



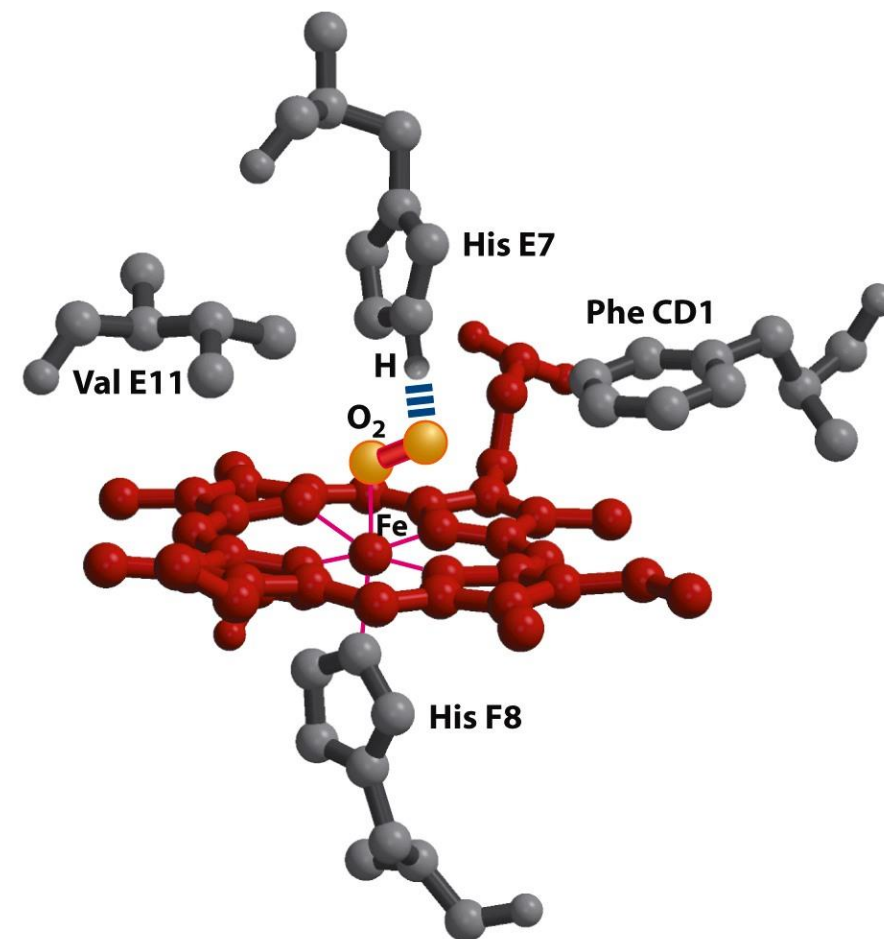
Хемоглобин

Функција и структура

ПРЕДАВАЊА Д-Р НАТАША РИСТОВСКА

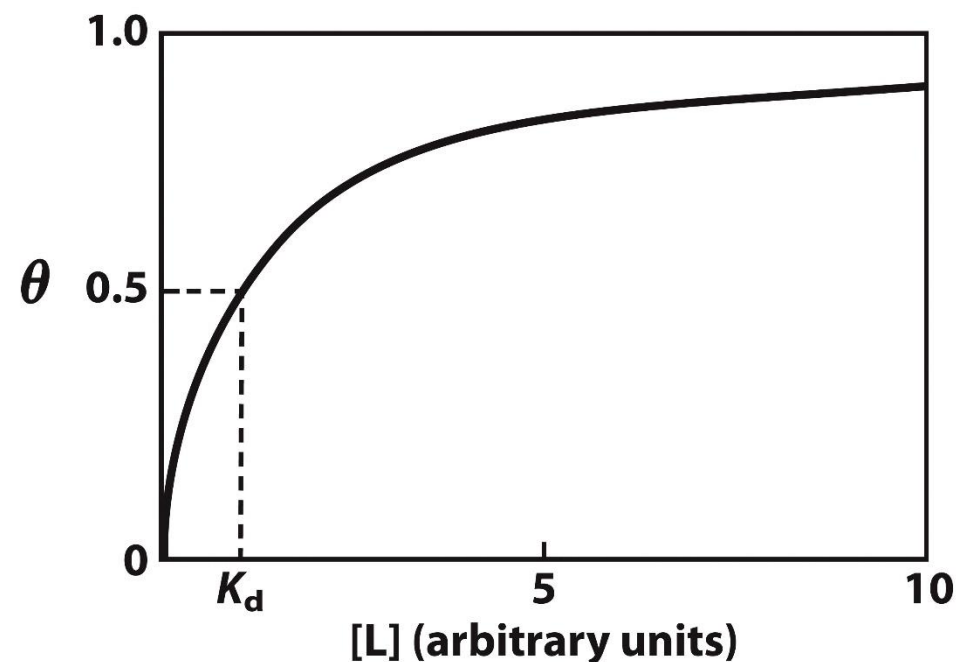
МИОГЛОБИН

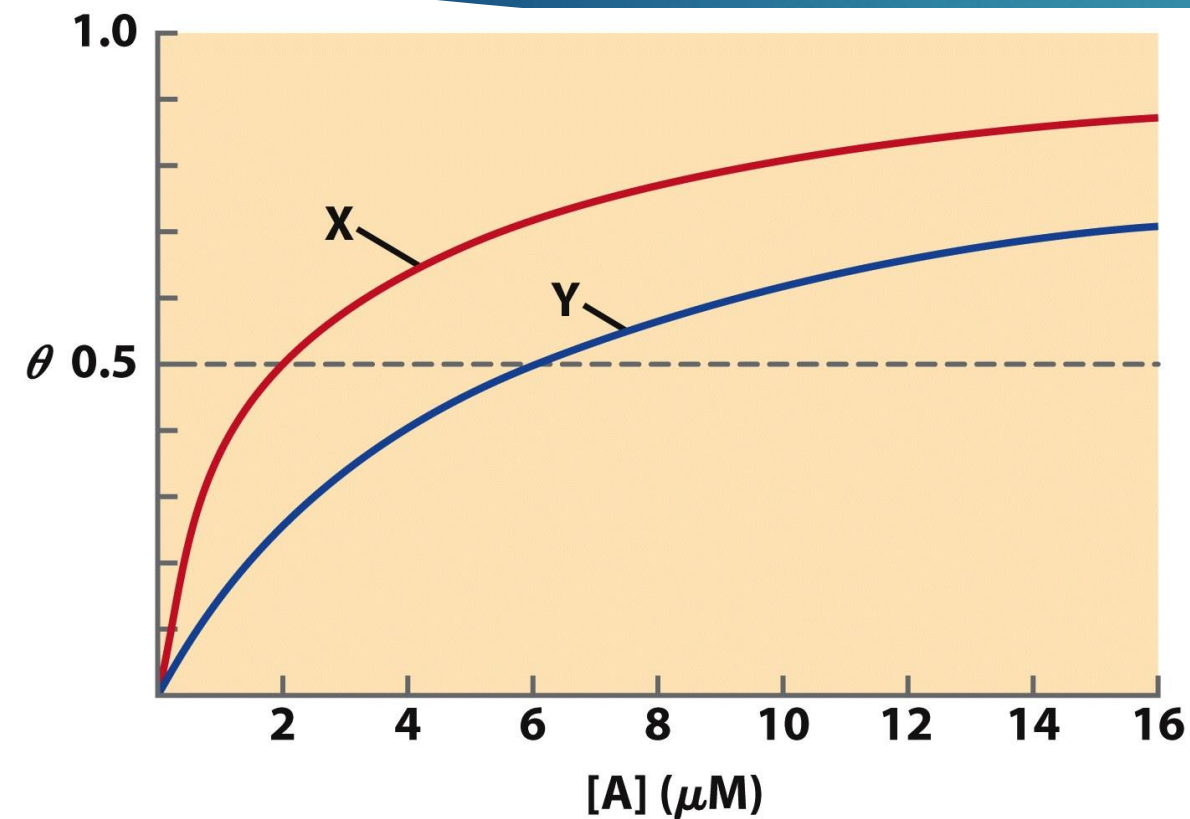
- ▶ Сврзување на кислород (складирање).
- ▶ Оваа функција ја има Fe^{2+} јонот, чија реактивност е намалена поради координативните врски во хемот.
- ▶ O_2 се сврзува нековалентно со Fe^{2+} од хемот, а се стабилизира преку водородна врска со протонот од His-64, односно His E7).
- ▶ Покрај 4 координативни врски со N-атомите од порфириинскиот систем, Fe^{2+} е нековалентно врзан со глобинот преку хистидински остаток (His 93 или His F8).
- ▶ Миоглобинот има едно место за сврзување со O_2 .



Интеракции протеин - лиганд

- ▶ Вредноста за K_d може да се определи графички преку зависноста на уделот на зафатени места за сврзување од концентрацијата на слободниот лиганд.
- ▶ **θ е хиперболична функција од $[L]$.**
- ▶ При зголемување на концентрацијата на лигандот, уделот на зафатени места за сврзување од лигандот асимптотски се приближува до граничната вредност.
- ▶ $\theta = 0.5$ е концентрацијата на $[L]$ при која половина од достапните места за сврзување на лигандот се зафатени, а одговара на $1/K_d$.





- ▶ Пресметките се поедноставни во однос на константата на дисоцијација на PL комплексот.

$$K_d = [P][L]/[PL] = k_d/k_a$$

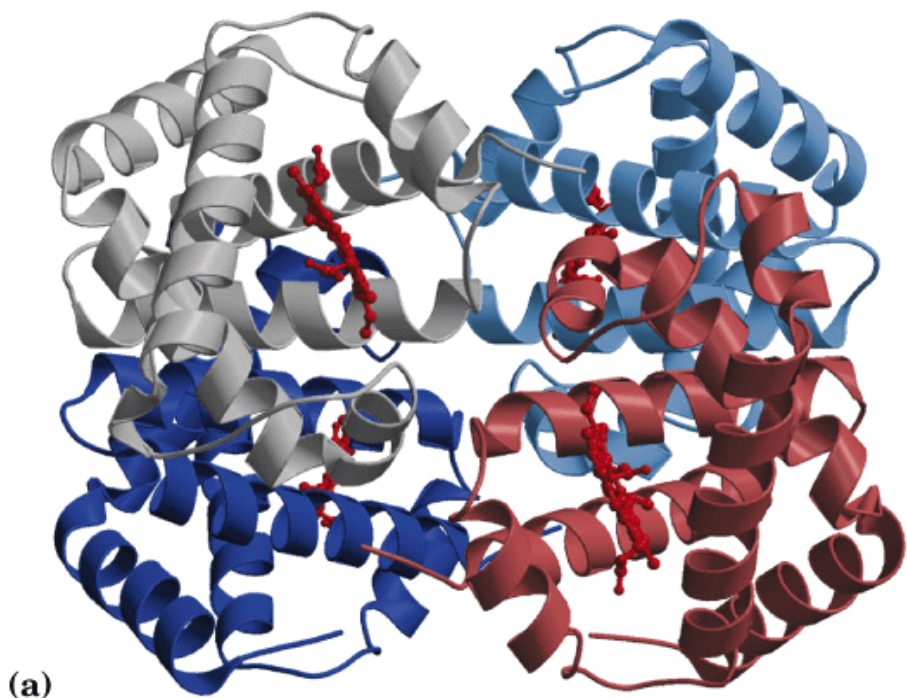
- ▶ После преуредување, се добива изразот:

$$\theta = [L]/([L] + K_d)$$

- ▶ $K_d = 1/K_a$, одговара на зафатеност на половина од вкупниот број на места за сврзување.

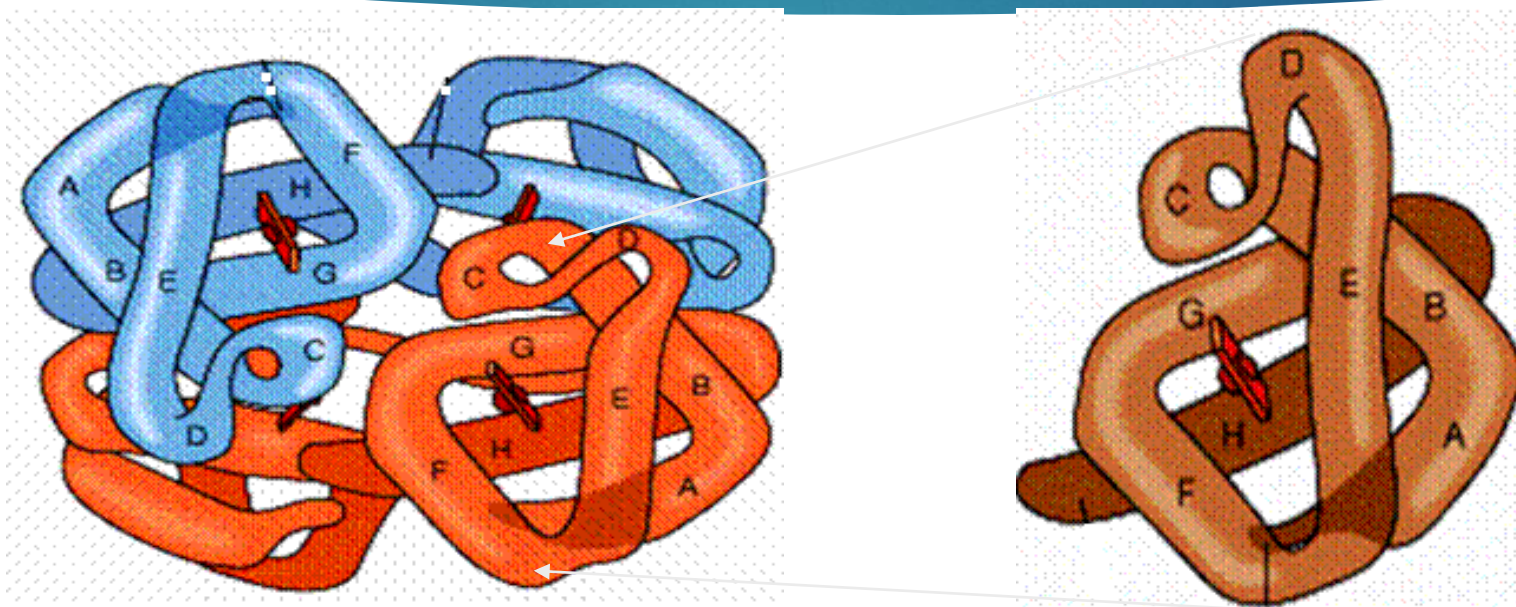
- Пониска вредност на K_d , значи повисок афинитет на лигандот кон протеинот.

Хемоглобин



- ▶ Прв олигомерен протеин со решена 3D структура е хемоглобин Hb.
- ▶ Хемоглобинот е изграден од протеински дел (глобин) и 4 простетични групи – хем.
- ▶ Глобинот содржи 4 полипептидни низи: две α - (141 остаток) и две β -низи (146 аминокиселински остатоци). Хемоглобинот е **тетрамер**.
- ▶ Двете низи имаат слични тридимензионални структури поради сличните аминокиселински секвенци (совпаѓање на 27 позиции).
- ▶ Поединците се распоредени во симетрични парови. Хемоглобинот е **димер од $\alpha\beta$ -протомери, со циклична C_2 симетрија**.

Слична структура со миоглобинот



- ▶ Тридимензионалните структури на двете подединици на хемоглобин и полипептидната низа на миоглобин се многу слични: изградени се од **8 алфа спирали и непротеински дел - хем**.
- ▶ Сите три полипептиди се членови на **глобинското** семејство. Покажуваат **сличност во 27 позиции**.



	Mb	Hb α	Hb β
NA1	1V	1V	1V
	—	—	H
	L	L	L
A1	---S	S	T---
	E	P	P
	G	A	E
	E	D	E
	W	K	K
	Q	T	S
	L	N	A
	V	V	V
	L	K	T
	H	A	A
	V	A	L
	W	W	W
	A	G	G
	K	K	K
	V	V	V
A16	---E	G	---
	A	A	—
B1	--20D	20H	N---
	V	A	20V
	A	G	D
	G	E	E
	H	Y	V
	G	G	G
	Q	A	G
	D	E	E
	I	A	A
	L	L	L
	I	E	G
	R	R	R
	L	M	L
	F	F	V
B16	---S	S	V---
	:	:	:
	:	:	:

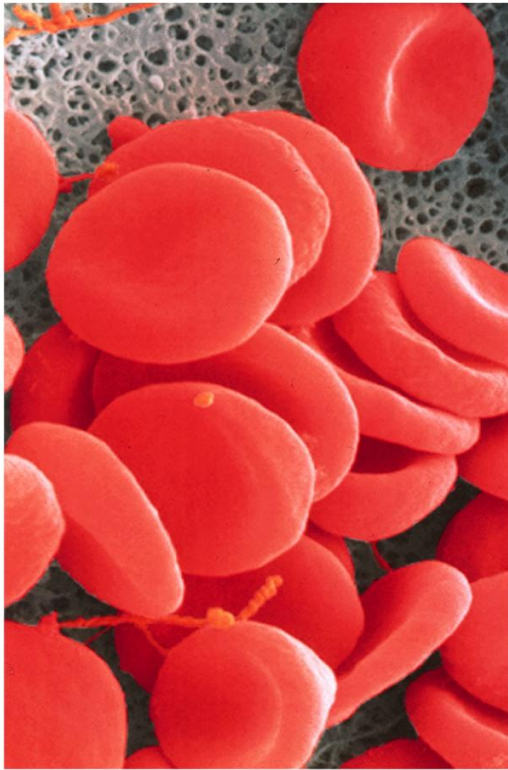
	Mb	Hb α	Hb β
	K	A	A
	K	H	H
	K	V	L
80G	D	D	D
	H	D	80N
	H	M	L
	E	P	K
	A	N	G
	E	A	T
F1	---L	80L	F---
	K	S	A
	P	A	T
	L	L	L
	A	S	S
	Q	D	E
	S	L	L
Proximal His F8	H	H	H
F9	---A	A	C---
	T	H	D
	K	K	K
	H	L	L
	K	R	H
	I	V	V
G1	--100P	D	100P
	I	P	E
	K	V	N
	Y	N	F
	L	F	R
	E	K	L
	F	100L	L
	I	S	G
	S	H	N
	A	C	V
	I	L	V
	:	:	:
	:	:	:

	:	:	:
C1	---H	F	Y---
	P	P	P
	E	T	W
	T	T	T
40L	E	40K	Q
	E	T	40R
C7	---K	Y	F---
	F	F	F
	D	P	E
	R	H	S
	F	F	F
	K	—	G
	H	D	D
	L	L	L
	K	S	S
D1	---T	H	T---
	E	—	P
	A	—	D
	E	—	A
	M	—	V
	K	—	M
D7	---A	G	G---
E1	---S	S	N---
	E	A	P
60D	L	Q	K
	L	V	60V
	K	K	K
	K	G	A
Distal His E7	H	H	H
	G	G	G
	V	60K	K
	V	K	K
	V	V	V
	L	A	L
	T	D	G
	A	A	A
	L	L	F
	G	T	S
	A	N	D
	I	A	G

	:	:	:
	H	V	C
	V	T	V
	L	L	L
	H	A	A
	S	A	H
G19	---R	H	H---
	H	L	F
120P	P	P	G
	G	A	120K
	D	E	E
	F	F	F
H1	---G	T	T---
	A	P	P
	D	120A	V
	A	V	Q
	Q	H	A
	G	A	A
	A	S	A
	M	L	Y
	N	D	Q
	K	K	K
	A	F	V
	L	L	V
	E	A	A
	L	S	G
	F	V	V
	R	S	A
140K	D	T	N
	I	L	L
	A	T	A
H21	---A	S	H---
	K	K	K
	Y	140Y	Y
	K	141R	146H
	E		
H26	---L		
	G		
	Y		
	Q		

H b α and Hb β only

Функција на хемоглобин



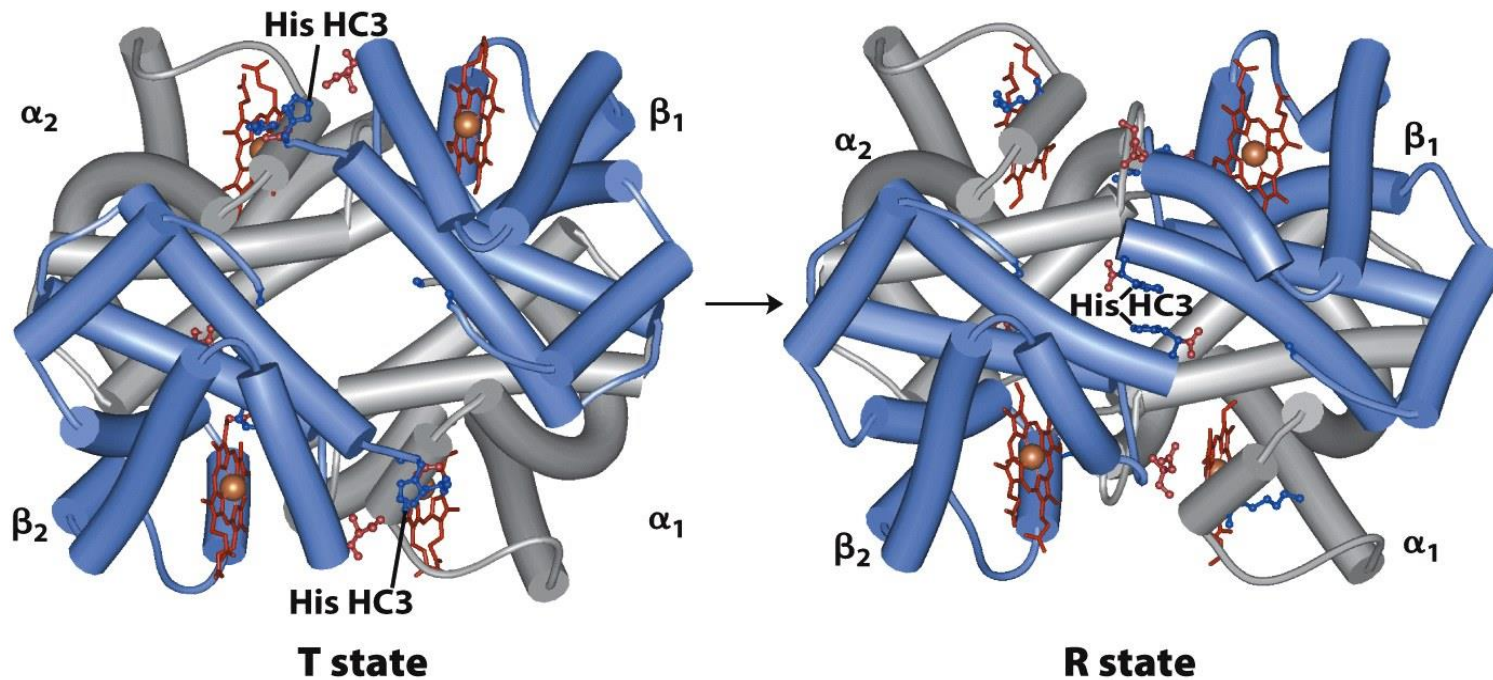
(a)

2 μm

- ▶ Хемоглобинот има повеќе подединици и места за сврзување на кислородот од миоглобинот.
- ▶ Хемоглобинот има функција да го **сврзува и транспортира кислородот**.
- ▶ Хемоглобинот ги пренесува двата крајни продукти на клеточна респирација H^+ и CO_2 .
- ▶ Каде и во каков облик се наоѓа хемоглобинот?
- ▶ Во еритроцитите (биконкавни дискови со дијаметар од 6 до 9 μm) растворен во цитосолот (до 34%).

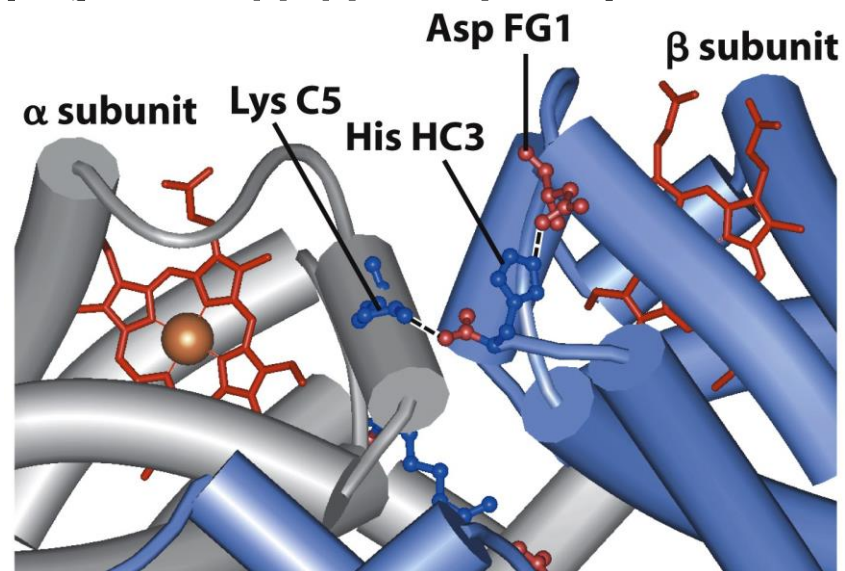
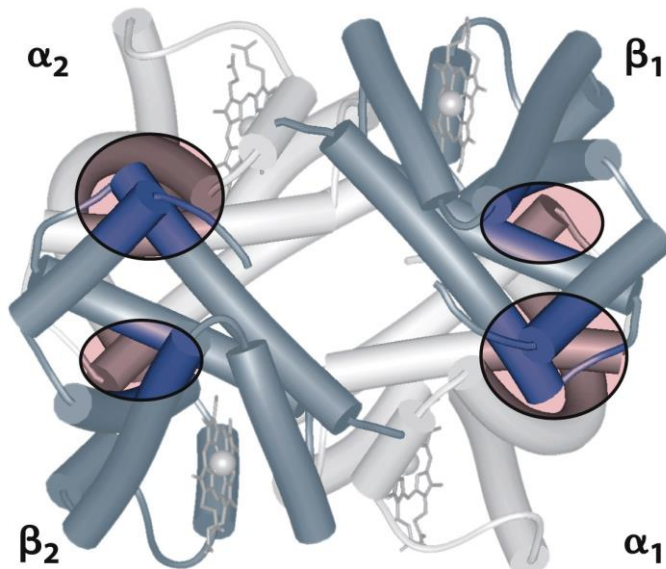
Промени на Hb при сврзување на O₂

- ▶ Дишење (пулсирање) на протеините.
- ▶ Хемоглобинот сврзува кислород во двете конформации: R (relaxed) - опуштена и T (tense) - напрегната состојба.



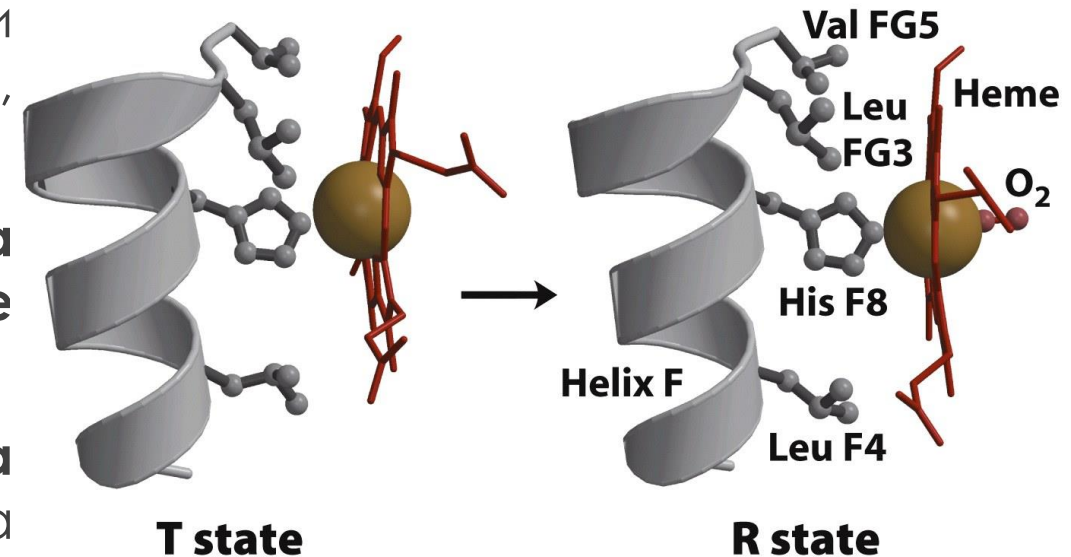
T конформација на хемоглобин

- ▶ При отсуство на O_2 постабилна е T конформацијата (деоксихемоглобин), која е стабилизирана со интеракции меѓу **јонски парови** на $\alpha_1\beta_2$ и $\alpha_2\beta_1$.
- ▶ T состојбата на деоксихемоглобин е стабилизирана со интеракциите меѓу **His HC3 и Asp FG1 од β подединицата**, како и **Lys C5 од α подединицата** и карбоксилната група на **His H3 која е C-крај на подединицата β** .

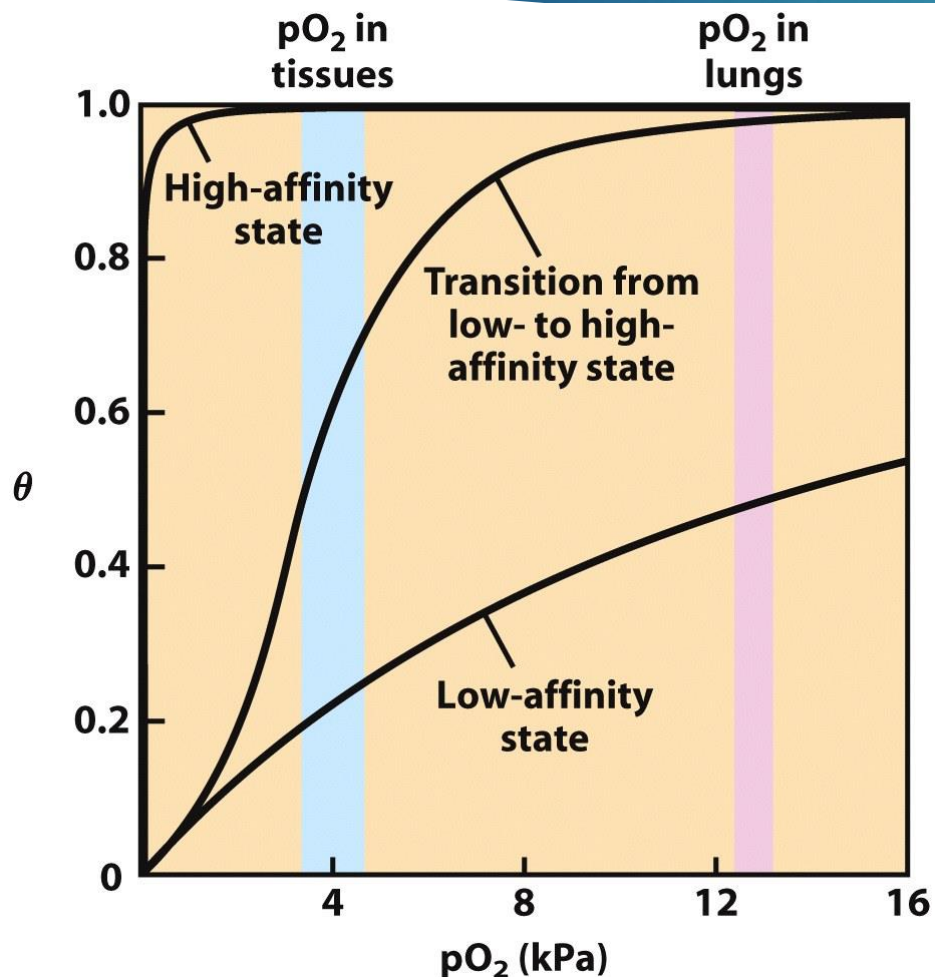


Структурни промени на хемоглобин

- ▶ Во R конформацијата е забележана промена на положбата на His HC3, и стеснување на џебот меѓу β подединиците, за разлика од T конформацијата.
- ▶ Преминот $T \rightarrow R$ е поттикнат од промената на положбите на аминокиселинските остатоци околу хемот.
- ▶ Во R состојба, **хемот завзема попланарна конформација**, се менува положбата на проксималниот His и сврзаниот F хеликс.
- ▶ Лигандот (O_2) има поголем афинитет за сврзување со R конформацијата.



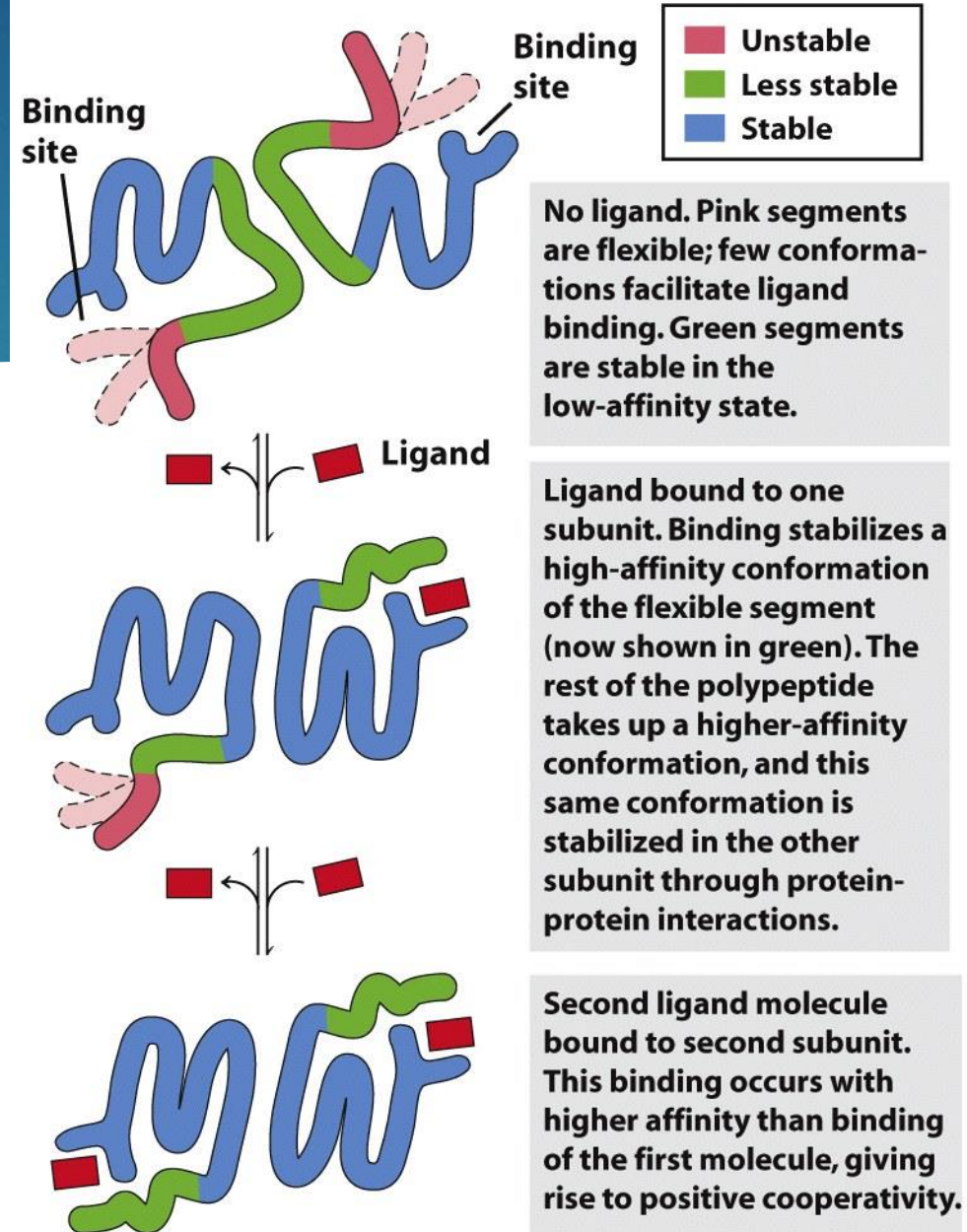
Кооперативно сврзување на O_2



- ▶ Протеинот со висок афинитет за сврзување на O_2 во белите дробови нема да испушти многу од сврзаниот кислород во ткивата.
- ▶ Протеинот со доволно низок афинитет на сврзување на O_2 за да го испушти во ткивата, не сврзува многу кислород во белите дробови.
- ▶ Решение: **Хемоглобинот покажува хибридна S-крива или сигмоидна крива.**
- ▶ Се добива како **последица на кооперативно сврзување**: сврзувањето на O_2 за одделна подединица на Hb го менува афинитетот за сврзување кај соседните подединици.

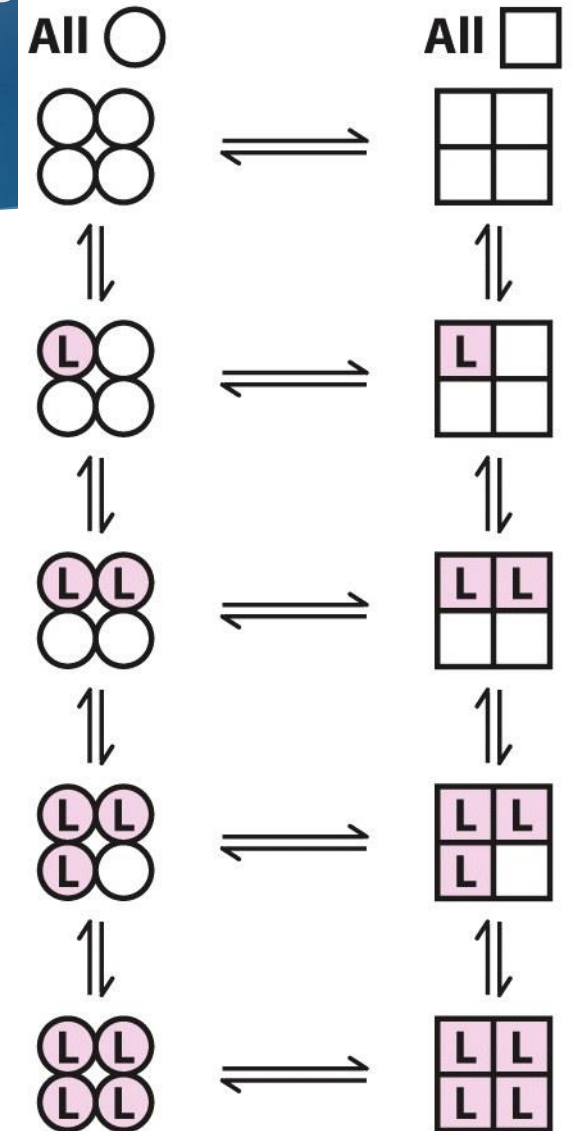
Алостерија

- ▶ Кооперативното сврзување на лигандот O_2 за мултимерниот протеин хемоглобин, претставува форма на алостеричко поврзување.
- ▶ Сврзувањето на еден лиганд (O_2 – хомотропен модулатор за активирање) влијае врз афинитетот на останатите слободни места за сврзување.

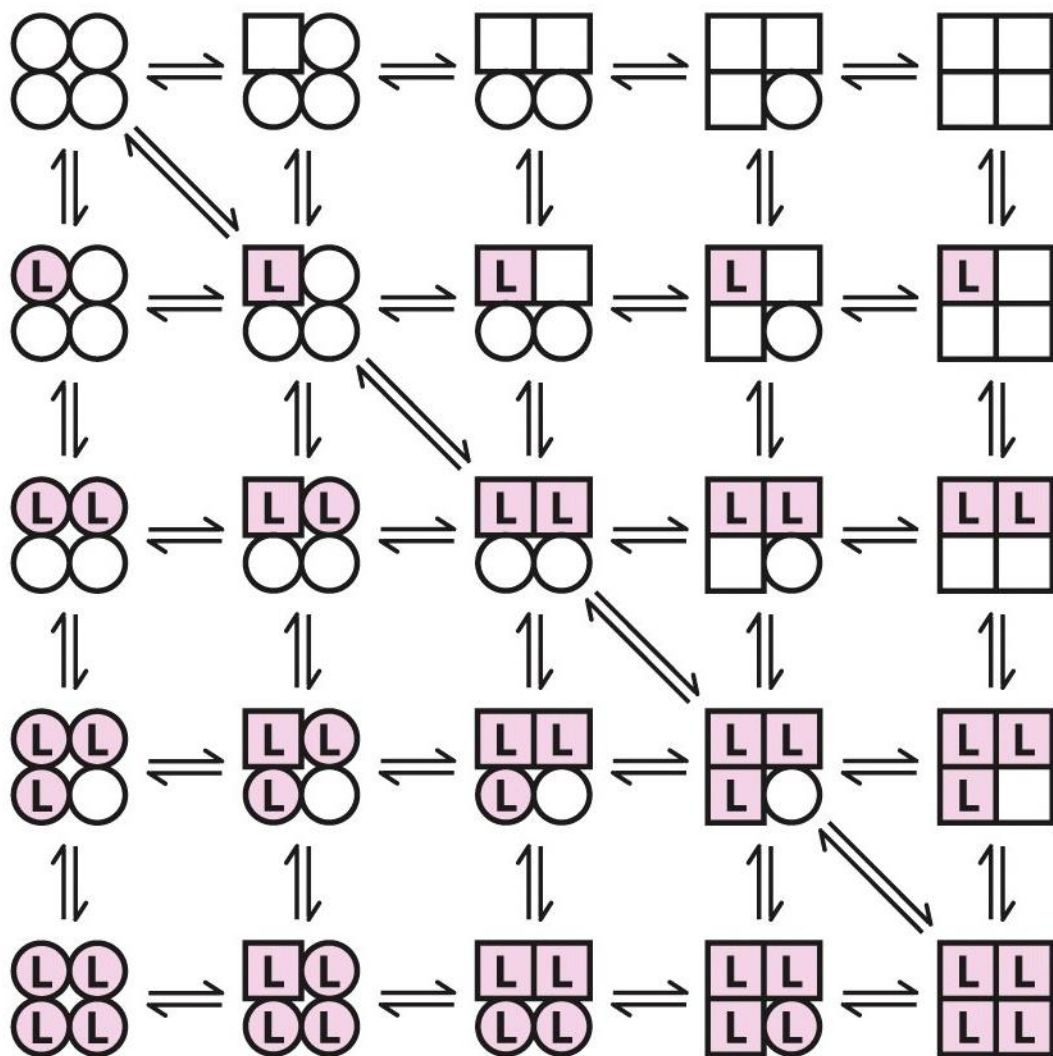


Механизам на кооперативно сврзување

- ▶ Механизмот за кооперативно сврзување на O_2 за хемоглобин со повеќе места на сврзување, се објаснува со помош на два модели:
 - ▶ MWC (Monod, Wyman, Changeux) – усогласен модел
 - ▶ Последователен (секвенцијален) модел.
- ▶ Според усогласениот модел:
 - ▶ Подединиците во протеинот се функционално идентични и немаат различни конформации.
 - ▶ Сите подединиците истовремено преминуваат од една во друга конформација (рамнотежа).
 - ▶ Лигандот се сврзува со различен афинитет за било која конформација, со што се олеснува преминот во конформација со повисок афинитет.



Последователен (секвенцијален) модел



- Сврзувањето на лигандот може да предизвика промена на конформацијата на секоја поединечна подединица.
- Конформационата промена на една подединица предизвикува слична промена на соседната подединица.
- Постојат повеќе можни преодни состојби отколку кај усогласениот модел.
- Усогласениот модел е граничен случај на секвенцијалниот модел.

Хилова равенка

- ▶ Квантитативен опис на кооперативното сврзување на лигандот во мултимерниот протеин со n места за сврзување:



$$K_d = [PL]/[P][L]^n$$

θ = број на зафатени места за сврзување/вкупен број на места за сврзување = $[PL]/([PL] + [P])$

- ▶ Со внесување на изразот за $[PL] = K_d [P] [L]^n$

$\theta = K_d [P] [L]^n / (K_d [P] [L]^n + [P]) = K_d [L]^n / (K_d [L]^n + 1) = [L]^n / ([L]^n + 1/K_d)$ или

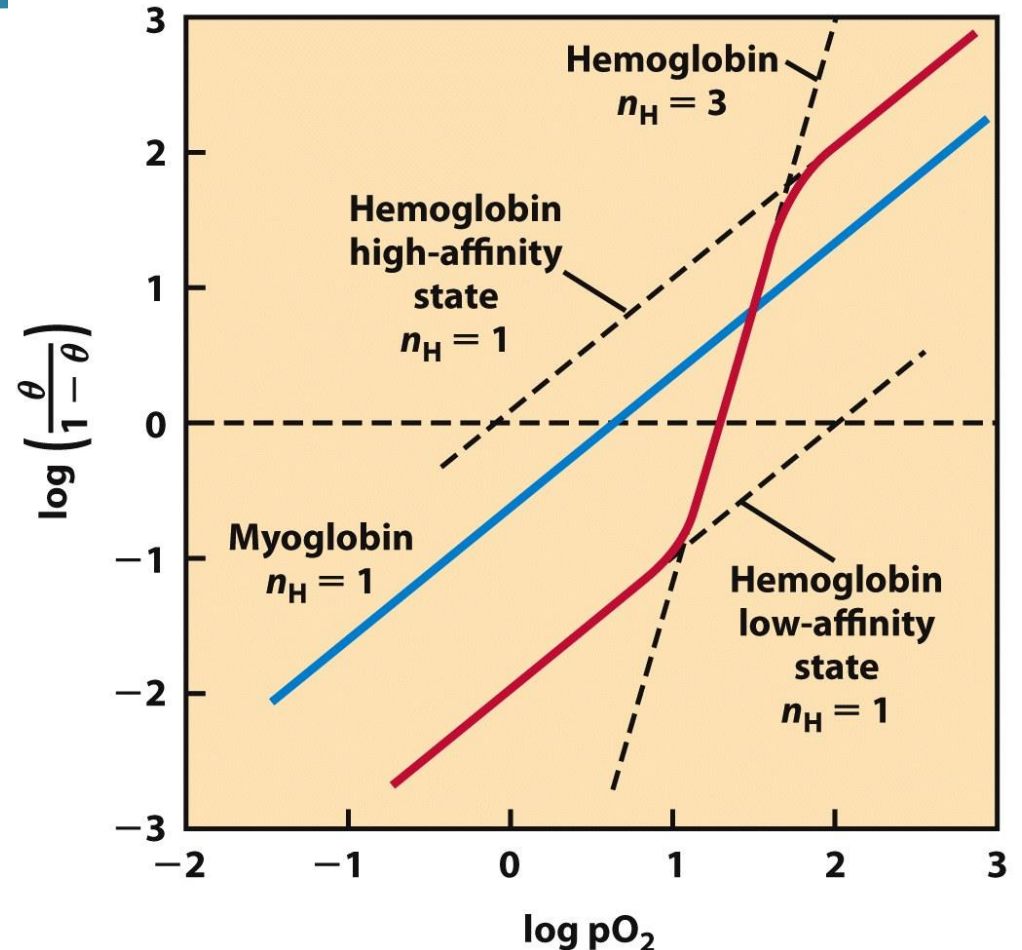
$$\theta = [L]^n / ([L]^n + K_d)$$

- ▶ Со преуредување: $[L]^n = \theta [L]^n + \theta K_d$; $(1 - \theta) [L]^n = \theta K_d$; $\theta / (1 - \theta) = [L]^n / K_d$

- ▶ Со логаритмирање: $\log [\theta / (1 - \theta)] = n \log [L] - \log K_d$ Хилова равенка

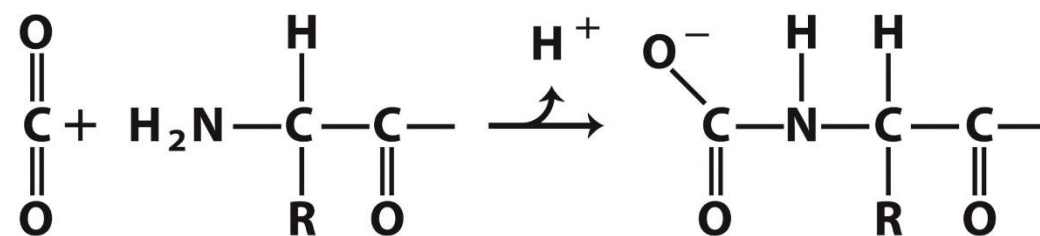
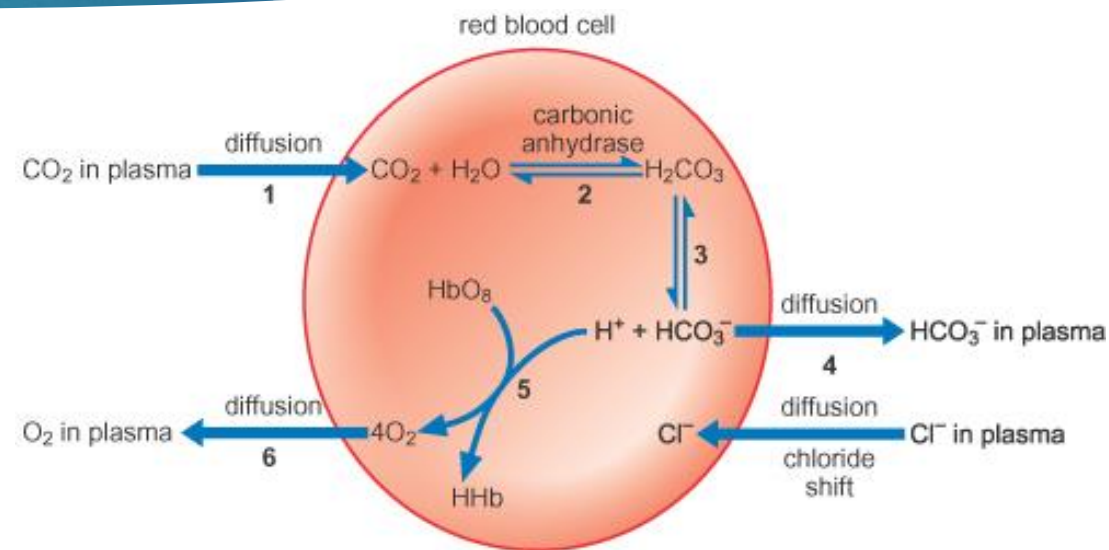
Хилов график за сврзување на кислород

- ▶ Графикот на кој е претставена зависноста на $\log [\theta/(1-\theta)]$ во однос на $\log [L]$ е наречен Хилов график.
- ▶ Експериментално определениот наклон (n_H) е Хилов коефициент, мерка за степенот на кооперативност (не е број на слободни места за сврзување).
- ▶ $n_H = 1$, сврзувањето не е кооперативно.
- ▶ $n_H > 1$, позитивна кооперативност (сврзувањето на една молекула L го олеснува сврзувањето на следните молекули).
- ▶ $n_H < 1$, негативна кооперативност



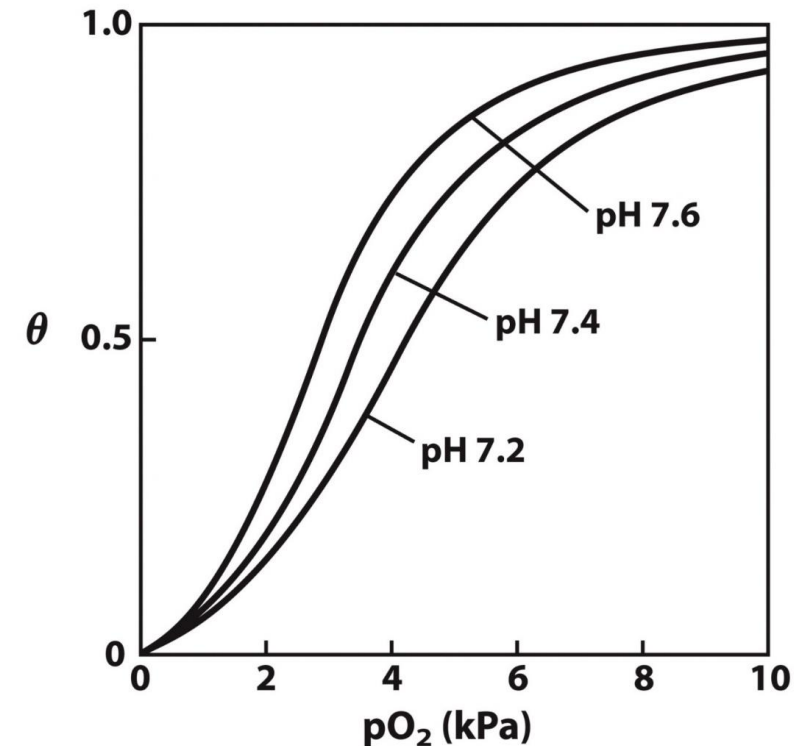
Хемоглобинот пренесува H^+ и CO_2

- ▶ Хемоглобинот од клетките во ткивата до бубрезите и белите дробови пренесува дел од крајните продукти на клеточната респирација H^+ (40%) и CO_2 (15-20%).
- ▶ Во еритроцитите под дејство на карбонатна анхидраза, CO_2 се хидратира до бикарбонат: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$
- ▶ H^+ се сврзува за некој од аминокиселинските остатоци од Hb (HHb^+).
- ▶ CO_2 се сврзува за α -аминогрупата на аминокрајот од секоја глобинска низа како карбамин, образувајќи карбаминохемоглобин:



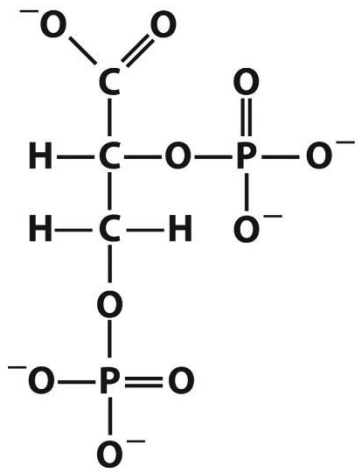
Боров ефект

- ▶ Сврзувањето на H^+ и CO_2 за Hb е обратно пропорционално од сврзувањето со O_2 .
- ▶ Влијанието на pH и концентрацијата на CO_2 врз сврзувањето и отпуштањето на O_2 од Hb се нарекува Боров ефект.
- ▶ Најголем придонес за Боровиот ефект има стабилизирањето на T состојбата (поттикнато ослободување на O_2), преку:
 - ▶ Протонирање на His HC3 (146) од β подединиците и образување на стабилизирани јонски пар со Asp FG1 (94).
 - ▶ Сврзаните карбамати градат дополнителни јонски мостови.



pH на крвта во белите дробови е 7,6, а во ткивата 7,2.

Сврзување на O_2 за Hb. Регулирање со BPG



► Во еритроцитите со голема концентрација е присутен 2,3-бисфосфоглицерат (BPG), сврзан за хемоглобинот во шуплина меѓу β -подединиците на Т состојбата.

Со стабилизирање на Т состојбата на Hb се намалува афинитетот за сврзување на O_2 , односно се зголемува ослободувањето на O_2 во ткивата.

