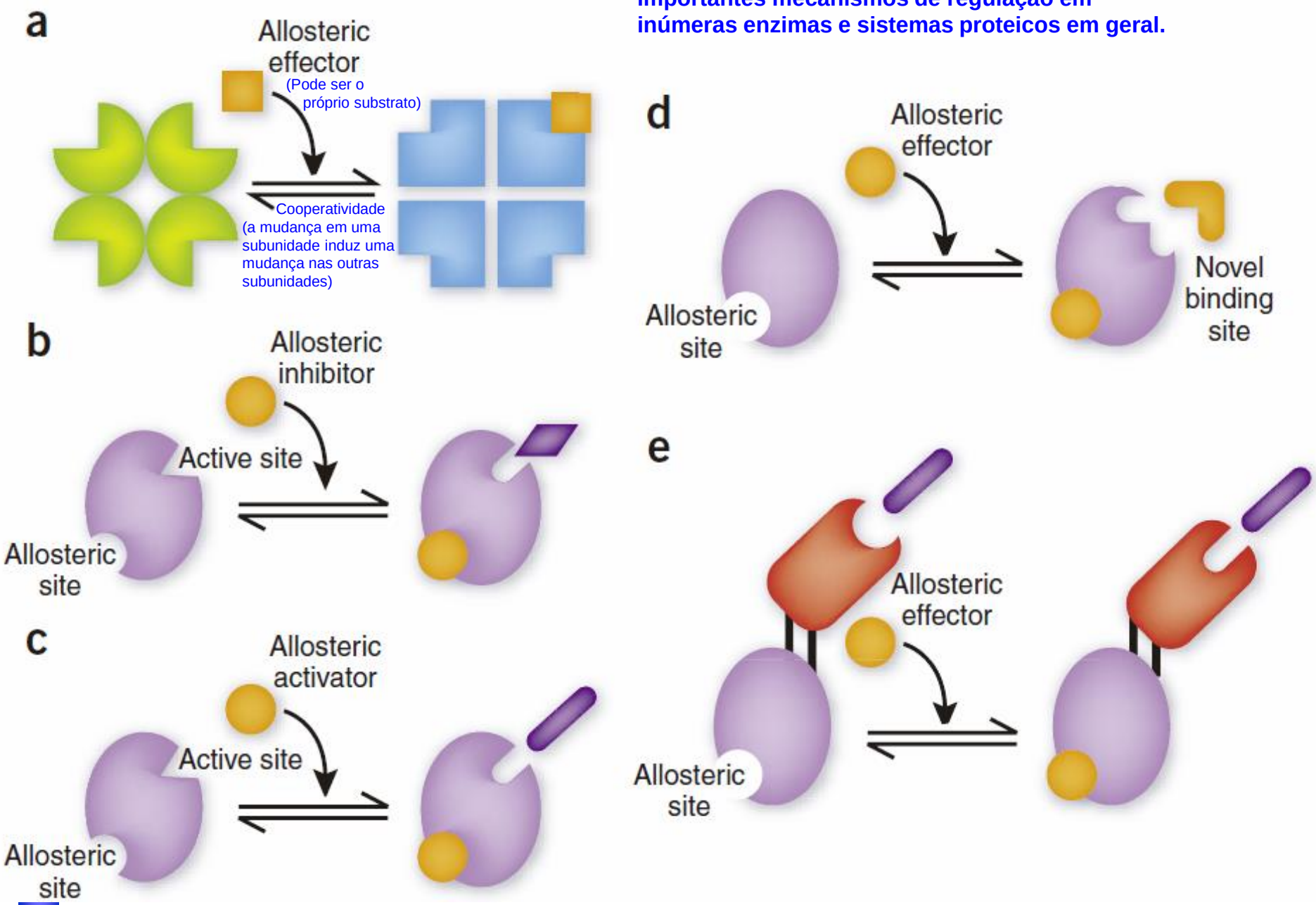
- A proteína está em equilíbrio entre 2 ou mais estados conformacionais
  - O ligante liga preferencialmente em (*seleciona*) uma das conformações.



Modelo de ligação: Combinando *Induced fit* e seleção conformacional



Alosteria (e cooperatividade) são importantes mecanismos de regulação em inúmeras enzimas e sistemas proteicos em geral.



Proteínas que ligam O_2

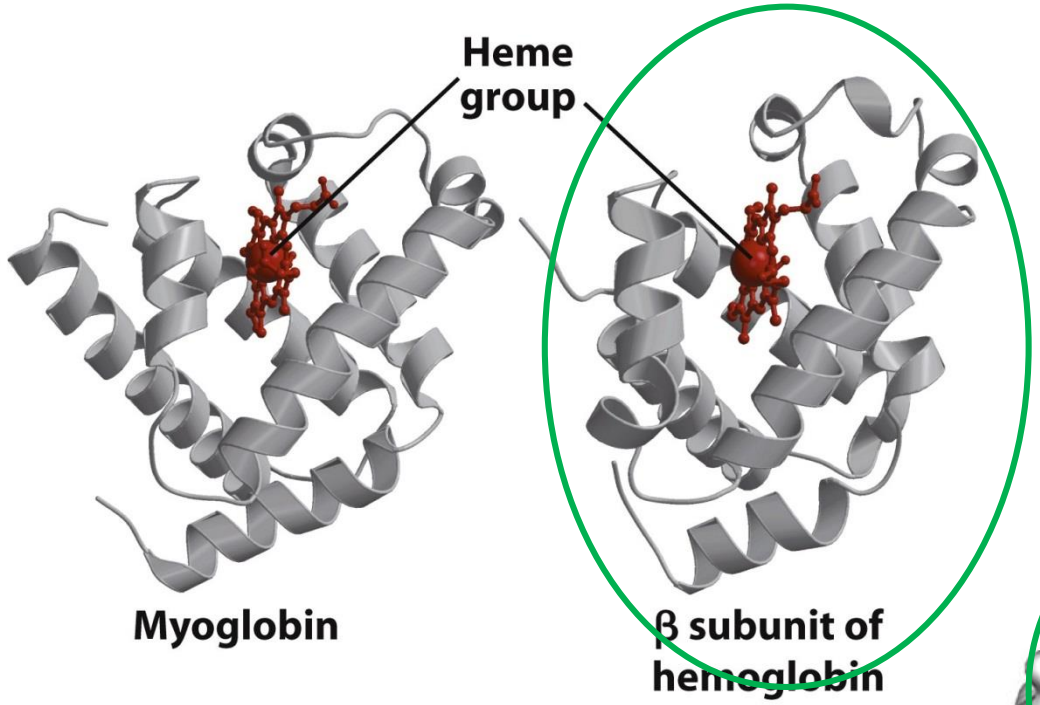
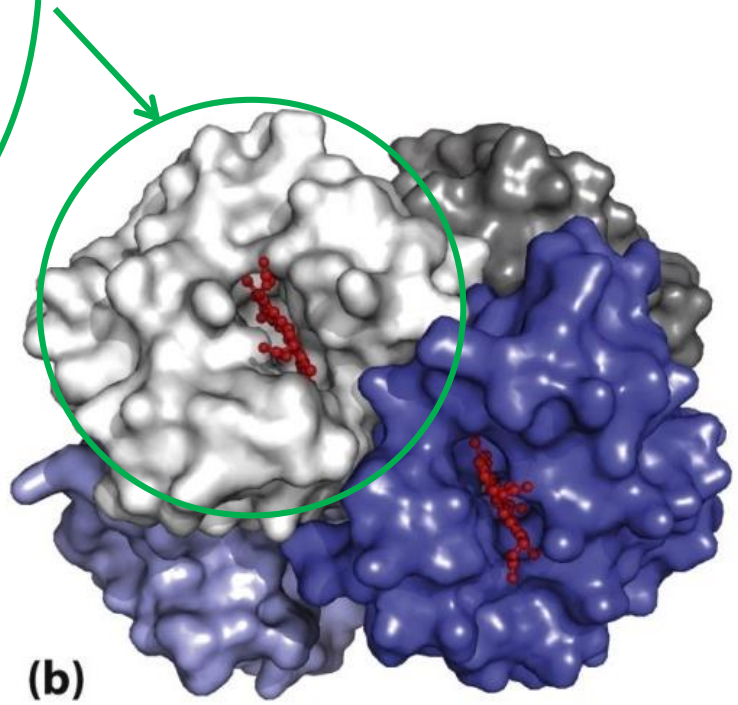
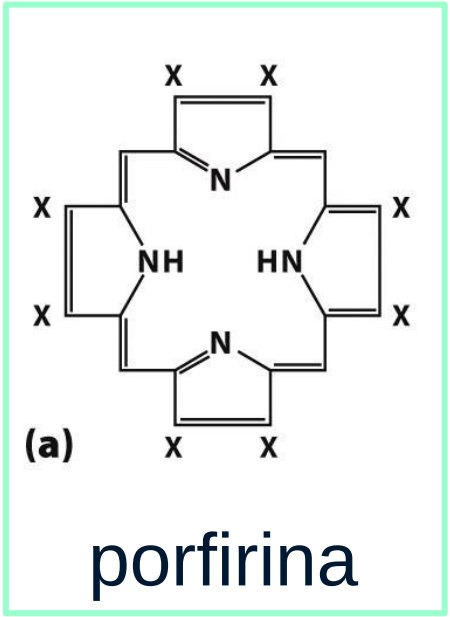


Figure 5-6
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

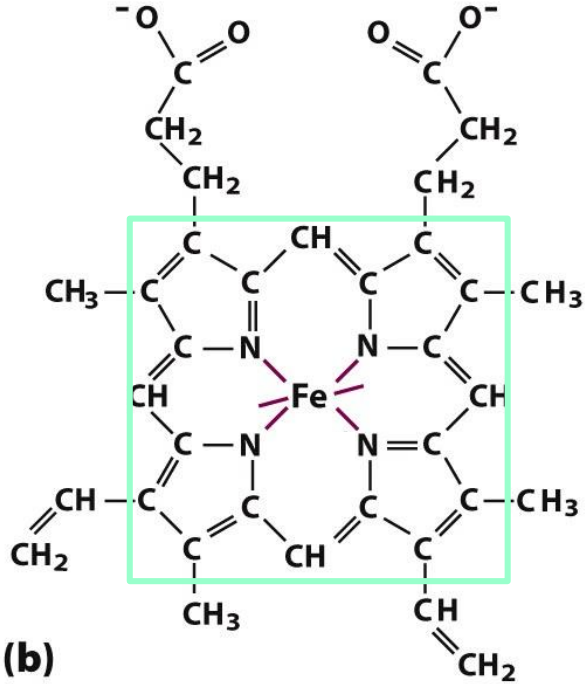


Heme:
grupo prostético contendo Fe^{2+} que faz parte do sítio de ligação ao O_2

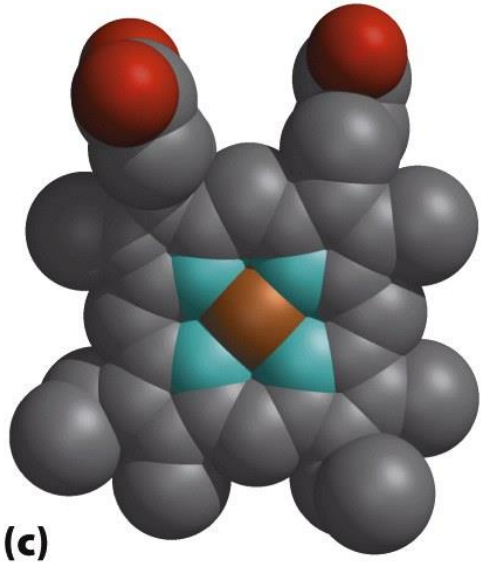
Grupo Heme



porfirina



protoporfirina IX



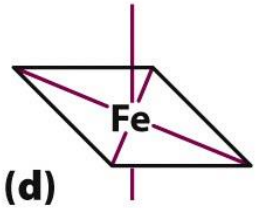
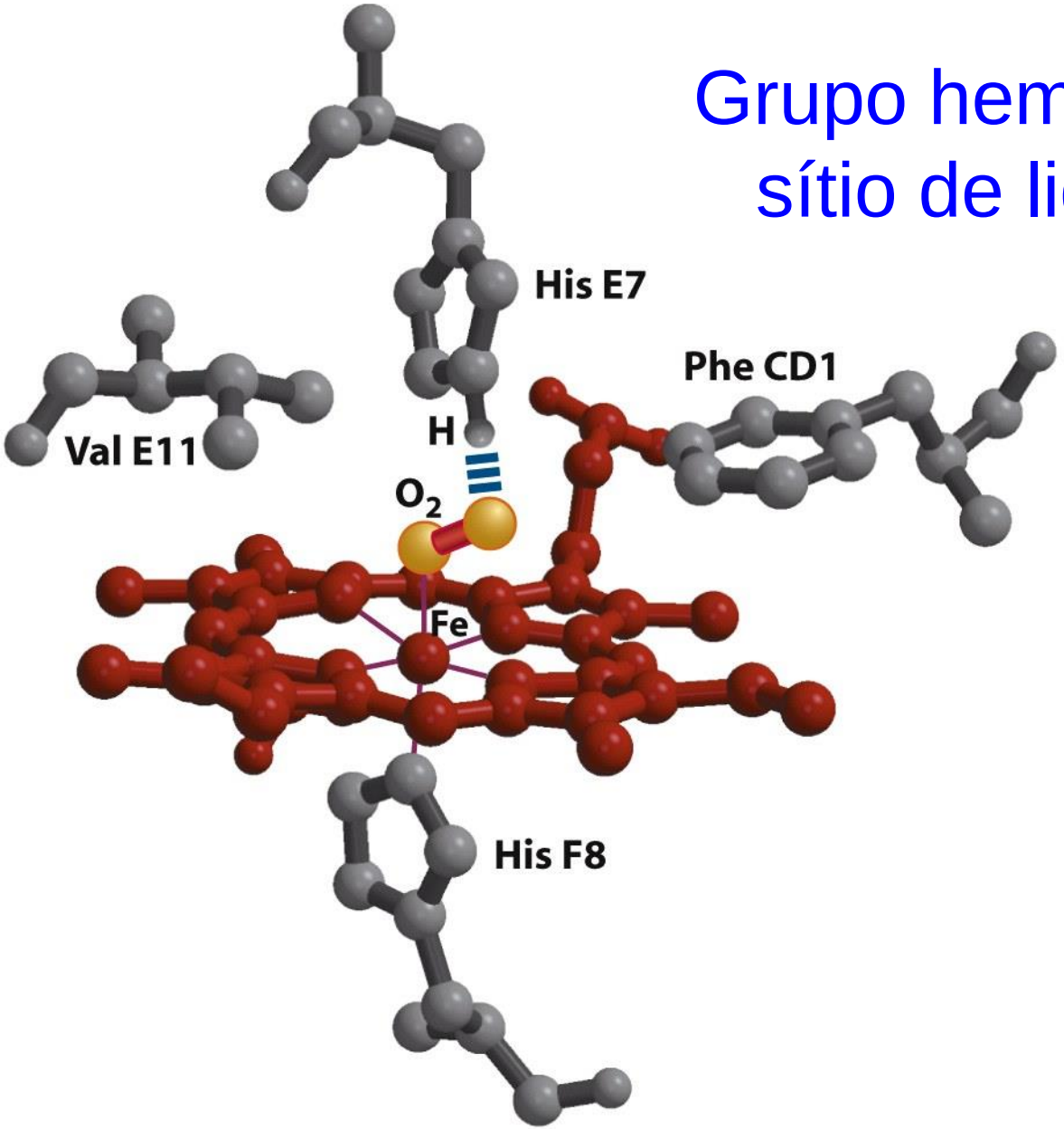


Figure 5-1
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Grupo heme faz parte do sítio de ligação ao O_2



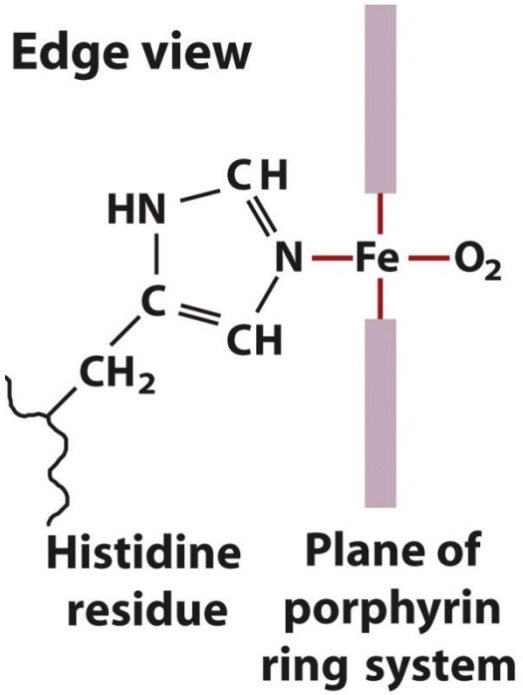


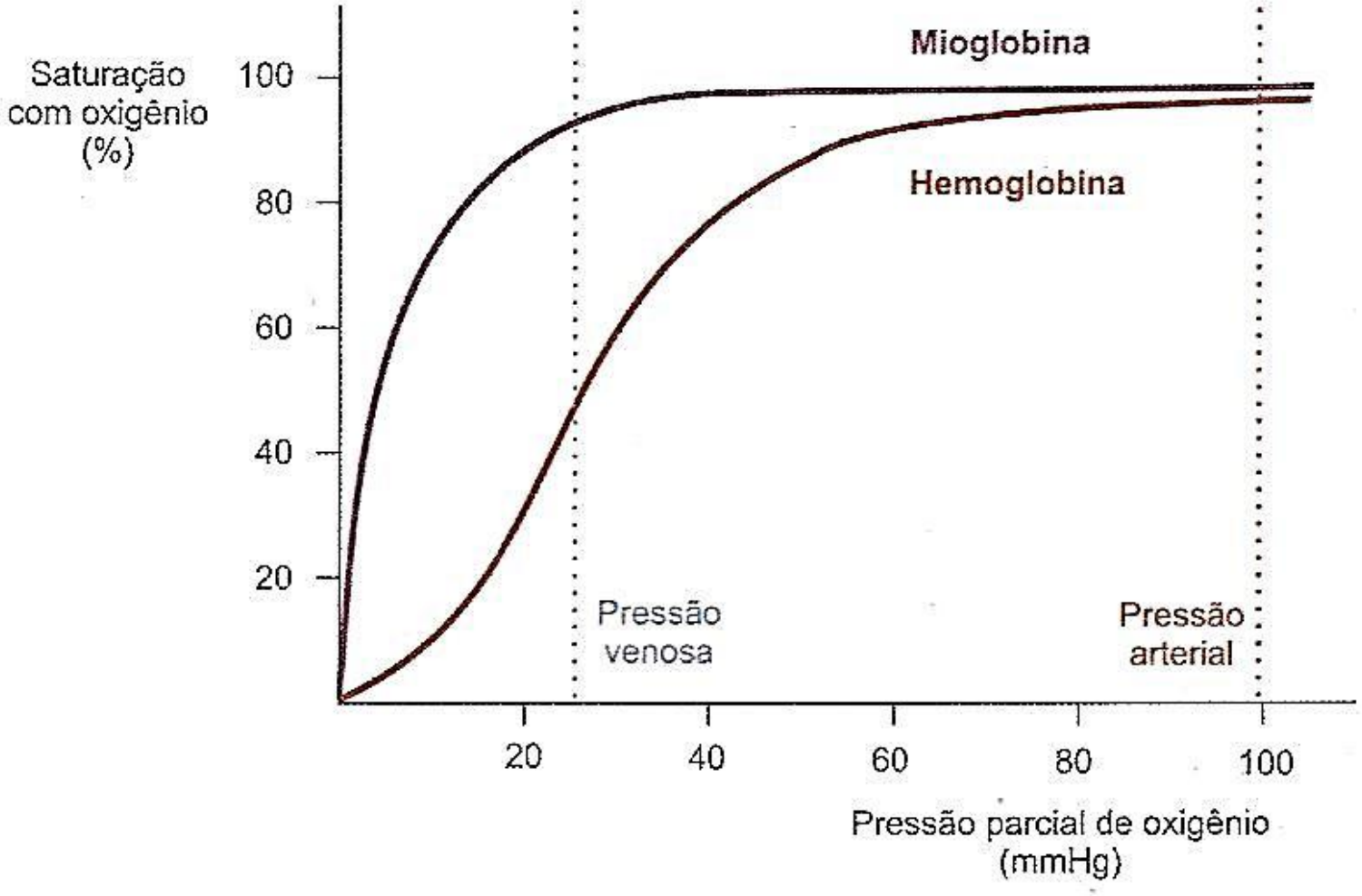
Figure 5-5c
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

e 5-2
ger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
W. H. Freeman and Company

Ligações do Fe^{2+} no heme

- O átomo de ferro II do heme faz 6 ligações com:
  - 4 N do anel porfirina (2 coordenadas e 2 covalentes)
  - N da His F8 (coordenada)
  - O_2 (na oxiHb) ou com H_2O (na desoxi Hb) (coord.)
- Ligações coordenadas:
  - o par de elétrons compartilhado vem do átomo ligante (no caso, dos N ou do O)
  - são mais fracas que as ligações covalentes “normais”, onde um elétron de cada átomo é compartilhado

Ligação de O_2 a Hb e Mioglobina



Por que a forma da curva é diferente?

Cooperatividade

- Proteínas com mais de um sítio de ligação
- Ligação de um ligante aumenta afinidade pela ligação de outro ligante
- Curva de ligação sigmoidal

- Afinidade de ligação do primeiro sítio é menor que a dos sítios seguintes

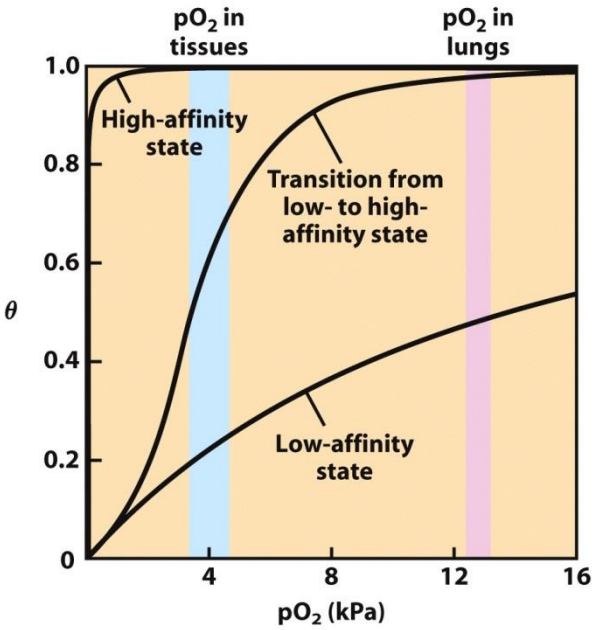
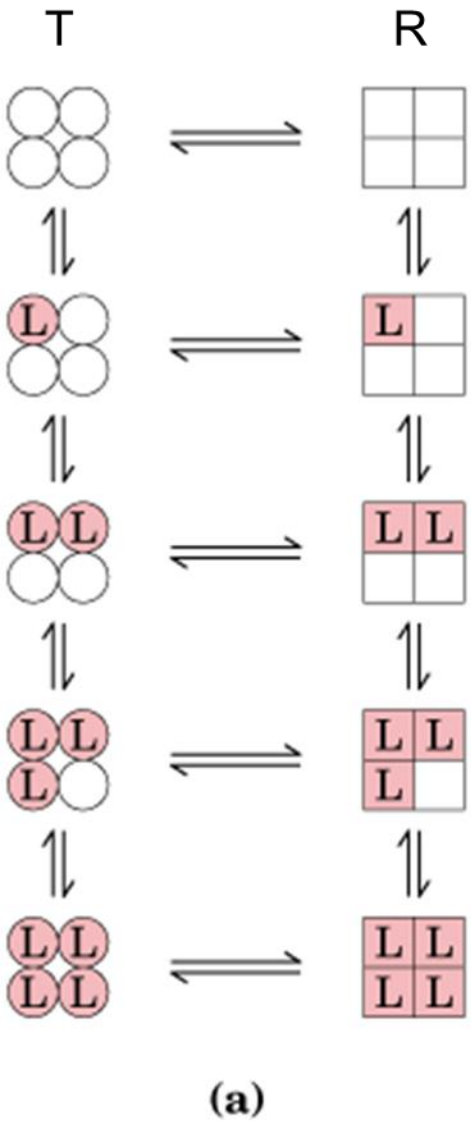


Figure 5-12
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Modelo para Cooperatividade em Hb



1) Proteína multimérica e simétrica

2) Cada subuinidade pode existir em 2 estados conformacionais (T e R). Estes estados estão em equilíbrio.

3) Simetria é conservada durante as mudanças conformacionais (“tudo ou nada”).

4) O ligante tem maior afinidade para a conformação R do que a conformação T.

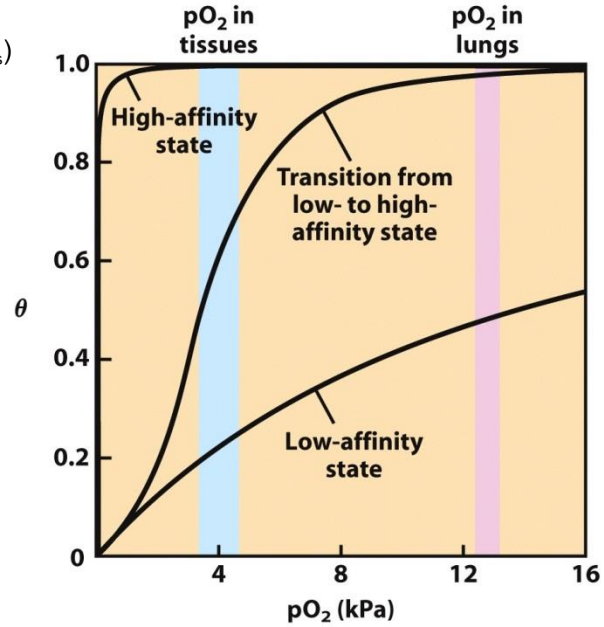
5) A afinidade para o estado T ou R não depende de número de ligantes. Porém, a transição para a conformação R é facilitada conforme aumenta o número de ligantes

L_0 = constante de equilíbrio entre T e R
= [To]/[Ro]

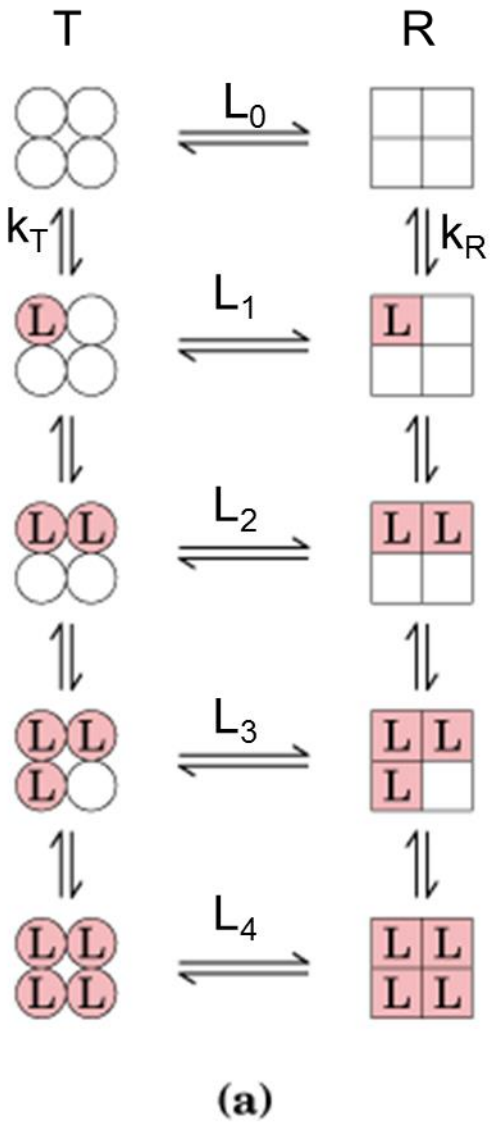
k_R e k_T saõ as constantes de dissociação (K_{diss}) dos estados R e T para o ligante

Proposta por
Jacques **Monod**
Jeffries **Wyman**
Jean-Pierre **Changeaux**

Modelo MWC



Modelo para Cooperatividade em Hb



1) Proteína multimérica e simétrica

2) Cada subuinidade pode existir em 2 estados conformacionais (T e R). Estes estados estão em equilíbrio.

3) Simetria é conservada durante as mudanças conformacionais ("tudo ou nada").

4) O ligante tem maior afinidade para a conformação R do que a conformação T.

5) A afinidade para o estado T ou R não depende de número de ligantes. Porém, a transição para a conformação R é facilitada conforme aumenta o número de ligantes

L_0 = constante de equilíbrio entre T e R
= [To]/[Ro]

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

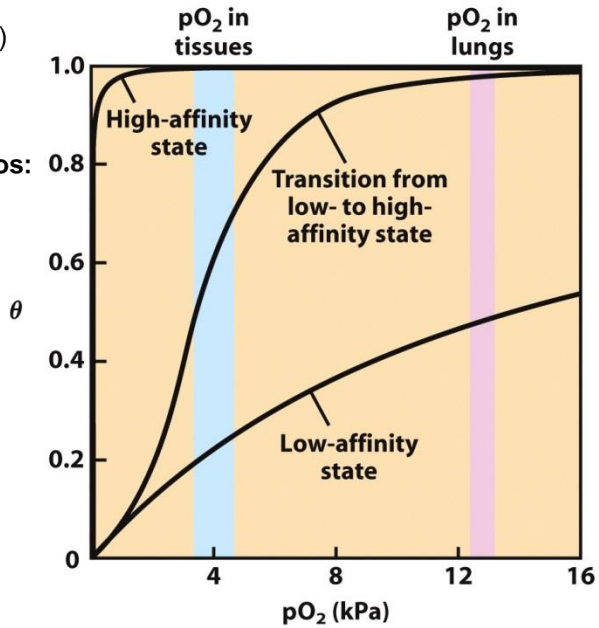
Cooperatividade se deriva do acoplamento energético dentro dos ciclos termodinâmicos:

$$L_1 k_T = L_0 k_R$$

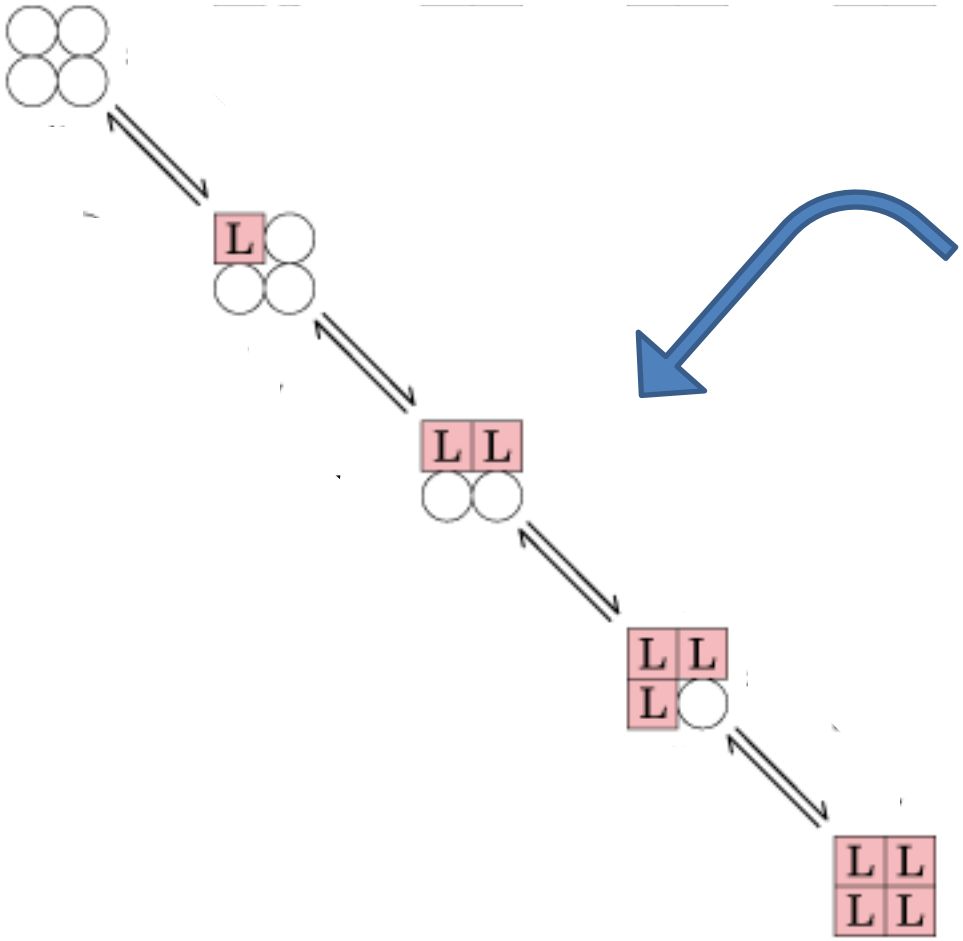
$$\rightarrow \boxed{L_1 = L_0 k_R / k_T}$$

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

$$\boxed{L_n / L_0 = (k_R/k_T)^n}$$



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



(b)

1) A ligação do ligante induz uma mudança conformacional em uma subuindade

2) Estas mudanças são transmitidas para outras subunidades, modificando sua afinidade para ligante.

3) Se o acoplamento é fraco, estados não simétricos podem existir

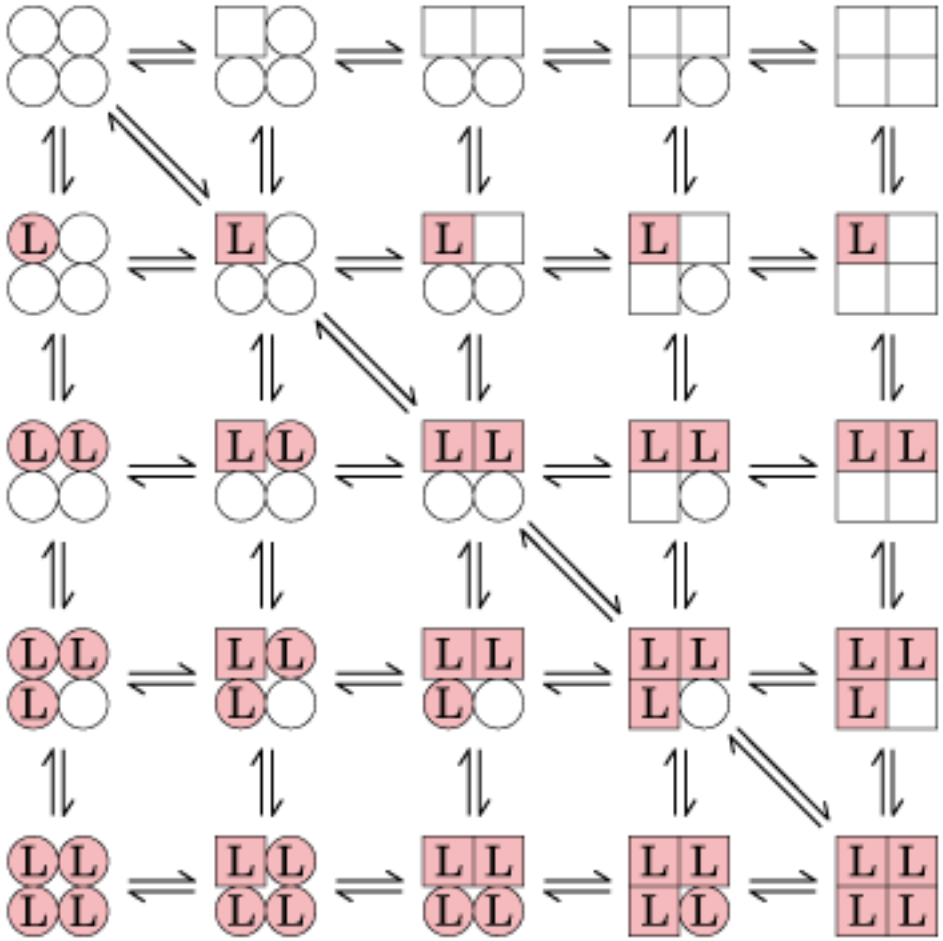
4) Se o acoplamento é forte, as mudanças conformacionais são simultâneas e o oligômero mantém sua simetria (aproxima modelo “tudo ou nada” do MWC)

KNF
(acop.
fraco)

MWC

MWC

Modelo Combinado



(b)

Ligação do oxigênio induz uma mudança de conformação em uma subunidade, que é transmitida às outras

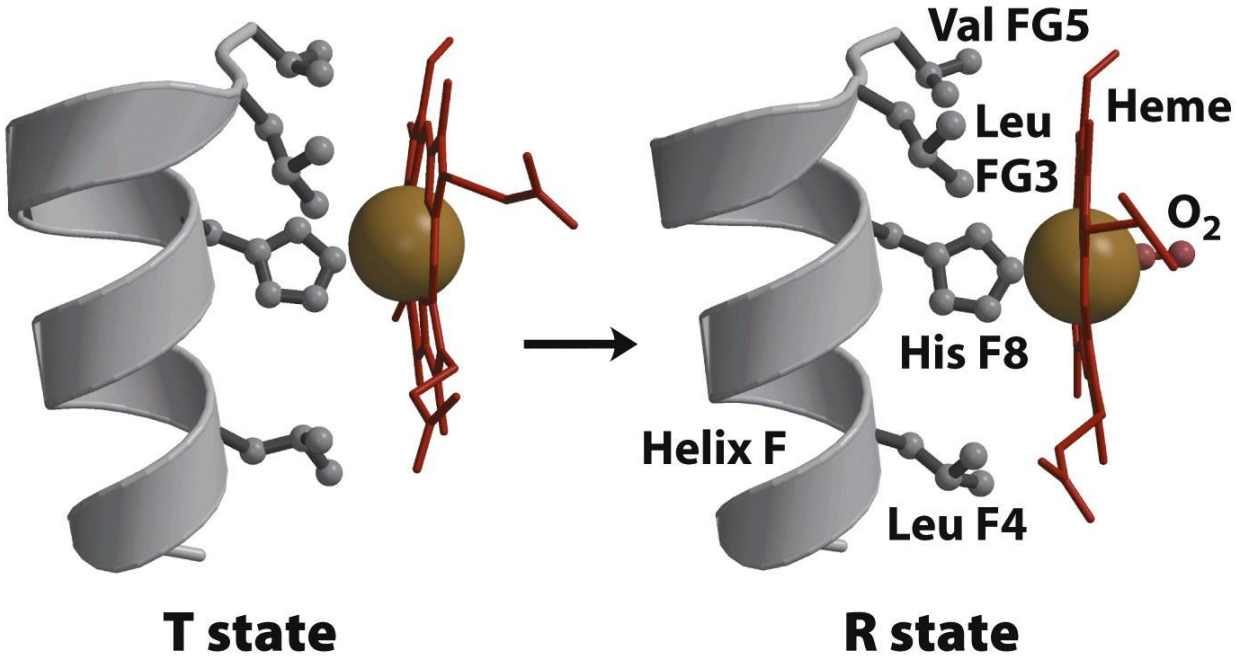
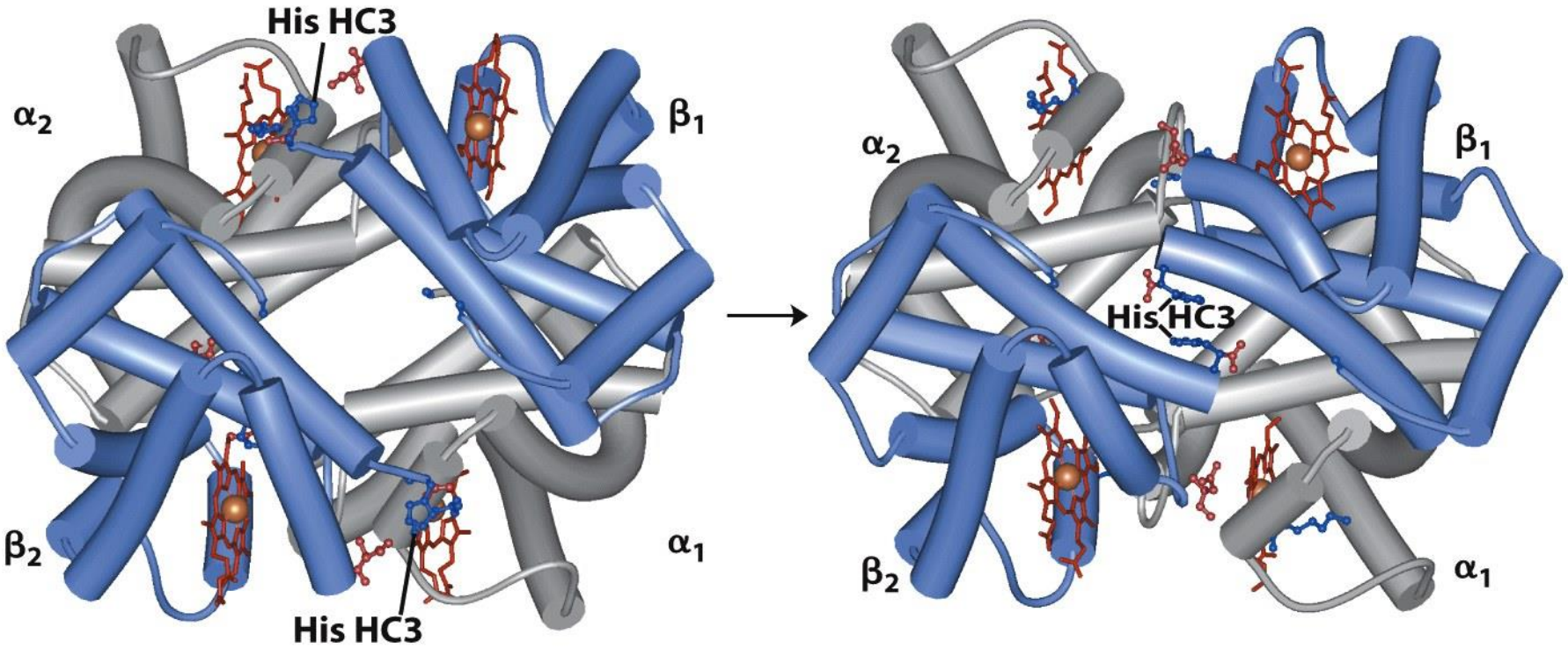


Figure 5-11
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

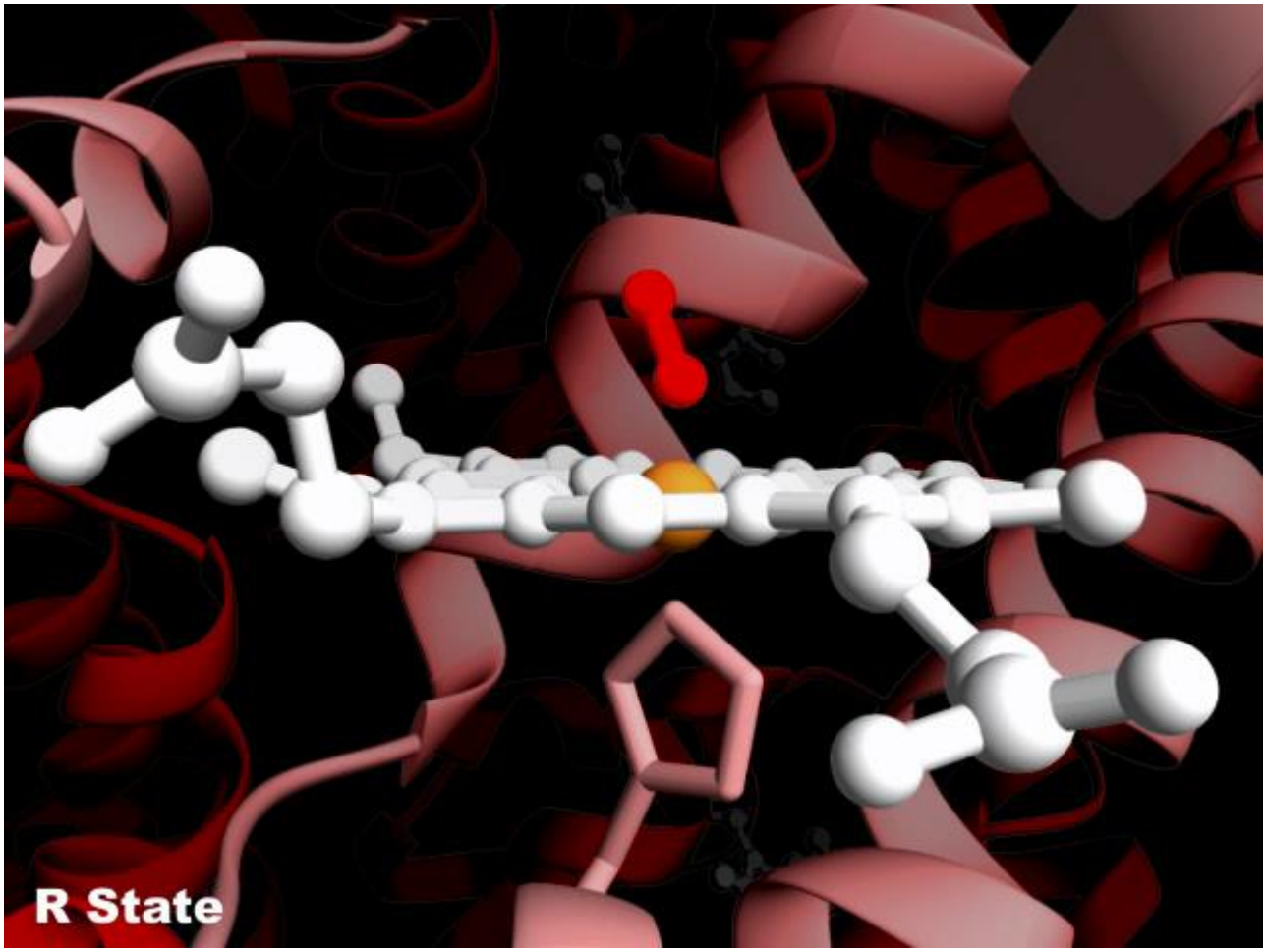
Hemoglobina tem duas estruturas



Tenso, (desóxiHb) Relaxado, (óxiHb)

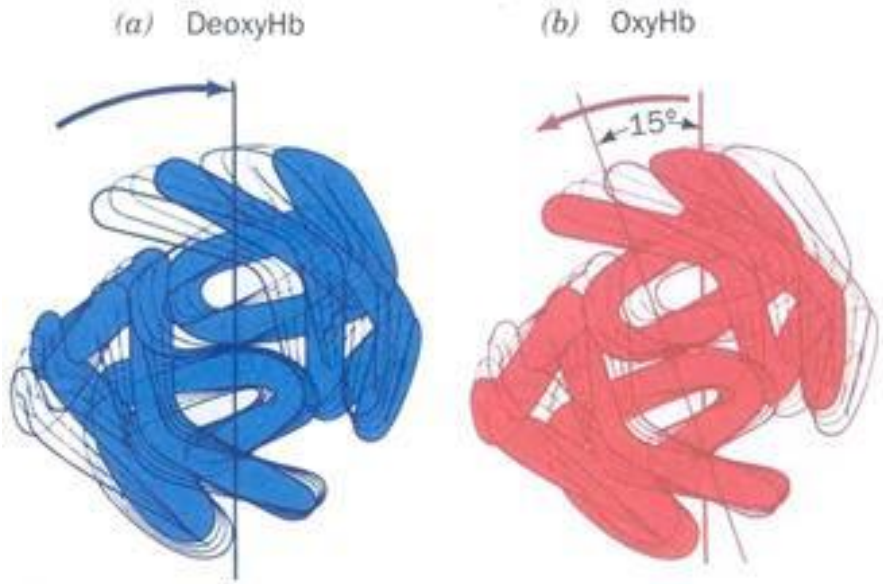
- Mudanças nas intefaces $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$

Ligação de oxigênio

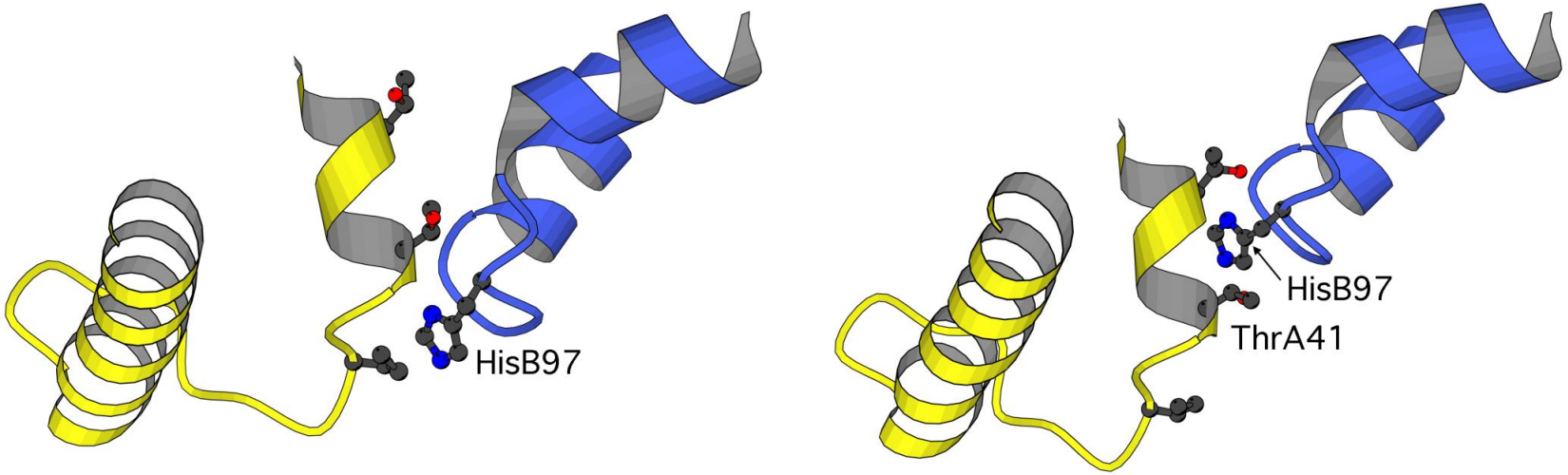


http://www.biomedicaltimes.com/downloads/animations/molbio/

Os contatos α1-β2 e α2-β1 tem duas posições estáveis.

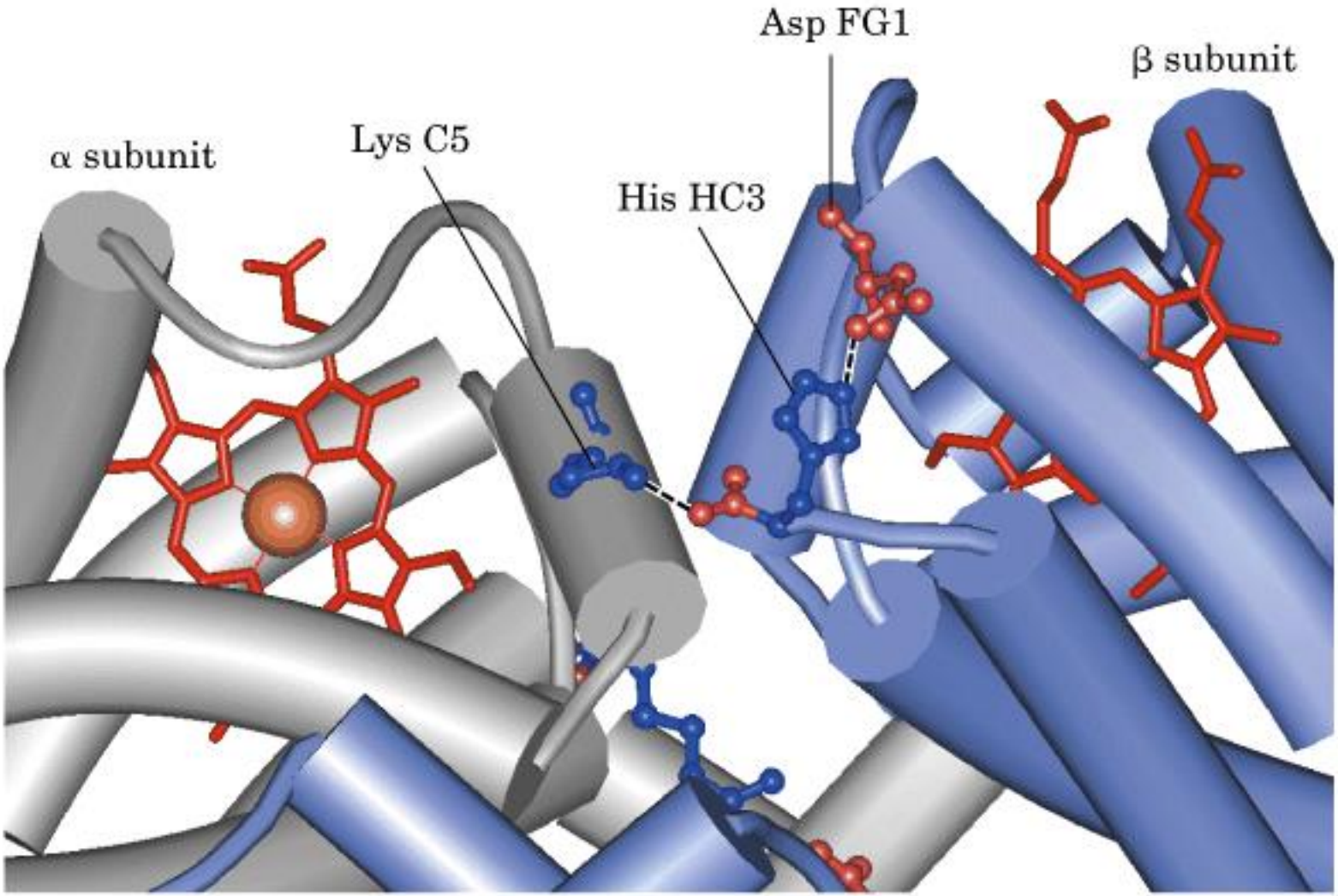


Movimentos de α1β1 relativos a α2β2



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

Pares iônicas que estabilizam o estado T da hemoglobina



(a)

Mudança no pKa dos grupos carregados por causa da mudança de conformação

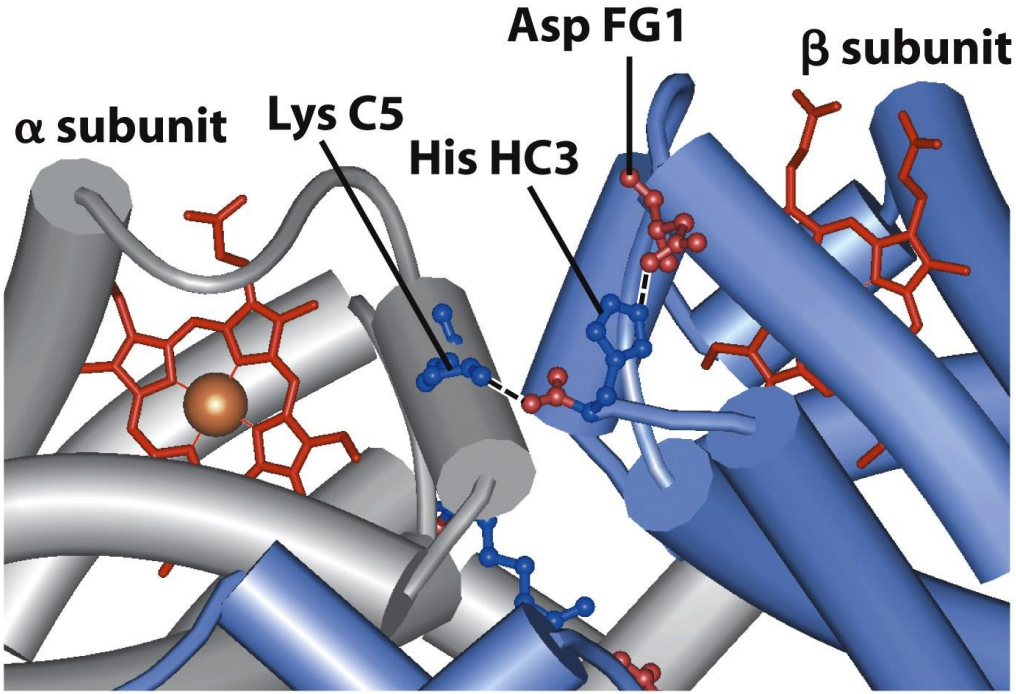


Figure 5-9a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

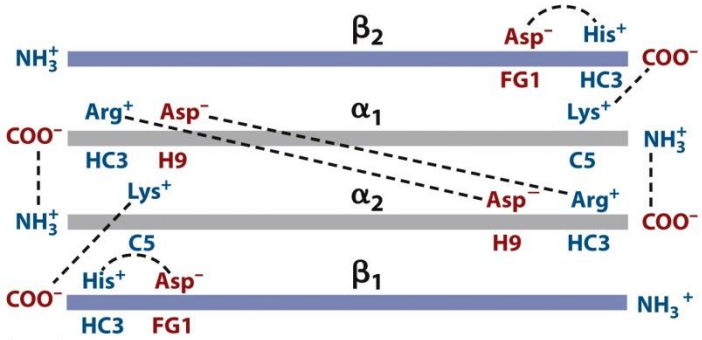


Figure 5-9b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

- Desóxi-Hb “carrega” mais prótons (H^+):
- pontes salinas estabilizam forma “T”
- menor afinidade pelo O_2

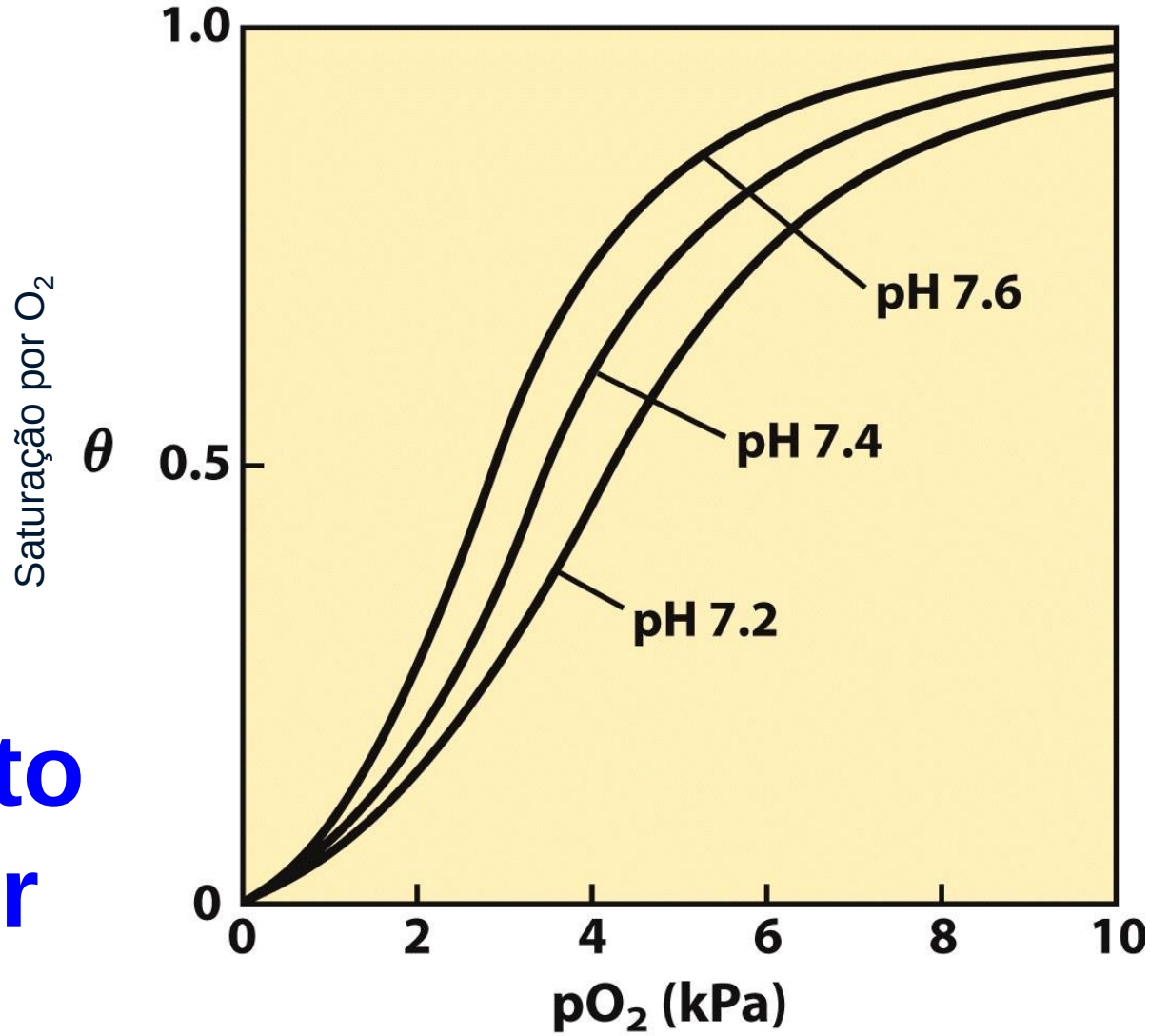
Você pode explorar as moléculas de Mioglobina e Hemoglobina empregando um programa de gráfica molecular Pymol ou Chimera

1) Do site do e-disciplinas baixar os arquivos dos coordenados
de dessoxihemoglobina (2HHB)
oxihemoglobina (1HHO)
e mioglobina humana (3RGK),

2) Abrir Pymol ou Chimera e abrir os arquivos pdb para carregar uma das moléculas.

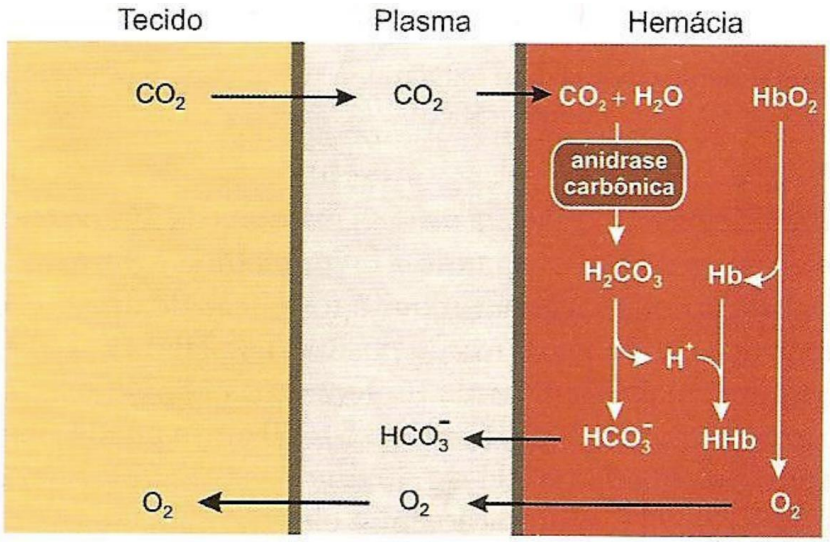
3) **DESAFIO**: Tentar sobrepor subunidades α1β1 de oxiHb em cima das subunidades α1β1 de dessoxiHb e comparar o resultante diferenças nas interfaces entre as subunidades α1β2 e α2β1 nas duas estruturas.

Efeito do pH na afinidade por O_2

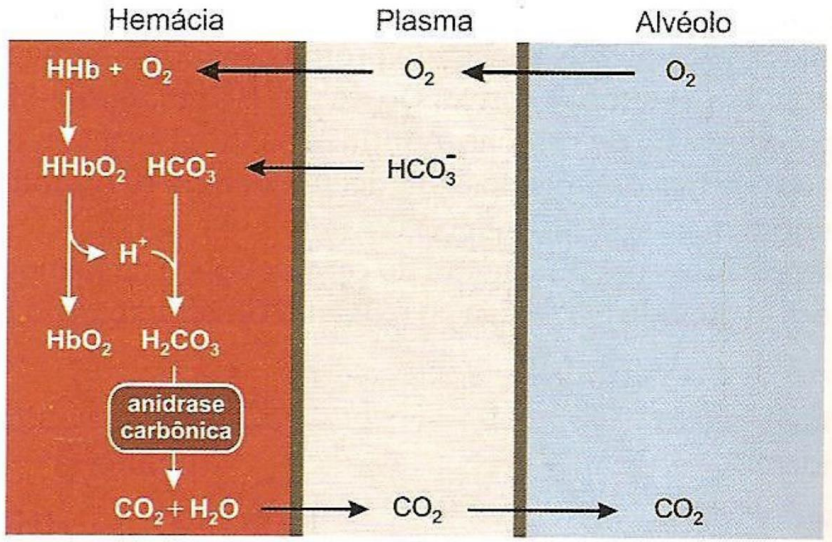


Efeito Bohr

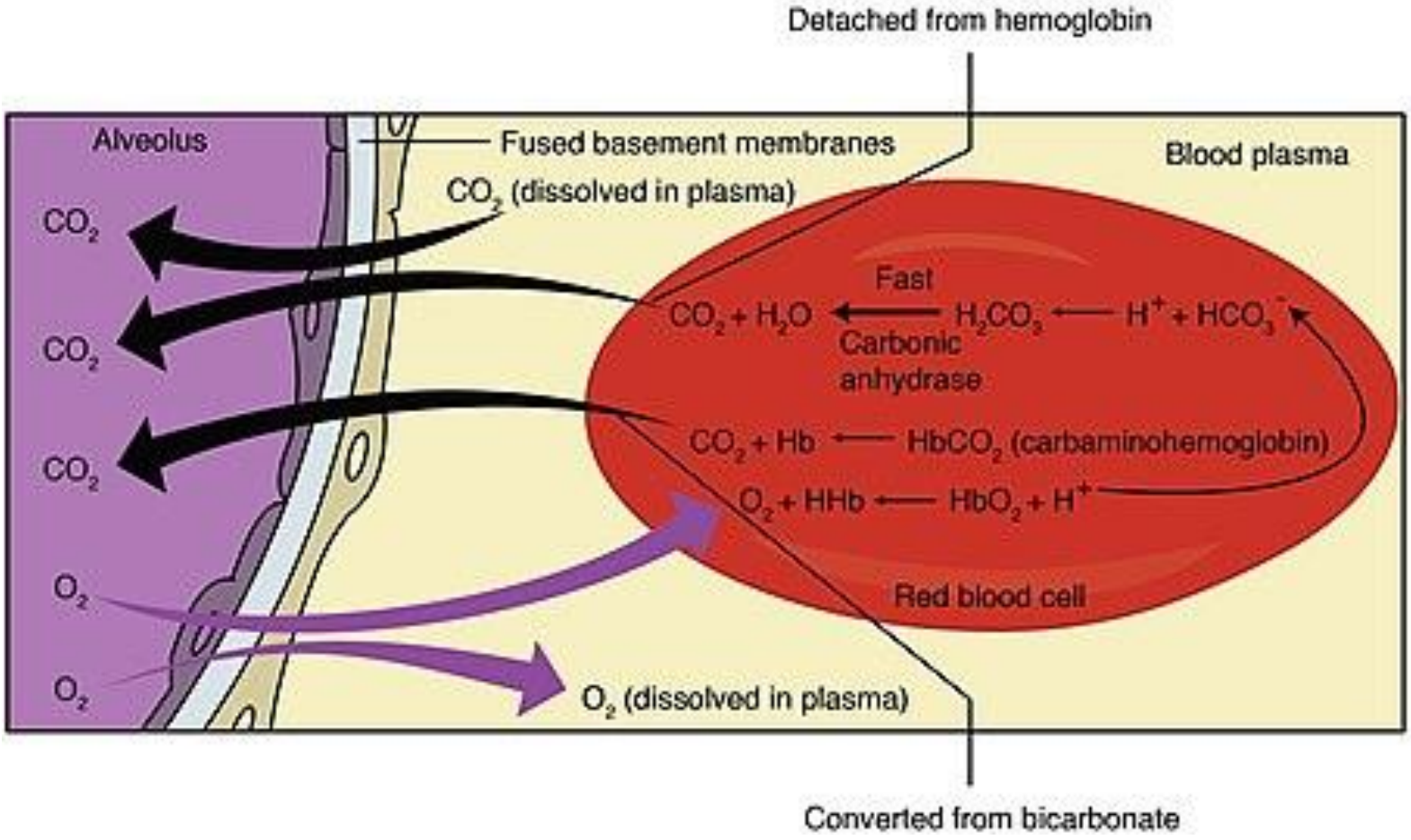
Tamponamento de Sangue

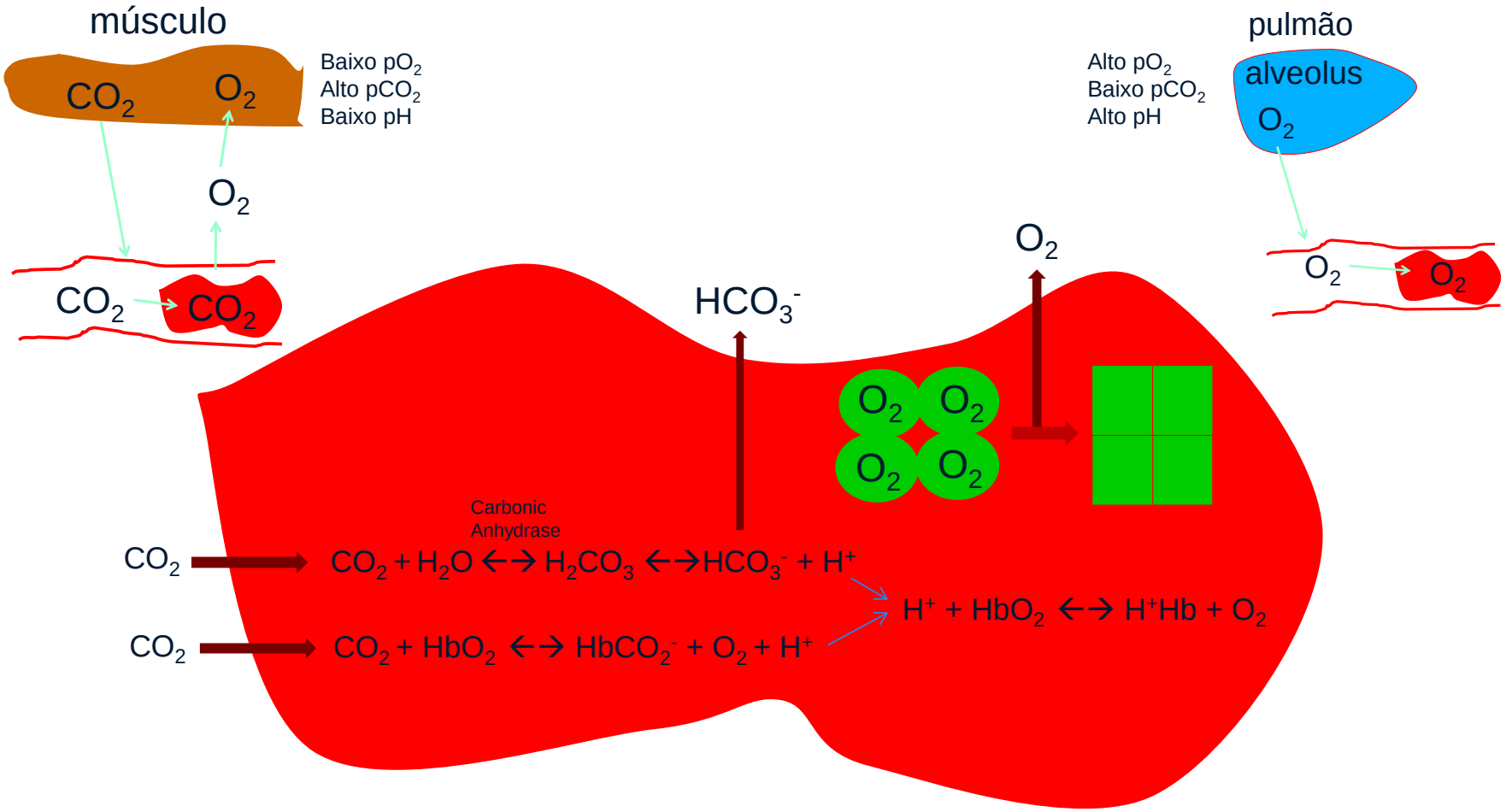


(a)



(b)

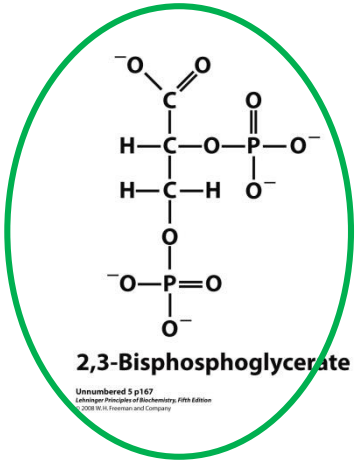

Detached from hemoglobin
Alveolus
Fused basement membranes
Blood plasma
CO_2 (dissolved in plasma)
CO_2
CO_2
CO_2
O_2
O_2
Fast
$CO_2 + H_2O \longleftarrow H_2CO_3 \longleftarrow H^+ + HCO_3^-$
Carbonic anhydrase
$CO_2 + Hb \longleftarrow HbCO_2$ (carbaminohemoglobin)
$O_2 + HHb \longleftarrow HbO_2 + H^+$
Red blood cell
O_2 (dissolved in plasma)
Converted from bicarbonate

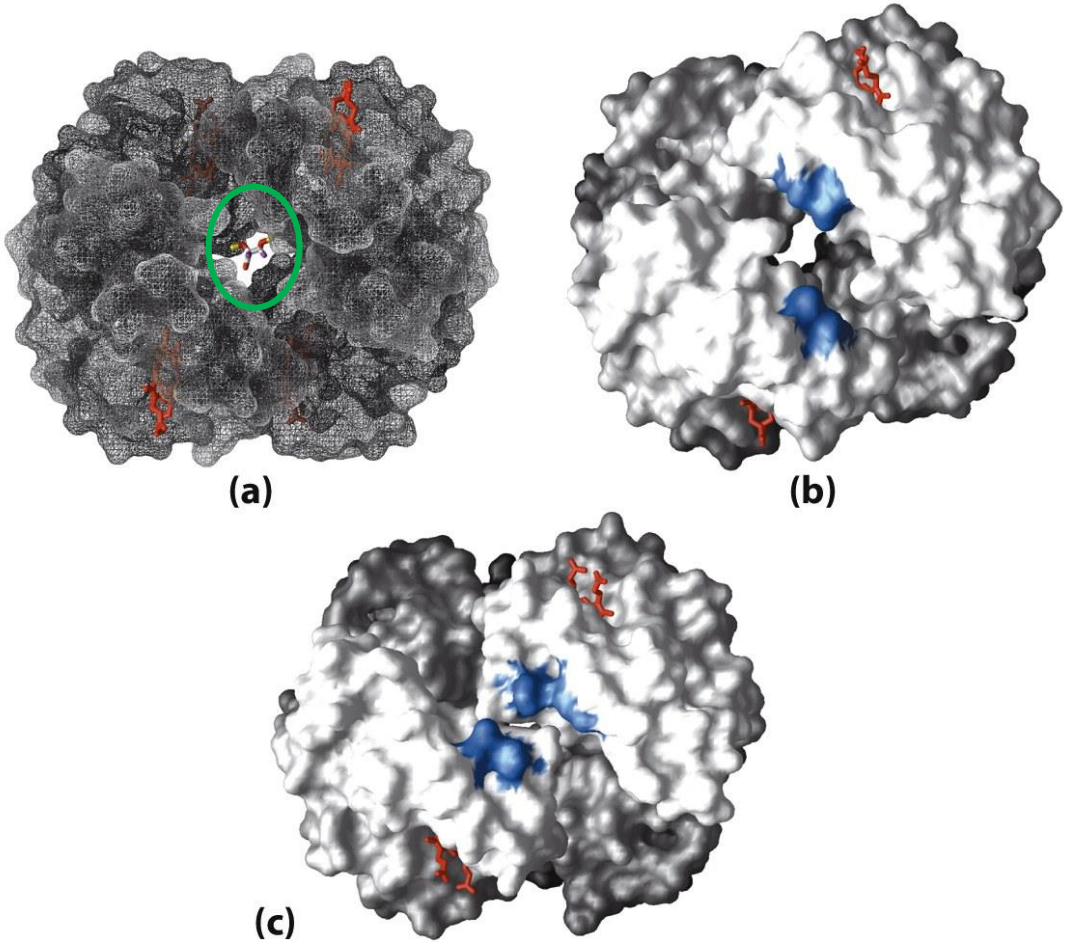


Transporte de O_2:
i) HbO_2
ii) O_2 dissolvido no sangue
Troca de CO_2 na pulmão:
i) ↓pCO_2
ii) HbO_2 estabiliza estado R
Liberando CO_2 de Hb-CO_2^-
e H^+ de H^+Hb

Transporte de CO_2:
i) Hb-CO_2^- (carbaminoHb) (23%)
ii) HCO_3^- no plasma (70%)
iii) CO_2 dissolvido no sangue (7%)
Troca de O_2 no músculo:
i) ↓pO_2
ii) H^+Hb estabiliza o estado T
iii) CO_2 estabiliza o estado T

Regulação da ligação de O_2 por 2,3-Bisfosfoglicerato





T

R

Figure 5-18
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

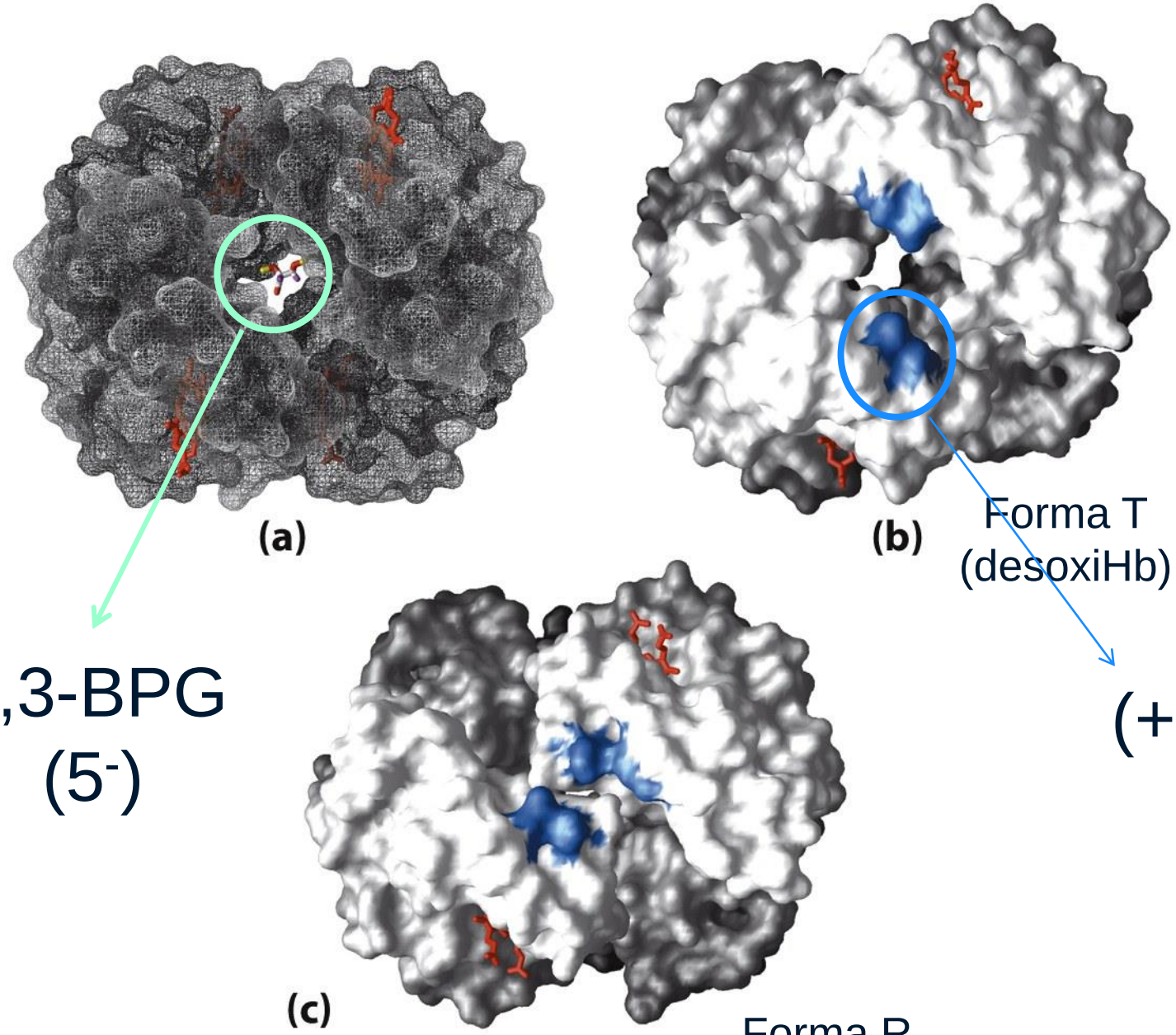
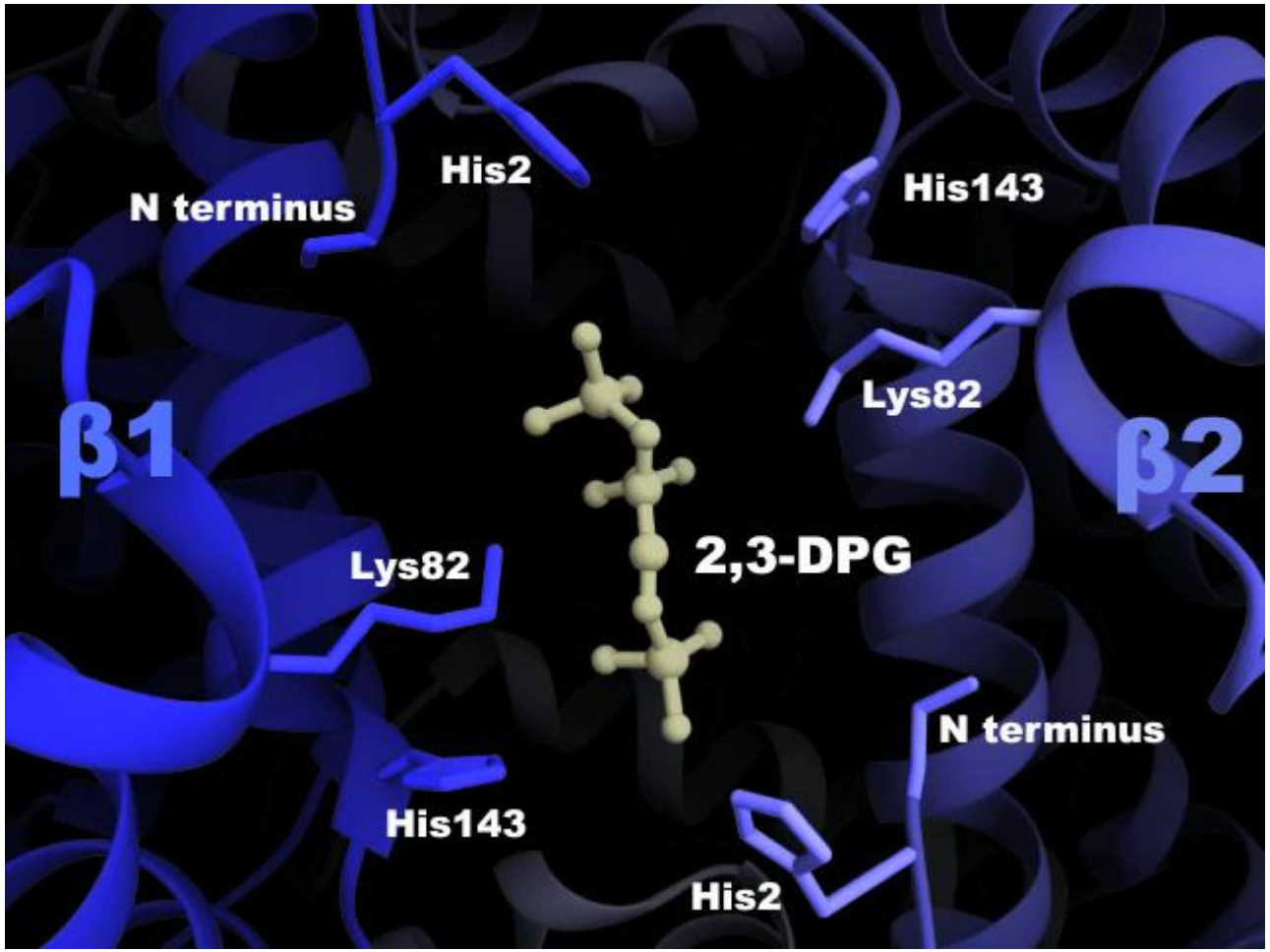


Figure 5-18
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Ligação do 2,3-BPG



http://www.biomedicaltimes.com/downloads/animations/molbio/

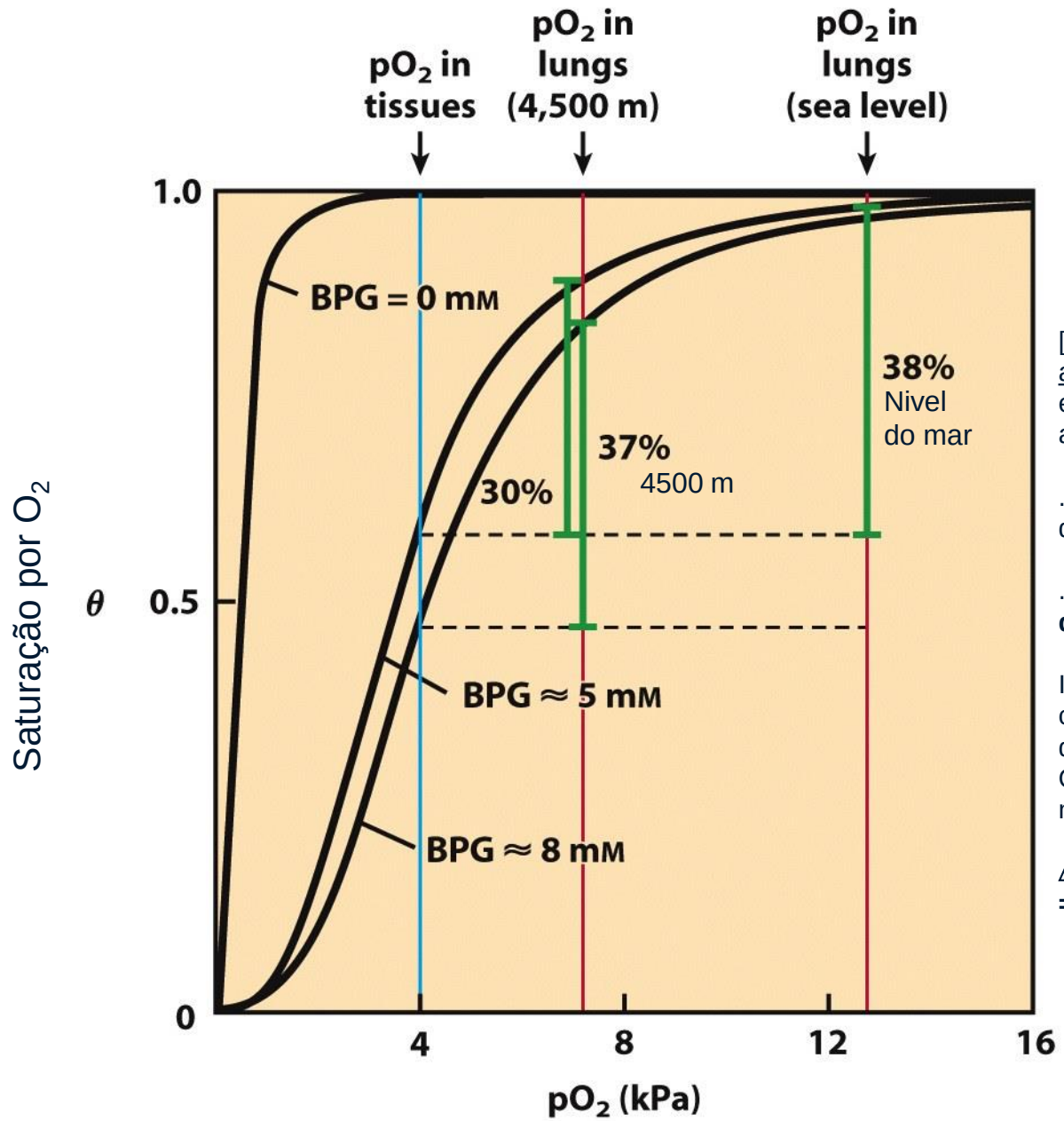


Figure 5-17
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

[BPG] <u>aumenta</u> em altas altitudes

... A captação de O_2 é reduzida

... mas **a liberação de O_2 aumenta ainda mais**.

Isso mantém constante a quantidade O_2 liberado na circulação

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

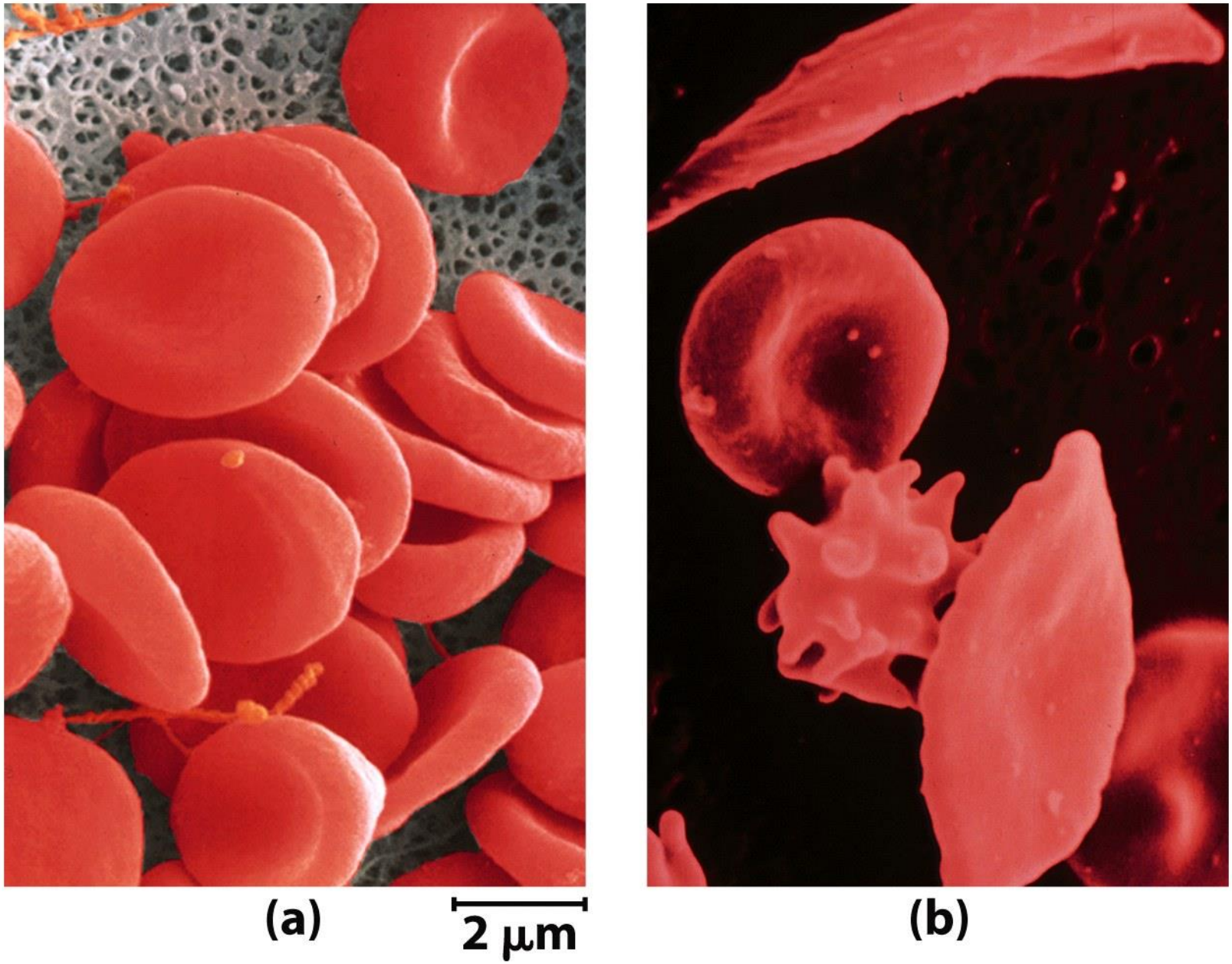


Figure 5-19
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Anemia falciforme

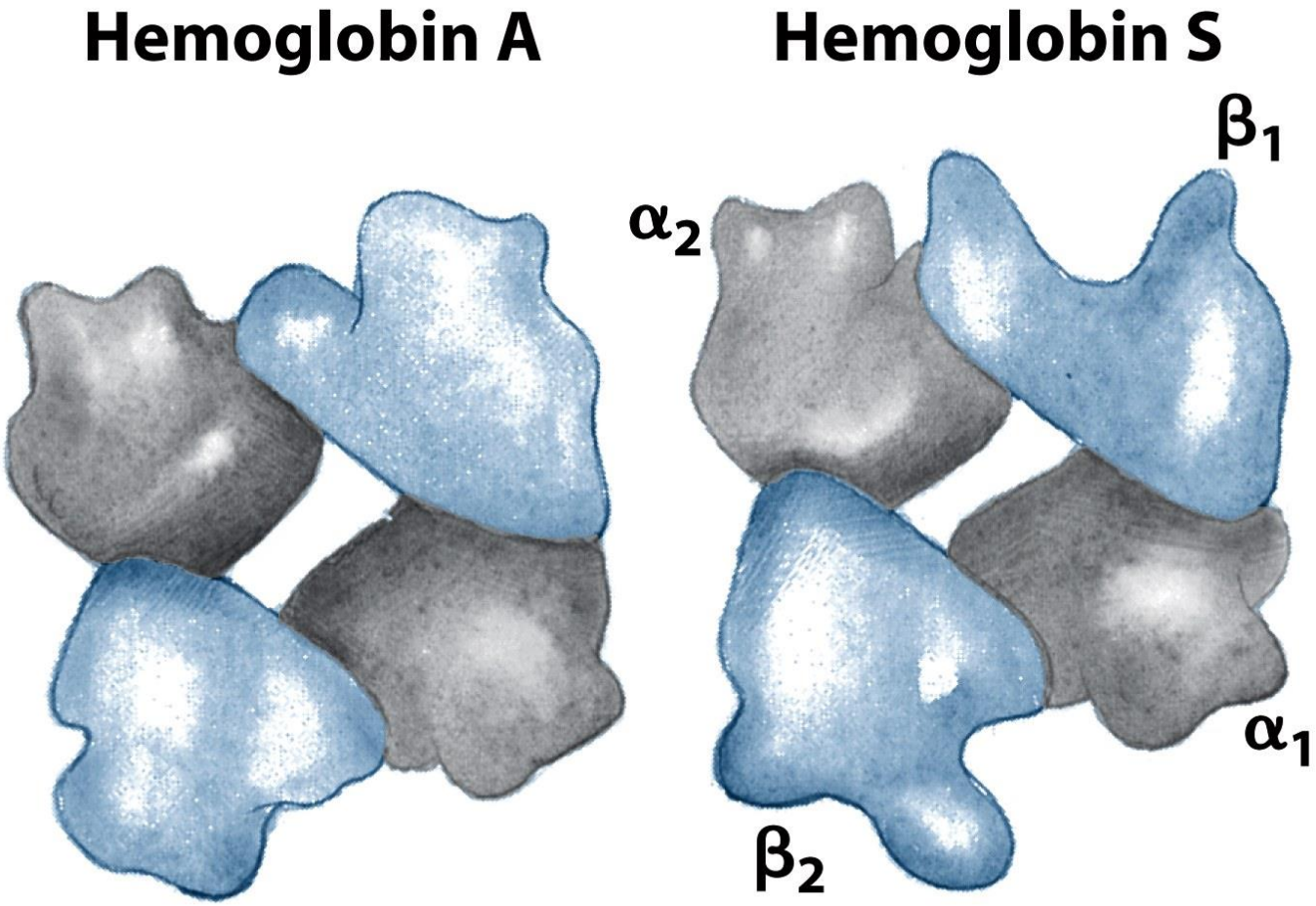


Figure 5-20a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Mutação Glu→Val (β)

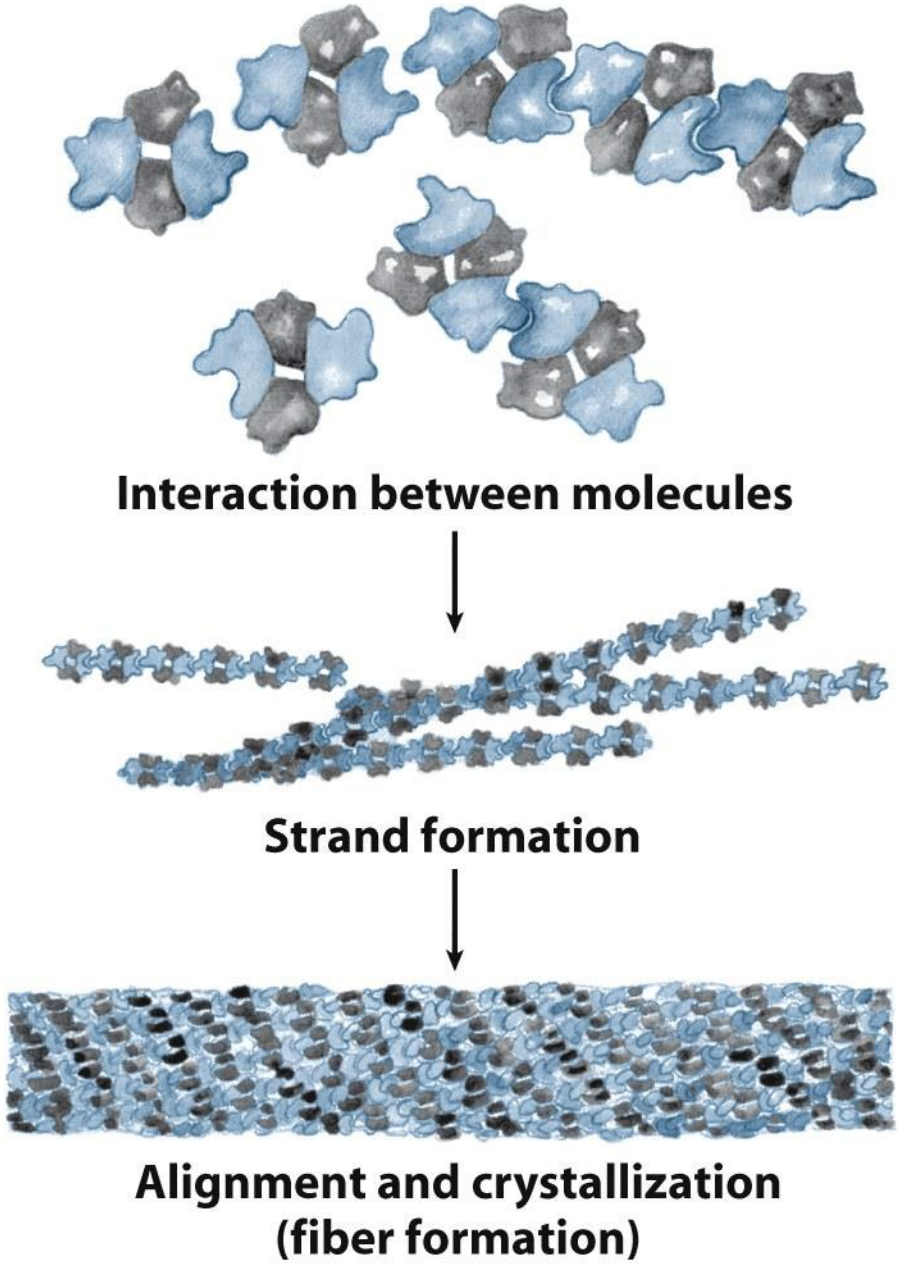
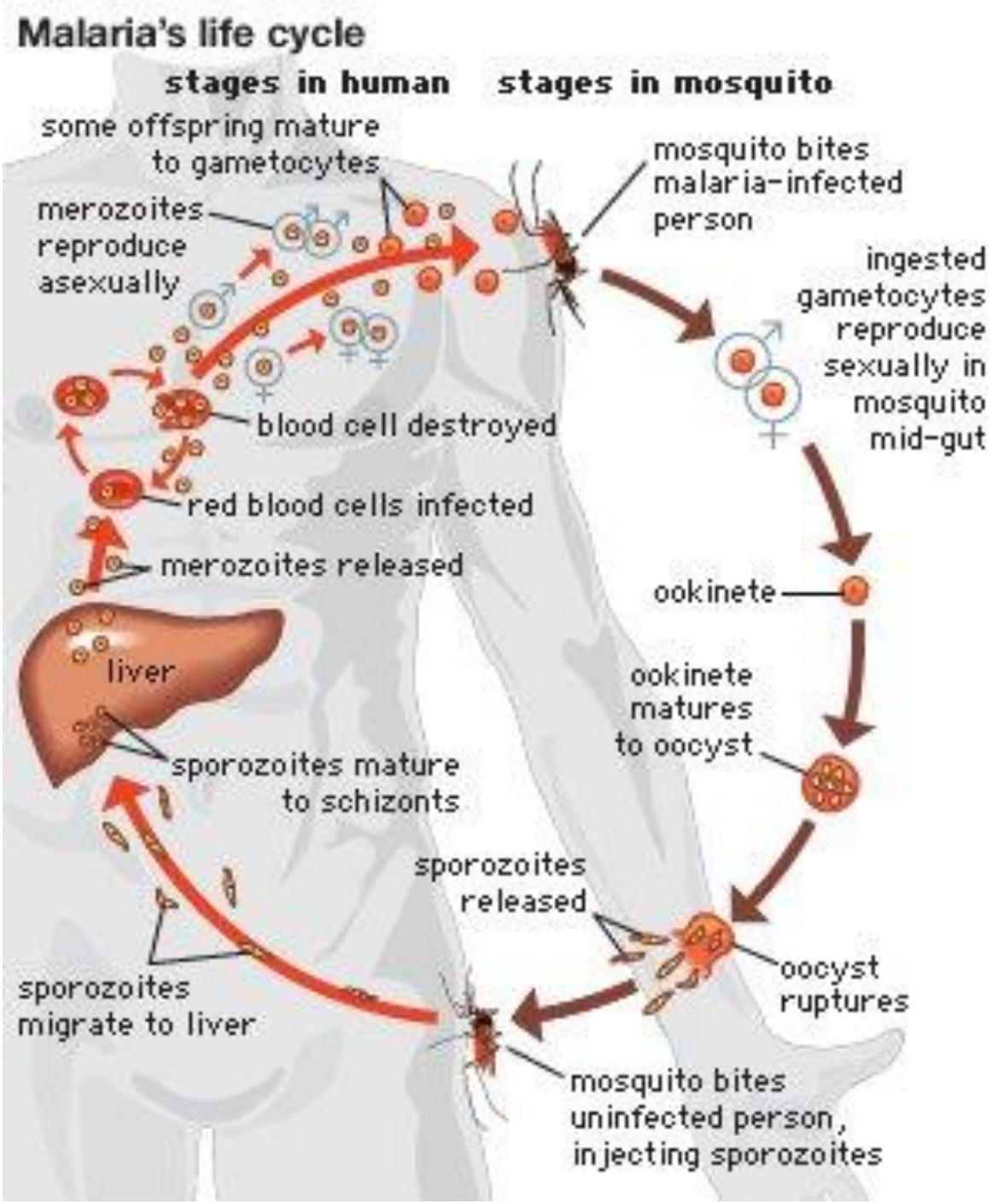
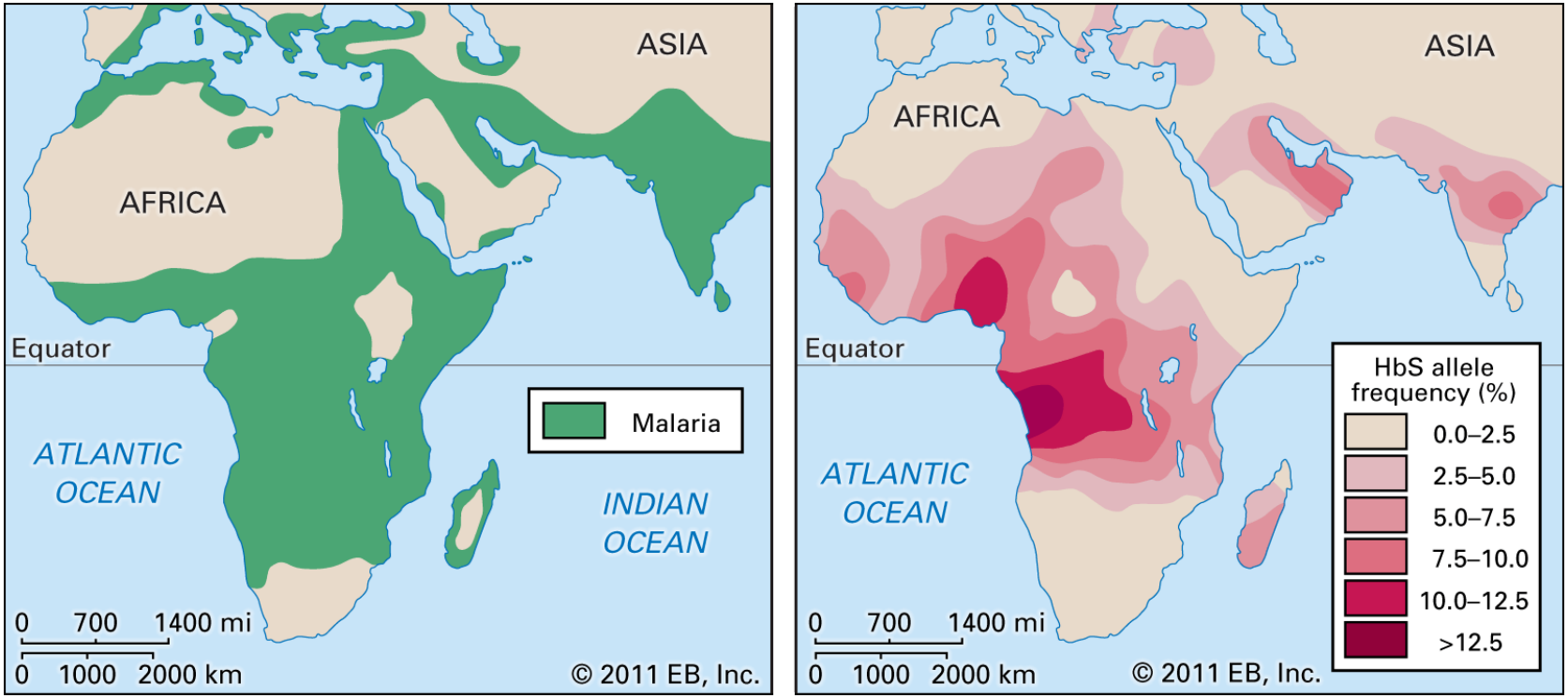


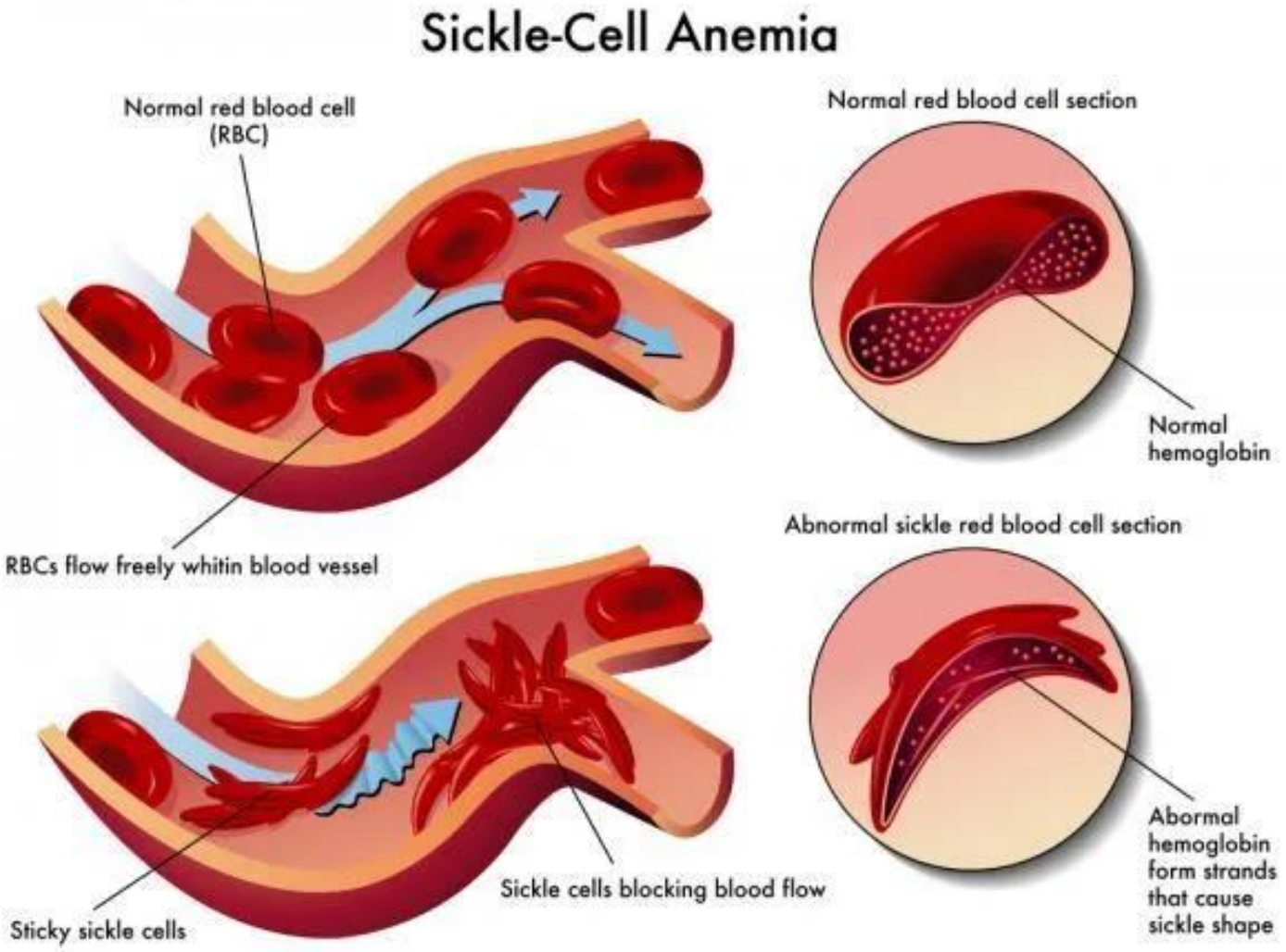
Figure 5-20b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company


Malaria's life cycle
stages in human
stages in mosquito
some offspring mature to gametocytes
merozoites reproduce asexually
mosquito bites malaria-infected person
ingested gametocytes reproduce sexually in mosquito mid-gut
blood cell destroyed
red blood cells infected
merozoites released
ookinete
liver
ookinete matures to oocyst
sporozoites mature to schizonts
sporozoites released
oocyst ruptures
sporozoites migrate to liver
mosquito bites uninfected person, injecting sporozoites



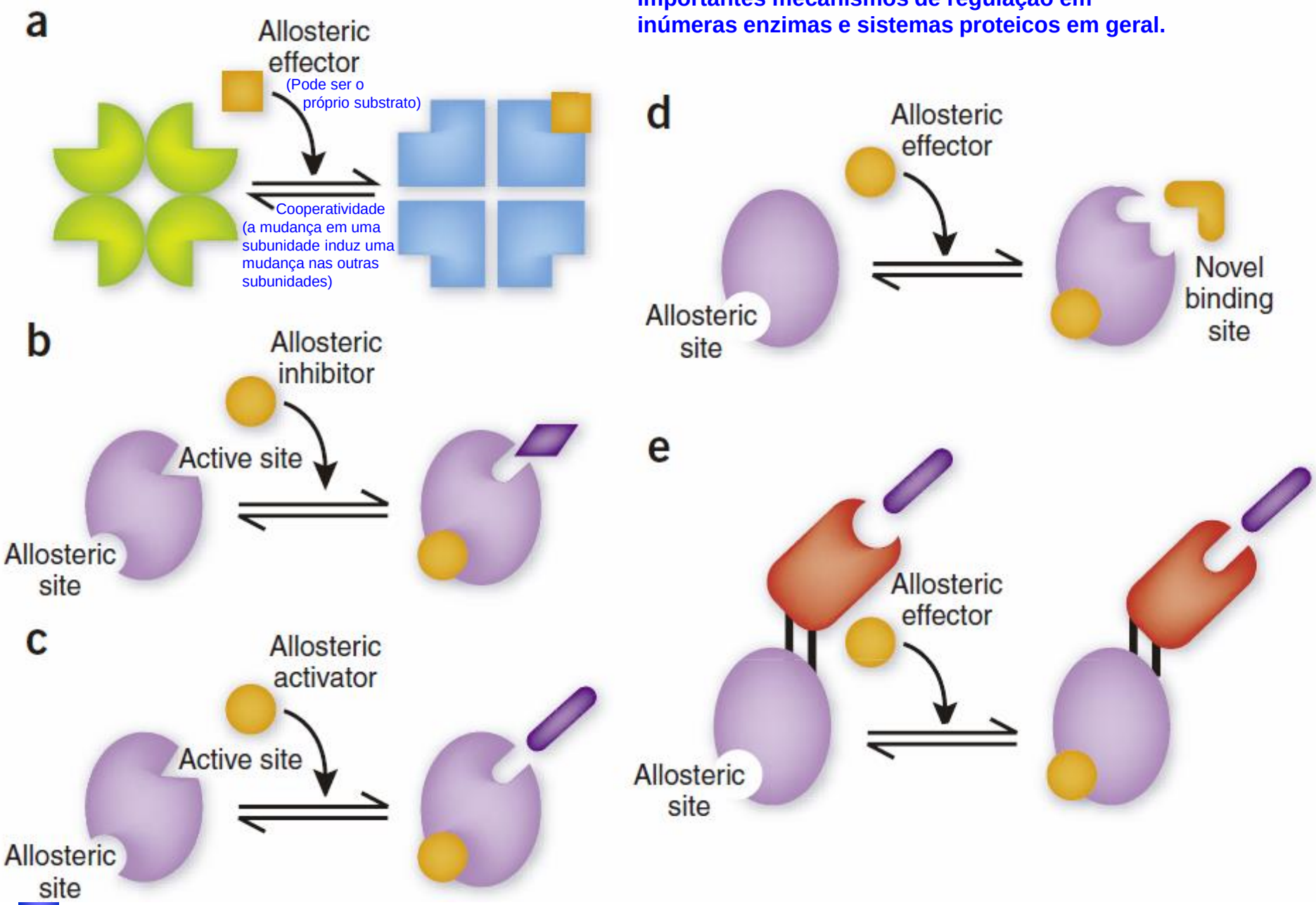
Malária e anemia falciforme.
Distribuição da malária e a distribuição da anemia falciforme se sobrepõem em áreas da África, sul da Ásia e Mediterrâneo.

A persistência do gene HbS, que causa a anemia falciforme, é explicada pelo fato de os heterozigotos serem resistentes à malária.



Ser heterozigoto HbA/HbS (AS) em um ambiente de malária parece ser melhor do que não ter genes falciformes (AA) ou ter 2 genes falciformes (SS).

Eritrócitos HbA/HbS infectados por parasitas tendem a formar foice, um processo que pode resultar em sua destruição prematura pelo baço.

Em uma pessoa que sofre de anemia falciforme (homozigoto p. gene HbS), os efeitos da febre, diarréia e vômito provocaram uma crise que não pode superar qualquer efeito benéfico da doença falciforme contra o parasita da malária.

Alosteria (e cooperatividade) são importantes mecanismos de regulação em inúmeras enzimas e sistemas proteicos em geral.