

Proteína: estrutura e função - hemoglobina

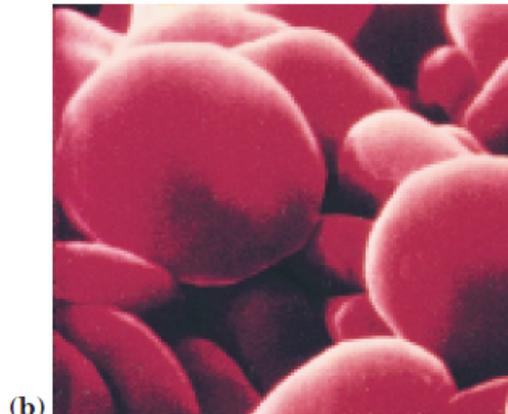
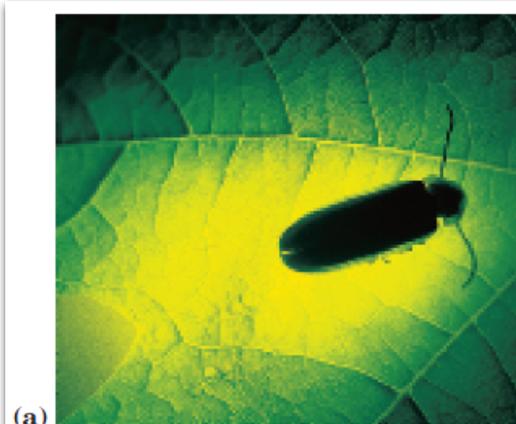
20-abr-2023

QBQ-0313

Bioquímica do Metabolismo – Nutrição Noturno

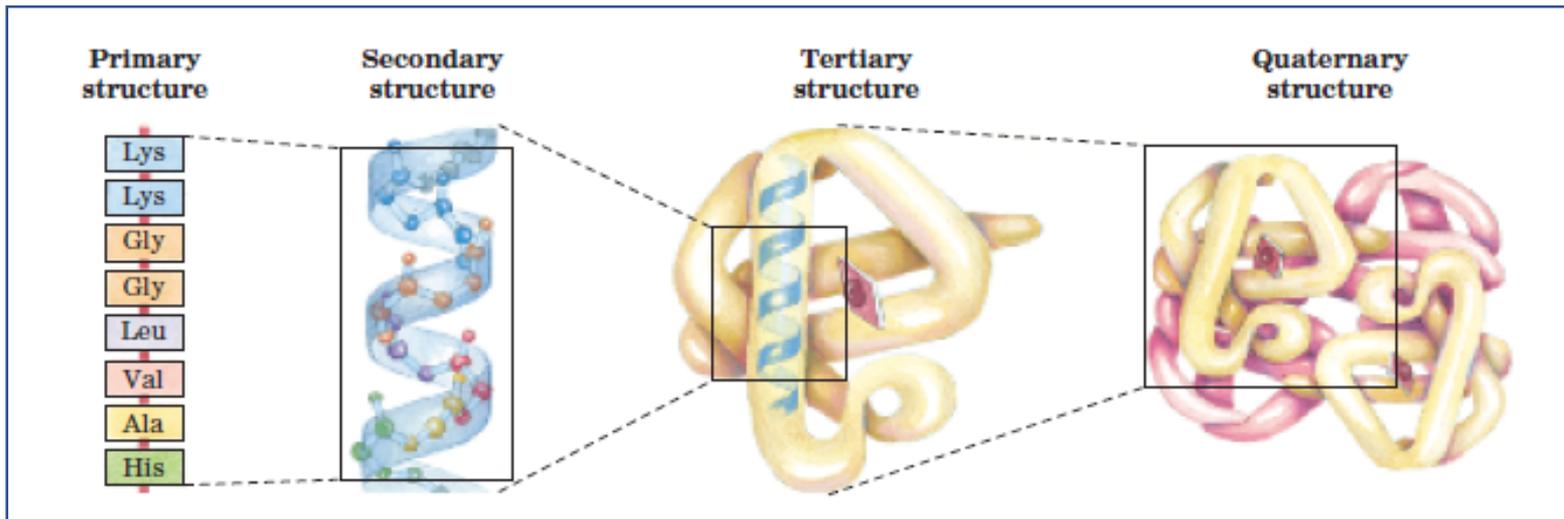
Aminoácidos, peptídios e proteínas

- As proteínas são responsáveis por praticamente todos os processos que acontecem numa célula.
- Elas apresentam propriedades e funções quase 'infinitas'.
- As proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes, presentes em todas as células.
- Proteínas são polímeros compostos pela combinação de 20 aminoácidos.
- Todas as proteínas, sejam humanas ou de bactérias, são compostas dos mesmos 20 aminoácidos.
- O mais impressionante é que as células podem produzir, a partir dos mesmos 20 aminoácidos, proteínas com propriedades absolutamente distintas.
- Por exemplo, destes 20 componentes, as células produzem enzimas, hormônios, anticorpos, a hemoglobina que transporta oxigênio, as fibras musculares, a lente dos olhos, penas, teia de aranha, o chifre do rinoceronte, unhas, e as proteínas do leite, para citar alguns exemplos.
- As enzimas, por exemplo, são os catalisadores de praticamente todas as reações biológicas.



Estrutura de proteínas

- Proteínas com dezenas ou centenas de aminoácidos poderiam assumir qualquer estrutura no espaço.
- Porém, isto não é o que se observa na prática.
- Cadeias polipeptídicas se organizam em estruturas comuns, dando origem a diversos formatos de proteínas.



Proteínas globulares e fibrosas

- Proteínas podem ser comparadas ao fio de um novelo.
- As proteínas globulares, são parecidas com o novelo, onde os fios estão enrolados e organizados.
- Já as proteínas fibrosas são iguais ao fio desenovelado.

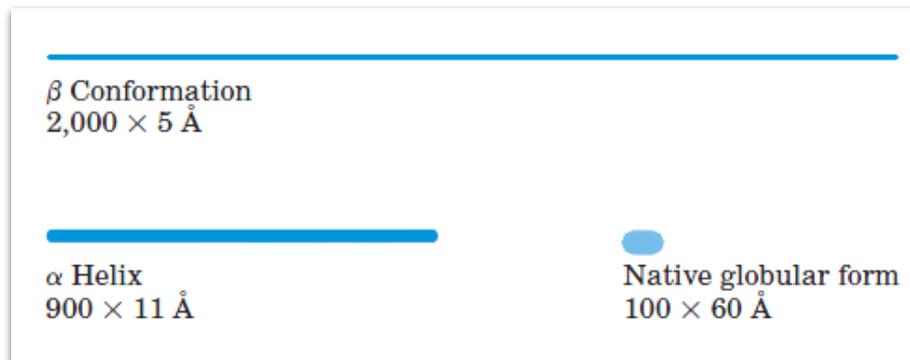


As proteínas podem ser divididas em duas grandes classes:

- As proteínas fibrosas (ou fibrilares) e
- As proteínas globulares

Proteínas globulares e fibrosas

- As proteínas pode se enovelar em diferentes formatos.
- Porém, 2 formatos principais podem ser identificados: proteínas globulares e proteínas fibrosas.
- As proteínas globulares são as mais diversas e se enovelam de uma forma mais compacta, com suas cadeias peptídicas organizadas em formatos mais ou menos esféricos.
- Já as proteínas fibrosas têm formatos alongados e são, geralmente, insolúveis.
- As proteínas fibrosas desempenham papel estrutural e são compostas de unidades repetitivas que se associam, permitindo a formação de grandes estruturas.



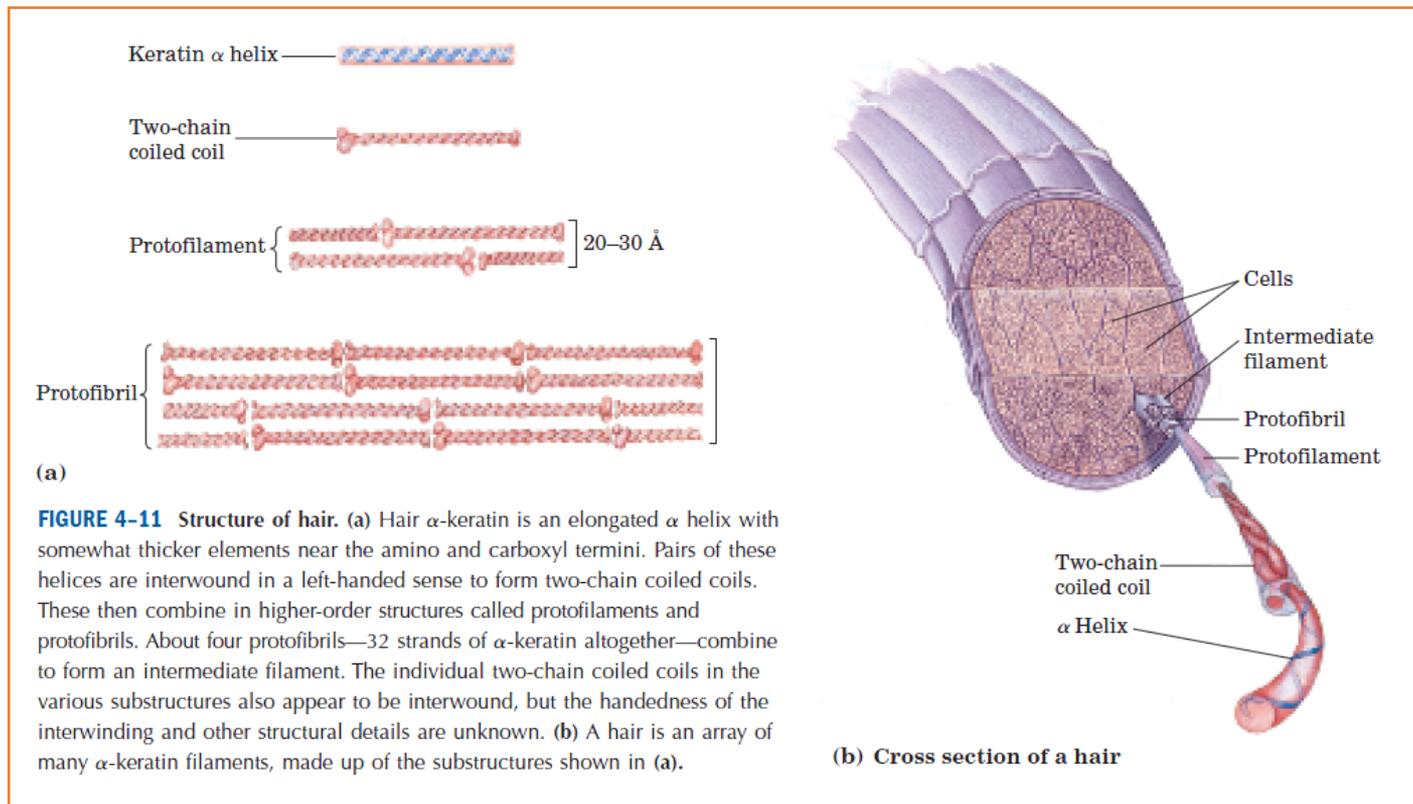
Proteínas fibrosas

- As proteínas fibrosas conferem resistência e/ou elasticidade.
- São sempre insolúveis devido ao seu alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos.



Proteínas fibrosas: α -queratinas

- As proteínas fibrosas são formadas por cadeias longas e estendidas, com formato regular.
- Por exemplo, as α -queratinas são formadas pela associação lateral de duas ou três cadeias em α -hélice, formando longos cabos laterais.
- Por isso, as α -queratinas são ricas em aminoácidos hidrofóbicos (Ala, Val, Ile, Met e Phe).



α -keratins

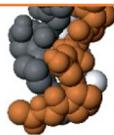
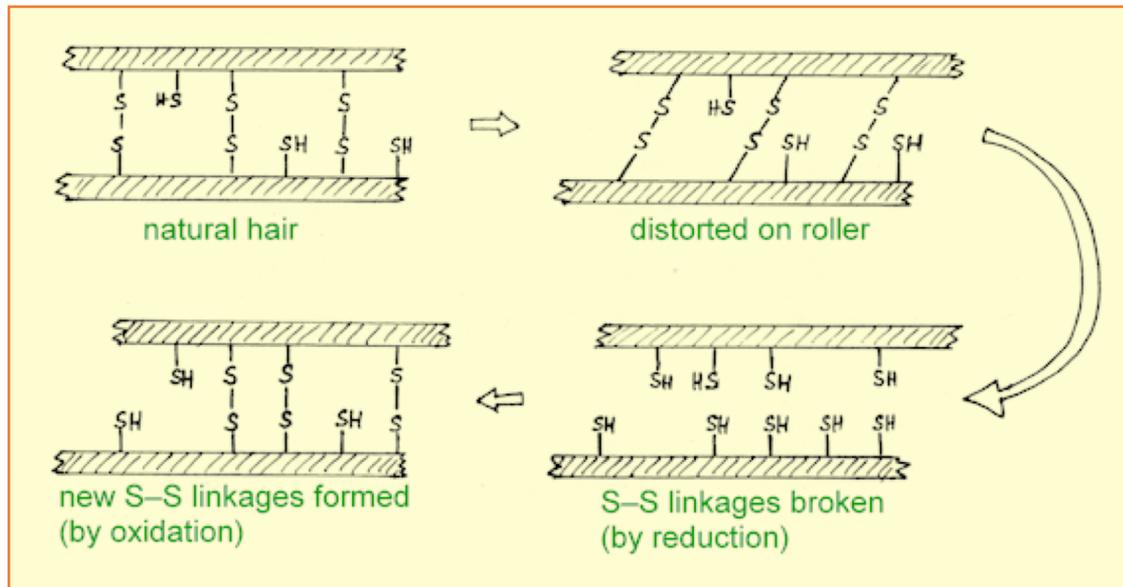


Figure 19-22
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

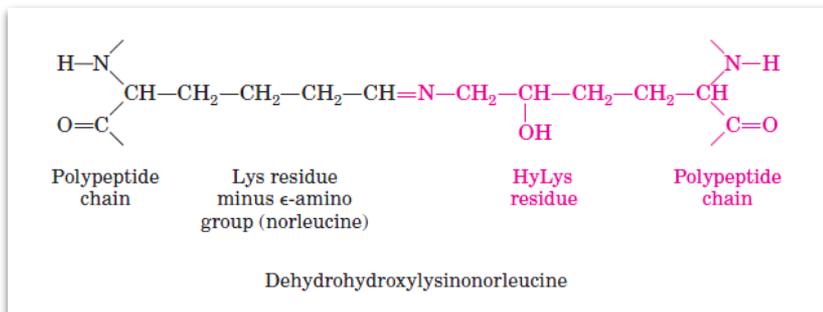
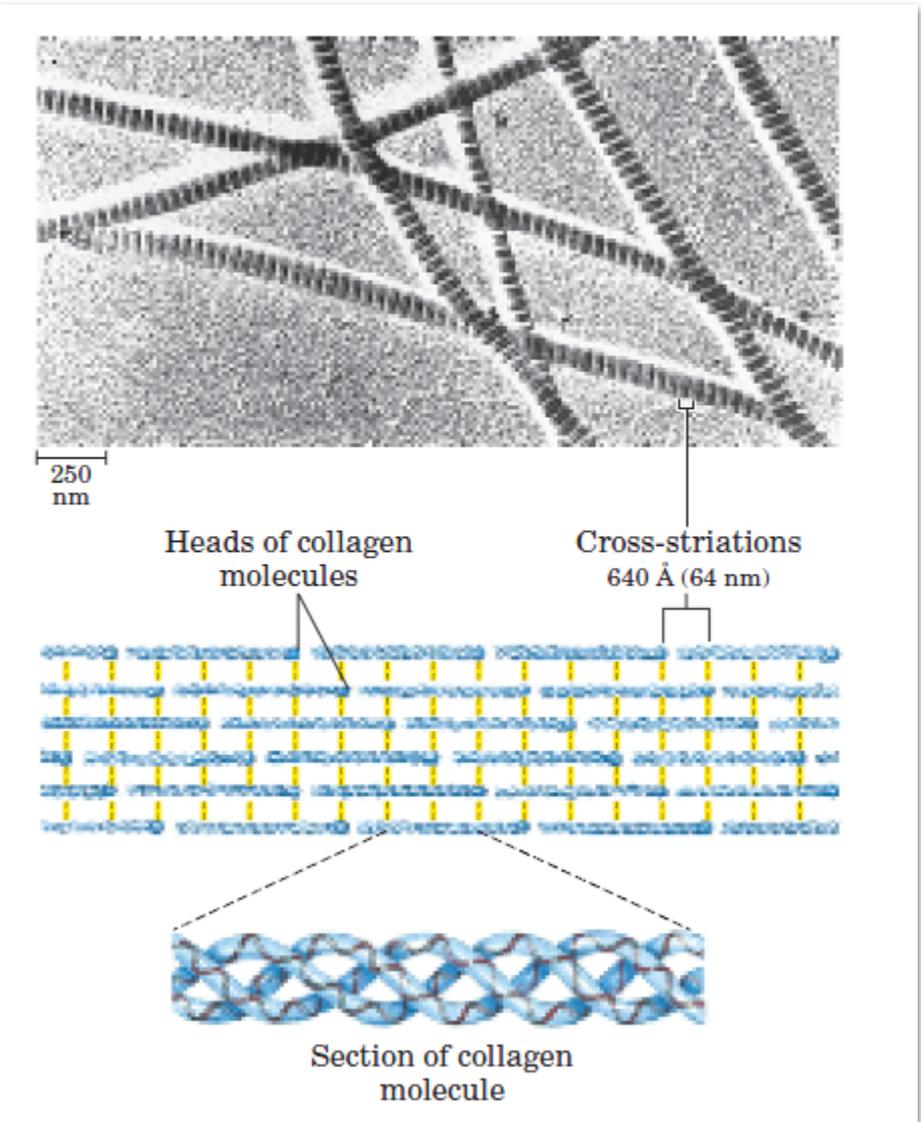
α -queratinas, cisteínas e as pontes de dissulfeto

- As α -hélices de queratina podem se ligar covalentemente.
- Isto ocorre por ligação de dissulfeto entre as cisteínas.
- Diferenças em como estas pontes se forma, explicam as diferentes texturas do cabelo humano.



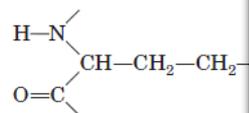
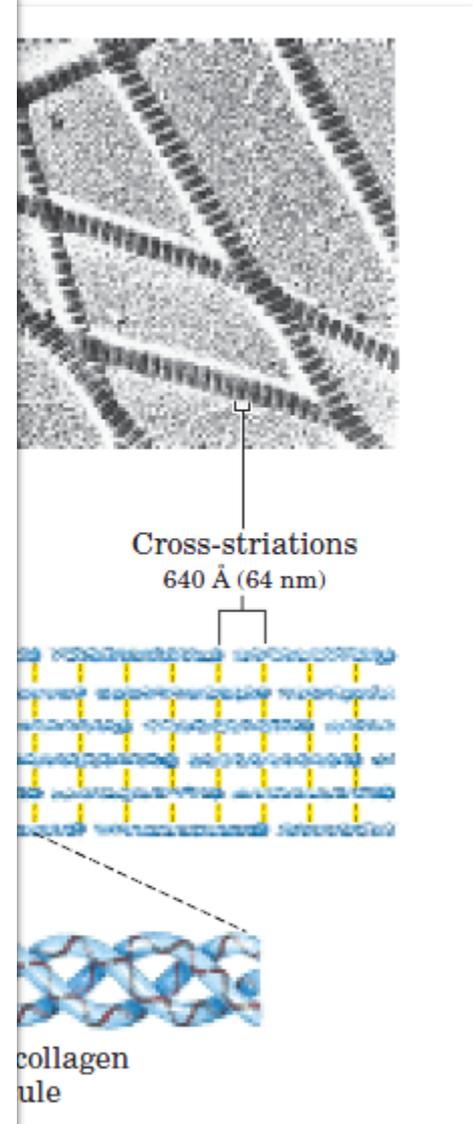
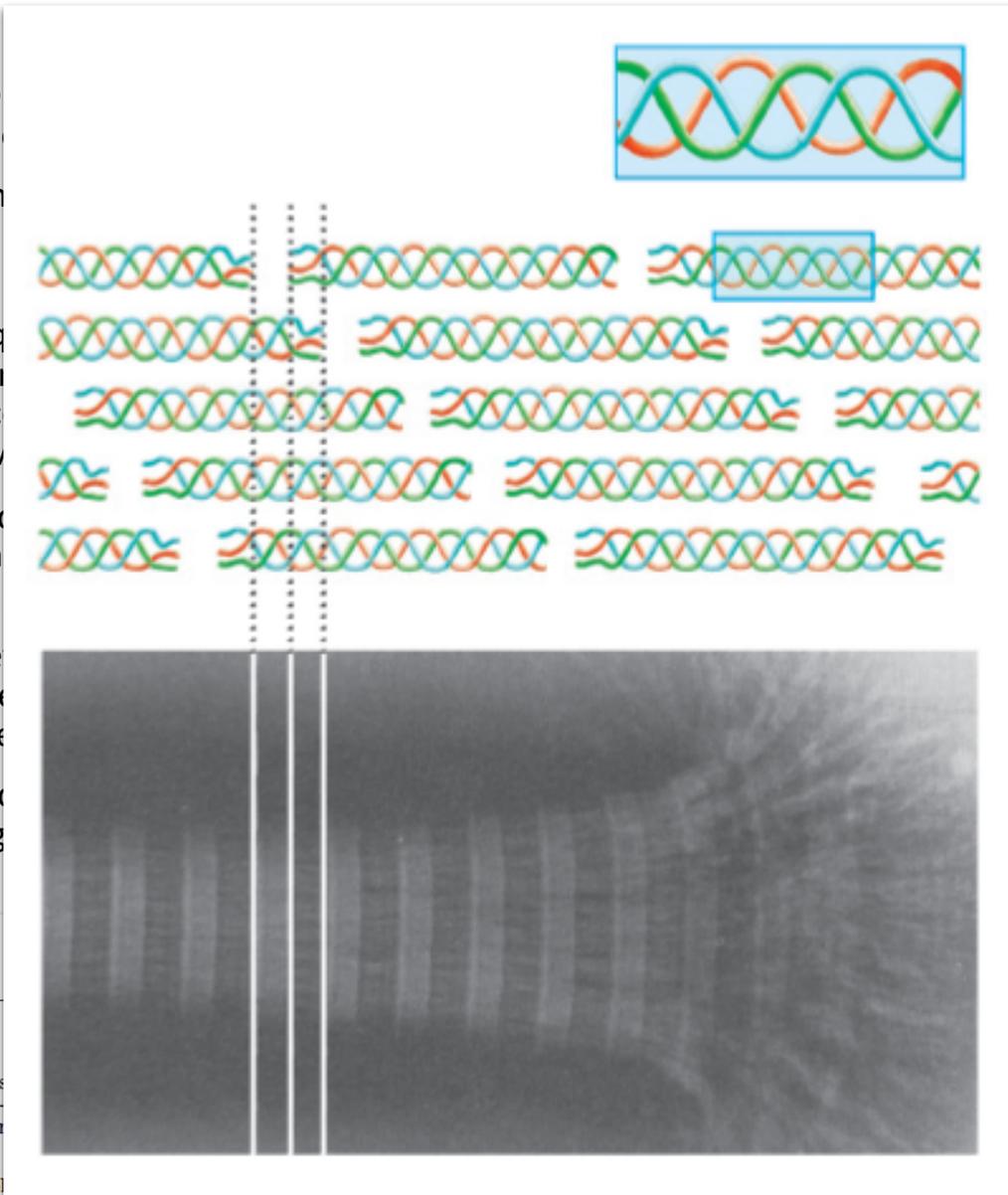
Proteínas fibrosas: colágeno

- Outra proteína fibrosa de extrema importância para os animais é o colágeno.
- Colágeno é formado por três cadeias polipeptídicas em hélice enroladas umas às outras, formando longas fibras.
- Por ser rico na sequência Gly-X-Y (X geralmente é Pro e Y, 4-hidroxi-Pro), a cadeia polipeptídica se enrola numa hélice para a esquerda com 3 aminoácidos por volta.
- Da mesma forma que na α -queratina, estas fibras se associam lateralmente, formando longas estruturas.
- Pontes de dissulfeto e outras ligações especiais conectam as diferentes fibras de colágeno, dando-lhes uma resistência maior que a do aço.
- Colágenos são os constituintes do tecido conectivo: cartilagens, tendões, ossos e a córnea do olho.



Proteínas fibrosas: colágeno

- Outra proteína fibrosa para os animais é o colágeno.
- Colágeno é formado por cadeias polipeptídicas em forma de fitas, formando uma estrutura de fita-triplex.
- Por ser rico na sequência Pro e Y, 4-hidroxiprolina e 4-hidroxilisina, a cadeia se enrola numa hélice tripla.
- Da mesma forma que as fibras de queratina, as fibras de colágeno se associam em longas estruturas.
- Pontes de dissulfeto conectam as diferentes cadeias, dando-lhes uma resistência mecânica.
- Colágenos são os principais componentes do tecido conectivo: cartilagem, tendão e córnea do olho.



Polypeptide chain Lys residue minus epsilon group (not shown)

Del

Proteínas fibrosas

- Comparação entre as diferentes proteínas fibrosas.
- Notem que a principal diferença entre a alfa e beta-queratina está no volume das cadeias laterais dos aminoácidos.

Amino Acid	α -Keratin	Fibroin	Collagen
Gly	8	45	32
Ala	5	29	12
Ser	10	12	3
Glu,Gln	12	1	8
Cys	11	0	0
Pro	8	0.3	22
Arg	7	0.5	5
Leu	7	0.5	2
Thr	6	1	2
Asp,Asn	6	1	4
Val	5	2	2
Tyr	4	5	0.4
Ile	3	1	1
Phe	2	0.5	1
Lys	2	0.3	4
Trp	1	0.2	0
His	1	0.2	0.3
Met	0.5	0	1

Proteínas globulares

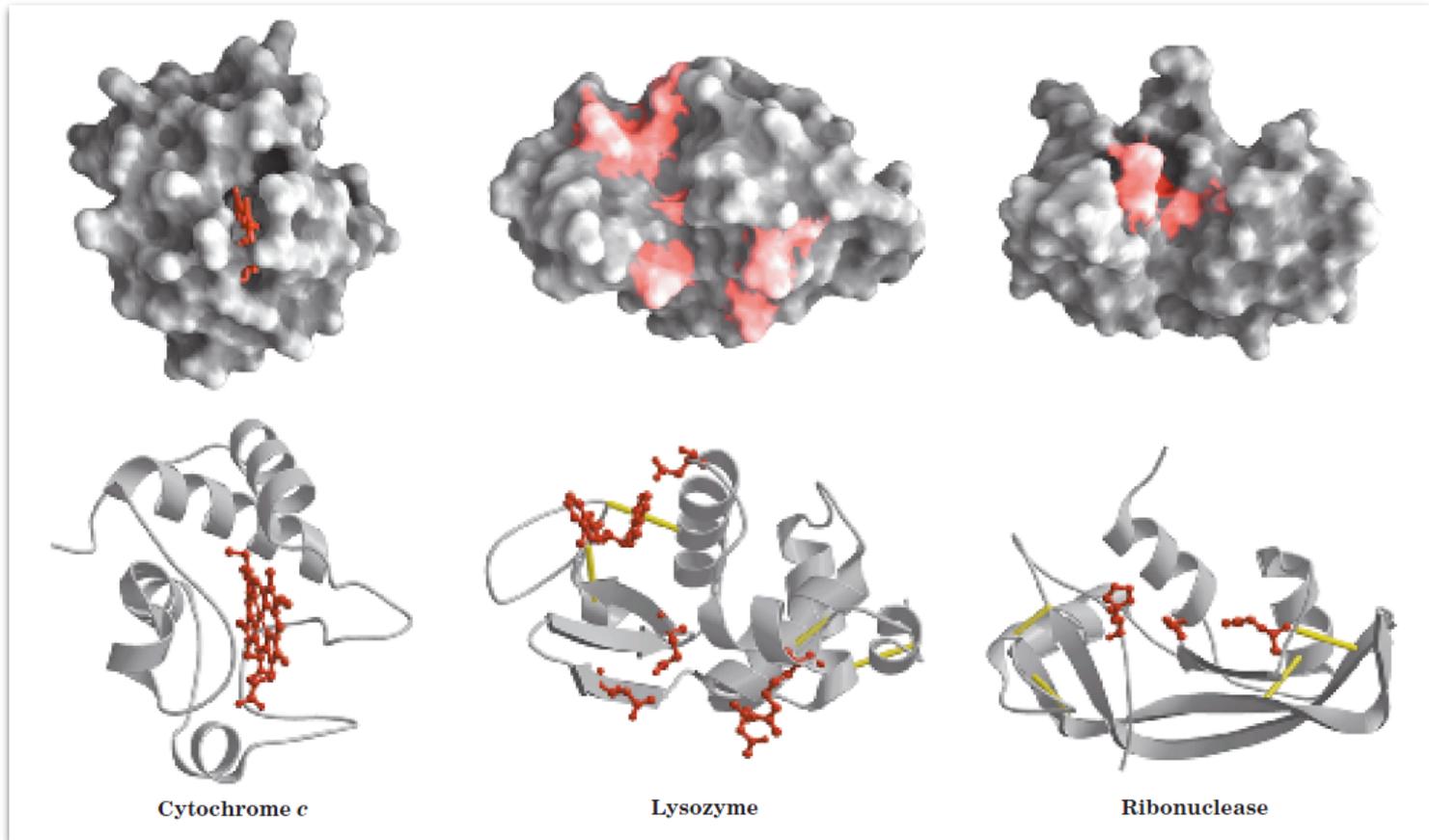
- Numa proteína globular, os diferentes segmentos de um polipeptídios se dobram uns sobre os outros, gerando uma estrutura mais compacta, se comparada com as proteínas fibrosas.
- As proteínas globulares podem assumir uma grande variedade de formatos.
- Proteínas globulares podem ser formadas por α -hélices, folhas β -pregueadas e voltas.

TABLE 4-2 Approximate Amounts of α Helix and β Conformation in Some Single-Chain Proteins

<i>Protein (total residues)</i>	<i>Residues (%)*</i>	
	<i>α Helix</i>	<i>β Conformation</i>
Chymotrypsin (247)	14	45
Ribonuclease (124)	26	35
Carboxypeptidase (307)	38	17
Cytochrome c (104)	39	0
Lysozyme (129)	40	12
Myoglobin (153)	78	0

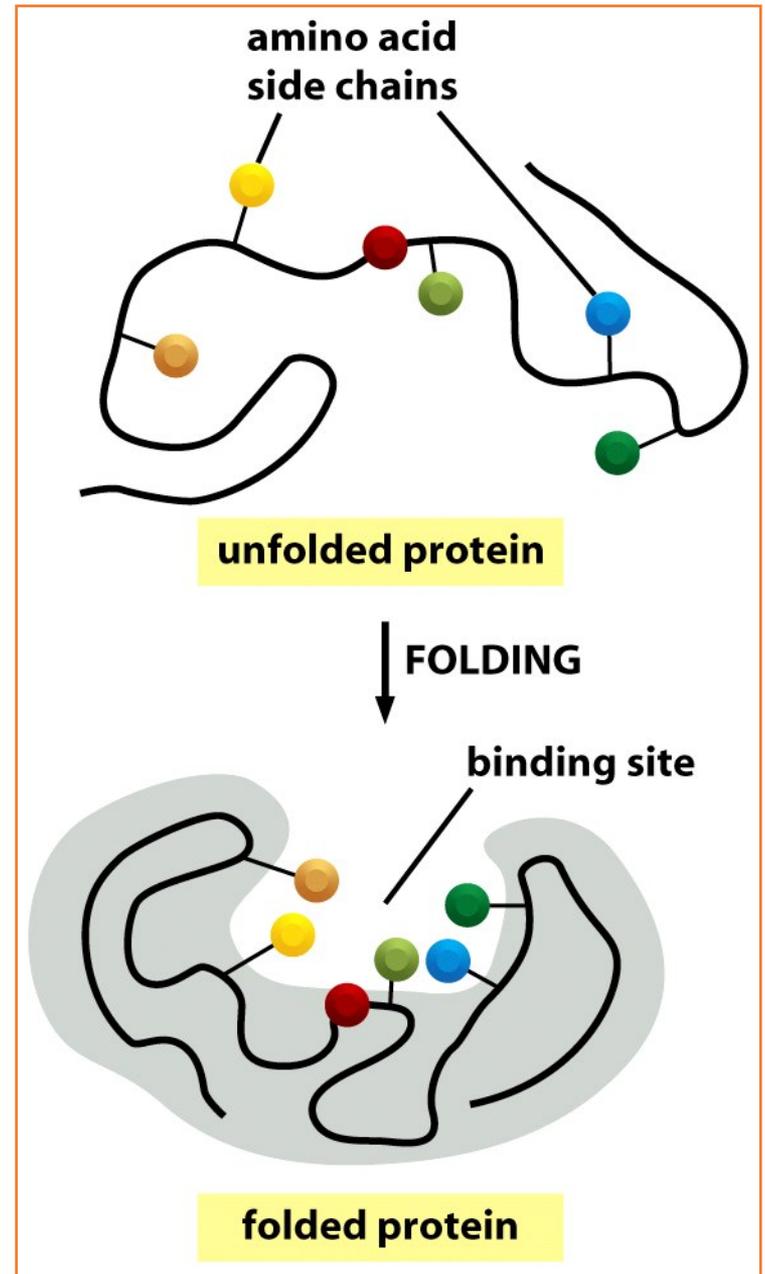
Proteínas globulares

- A orientação dos diferentes segmentos da cadeia polipeptídica permite que as cadeias laterais se aproximem formando grupos ativos.



Sítio ativo de uma proteína

- Os aminoácidos que formam um sítio de ligação podem estar próximos ou distantes na sequência primária.



Hemoglobina e o transporte de oxigênio

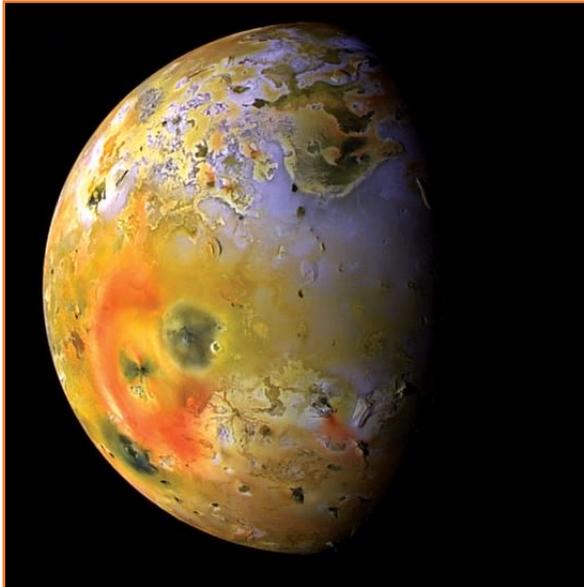
O impacto da vida na terra

- Qual a relação desta imagem (mineração de ferro, Fe_2O_3 , Fe_3O_4) com a evolução da vida na terra?

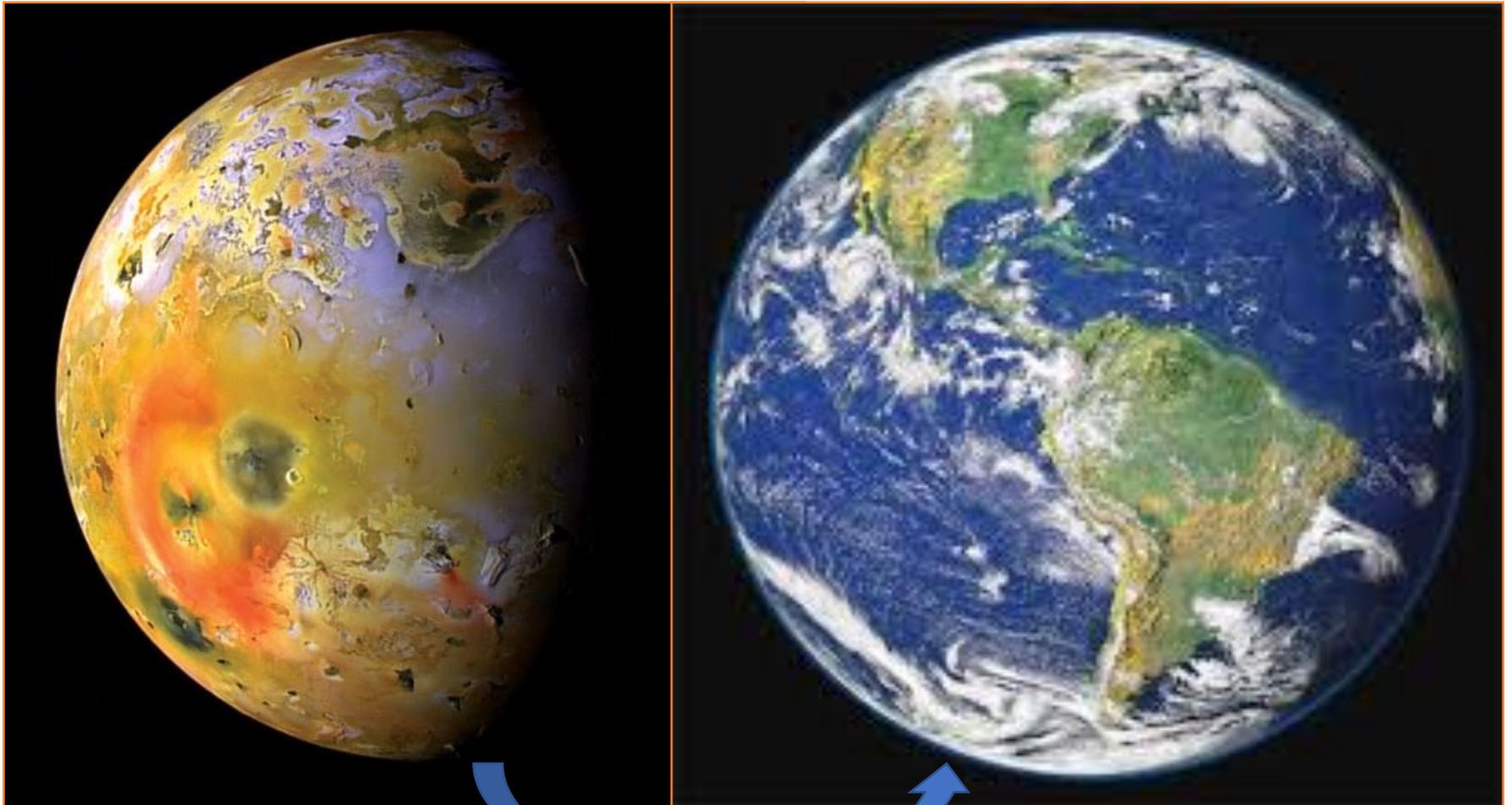


O oxigênio na terra prebiótica (early earth)

- O terra pré-biótica era bem diferente da terra que conhecemos hoje.
- Sem oxigênio molecular na atmosfera, íons ferroso e férrico podiam ser encontrados solúveis nos oceanos e lagos.
- Com o advento dos microorganismos fotossintéticos, houve uma grande liberação de oxigênio molecular na atmosfera, subproduto da reação de hidrólise da água para gerar energia.
- Este subproduto, ao longos dos milhões de anos, resultou na atmosfera de 21% de O₂ que temos hoje.



O oxigênio na terra prebiótica (early earth)



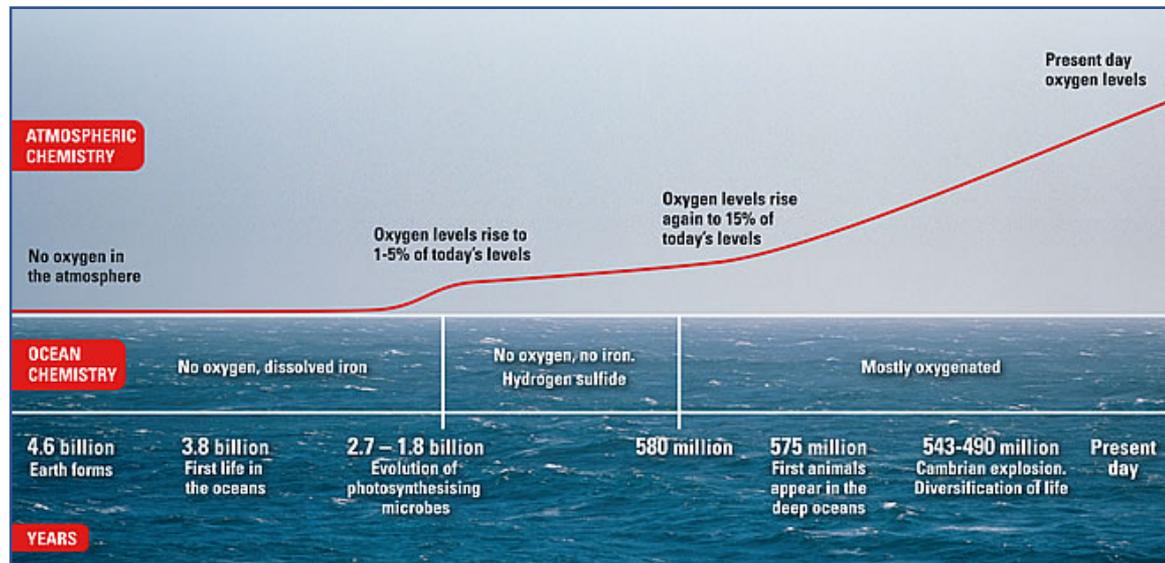
Oxigênio!

A vida e oxigênio na atmosfera: as cianobactérias

- O aumento nos níveis de oxigênio, permitiu o surgimento da vida como conhecemos, dos organismos metazoa (reino Animal), que se utilizam do poder redutor do O₂ para a geração de energia.
- Como veremos mais adiante no curso, o oxigênio é uma molécula essencial para a geração de energia.

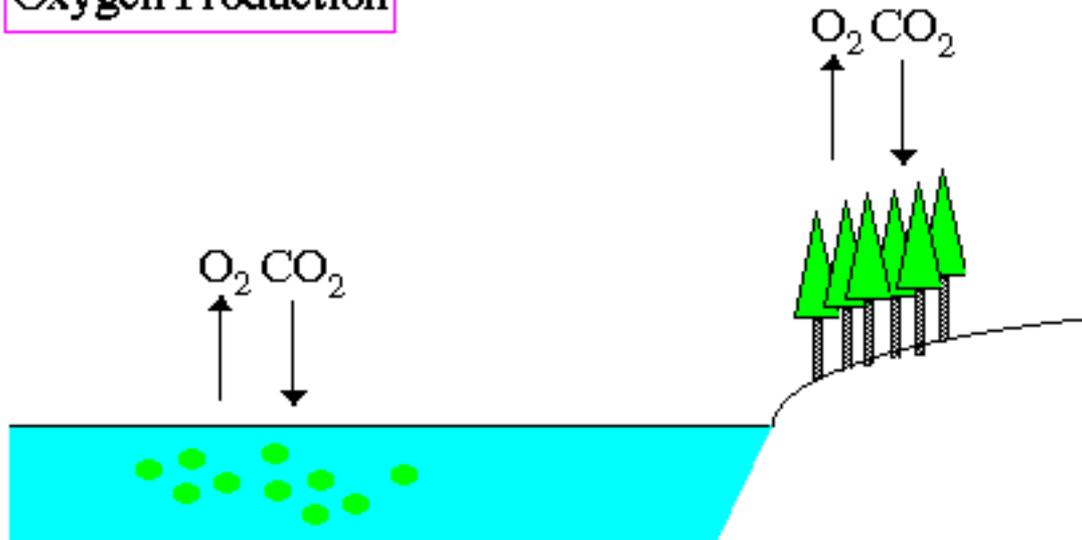


- Porém, para que estes organismos multicelulares pudessem crescer, foi necessário o desenvolvimento de um sistema de transporte de oxigênio da atmosfera para os tecidos.

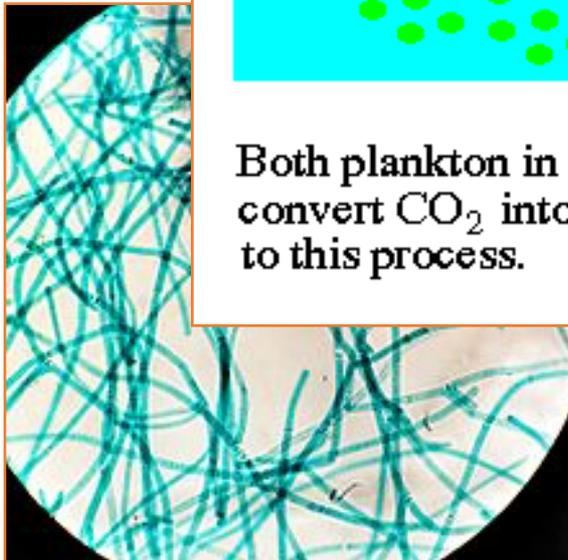


A vida e oxigênio na atmosfera: as cianobactérias

Oxygen Production

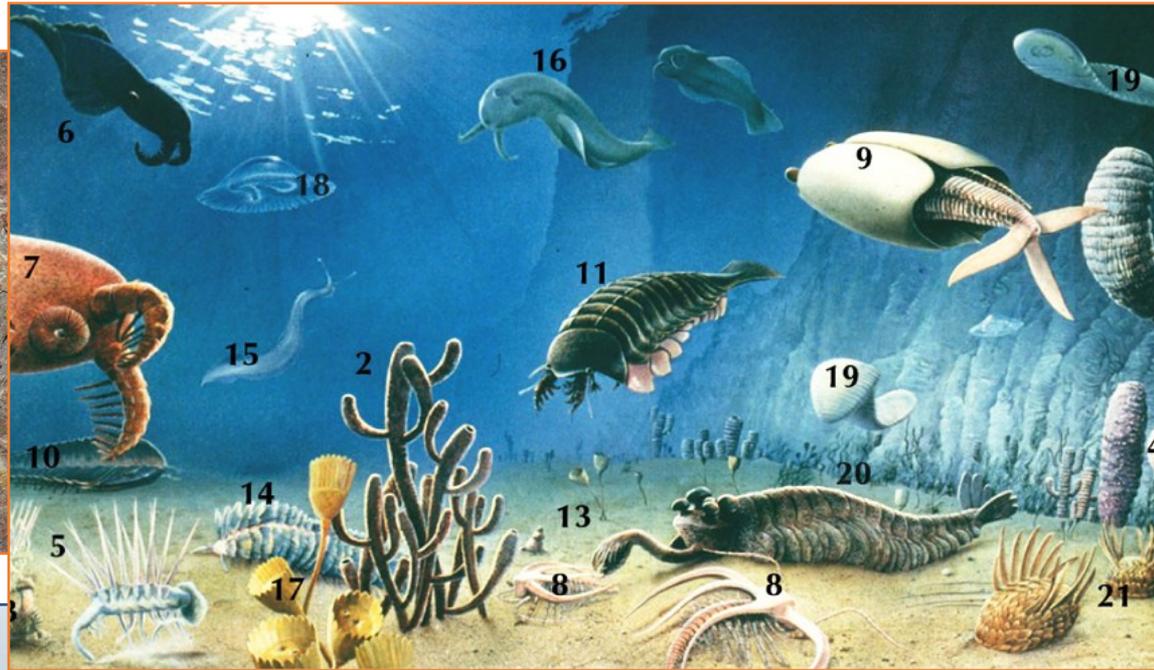


Both plankton in the oceans and plants on land contribute to convert CO_2 into O_2 , the oceans are much larger contributors to this process.



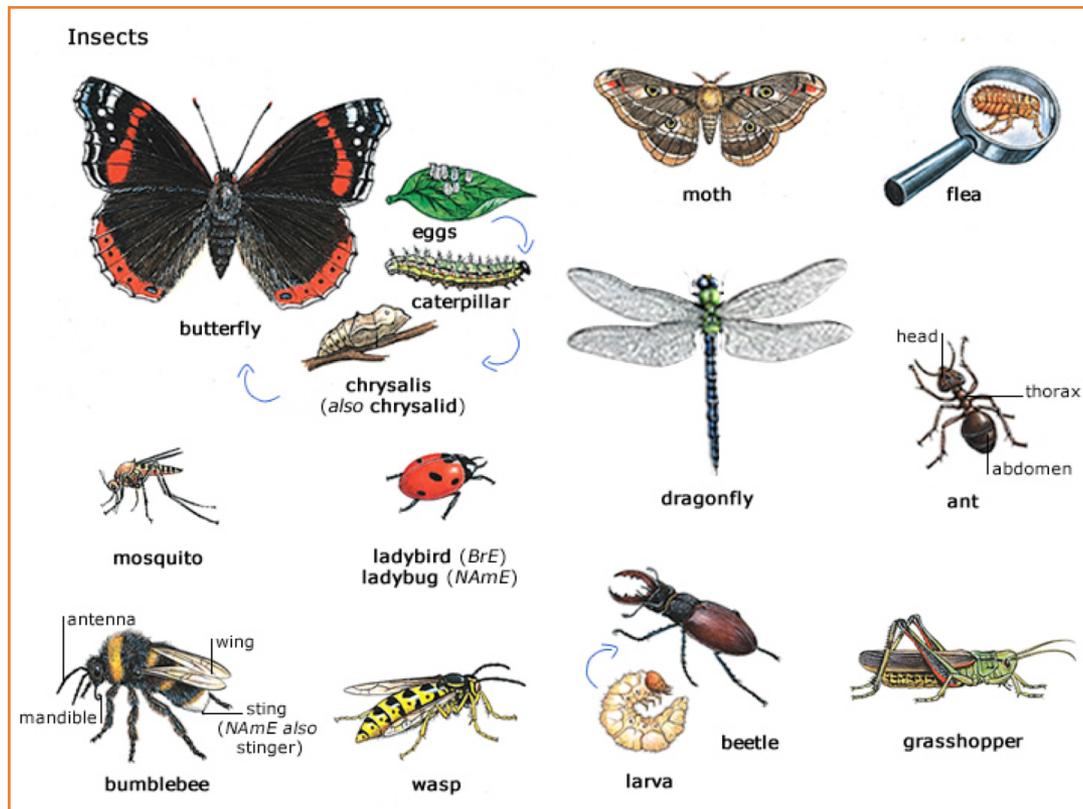
OCEAN CHEMISTRY	No oxygen, dissolved iron	No oxygen, no iron. Hydrogen sulfide	Mostly oxygenated			
YEARS	4.6 billion Earth forms	3.8 billion First life in the oceans	2.7 – 1.8 billion Evolution of photosynthesising microbes	580 million 575 million First animals appear in the deep oceans	543-490 million Cambrian explosion. Diversification of life	Present day

A explosão cambriana (~500-600 milhões de anos)



O oxigênio

- Porém, mesmo com o surgimento do oxigênio (O_2) na atmosfera, o tamanho dos animais é limitado pela capacidade do oxigênio se difundir nos tecidos.
- Por isso, insetos e outros seres invertebrados não crescem além de alguns centímetros.



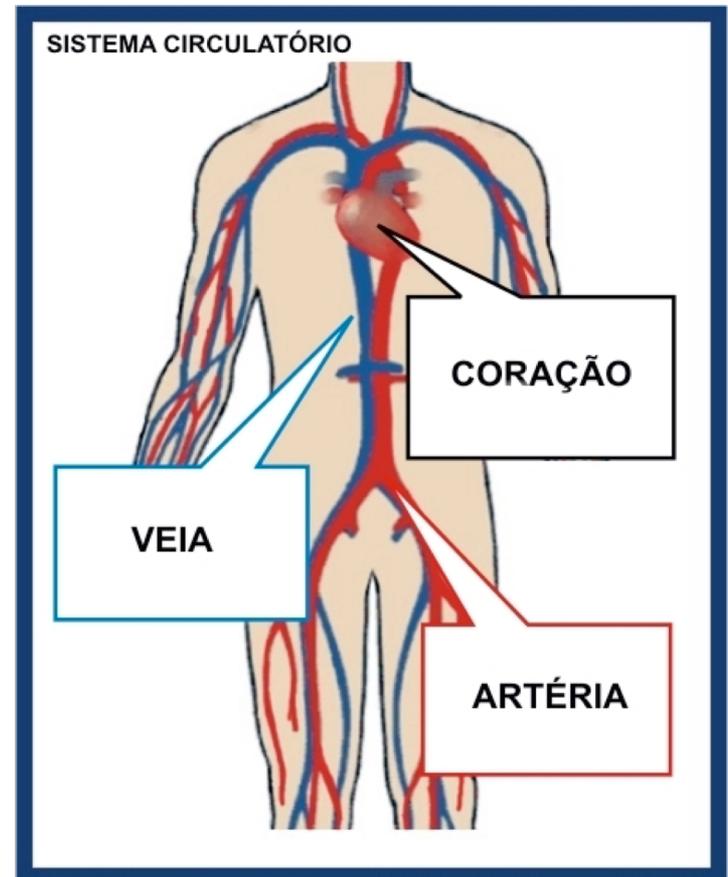


O oxigênio

- Para que o limite de difusão do O_2 fosse superado, animais desenvolveram o sistema circulatório.
- Dentro dos vasos e do sangue, encontram-se células especializadas (hemácias) ricas numa proteína capaz de ligar e transportar o oxigênio.



Células vermelhas (hemácias) são ricas em hemoglobina



Mioglobina

- A mioglobina é uma pequena proteína globular produzida no tecido muscular.
- A mioglobina contém Ferro (Fe) e é capaz de ligar oxigênio.
- Ela foi uma das primeiras proteínas a ter sua estrutura tridimensional resolvida por John Kendrew e colaboradores nos anos de 1950 utilizando método de difração de raios-X.
- A mioglobina contém uma única cadeia polipeptídica de 153 aminoácidos e um grupo prostético protoporfirina/Fe, que liga oxigênio.

A mioglobina é responsável
pela cor avermelhada do
músculo

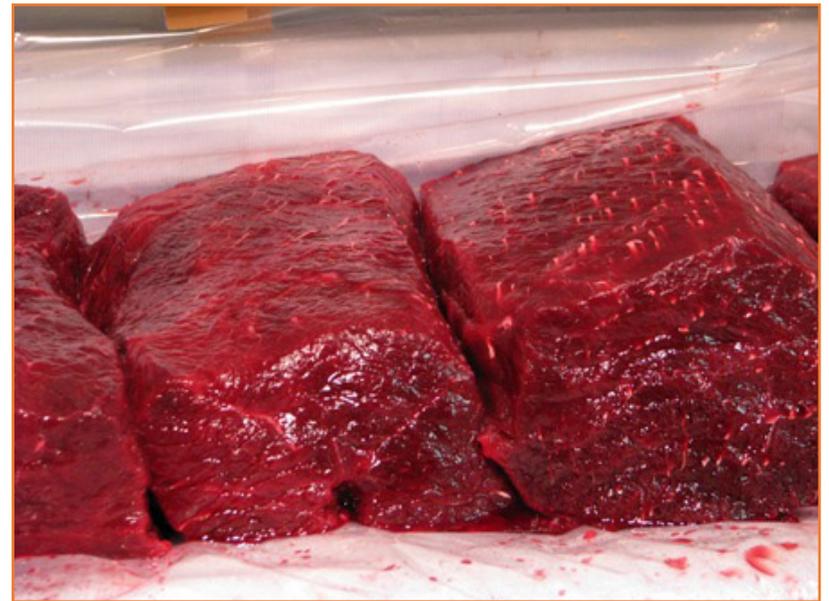


Mioglobina



Mioglobina

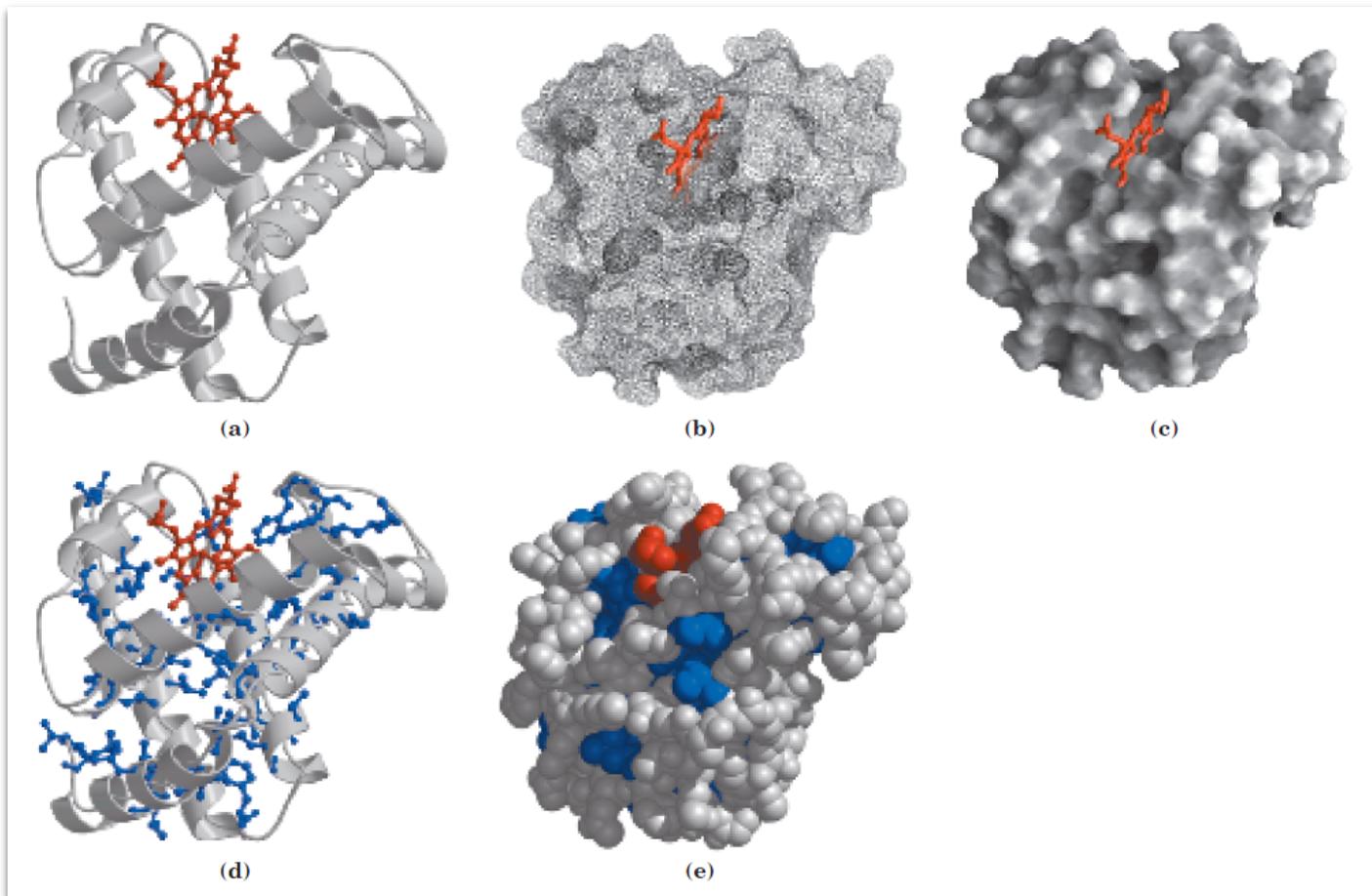
- Ela é mais abundante na musculatura de animais que mergulham e permanecem submersos por longos períodos de tempo (focas e baleias).
- Por causa da grande quantidade de mioglobina, o músculo destes animais é quase marrom.



Carne de baleia (mercado japonês)

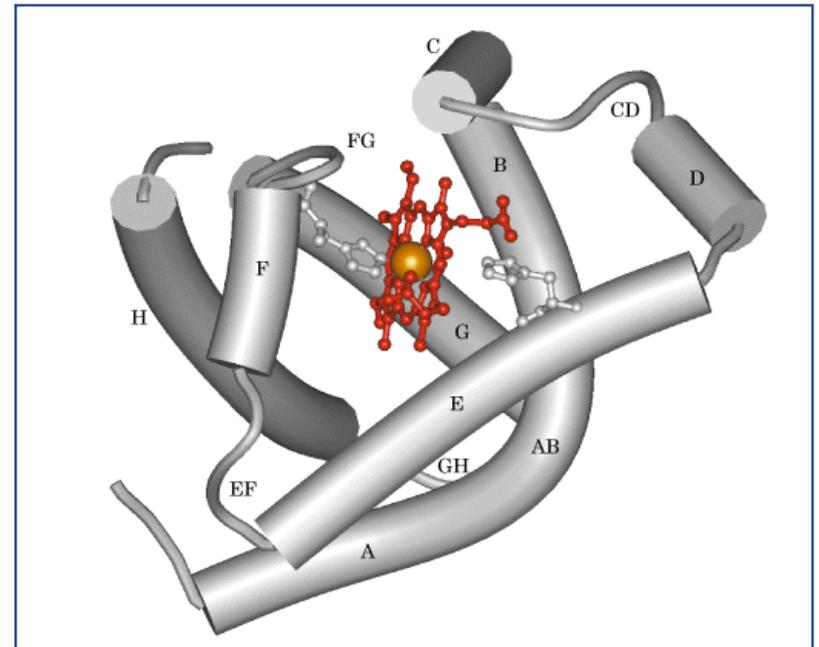
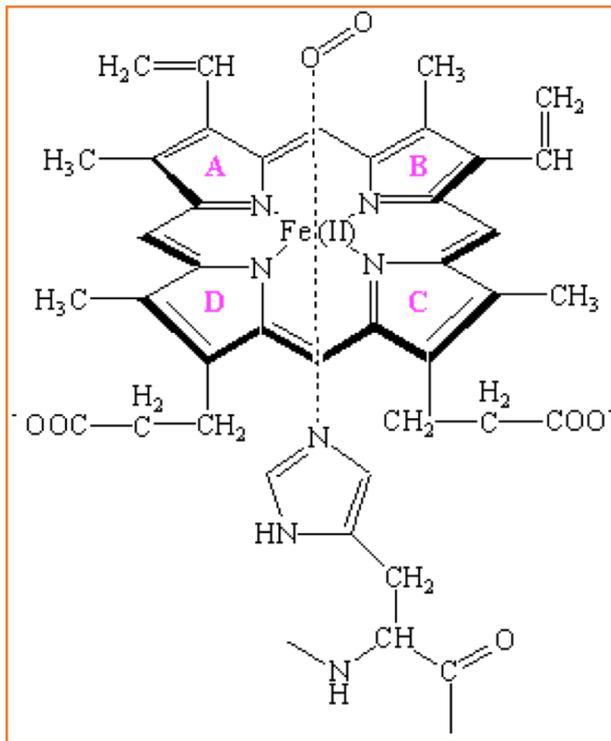
Mioglobina

- Ao se enovelar, os resíduos hidrofóbicos (Leu, Ile, Val, Phe), e indicados em azul (d) e (e), são enterrados dentro da estrutura terciária da proteína.
- Em vermelho, o grupo protoporfirina/Fe (também chamado de grupo heme).



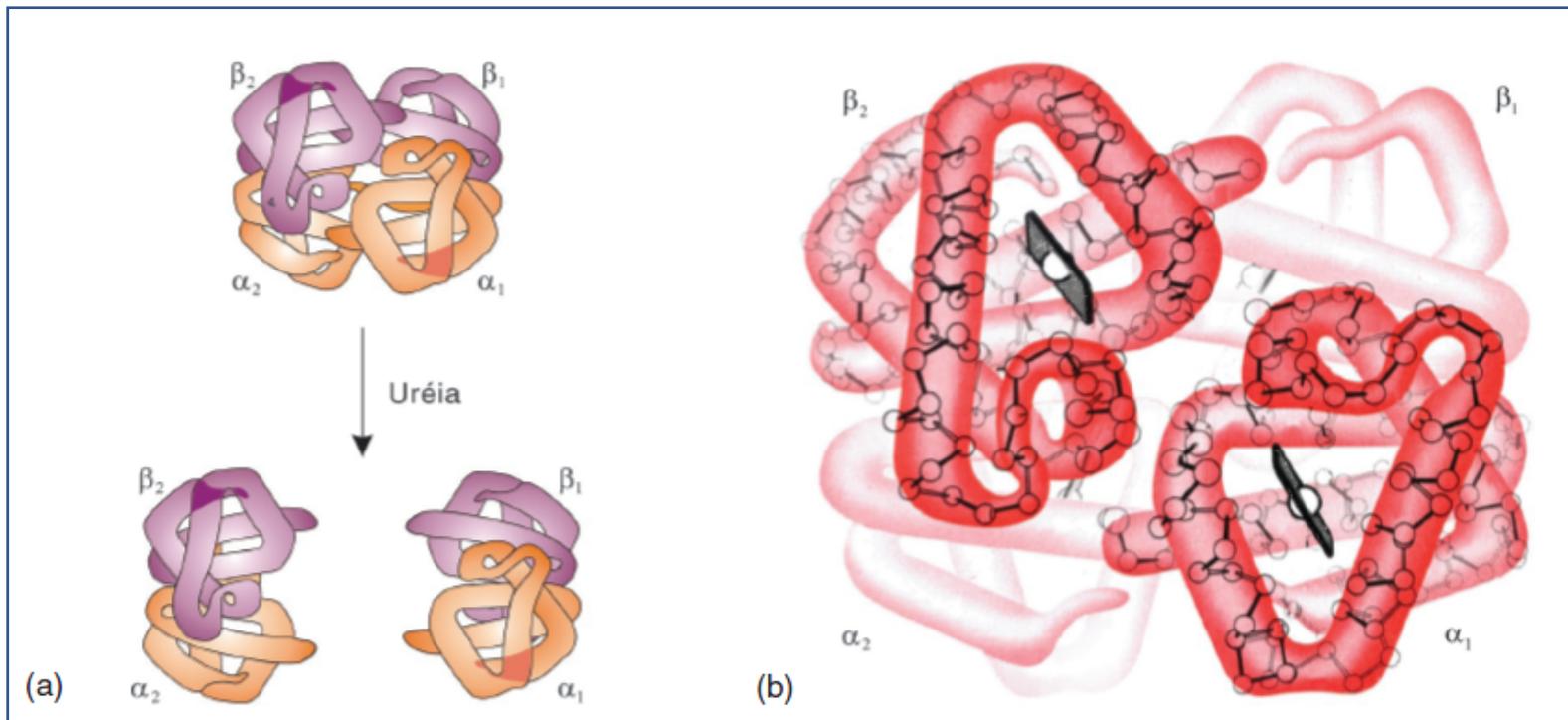
Mioglobina e o grupo heme

- O grupo heme se liga a uma cavidade formada na estrutura terciária da mioglobina.
- O grupo heme se complexa à proteína através de um resíduo de histidina, que participa da ligação da molécula de oxigênio molecular.



A hemoglobina

- A hemoglobina é uma proteína composta de quatro cadeias polipeptídicas (duas α e duas β).
- As cadeias α e β se associam em dímeros, que ligam uns aos outros formando um tetrâmero.

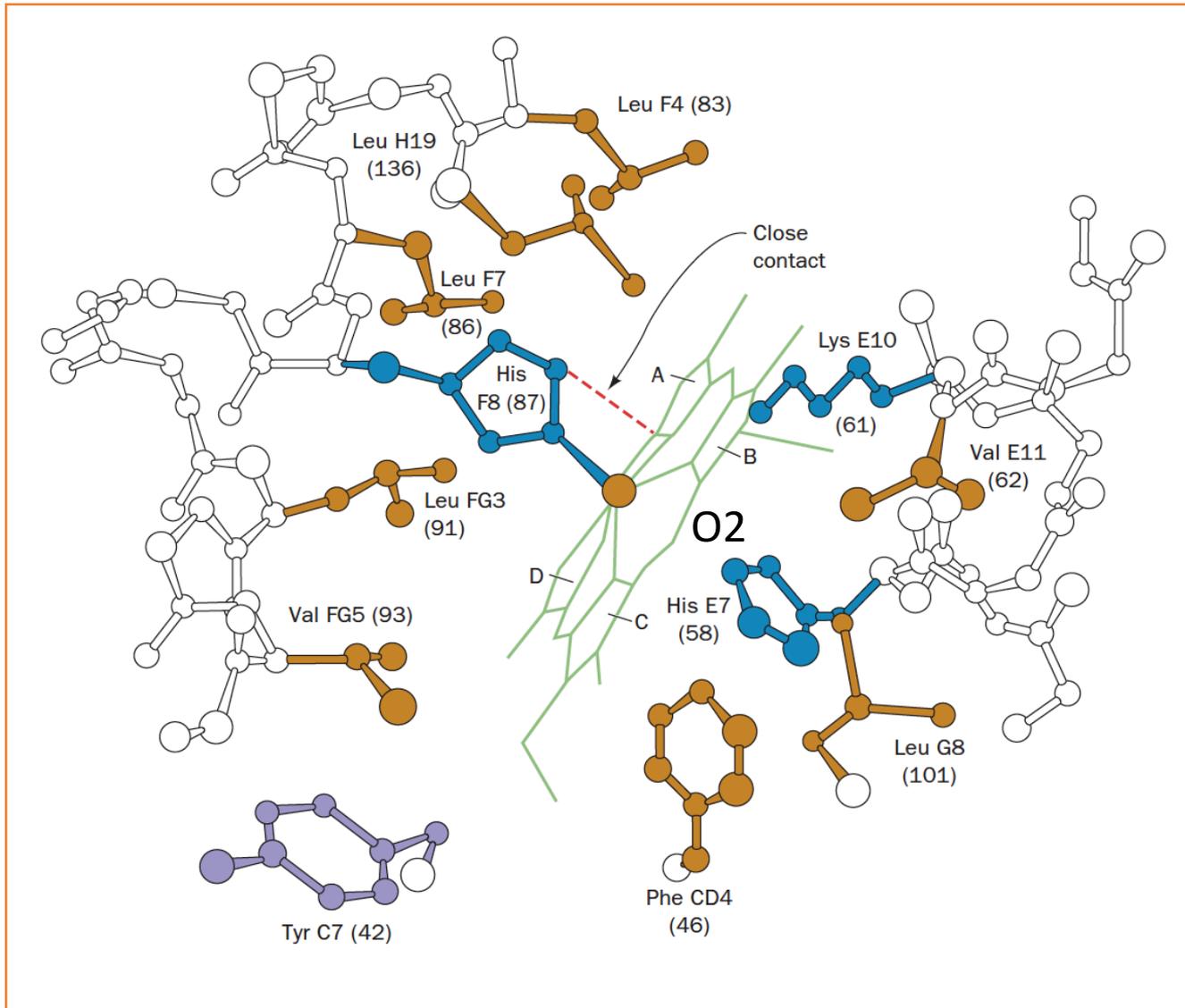


Hemoglobina e mioglobina.

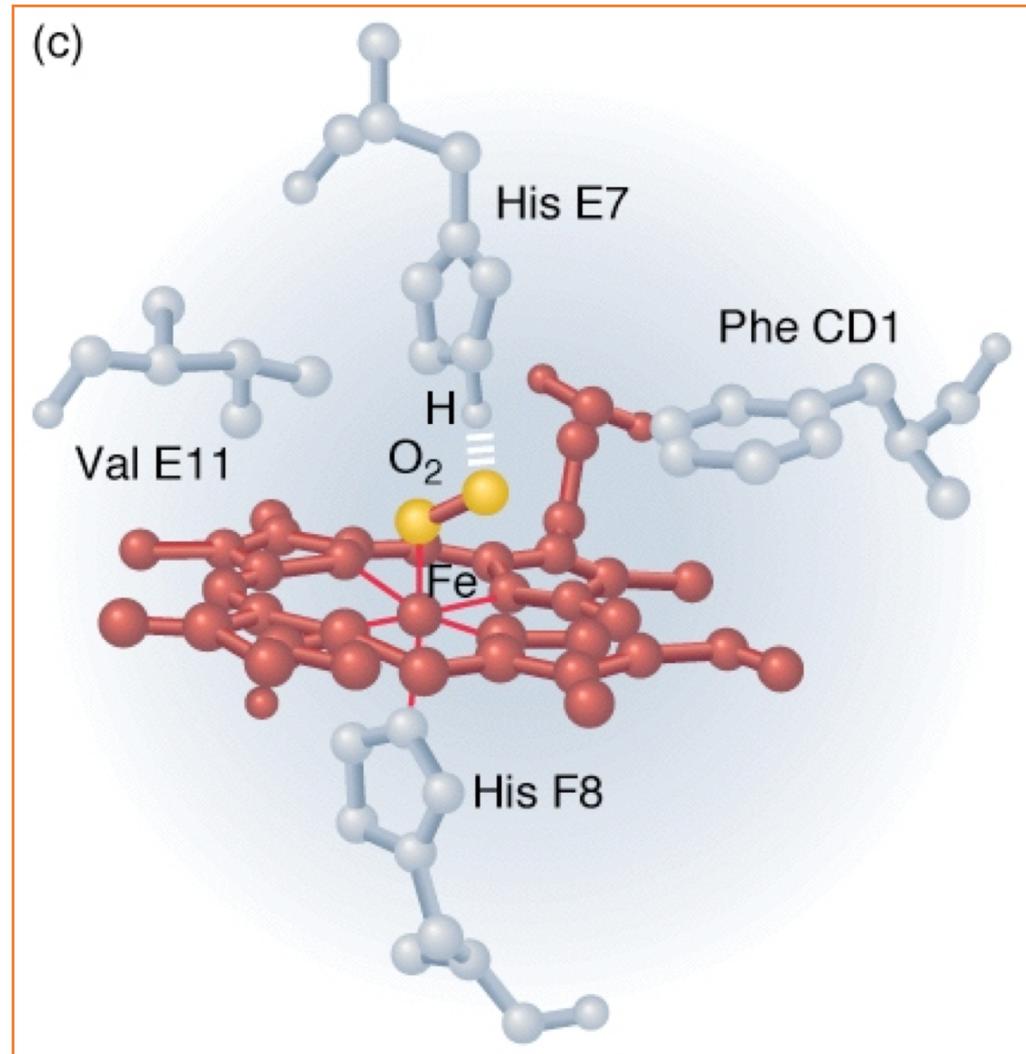
- Comparação das sequências primárias da mioglobina e das cadeias α e β da hemoglobina.
- A cadeia α e β da hemoglobina compartilham apenas 43% dos aminoácidos.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
114 bits (286)	2e-37	Compositional matrix adjust.	63/145 (43%)	88/145 (60%)	8/145 (5%)
Hemo a 3	LSPADKTNVKAAWGKVGAGHAGEYGAERALERMFLSFPTTKTYFPHF-DLS-----HGSAQV				56
	L+P +K+ V A WGKV + E G EAL R+ + +P T+ +F F DLS G+ +V				
Hemo b 4	LTPEEKSAVTALWGKV--NVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGNPKV				61
Hemo a 57	KGHGKKVADALTNAVAHVDDMPNALSALSADLHAHKLKRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPA				116
	K HGKKV A ++ +AH+D++ + LS+LH KL VDP NF+LL + L+ LA H				
Hemo b 62	KAHGKKVLGAFSDGLAHLAHDNLKGTFFATLSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLCVLAHFFGK				121
Hemo a 117	EFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKY		141		
	EFTP V A+ K +A V+ L KY				
Hemo b 122	EFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKY		146		

Hemoglobina e mioglobina.



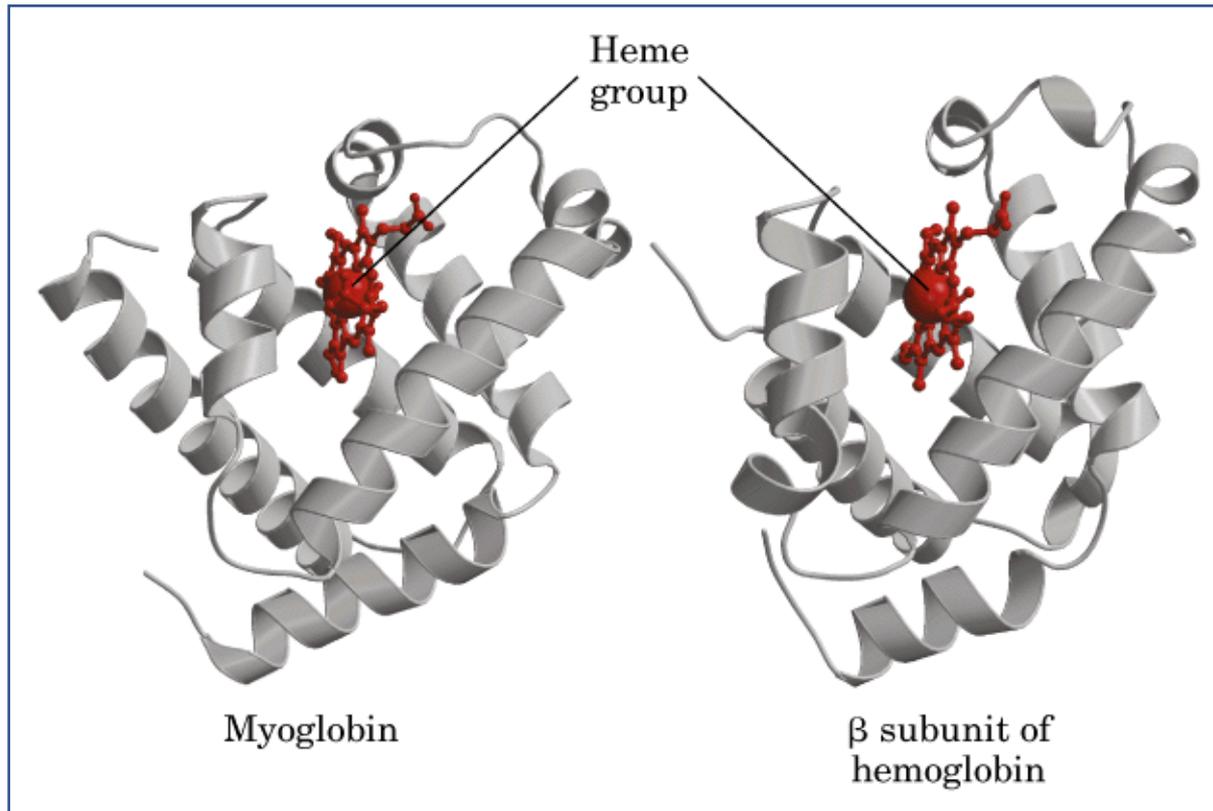
A ligação do oxigênio ao grupo heme



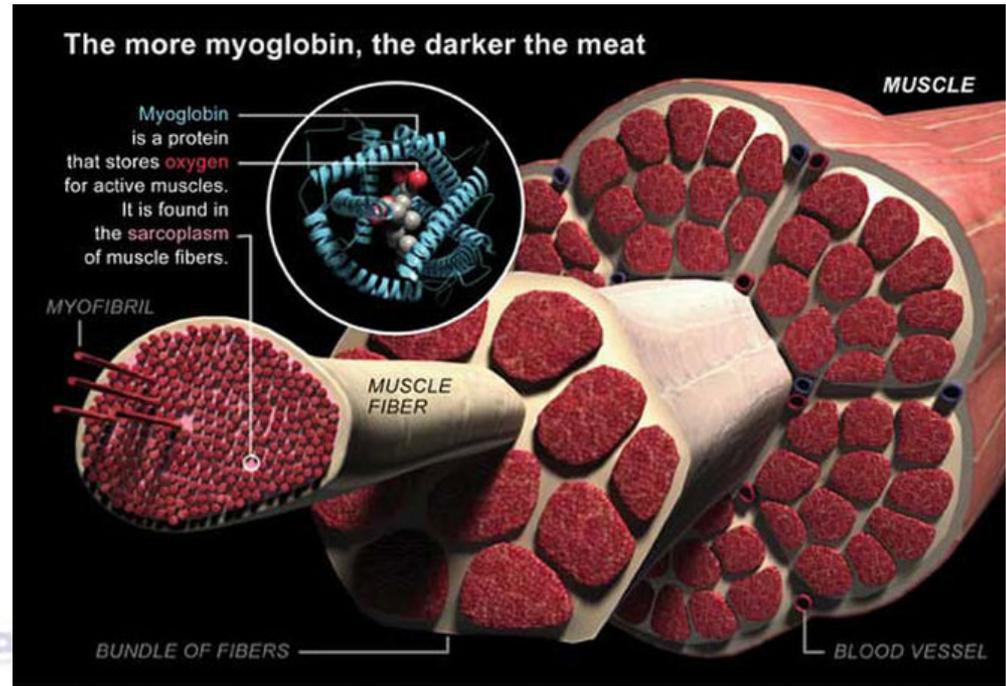
<https://www.youtube.com/watch?v=B6xNZleVmCA>

<https://www.youtube.com/watch?v=6d39yPB5yw4>

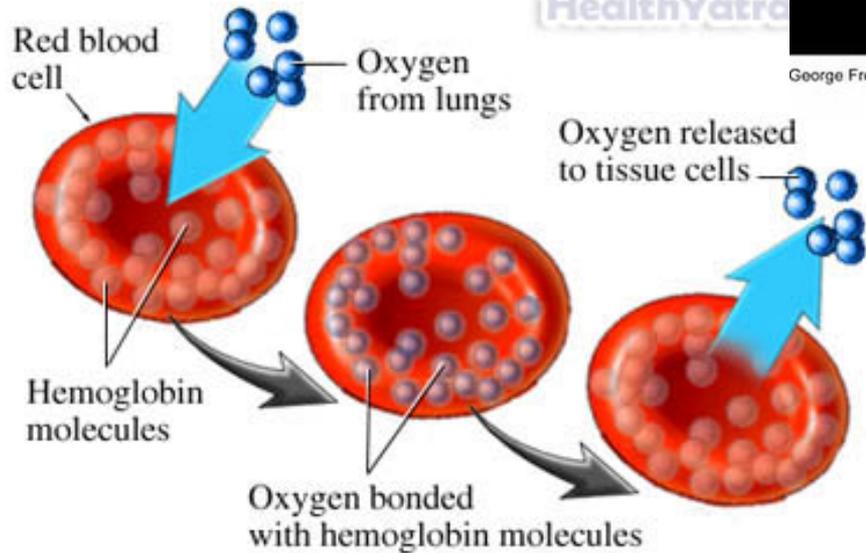
A hemoglobina e a mioglobina tem estruturas terciárias semelhantes



A hemoglobin transporta e a mioglobina “guarda” o oxigênio até o músculo precisar



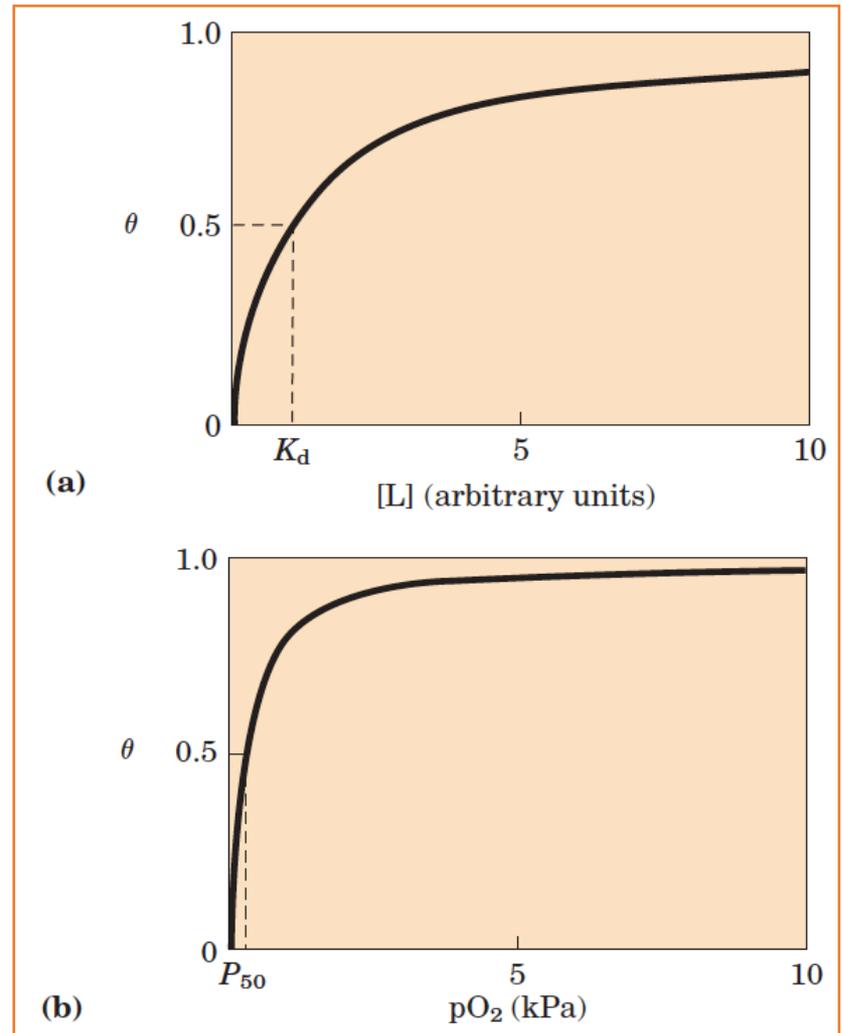
George Frederick for LiveScience Sources: Dr. Daniel L. Fletcher, University of Connecticut; University of Montana-Missoula; Indiana State University



HealthVatro

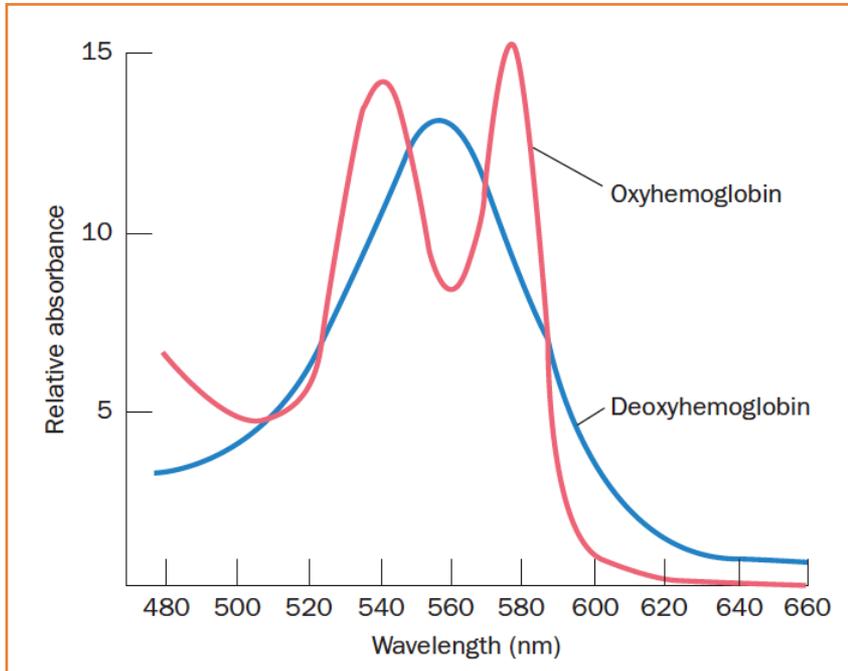
A ligação do oxigênio ao grupo heme

- A ligação do oxigênio depende da pressão ou concentração (pO_2).
- A letra grega teta (θ) representa a fração ligada
- (ou seja, 1 = 100%).



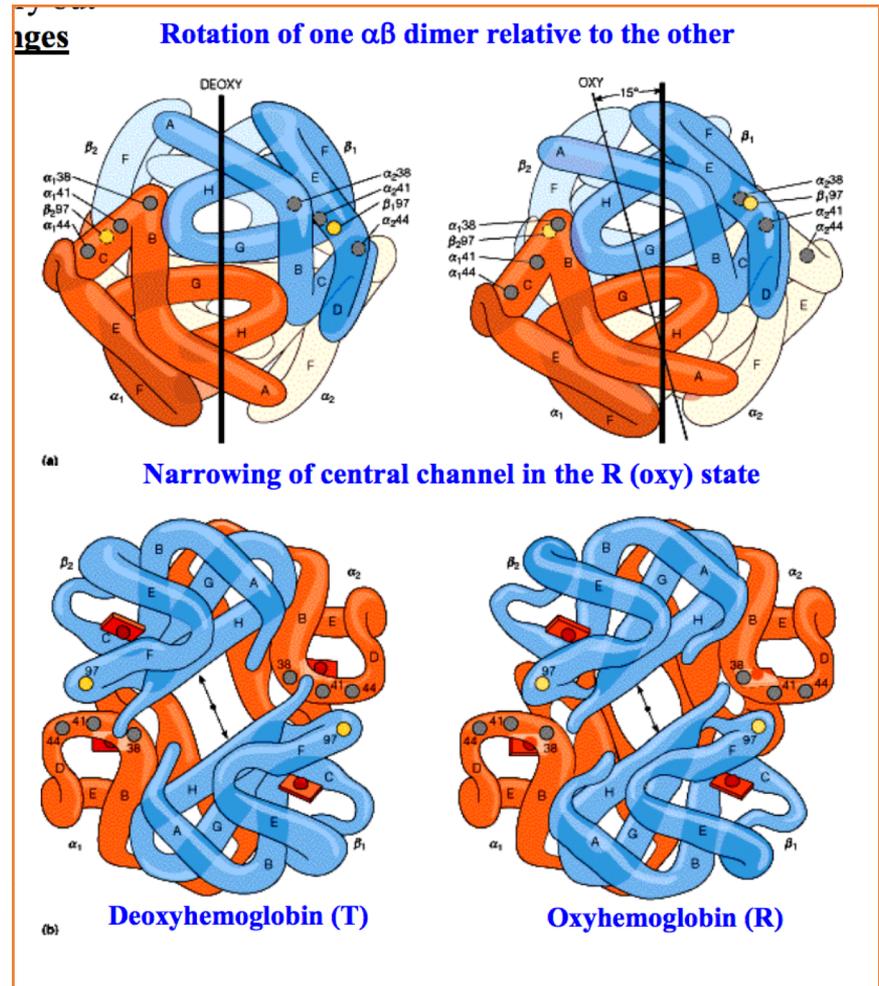
A ligação do oxigênio altera a hemoglobina

- Hemoglobina pode ser encontrada em dois estados: deoxihemoglobina e oxihemoglobina
- $\text{Hb} + \text{O}_2 \rightarrow \text{HbO}_2$
- A deoxihemoglobina e oxihemoglobina absorvem em diferentes comprimentos de onda, por isso, o sangue oxigenado é vermelho e o sangue venoso (pobre em oxigênio) é "azulado".



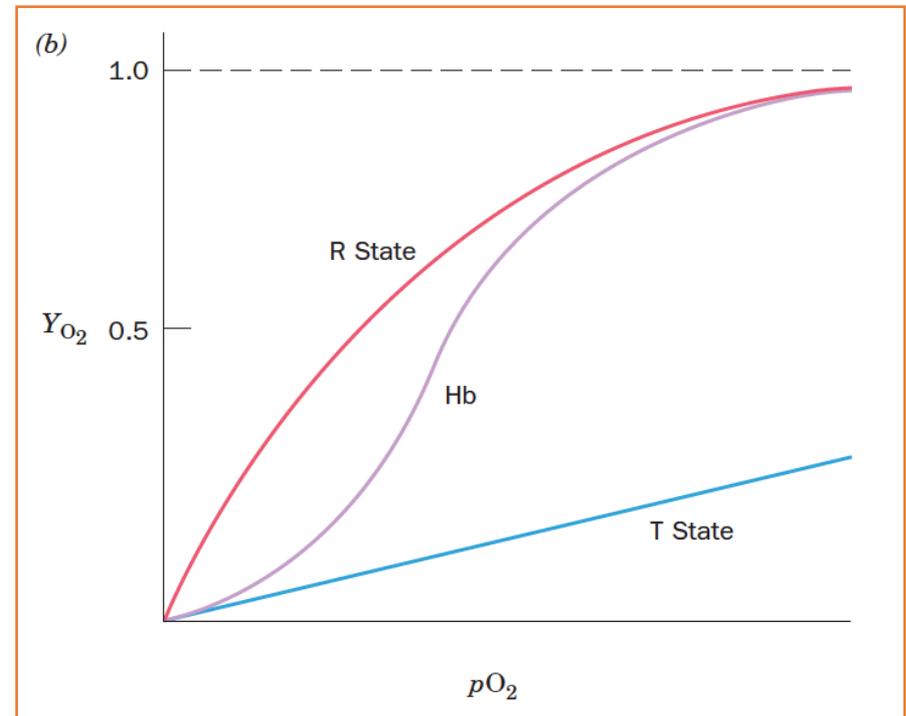
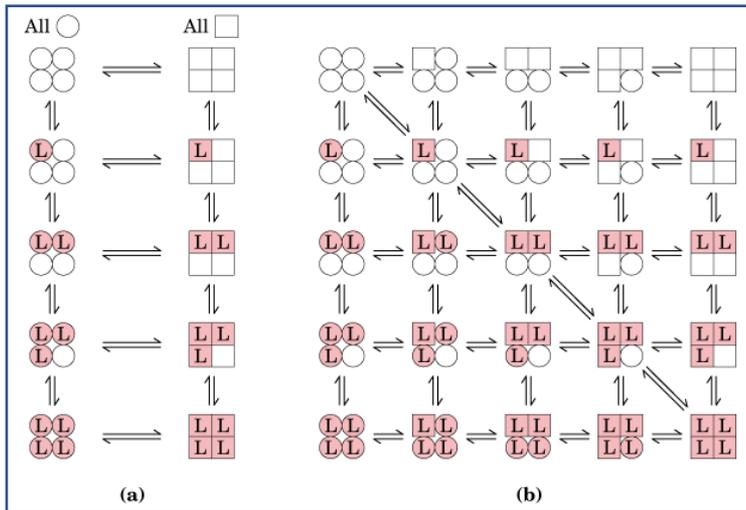
O oxigênio altera a conformação da hemoglobina

- A ligação do oxigênio à hemoglobina, altera a conformação da proteína, aumentando a afinidade pelo oxigênio.
- A deoxihemoglobina encontra-se no estado **T**; já a oxihemoglobina, encontra-se no estado **R**.



A hemoglobina liga O₂ de forma cooperativa

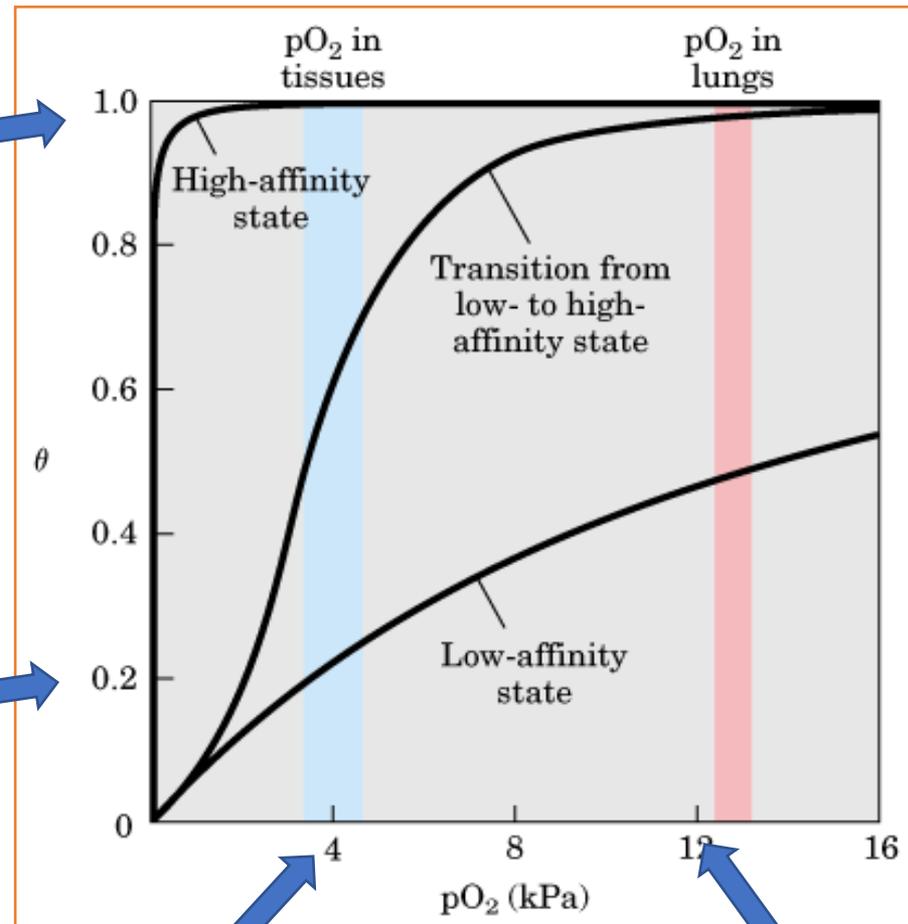
- A ligação da primeira molécula, induz uma mudança de conformação da outra cadeia de hemoglobina, estabilizando seu estado de maior afinidade pelo O₂.



Como interpretar a curva de saturação com oxigênio?

Saturação de O₂ no sangue
ao nível do mar

Saturação de O₂ no
sangue no topo Everest

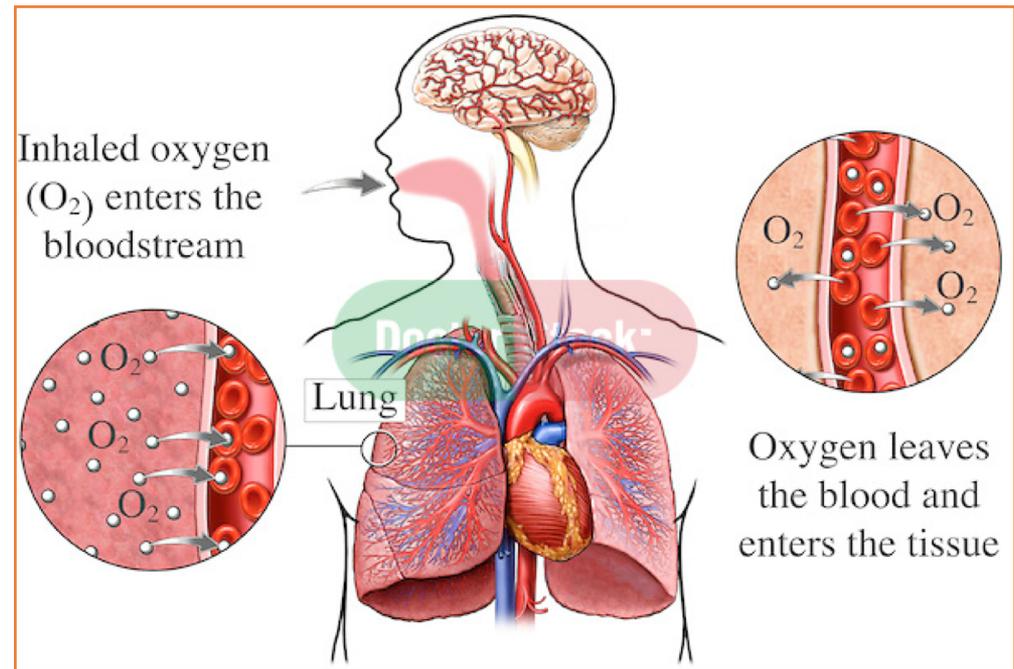
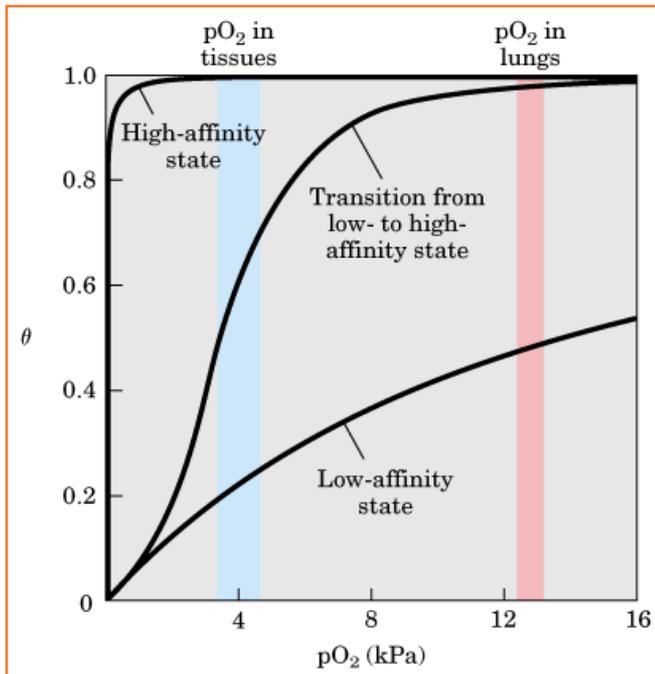


Pressão de O₂ no topo do
Everest (>8,000m)

Pressão de O₂
ao nível do mar

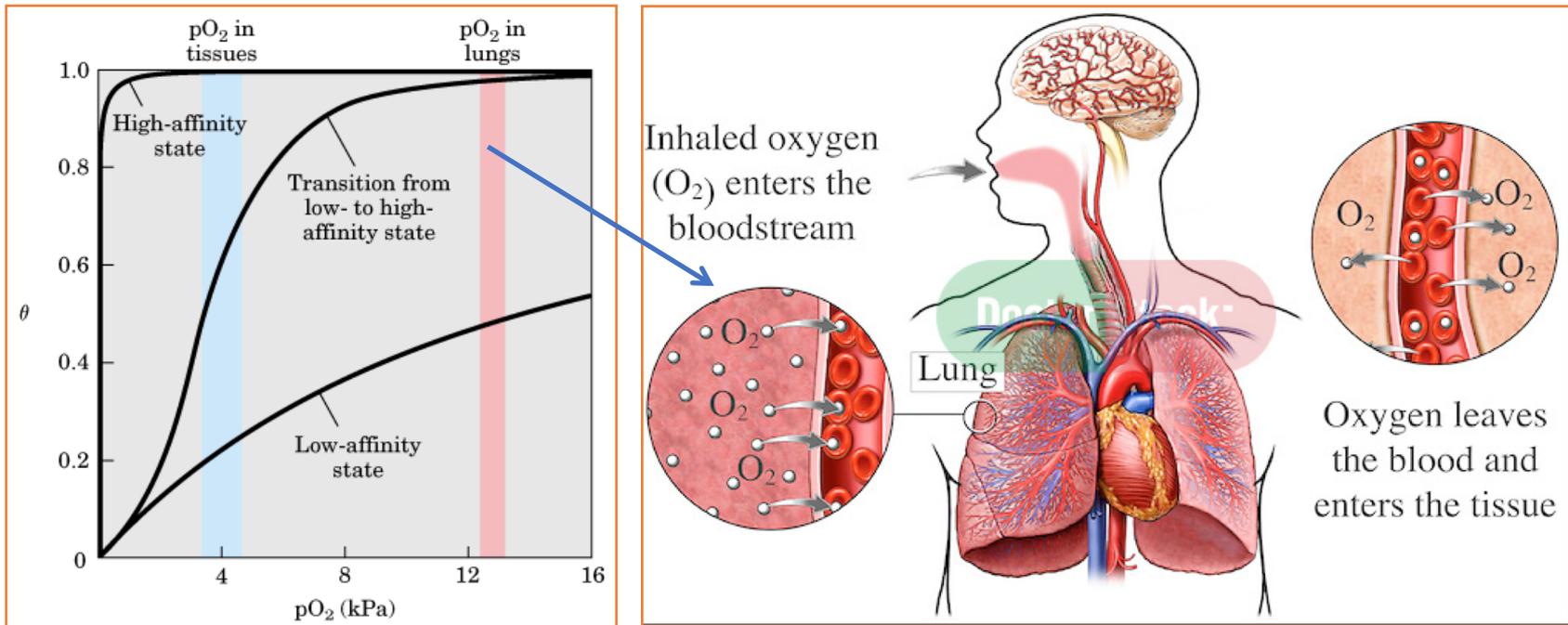
O mudança de afinidade pelo oxigênio é essencial para a função da hemoglobina

- Esta mudança de conformação e afinidade pelo O_2 é essencial para que o oxigênio se ligue à hemoglobina nos pulmões ($\uparrow pO_2$), mas se desligue nos tecidos ($\downarrow pO_2$).



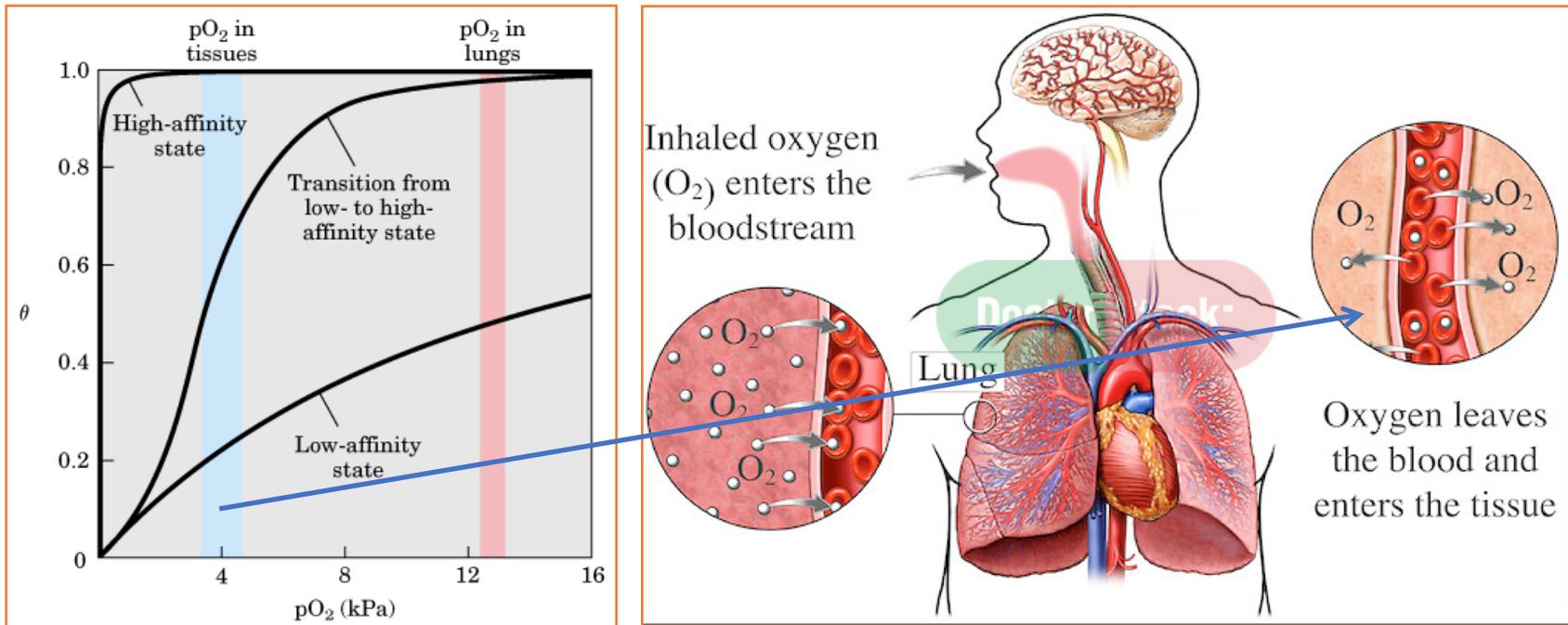
O mudança de afinidade pelo oxigênio é essencial para a função da hemoglobina

- Esta mudança de conformação e afinidade pelo O₂ é essencial para que o oxigênio se ligue à hemoglobina nos pulmões (↑ pO₂), mas se desligue nos tecidos (↓ pO₂).



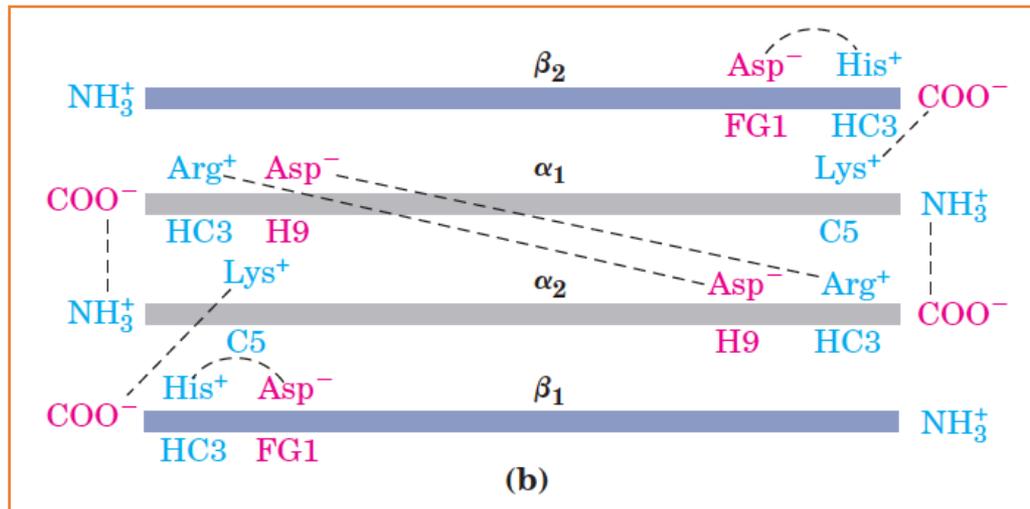
O mudança de afinidade pelo oxigênio é essencial para a função da hemoglobina

- Esta mudança de conformação e afinidade pelo O₂ é essencial para que o oxigênio se ligue à hemoglobina nos pulmões (↑ pO₂), mas se desligue nos tecidos (↓ pO₂).



A hemoglobina não transporta apenas O₂....

- Enquanto o grupo Heme transporta o O₂, as cadeias laterais da hemoglobina transportam H⁺.
- Esta propriedade da hemoglobina é conhecida como efeito Bohr, em homenagem a Christian Bohr, pais do físico Niels Bohr.
- Com a mudança da conformação da hemoglobina do estado T para o R, há alterações no pKa de cadeias laterais de alguns aminoácidos.
- Em particular, de resíduos de Histidina, com pKa ~6, próximo ao pH do sangue.



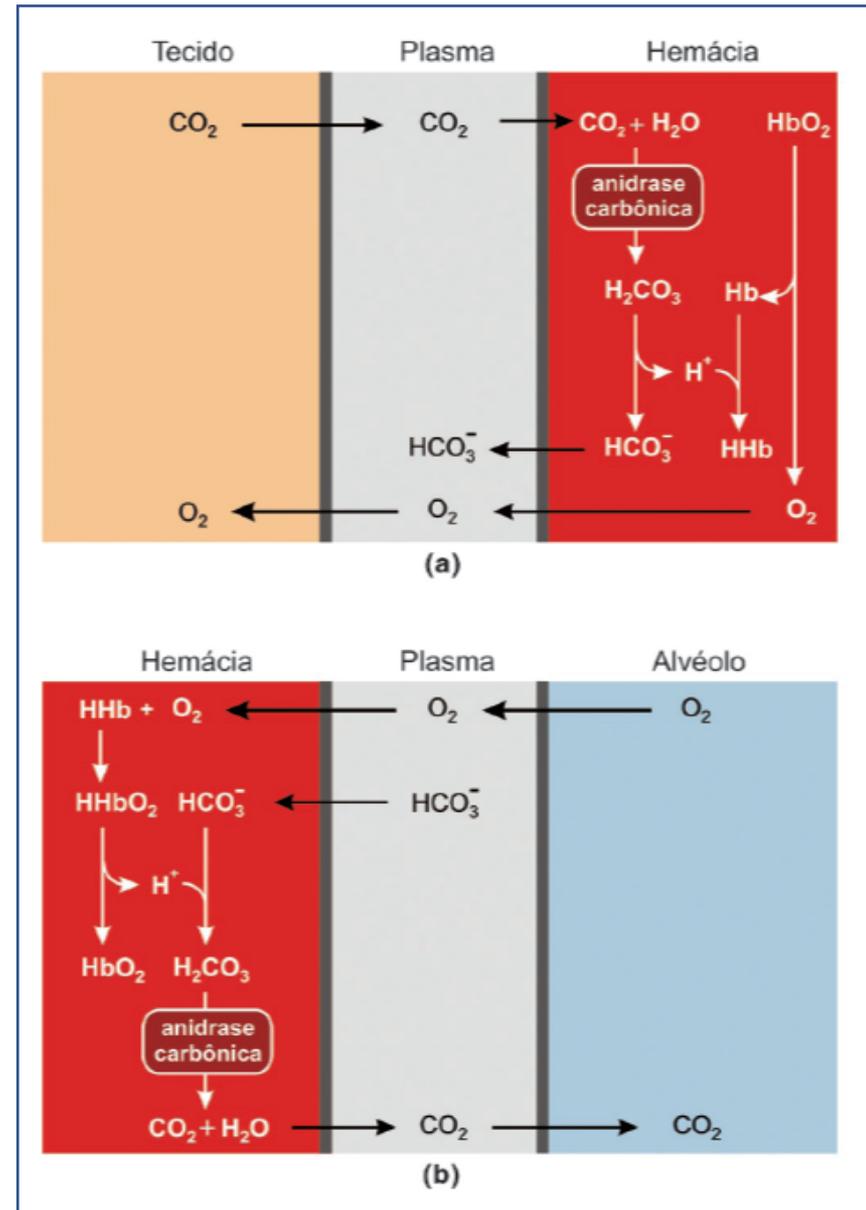
A hemoglobina não transporta apenas O₂....

- Enquanto o grupo Heme transporta o O₂, as cadeias laterais da hemoglobina transportam H⁺.
- Esta propriedade da hemoglobina é conhecida como efeito Bohr, em homenagem a Christian Bohr, pais do físico Niels Bohr.
- Com a mudança da conformação da hemoglobina do estado T para o R, há alterações no pKa de cadeias laterais de alguns aminoácidos.
- Em particular, de resíduos de Histidina, com pKa ~6, próximo ao pH do sangue.



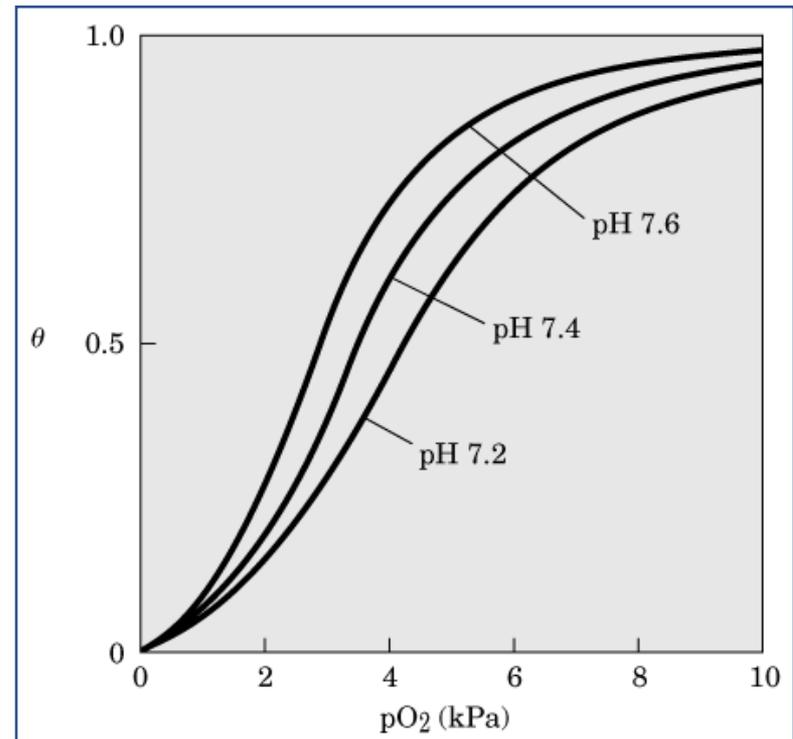
O transporte de O_2 regula o transporte de H^+ e CO_2

- A enzima anidrase carbônica é abundante em hemácias e tem um papel importante neste processo.
- Esta enzima catalisa a reação de formação de ácidos carbônicos a partir de CO_2 e H_2O .



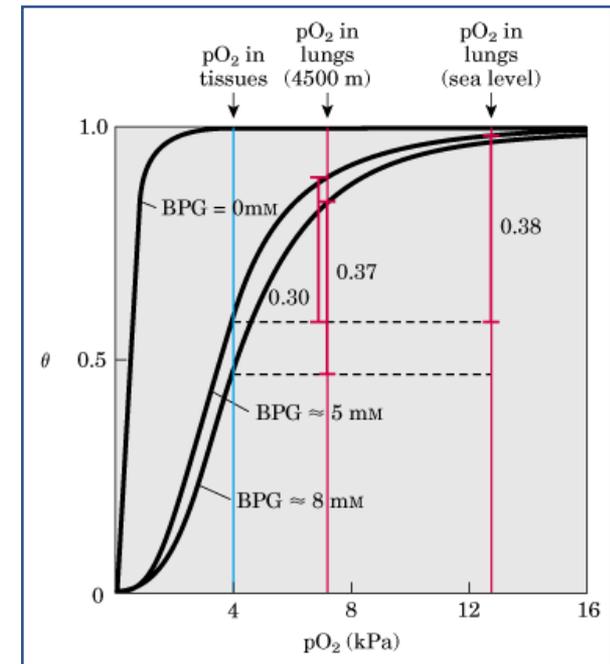
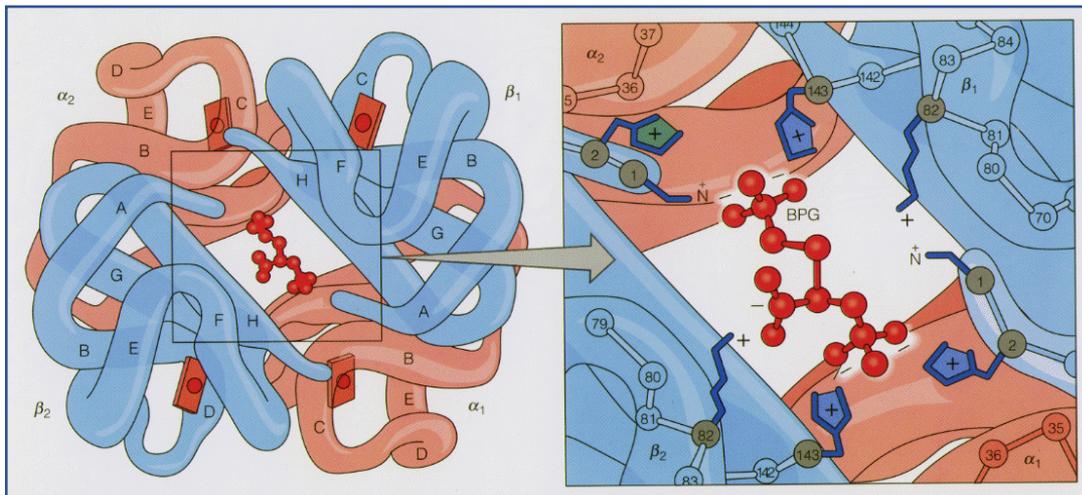
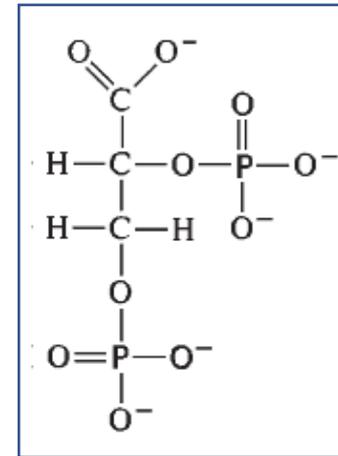
O pH do sangue é importante para o transporte de O₂

- O transporte de H⁺ e CO₂ pela hemoglobina e hemácias tem como resultado uma mudança no pH do sangue.
- O pH do sangue, por outro lado, altera a afinidade da hemoglobina pelo O₂.
- Todas estas mudanças, tornam a hemoglobina uma molécula ideal para sua função: recolher oxigênio nos pulmões e libera-lo nos tecidos.
- E ao mesmo tempo, recolher o CO₂ acumulado nos tecidos, trazendo-o de volta para ser eliminado nos pulmões.



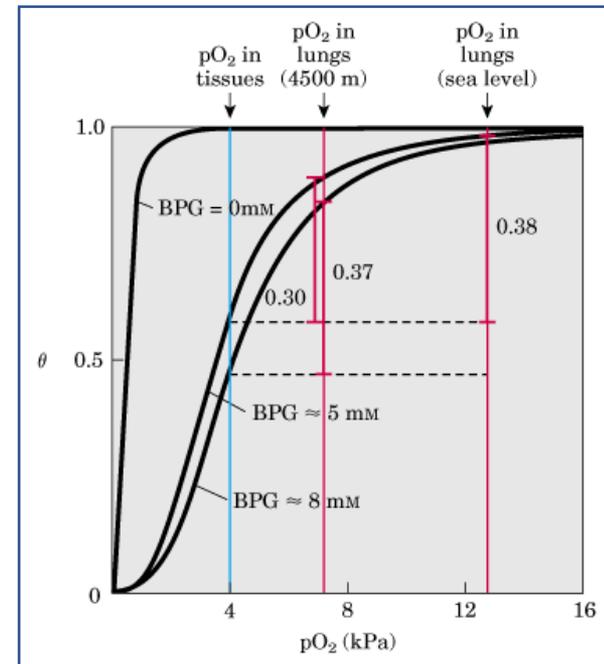
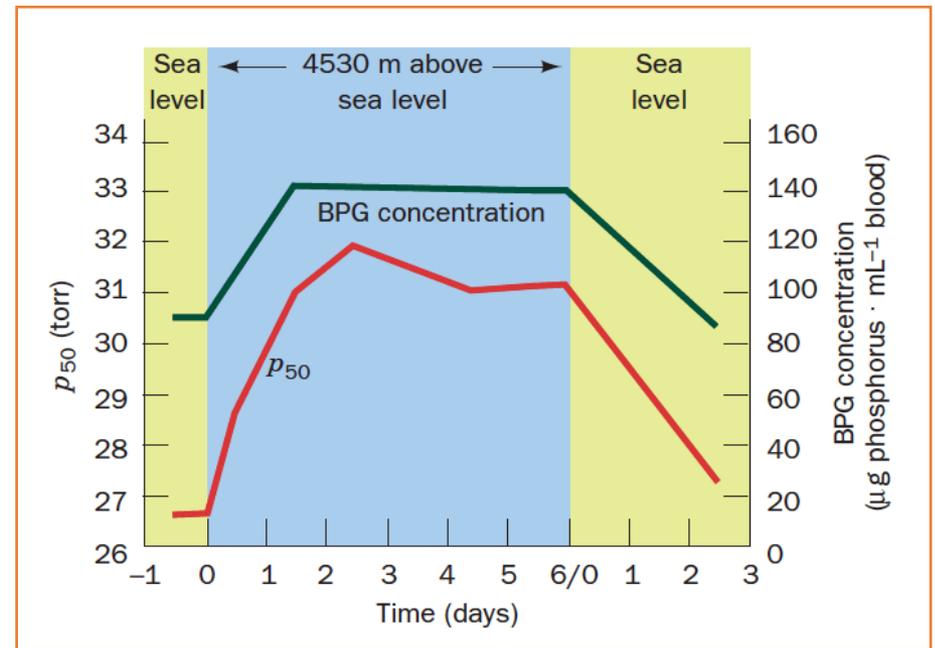
O 2-3-bisfosfoglicerato (BPG)

- O BPG é produzido nas hemácias a partir do 3-fosfoglicerol (via glicolítica).
- O BPG liga-se ao centro da hemoglobina, inibindo a transição do estado de baixa para o de alta afinidade pelo oxigênio.
- O BPG é essencial para "ajustar" a afinidade e a cooperatividade da hemoglobina pelo oxigênio.
- Sem o BPG, a hemoglobina não liberaria o oxigênio nos tecidos.

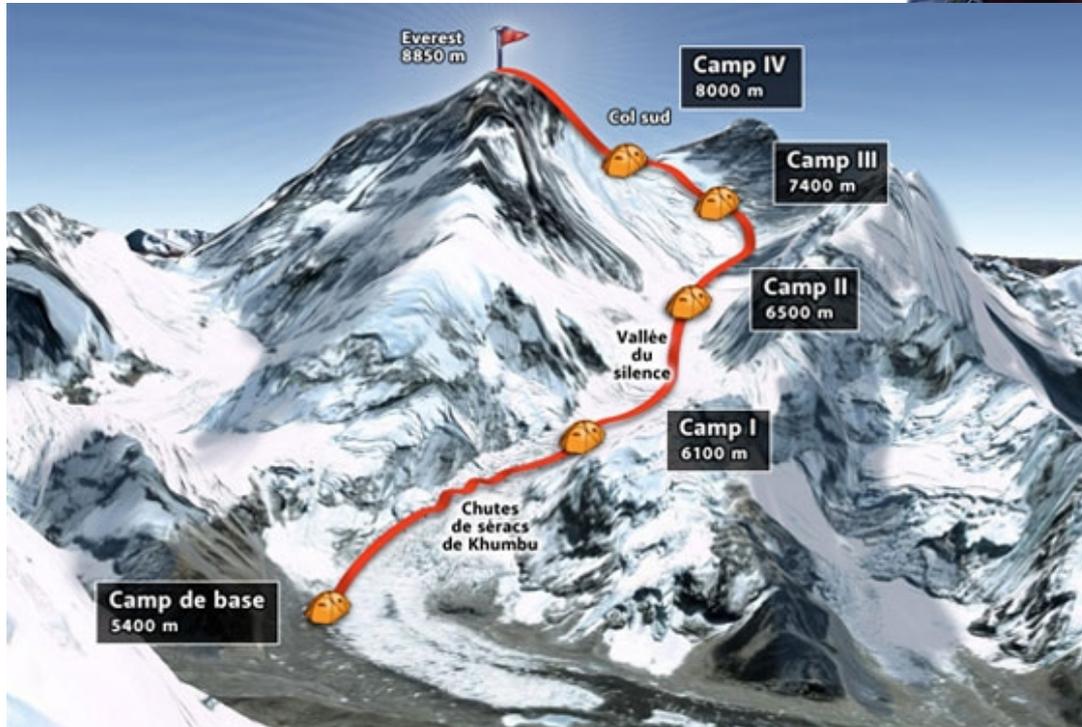


A concentração de BPG pode ser alterada na hemácia

- A concentração de BPG pode ser alterada na hemácia.
- Por exemplo, em altitudes onde o pO_2 é baixo, a concentração de BPG aumenta.
- Isto faz com que a afinidade da hemoglobina pelo O_2 aumente no pulmão e diminua nos tecidos.
- Isto permite que o O_2 se ligue a hemoglobina no pulmão e se desligue nos tecidos.



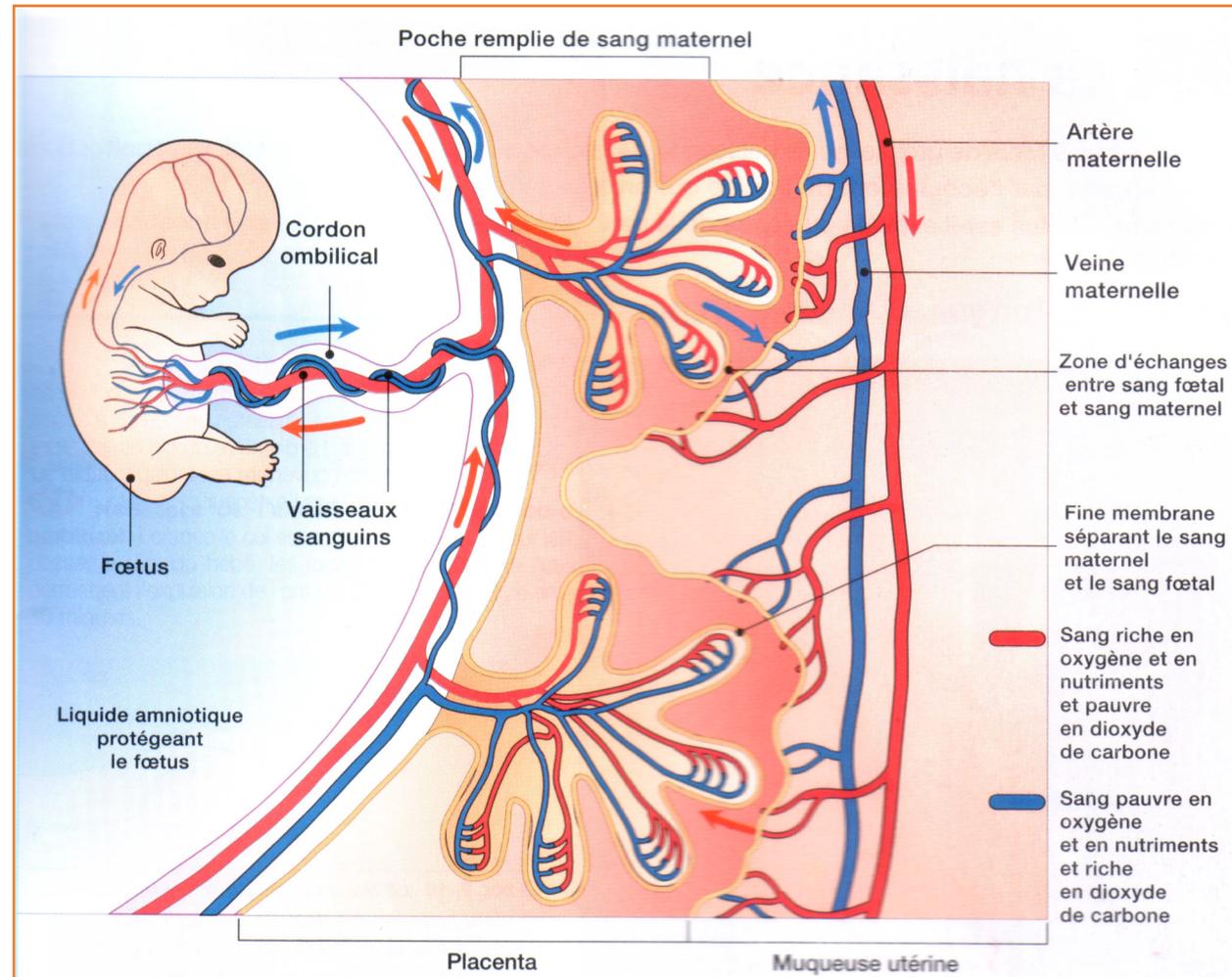
Escalando uma montanha: aclimatação



- Durante uma escalada, o corpo vai se adaptando à altitude
- Uma destas adaptações é o aumento da concentração de BPG nas hemácias

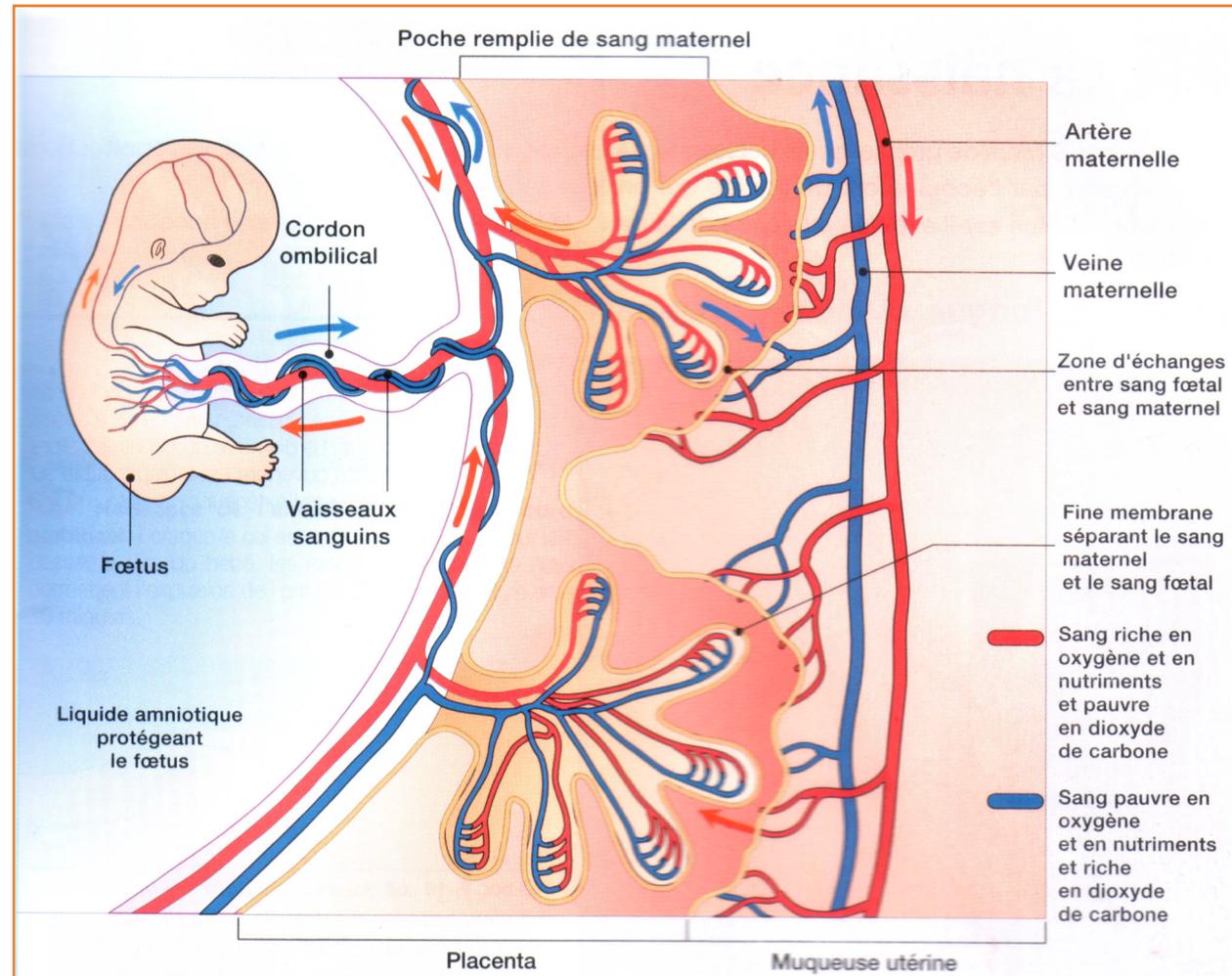
O transporte de oxigênio na gravidez

- Durante a gravidez, a mãe tem que suprir todas as necessidades nutricionais do feto que se desenvolve no útero
- Isto é feito através do cordão umbilical
- Como o oxigênio é transferido para o sangue do bebê?



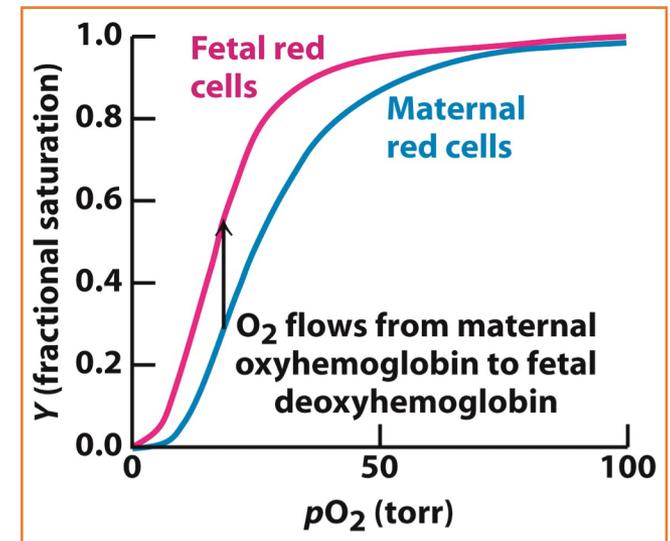
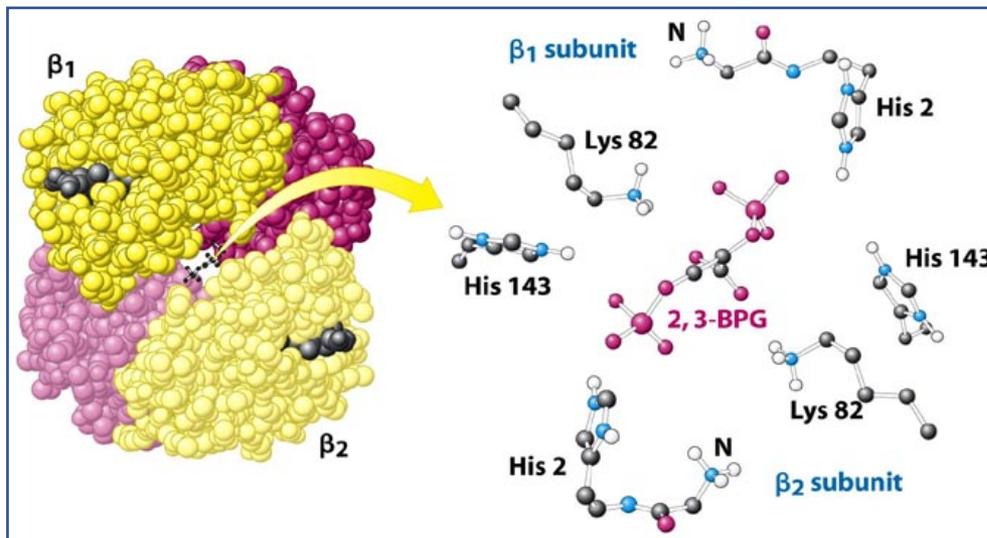
Hemoglobina fetal

- O feto humano, e de outros mamíferos, produz uma hemoglobina diferente da HbA. Ao invés da cadeia β , o feto produz a cadeia γ , que se associa com a cadeia α formando a hemoglobina fetal (HbF) ($\alpha_2\gamma_2$).
- Isto porque o oxigênio precisa ser transferido do sangue materno, para o sangue do bebê.
- A transferência é feita na placenta.



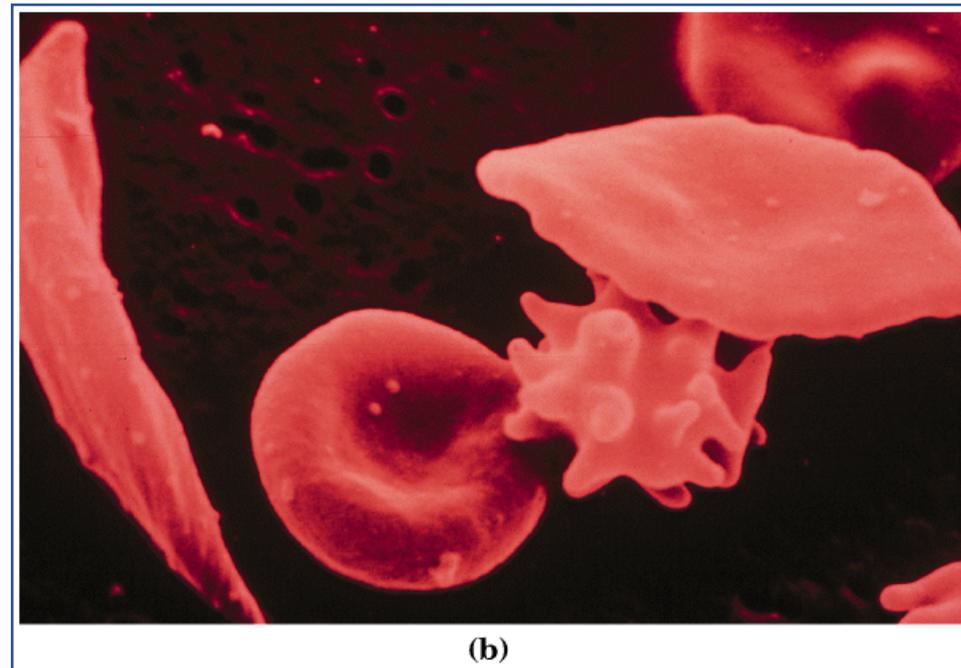
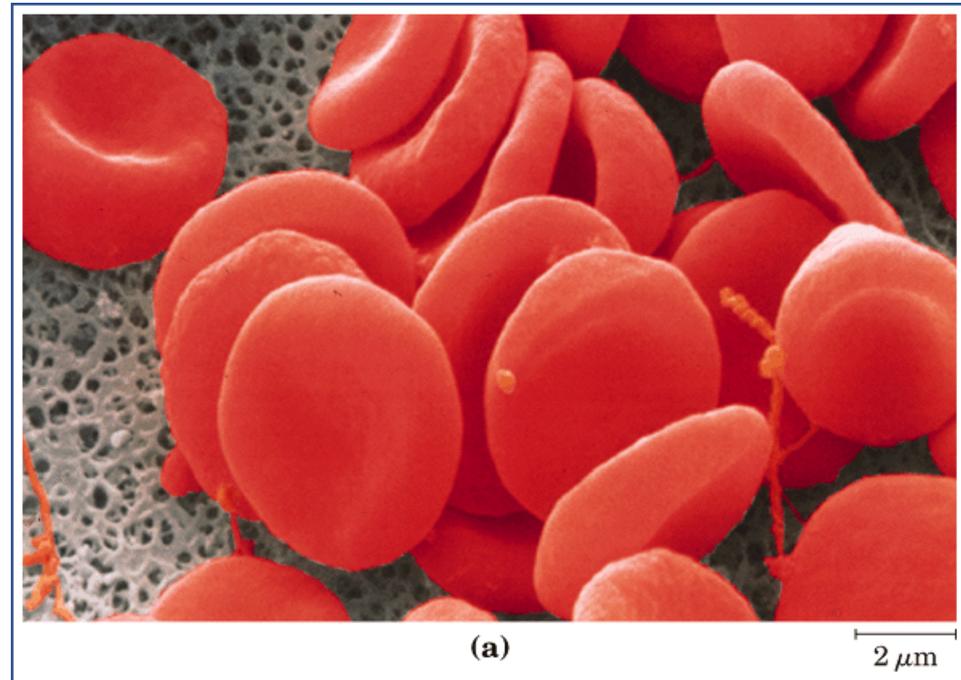
Hemoglobina fetal

- A HbF tem afinidade mais alta por oxigênio, em condições fisiológicas, do que a HbA da mãe, permitindo assim que o O₂ seja transferido da mãe para o feto.
- As cadeias β e γ da hemoglobina têm o mesmo número de aminoácidos, porém, a cadeia γ tem uma serina ao invés de uma histidina na posição 143. Esta histidina é importante para a ligação do BPG.
- Assim, a HbF não liga BPG com a mesma afinidade, aumentando a ligação de O₂.



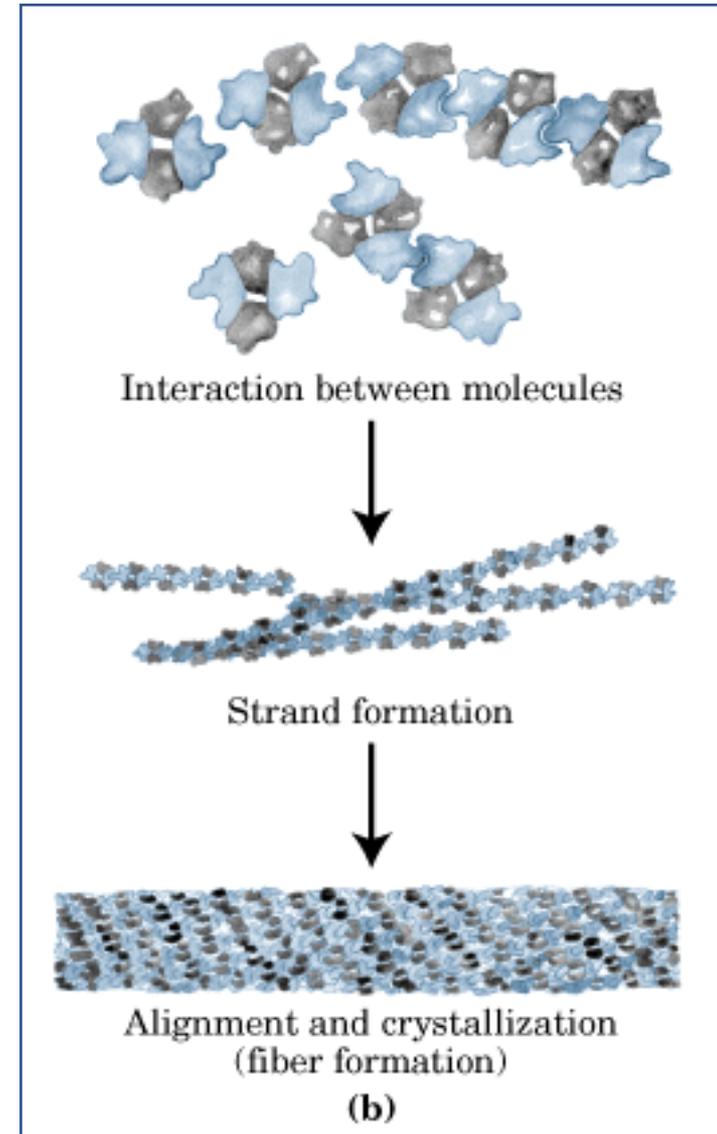
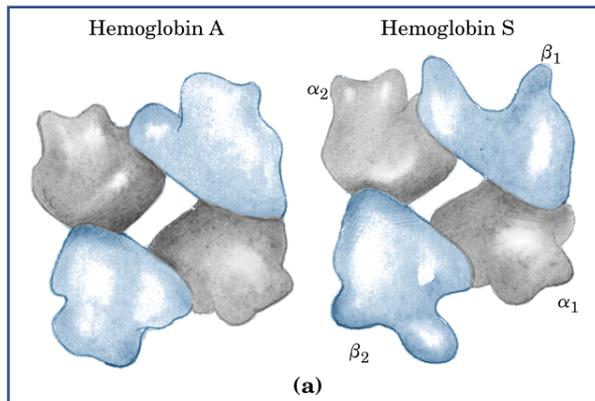
Anemias

- Quase 500 mutações (variações na sequência primária das hemoglobinas) são conhecidas, quase todas, muito raras.
- A diferença na estrutura causada pela mudança de um único aminoácido podem ser pequenas, mas os efeitos são, geralmente, importantes.

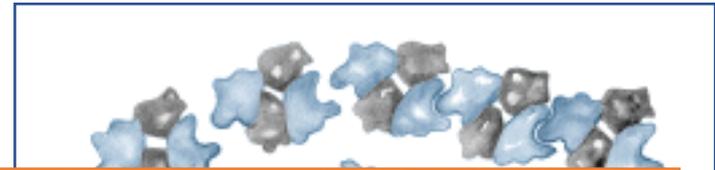


Anemias

- A anemia falciforme demonstra a importância da estrutura primária, secundária, terciária e quaternária da hemoglobina.
- Pessoas que carregam o gene da hemoglobina S, produzem uma hemoglobina que contém uma Valina na posição 6, ao invés de um ácido glutâmico.
- Esta mudança faz com que a hemoglobina S tenha uma carga negativa a menos que a hemoglobina normal, em pH 7.4.
- A substituição de um aminoácido hidrofílico por um alifático faz ainda com que se crie uma região que não interage com a água.
- A hemoglobina S começa, então, a agregar, formando as longas fibras de agregados característicos da anemia falciforme.

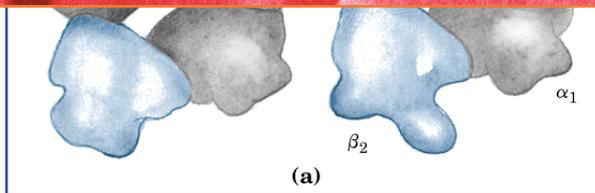


Anemias



Alignment and Crystallization
(fiber formation)

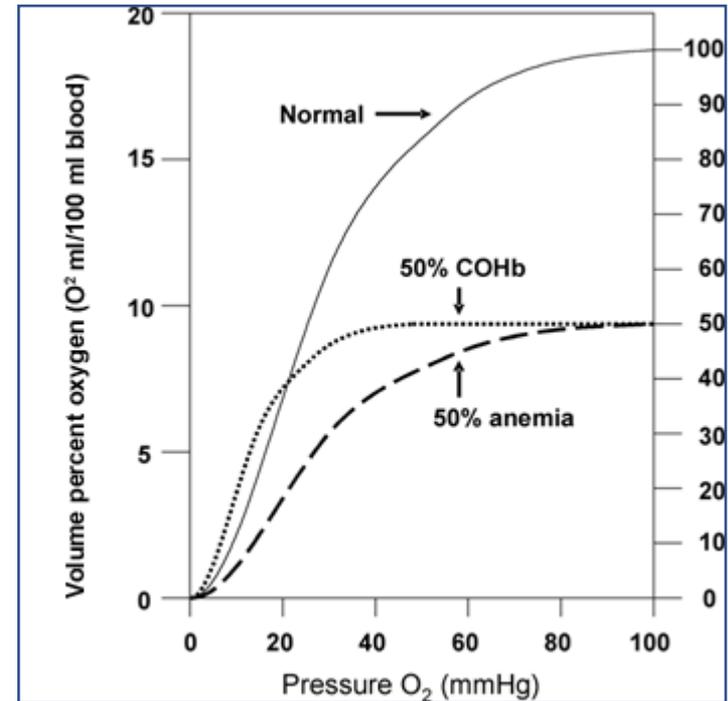
(b)



(a)

O monóxido de carbono (CO)

- O monóxido de carbono (CO) é um gás inodoro que se liga-se com alta afinidade à hemoglobina.
- É interessante observar, porém, que indivíduos expostos a CO e que tenham metade da hemoglobina comprometida venham a falecer.
- É sabido que pessoas com anemia conseguem viver razoavelmente bem com metade da hemoglobina de um indivíduo normal.
- O problema é que o CO aumenta a afinidade da HbA pelo O₂ e uma hemoglobina com duas moléculas de CO e duas moléculas de O₂ ligadas, não libera o oxigênio para o tecido em condições fisiológicas.
- Para socorrer pessoas expostas a CO, é preciso remove-las rapidamente do local para que o oxigênio atmosférico possa substituir o CO ligado à hemoglobina.
- Administrar oxigênio 100% aumenta em até 4-vezes a troca do CO pelo O₂.



Bibliografia

- Capítulo 2 (Aminoácidos e proteínas) do livro Bioquímica Básica (Marzzoco e Torres).
- Capítulo 4 (A estrutura tridimensional de proteínas) do Lehninger – Princípios de Bioquímica
- YOUTUBE: <https://www.youtube.com/watch?v=UFIfiLjSE5w>