Hemoglobin - funkcija i struktura

Hajduković, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:118706

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Josipa Hajduković

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

HEMOGLOBIN – FUNKCIJA I STRUKTURA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. D. Matković-Čalogović

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 2. lipnja 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 15. rujna 2017.

Mentor rada: prof. dr. sc. D. Matković-Čalogović Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK VI
§ 1. UVOD 1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME 2
2.1. Struktura hema 2
2.2. Oksidacijsko stanje iona željeza u deoksi i oksihemoglobinu 4
2.3. Struktura utječe na vezanje liganada 4
2.4. Kisik se prenosi pomoću hemoglobina 5
2.5. Struktura hemoglobina 6
2.5.1. Kristalna struktura oksihemoglobina i karboksihemoglobina pri razlučenju od 1,25 Å 6
2.6. T i R stanje hemoglobina 9
2.7. Kooperativno vezanje kisika 10
2.8. Dva modela kooperativnog vezanja 11
2.9. Bohrov efekt 12
2.10. Vezanje 2,3-bisfosfoglicerata 14
2.11. Srpasta anemija 15
§ 3. LITERATURNI IZVORI XVII

§ Sažetak

Hemoglobin je protein kojem je glavna uloga prijenos kisika u krvi preko eritrocita (crvenih krvnih stanica). Hemoglobin sadrži 4 polipeptidne podjedinice, 2 identična α lanca i 2 identična β lanca. Svaka α podjedinica spojena je na identičan način sa β podjedinicom unutar strukture ovog višepodjediničnog proteina, tako da se hemoglobin može smatrati tetramerom 4 polipeptidne podjedinice ili αβ dimerom. Svaka od podjedinica sadrži prostetičku skupinu hem. Hem se sastoji od složenog organskog prstena, protoporfirina na koji je vezan ion željeza. Željezov ion ima 6 koordinacijskih veza, 4 su u ravnini protoporfirina gdje je ion željeza vezan na 4 atoma dušika, a dvije su okomite na ravninu. Jedna od okomitih veza povezuje željezo za dušikom iz histidinskog bočnog ogranka (proksimalni histidin). Šesto koordinacijsko mjesto slobodno je za vezanje molekule kisika.

Vezanje kisika na hemoglobin je kooperativno, tj. vezanje kisika na jednu podjedinicu povećava afinitet ostalih podjedinica za kisikom. 2,3–bisfosfoglicerat (2,3-BPG) je alosterički modulator koji se veže na mjesto udaljeno od vezanja kisika te utječe na vezanje kisika na hemoglobin. 2,3-BPG regulira afinitet hemoglobina prema kisiku u svezi sa parcijalnim tlakom kisika u plućima. Osim kisika, hemoglobin također prenosi H^+ ione te CO_2.

§ 1. UVOD

Hemoglobin je protein, jedan od glavnih prenositelja kisika u krvi. Nalazi se u eritrocitima, crvenim krvnim stanicama. Kisik se iz pluća prenosi do tkiva preko arterija, čija je krv bogata kisikom te je zbog toga jarko crvene boje, a vraća se iz tkiva u pluća preko vena koje su siromašne kisikom te je stoga venska krv tamnoljubičaste boje. Osim hemoglobina, kisik također veže i mioglobin, protein kojem je glavna uloga skladištenje kisika. Oba proteina imaju istu prostetičku skupinu hem, na koju se veže kisik. Vezanje kisika na hem jedne od 4 podjedinice hemoglobina dovodi do konformacijskih promjena na drugim podjedinicama te se povećava afinitet ostalih podjedinica za kisikom, što se naziva kooperativnim vezanjem.[1,2] Hemoglobin je prvi oligomerni protein kojem je otkrivena trodimenzionalna struktura. Zbog toga što je on 4 puta veći od mioglobina, puno više vremena i truda je bilo potrebno da se riješi njegova trodimenzionalna struktura pomoću difrakcije rendgenskih zraka, što je napokon uspjelo M. Perutzu, J. Kendrewu i njihovim kolegama 1959. godine. Struktura je tada riješena i objavljena u časopisu *Nature* 1960. do razlučenja od 5,5 Å.[3] Relativna molekulska masa hemoglobina je 64 500.[2] Godine 2006. struktura je riješena do visokog razlučenja od 1,25 Å koja je omogućila precizno lociranje pojedinih atoma u strukturi.[4] Uslijed mutacija mogu nastati različite bolesti. Srpasta anemija genetska je bolest uzrokovana promjenom jedne aminokiseline u polipeptidnom lancu kod koje je pojedinac naslijedio alel za hemoglobin srpastih stanica od oba roditelja. Eritrociti su kod ove bolesti dugi, tanki i u obliku polumjeseca, tj. oštrice srpa. Za ovakav oblik kriva su netopljiva vlakna hemoglobina koja nastaju deoksigenacijom. Ta je bolest bolna i smrtonosna, te bez liječenja, osobe sa srpastom anemijom obično umiru u djetinjstvu.[1]

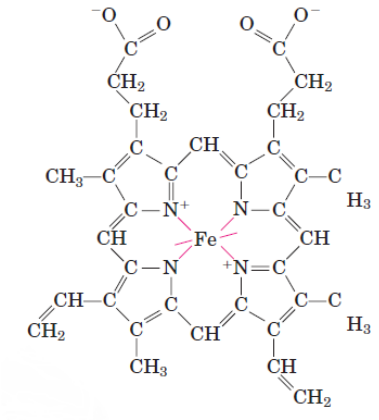
U ovom radu želi se prikazati uloga hemoglobina u ljudskom organizmu i objasniti kako on veže kisik na sebe. Također se želi prikazati struktura hemoglobina i objasniti do kojih sve promjena u strukturi, oksidacijskim stanjima itd. dolazi tijekom vezanja i otpuštanja kisika te koji sve faktori i na koji način utječu na vezanje kisika.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Struktura hema

Kisik je slabo topljiv u vodenim otopinama i ne može se prenijeti u tkiva u dovoljnoj količini jer se otopi u krvnom serumu. Difuzija kisika kroz tkiva je također neučinkovita za udaljenosti veće od nekoliko milimetara. Evolucija većih, višestaničnih životinja ovisila je o evoluciji proteina koji prenose i spremaju kisik. Ipak, niti jedan aminokiselinski bočni lanac proteina nije odgovoran za reverzibilno vezanje molekula kisika. Ovu ulogu ispunjavaju određeni prijelazni metali, među njima željezo i bakar, koji imaju veliku tendenciju da vežu kisik. Višestanični organizmi iskorištavaju svojstva metala, pogotovo željeza, za transport kisika. Ipak, slobodno željezo potiče stvaranje visoko reaktivnih kisikovih specija kao što su hidroksilni radikali koji mogu oštetiti DNA i druge makromolekule. Željezo u stanicama je zato vezano u oblicima koji ga izoliraju ili čine manje reaktivnim. U višestaničnim organizmima, pogotovo u onima u kojima je željezo koje prenosi kisik, i mora se prenositi na velike udaljenosti, željezo je često spojeno s prostetičkom skupinom proteina - hemom.

Hem se sastoji od složene strukture organskog prstena, protoporfirina, načinjenog od 4 pirolna prstena povezana metinskim mostovima. Na tom tetrapirolnom prstenu nalaze se četiri metilne skupine, dvije vinilne skupine i dva propionatna bočna ogranka. U središte tetrapirolnog prstena vezan je jedan ion željeza. Atom željeza ima 6 koordinacijskih veza, 4 sa atomima dušika koji su dio protoporfirinskog prstena i dvije veze koje su okomite na protoporfirin (slika 1).[1]



Slika 1. Struktura hema s vezanim ionom željeza bez aksijalnih liganada

Koordinirani atomi dušika, koji imaju elektron-donorski karakter, sprječavaju pretvaranje hemskog željeza u Fe^{3+} stanje u deoksihemoglobinu. Željezo u Fe^{2+} stanju veže kisik reverzibilno, a u Fe^{3+} stanju ne veže kisik. Ion željeza leži 0,4 Å izvan ravnine protoporfirina u Fe^{2+} stanju, a kada se na njega veže kisik, on se smanjuje prelaskom u Fe^{3+} te ulazi u šupljinu protoporfirinskog prstena. Hem je pronađen u većem broju proteina koji vežu kisik, kao i u nekim proteinima, kao što su citokromi, koji sudjeluju u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama (transfer elektrona).

U slobodnim molekulama hema (koje nisu vezane za protein), reakcija kisika sa slobodnim koordinirajućim mjestom na željezu (okomitim na protoporfirin) može rezultirati s ireverzibilnom pretvorbom Fe^{2+} u Fe^{3+}. U proteinima koji sadrže hem, ova reakcija je spriječena smještanjem hema duboko u strukturu proteina gdje je prilaz tom koordinacijskom mjestu ograničen. Jedno od ta dva koordinacijska mjesta je zauzeto s dušikom iz bočnog lanca histidinskog ostatka. Taj se histidin naziva proksimalnim histidinom. Drugo mjesto je slobodno za vezanje kisika. Kada se kisik veže, elektronska svojstva željeza u hemu se promijene. To se vidi u promjeni boje iz tamnoljubičaste kisikom siromašne venske krvi, do jarko crvene kisikom bogate arterijske krvi. Neke male molekule, kao što je ugljikov monoksid i dušikov oksid, vežu se na hemsko željezo s većim afinitetom od kisika. Vezanje molekule CO na hem, onemogućava vezanje kisika, zbog čega je CO jako toksičan za aerobne organizme. Pomoću okruženja (aminokiselinskih ostataka u blizini iona željeza) i smještanja hema, proteini koji vežu kisik reguliraju pristup CO i ostalih malih molekula hemskom željezu.[2]

2.2. Oksidacijsko stanje iona željeza u deoksi i oksihemoglobinu

Ion željeza je u deoksihemoglobinu prisutan kao Fe^{2+}. Međutim, oksidacijsko stanje iona željeza u oksi-hemoglobinu dugo je bilo predmet istraživanja. Pin i suradinici istraživali su oksidacijsko stanje željeza u hemoglobinu pomoću strukture rendgenske apsorpcije blizu praga, XANES (engl.: X-ray absorption near edge structure).[5] To je spektroskopska metoda rendgenske apsorpcije vezane uz područje koje se nalazi do 10 eV iznad energije ionizacije elementa (iznad apsorpcijskog praga elementa). U navedenom radu istražen je Kα apsorpcijski prag željeza. Analizirajući maksimume u spektru nađeno je da hemoglobin bez liganada kao i oksidirani oblici daju očekivani Fe^{3+} u Fe^{2+} energetski pomak kod 1s-4p i 1s-4s prijelaza. Maksimumi navedenih prijelaza pomiču se za 5,5 eV prelazeći iz deoksi- u oksihemoglobin. Položaj 1s-4p prijelaza ovisi o kombiniranim učincima valencije, ionskog naboja i simetrije položaja u kojem se nalazi ion željeza, kao i o prirodi okoliša. Dugo vremena se pretpostavljalo da je konformacijska promjena između HbO_2 i Hb uzrokovana prijelazom Fe^{2+} iz niskospinskog u visokospinsko stanje.

U ovom radu je nađeno da je u HbO_2 prisutan ion Fe^{3+}. Pretpostavka je da nakon odlaska molekule kisika ion željeza pokupi elektron, mijenjajući svoj formalni naboj od +3 do +2. Ali nije poznato da li taj elektron dolazi od kisikova liganda ili iz porfirinskog prstena. Bez obzira na podrijetlo elektrona, proces deoksigenacije predstavlja pravu redukciju željeza. Reaktivnost željeza se može pratiti preko raspodjele elektrona oko željeza i takva istraživanja mogu pomoći da se odgonetne mehanizam kooperativnog vezanja u hemoglobinu.[5]

2.3. Struktura utječe na vezanje liganada

Vezanje liganda na protein je pod velikim utjecajem strukture proteina i često je popraćeno konformacijskim promjenama. Specifičnost s kojom hem veže različite ligande je promijenjena kada je hem dio hemoglobina. Ugljikov monoksid se veže na slobodni hem više od 20 000 puta jače od kisika, ali se veže samo oko 200 puta jače kad je hem dio hemoglobina. Ta razlika se može djelomično objasniti preko steričkih smetnji. Kada se kisik veže na slobodni hem, os molekule kisika je pod kutem u odnosu na željezov ion. Suprotno od toga, kada se CO veže na slobodni hem, Fe, C i O leže na istom pravcu. U hemoglobinu je His64 na strani hema gdje se veže kisik ali je predaleko da se koordinira s hemskim željezom,

no u interakciji je s ligandom vezanim na hem. Ovaj ostatak, zvan distalni histidin, ne utječe na vezanje kisika ali može sprječiti linearno vezanje CO što objašnjava smanjeno vezanje CO na hem u hemoglobinu. Smanjeno vezanje CO je fiziološki važno, jer je CO nusprodukt staničnog metabolizma. Drugi faktori, koji nisu još utvrđeni, također utječu na interakciju hema sa CO u ovim proteinima.

Vezanje kisika na hem u hemoglobinu također ovisi o kretanjima molekula, ili o „disanju“ u strukturi proteina. Molekula hema je zakopana duboko u smotanom polipeptidu, bez direktnog puta za kisik da dođe iz okolne otopine do strane za vezanje liganda. Da je protein krut, kisik ne bi mogao ući ili izaći iz hemskog džepa mjerljivom brzinom. Međutim, brzo savijanje bočnih lanaca aminokiselina stvara prolazne šupljine u strukturi proteina i kisiku omogućava put unutra i van. Kompjuterske simulacije brzih strukturnih fluktuacija u hemoglobinu upućuju na to da postoji više takvih puteva. Jedan bitan put se ostvari rotacijom bočnog lanca distalnog histidina (His64), proces koji se odvija u skali nanosekunde. Čak i male konformacijske promjene mogu biti kritične za aktivnost proteina.[2]

2.4. Kisik se prenosi pomoću hemoglobina

Skoro sav kisik koji se prenosi u krvi u životinjama je vezan i prenošen pomoću hemoglobina u eritrocitima (crvenim krvnim stanicama). Normalni ljudski eritrociti su mali (promjer je 6 do 9 μm) bikonkavni diskovi. U procesu sazrijevanja, matične stanice stvaraju stanice kćeri koje stvaraju veliku količinu hemoglobina i tada gube svoje unutarstanične organele – jezgru, mitohondrij i endoplazmatski retikulum. Eritrociti su stoga nepotpune, zakržljale stanice, nesposobne za reprodukciju i u ljudi predodređene da žive samo 120 dana. Njihova glavna uloga je da prenose hemoglobin, koji je otopljen u citosolu u veoma velikoj koncentraciji.

U arterijskoj krvi koja prolazi iz pluća do srca kroz periferna tkiva, hemoglobin je zasićen kisikom oko 96%. U venskoj krvi koja se vraća u srce, hemoglobin je zasićen samo oko 64%. Također, svakih 100 mL krvi što prođe kroz tkivo, oslobodi oko jednu trećinu kisika kojeg prenosi, ili 6,5 mL kisika pri atmosferskom tlaku i temperaturi tijela.[2]

2.5. Struktura hemoglobina

Hemoglobin (Mr = 64 500, oznaka Hb) je grubo sferičan, sa promjerom od približno 5,5 nm. To je tetramerni protein koji sadrži 4 hem prostetičke skupine, svaku povezanu sa svakim polipeptidnim lancem. Hemoglobin odraslih osoba sadrži 2 tipa globina, 2 α lanca (141 aminokiselinski ostataka svaki) i 2 β lanca (146 aminokiselinskih ostataka svaki). Iako je manje od pola aminokiselinskih ostataka u polipeptidnim slijedovima u α i β lancu identično, trodimenzionalna struktura dvije vrste podjedinica je veoma slična. Također, njihove strukture su veoma slične strukturi mioglobina, iako je slijed aminokiselina u tri polipeptida identičan samo za 27 aminokiselina. Sva tri polipeptida su članovi globinske obitelji proteina.

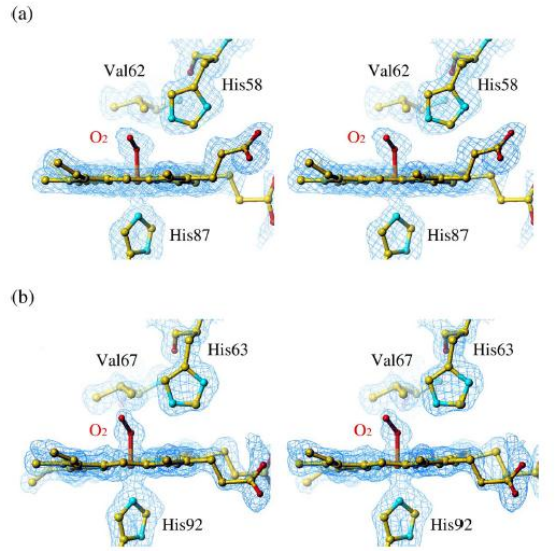
Kvaternu strukturu hemoglobina karakteriziraju jake interakcije između nejednakih podjedinica. Interakcije među podjedinicama α1β1 (i α2β2) uključuju više od 30 aminokiselinskih ostataka. Ukoliko se hemoglobin podvrgne blagom tretmanu ureom dolazi do ragradnje teramera no trebali bi se razoriti i αβ dimeri, međutim oni ostaju netaknuti zbog jakih interakcija. α1β2 (i α2β1) podjedinice povezuju interakcije između 19 aminokiselinskih ostataka. Dominiraju hidrofobne interakcije ali također ima mnogo vodikovih veza i nekoliko ionskih parova (solni mostovi).[2]

2.5.1. Kristalna struktura oksihemoglobina i karboksihemoglobina pri razlučenju od 1,25 Å

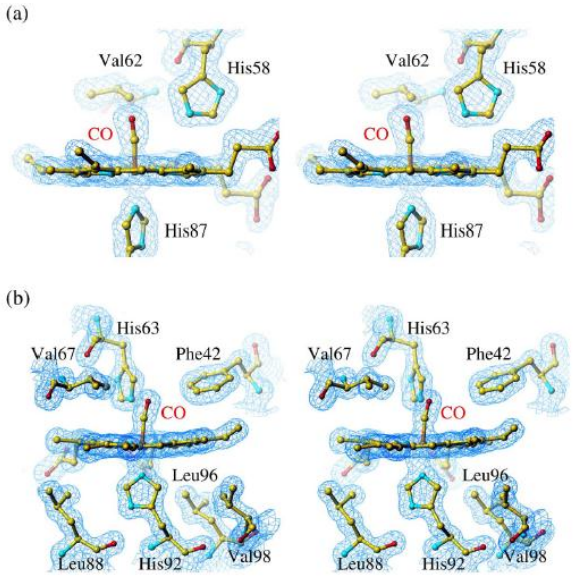
Određena je kristalna struktura deoksihemoglobina na sobnoj temperaturi, te strukture oksihemoglobina i CO-hemoglobina na 100 K.[4] Strukture su uspoređene međusobno te sa strukturama koje su bile riješena ranije da se nađu područja iste strukture kao i područja unutar αβ dimera gdje se razlikuju.

Uspoređujući novu strukturu oksihemoglobina s onom pohranjenom u bazi podataka *Protein data bank* pod imenom 1HHO (PDB 1HHO, riješena 1983.) nađene su značajne razlike na C terminalnom kraju α lanca i na N-terminalnom kraju β lanca. Važne promjene su pronađene u okolini hema, gdje je molekula kisika jasno vidljiva u mapi elektronske gustoće visoke rezolucije (slika 2). Vidljivo je da je distalni histidin u položaju u kojem se može vezati vodikovom vezom s ligandom i u α i β podjedinici. To nije uočeno u β podjedinici starije strukture 1HHO. Postojanje takve vodikove veze je prvo uočeno 1974. pomoću EPR mjerenja i potvrđeno kristalografski devet godina kasnije. Budući da mutacija distalnog histidina u glicin dosta slabi vezanje kisika na α globin, ali ne na β globin, čini se da je

vodikova veza kod His E7β puno slabija nego ona kod His E7α. Geometrija liganda i distalnog histidina je malo drugačija u dvije podjedinice, s O2 atomom kisika koji se nalazi 2,7 Å od N^{ε} atoma dušika iz distalnog histidina u α podjedinici, i 3 Å udaljenog u β podjedinici. Model visoke rezolucije dakle potvrđuje prisustvo vodikove veze u obje podjedinice. Zanimljivo je da kisikov atom O1, koji je direktno vezan na hemsko željezo, leži 2,8 Å od N^{ε} atoma u α podjedinicama, ali je na udaljenosti od 3,1 Å u β podjedinicama. Na temelju elektronske gustoće određena je slabija vodikova veza u β podjedinicama, s manjom gustoćom oko O2 atoma (slika 2). To govori da se oba kisikova atoma mogu vezati vodikovom vezom za histidin, ali udaljenija imidazolna grupa kod β podjedinice očigledno nema sposobnost da se jako veže za ligand. Distalni histidin je također malo bliži vezanom CO u α podjedinicama, što može povećati razlikovanje tog liganda od kisika (slika 3). Druge manje razlike između oksi- i CO-strukture uključuju rotamer Leu83α, koji je smješten pokraj proskimalnog histidina, i vinilnu grupu na β podjedinici. Nijedna razlika nema očitu ulogu u kontroli afiniteta prema ligandu. Unatoč mnogim istraživanjima posvećenim razlikovanju liganda od strane proteina koje sadrže hem, nijedan sigurni zaključak još nije donesen. U slučaju mioglobina, kojem je određena struktura rendgenskom difrakcijom pri veoma visokom razlučenju bilo je predloženo da svi hemski proteini razlikuju vezanje CO i kisika i prednost daju kisiku zbog steričkih efekata. Novija istraživanja strukture predlažu da sterički efekti ustvari ne pomažu, a razlikovanje liganada se javlja zbog elektrostatskog utjecaja što uključuje i stvaranje vodikove veze. Oksihemoglobin daje dobar probni slučaj za tu hipotezu pošto α i β podjedinice pokazuju izrazito drugačije ponašanje. U ovom modelu oksihemoglobina, Fe-O-O kut je 124^{o} u α podjedinici i 126^{o} u β podjedinici. Fe-C-O kutevi u CO-hemoglobinu su 172^{o} i 169^{o}. Te su vrijednosti unutar pogreške od 3^{o} što znači da nisu značajne.[4]



Slika 2. Stereo prikaz mapa elektronske gustoće za oksihemoglobin: a) ligand kisika na hemu α podjedinice i b) ligand kisika na hemu β podjedinice. Preuzeto iz literaturnog izvora[4]

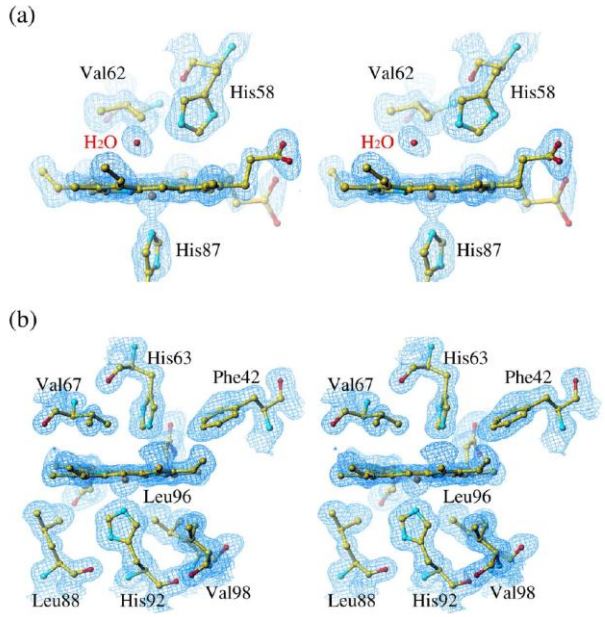


Slika 3. Stereo prikaz mapa elektronske gustoće za CO-hemoglobin: a) ligand CO na hemu α podjedinice i b) ligand CO na hemu β podjedinice. Preuzeto iz literaturnog izvora[4]

2.5.2. Struktura deoksihemoglobina

Struktura deoksihemoglobina predstavljena u ovom radu ima neobično visoko razlučenje za tako velik protein, naročito zato jer su difrakcijski podaci skupljeni na sobnoj temperaturi s kristala koji se nalazio u kapilari. Molekula vode nalazi se u obje α podjedinice hemskih

džepova vezana vodikovom vezom na distalni histidin, ali nema tragova molekule vode u β džepu (slika 4).[4]



Slika 4. Stereo prikaz mapa elektronske gustoće za deoksihemoglobin: a) hemski džep α podjedinice i b) hemski džep β podjedinice. Preuzeto iz literaturnog izvora[4]

2.6. T i R stanje hemoglobina

Rendgenskim zračenjem su otkrivene dvije bitne konformacije hemoglobina: R-stanje i T-stanje. Iako se kisik veže na hemoglobin u oba stanja, ima puno veći afinitet prema hemoglobinu u R-stanju. Vezanje kisika stabilizira R-stanje. Kada je kisik odsutan, T-stanje je stabilnije i zato je to dominantna konformacija deoksihemoglobina. T i R oznake potječu od „tense“ i „relaxed“ (napet i opušten), zato što je T-stanje stabilizirano pomoću većeg broja ionskih parova od kojih mnogi leže na α1β2 (i α2β1) sučelju. Vezanje kisika na podjedinicu hemoglobina u T-stanju, potiče promjenu u konformaciji prema R-stanju. Kada cijeli protein prođe kroz ovu promjenu, struktura svake podjedinice se malo promjeni, ali αβ parovi podjedinica kližu jedan pored drugog i rotiraju se, sužavajući džep između β podjedinica. U ovom procesu, neki parovi iona koji stabiliziraju T-stanje su pokidani i formirani su neki novi.

M. Perutz je predložio da je T-R prijelaz izazvan promjenama u položaju ključnih aminokiselinskih bočnih lanaca koji okružuju hem. U T-stanju, protoporfirin je lagano podignut, što uzrokuje da hemsko željezo izlazi malo na stranu proksimalnog histidina.

Vezanje kisika uzrokuje da hem zauzme više planarnu konformaciju, premještajući položaj proksimalnog histidina i pripojene F-uzvojnice.[2]

2.7. Kooperativno vezanje kisika

Hemoglobin mora vezati kisik učinkovito u plućima, gdje je parcijalni tlak kisika 13,3 kPa, i oslobađati kisik u tkivima, gdje je parcijalni tlak kisika 4 kPa. Mioglobin, ili bilo koji protein koji veže kisik s hiperbolnom krivuljom vezanja, bio bi nepodoban za tu funkciju. Protein koji veže kisik s velikim afinitetom, učinkovito bi ga vezao u plućima, ali ga ne bi dovoljno oslobađao u tkivima. Ako bi protein vezao kisik s niskim afinitetom vezanja da ga može otpustiti u tkivima, ne bi pokupio mnogo kisika u plućima. Hemoglobin rješava problem na način da ima prijelaz iz stanja s niskim afinitetom (T-stanje) u stanje s visokim afinitetom (R-stanje) kako se više molekula kisika veže. Kao rezultat, hemoglobin ima sigmoidalnu krivulju vezanja kisika, u obliku slova S. Protein sa samo jednom podjedinicom i s jednim mjestom za vezanje liganda ne može proizvesti sigmoidalnu krivulju vezanja, čak i ako vezanje izaziva konformacijsku promjernu, zato što se svaka molekula liganda veže nezavisno i ne može utjecati na vezanje drugih molekula. U suprotnosti, vezanje kisika na individualne podjedinice hemoglobina može mijenjati afinitet prema kisiku u pojedinim podjedinicama. Prva molekula kisika koja reagira s hemoglobinom veže se slabo, zato što se veže na podjedinicu u T-stanju. Njezino vezanje uzrokuje konformacijske promjene koje su povezane sa susjednim podjedinicama i čini da se ostale molekule kisika lakše povežu. Ustvari, T-R transformacija događa se puno brže u drugoj podjedinici jednom kad je kisik vezan na prvu podjedinicu. Zadnja (četvrta) molekula kisika veže se na hem na podjedinicu koja već je u R-stanju i stoga se veže s puno većim afinitetom nego prva molekula.

Alosterički protein je onaj u kojem vezanje liganda na jednu stranu utječe na svojstva vezanja na drugu stranu istog proteina. Pojam „alosterički“ dolazi od grčke riječi *allos* „drugi“ i *stereos* „čvrst“ ili „oblik“. Alosterički proteini su oni koji imaju „druge oblike“, ili konformacije, inducirane vezanjem liganada koji se nazivaju modulatori. Konformacijske promjene inducirane modulatorom pretvaraju više aktivne i manje aktivne oblike proteina jednog u drugi. Modulatori za alosteričke proteine mogu biti inhibitori ili aktivatori. Kada su normalni ligand i modulator identični, interakcija se naziva homotropnom. Kada je modulator

različita molekula od liganda, interakcija je heterotropna. Neki proteini imaju dva ili više modulatora i time mogu imati i homotropne i heterotropne interakcije.

Kooperativno vezanje liganda na multimerni protein, kao što to promatrano za vezanje kisika na hemoglobin, je oblik alosteričog vezanja koji se često uočava u multimernim proteinima. Vezanje liganda utječe na afinitete ostalih nepopunjenih veznih strana, i kisik se može smatrati kao ligand i kao aktivirajući homotropni modulator. Samo je jedno vezno mjesto za kisik na svakoj podjedinici tako da su alosterički efekti koji dovode do kooperativnosti posredovani konformacijskim promjenama koji se prenose iz jedne podjedinice u drugu preko interakcija između podjedinica. Sigmoidalna krivulja pokazuje kooperativno vezanje.

Kooperativne konformacijske promjene ovise o varijacijama u strukturnoj stabilnosti različitih dijelova proteina. Vezna mjesta alosteričkih proteina obično se sastoje od stabilnog segmenta u blizini relativno nestabilnih segmenata, a oni mogu imati česte promjene u konformaciji ili neorganizirano gibanje. Kada se ligand veže, pokretni dijelovi veznog mjesta proteina mogu se stabilizirati u određenoj konformaciji, utječući tako na konformacije susjednih polipeptidnih podjedinica. Ako bi cijelo vezno mjesto bilo jako stabilno, tada bi se nekoliko strukturnih promjena moglo pojaviti u veznom mjestu i proširile bi se na ostale dijelove proteina kad bi se ligand vezao.[2]

2.8. Dva modela kooperativnog vezanja

Biokemičari sada znaju mnogo o T i R stanju hemoglobina, ali mnogo toga ostaje za naučiti o tome kako se T - R transformacija odvija. Dva modela kooperativnog vezanja liganda za protein sa više veznih mjesta su mnogo utjecala na razmišljanje o ovom problemu. Prvi predloženi model je MWC model ili usklađen model. Usklađeni model pretpostavlja da su podjedinice proteina s kooperativnim vezanjem funkcionalno identične, da svaka podjedinica može postojati u (najmanje) dvije konformacije i da sve podjedinice prolaze kroz prijelaz iz jedne konformacije u drugu istovremeno. U ovom modelu, niti jedan protein nema pojedinačne podjedinice u različitim konformacijama. Dvije konformacije su u ravnoteži. Ligand se može vezati na podjedinice obje konformacije, ali se na svaku veže s različitim afinitetom. Posljedica uspješnog vezanje molekule liganda na podjedinicu u konformaciji

niskog afiniteta (koja je stabilnija u odsutnosti liganda) je prijelaz u visoko afinitetnu konformaciju.

U drugom modelu, sekvencijskom modelu, vezanje liganda može potaknuti promjenu u konformaciji u pojedinoj podjedinici. Konformacijska promjena u jednoj podjedinici radi sličnu promjenu u susjednoj podjedinici, kao i vezanje druge molekule liganda. Vjerojatnija su prijelazna stanja u ovom modelu nego u usklađenom modelu. Ova dva modela ne isključuju jedan drugog: usklađeni model može se promatrati kao granični slučaj sekvencijskog modela.[2]

2.9. Bohrov efekt

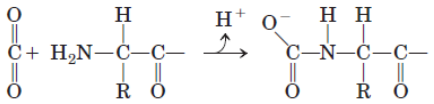
Uz to što prenosi gotovo sav kisik potreban stanicama iz pluća do tkiva, hemoglobin također prenosi dva krajnja produkta stanične respiracije, H^+ i CO_2, iz tkiva u pluća i bubrege, gdje se oni izlučuju. CO_2, koji se stvara oksidacijom organskih goriva u mitohondriju stvara bikarbonat HCO_3^-. Ovu reakciju katalizira ugljična-anhidraza, enzim koji je osobito obilat u eritrocitima. Ugljikov dioksid nije osobito topljiv u vodenoj otopini, i mjehurići CO_2 bi se stvarali u tkivima i krvi kad se on ne bi prevodio u bikarbonat. Kao što se može vidjeti iz reakcije, hidratacija CO_2 rezultira povećanjem koncentracije H^+ (smanjenje pH) u tkivima. Na vezanje kisika na hemoglobin utječe pH i koncentracija CO_2, tako da su interkonverzije CO_2 i bikarbonata od velike važnosti za regulaciju vezanja kisika i otpuštanja istog u krv.

Hemoglobin prenosi oko 40% ukupnog H^+ i 15% do 20% CO_2 koji se stvorio u tkivima u pluća i bubrege. Ostatak H^+ je apsorbiran od plazminog bikarbonatnog pufera a ostatak CO_2 se prenosi kao otopljeni bikarbonat i CO_2. Vezanje H^+ i CO_2 je obrnuto povezano s vezanjem kisika. Pri relativno niskom pH i visokoj koncentraciji CO_2 u perifernim tkivima, afinitet hemoglobina prema kisiku se smanjuje kako se H^+ i CO_2 vežu, a kisik se otpušta u tkiva. Obrnuto, u kapilarama u plućima, kako se CO_2 izlučuje i pH krvi postupno povećava, afinitet hemoglobina za kisikom se povećava i hemoglobin veže više kisika za transport u periferna tkiva. Ovaj efekt pH i koncentracije CO_2 na otpuštanje i vezanje kisika na hemoglobin zove se Borov efekt, prema Christianu Bohru, danskom fiziologu koji ga je otkrio 1904.

Kisik i H^+ se ne vežu na isto mjesto hemoglobina. Kisik se veže na atome željeza u hemu, a H^+ se veže na bilo koji od nekoliko aminokiselinskih ostataka u proteinu. Veliki

doprinos Bohrovom efektu daje His146 u β podjedinicama. Kad se protonira, ovaj ostatak tvori jedan od ionskih parova s Asp94 koji pomaže stabilizaciji deoksihemoglobina u T-stanju. Ionski par stabilizira protonirani His146, i daje tom ostatku jako visok pKa u T-stanju. pKa opada na svoju normalnu vrijednost od 6,0 u R-stanju jer se ne može stvarati ionski par, i taj ostatak je jako deprotoniran u oksihemoglobinu pri pH 7,6, a to je pH krvi u plućima. Kako se koncentracija H^+ povećava, protonacija His146 potiče oslobađanje kisika tako što favorizira prijelaz u T-stanje. Protonacija amino-terminalnih ostataka α podjedinica, nekih drugih histidinskih ostataka i možda drugih grupa, ima sličan efekt.

Tako vidimo da četiri polipeptidna lanca hemoglobina komuniciraju jedan s drugim ne samo o vezanju kisika na njihove hemske skupine, već i o vezanju H^+ na specifične aminokiselinske ostatke. Ali, hemoglobin također veže CO_2, na način koji je obrnuto povezan s vezanjem kisika. Ugljikov dioksid veže se kao karbamatna skupina na α-amino skupinu amino terminalnog kraja svakog globinskog lanca, tvoreći karbaminohemoglobin (slika 5).



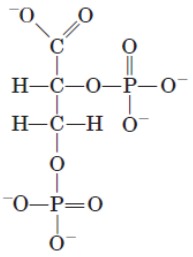
Slika 5. Reakcija stvaranja karbaminohemoglobina

Ova reakcija stvara H^+, čime doprinosi Bohrovom efektu. Vezani karbamati također tvore solne mostove koji pomažu stabilizaciji T-stanja i potiču oslobađanje kisika.

Kada je koncentracija ugljikova dioksida visoka, kao u perifernim tkivima, dio CO_2 se veže na hemoglobin i afinitet za kisik se smanjuje te uzrokuje njegovo otpuštanje. Suprotno, kada hemoglobin dođe u pluća, visoka koncentracija kisika potiče vezanje kisika i otpuštanje CO_2. Sposobnost da se prenese informacija o vezanju liganda iz jedne polipeptidne jedinice na drugu čini hemoglobin tako dobro prilagođenim da prenosi kisik, CO_2 i H^+ preko eritrocita.[2]

2.10. Vezanje 2,3-bisfosfoglicerata

Interakcija 2,3-bisfosfoglicerata (2,3-BPG, slika 6) s hemoglobinom daje primjer heterotropne alosteričke modulacije.



Slika 6. Strukturna formula 2,3- bisfosfoglicerata

2,3-BPG je prisutan u relativno visokoj koncentraciji u eritrocitima. Kad je hemoglobin izoliran, sadrži znatnu količinu vezanog 2,3-BPG-a, kojeg može biti teško u potpunosti ukloniti. Zapravo, krivulje vezanja kisika na hemoglobin su bile napravljene u prisutnosti vezanog 2,3-BPG-a. 2,3-bisfosfoglicerat jako smanjuje afinitet hemoglobina prema kisiku – postoji obrnuta veza između vezanja kisika i vezanja 2,3-BPG-a.

2,3-BPG se veže na mjesto udaljeno od mjesta vezanja kisika i regulira afinitet hemoglobina prema kisiku u svezi sa parcijalnim tlakom kisika u plućima. 2,3-BPG ima važnu ulogu u fiziološkoj prilagodbi nižem parcijalnom tlaku kisika koji je na višim nadmorskim visinama. Za zdravog čovjeka koji tumara oceanom, vezanje kisika na hemoglobin regulirano je tako da količina kisika koja se prenese u tkiva je jednaka odprilike 40% maksimuma koji se može prenijeti preko krvi. Zamislimo da se ta osoba brzo preseli na planinu na nadmorskoj visini od 4500 metara, gdje je pO_2 znatno niži. Dostava kisika je sad smanjena. Ipak, nakon samo nekoliko sati na višoj nadmorskoj visini, koncentracija 2,3-BPG u krvi će se početi povećavati i dovest će do smanjenog afiniteta hemoglobina prema kisiku. Ovo prilagođavanje razine 2,3-BPG-a ima samo mali utjecaj na vezanje kisika u plućima, ali veliki utjecaj na oslobađanje kisika u tkivima. Kao rezultat, isporuka kisika u tkiva je povraćena na odprilike 40% od onoga koji se može prenositi preko krvi. Situacija je obratna kada se osoba vrati na razinu mora. Koncentracija 2,3-BPG-a u eritrocitima također se povećava kod ljudi koji pate od hipoksije, umanjene oksigenacije u perifernim tkivima uslijed neadekvatnog funkcioniranja pluća ili krvožilnog sustava.

Mjesto vezanja 2,3-BPG-a na hemoglobin je šupljina između β podjedinica u T-stanju. Ova šupljina je obložena pozitivno nabijenim aminokiselinskim ostacima koji interagiraju s negativno nabijenim skupinama 2,3-BPG-a. Za razliku od kisika, samo jedna molekula 2,3-BPG-a je vezana za svaki hemoglobinski tetramer. 2,3-BPG smanjuje sklonost hemoglobina prema kisiku tako što stabilizira T-stanje. Prijelaz u R-stanje sužava vezni džep za 2,3-BPG, sprječavajući vezanje 2,3-BPG-a. U odsutnostni 2,3-BPG-a, hemoglobin se lakše prevodi u R-stanje.

Regulacija vezanja kisika na hemoglobin pomoću BPG-a ima važnu ulogu u fetalnom razvoju. Budući da fetus mora izvući kisik iz majčine krvi, fetalni hemoglobin mora imati veći afinitet od majčinog hemoglobina prema kisiku. Fetus sintetizira γ podjedinice radije nego β podjedinice, tvoreći α2γ2 hemoglobin. Ovaj tetramer ima puno niži afinitet za 2,3-BPG od normalnog odraslog hemoglobina i odgovarajuće veći afinitet za kisik.[2]

2.11. Srpasta anemija

Velika važnost sekvence aminokiselina u određivanju sekundarne, tercijarne i kvarterne strukture globularnih proteina, a time i njihovih bioloških funkcija je znatno dokazana preko nasljedne ljudske bolesti, srpaste anemije. Poznato je da se u ljudskoj populaciji javlja gotovo 500 genetskih varijanti hemoglobina, ali sve osim njih nekoliko su vrlo rijetke. Većina varijacija sastoji se od razlika u jednom aminokiselinskom ostatku. Učinci na strukturu i funkciju hemoglobina često su mali, ali ponekad mogu biti izrazito veliki. Svaka varijacija hemoglobina je produkt promijenjenog gena. Varijante gena nazivaju se aleli. Budući da ljudi općenito imaju dvije kopije svakog gena, pojedinac može imati dvije kopije pojedinog alela (tako da je homozigotan za taj gen) ili jednu kopiju svakog od dva različita alela (tako da je heterozigotan).

Srpasta anemija je genetska bolest u kojoj je pojedinac naslijedio alel za hemoglobin srpastih stanica od oba roditelja. Eritrociti kod ovih pojedinaca su manji i abnormalni. Pored neuobičajeno velikog broja nezrelih stanica, krv sadrži mnoge duge, tanke eritrocite u obliku polumjeseca koji izgledaju poput oštrice srpa. Kad je hemoglobin iz srpastih stanica (nazvan hemoglobin S) deoksigeniran, postaje netopljiv i tvori polimere koji se nakupljaju u cjevasto vlakno. Normalni hemoglobin (hemoglobin A) ostaje topljiv nakon deoksigenacije.

Netopljiva vlakna hemoglobina S odgovorna su za deformirani oblik srpastih eritrocita, a udio srpastih stanica se povećava kako se krv deoksigenira.

Promijenjena svojstva hemoglobina S rezultat su zamjene samo jedne aminokiseline, Val umjesto Glu na mjestu 6 u dva β lanca. R skupina valina nema električni naboj, a glutamat ima negativni naboj pri pH 7,4. Hemoglobin S tako ima dva negativna naboja manje nego hemogobin A, jedan za svaki od dva β lanca. Zamjena Glu za Val stvara ljepljivu hidrofobnu kontaktnu točku na poziciji 6 β lanca, koji je na vanjskoj površini molekule. Ova ljepljiva mjesta uzrokuju da se molekule deoksihemoglobina S abnormalno povezuju jedna s drugom, stvarajući duge, vlaknaste agregate karakteristične za ovaj poremećaj.

Srpasta anemija, kao što smo primjetili, javlja se u pojedinačnim homozigotima za srpasti alel gena koji kodira β podjedinicu hemoglobina. Pojedinci koji prime srpasti alel od samo jednog roditelja, pa su zato heterozigotni, dožive samo blagu crtu srpaste anemije: samo 1% njihovih eritrocita bude srpastog oblika tijekom deoksigenacije. Ovi pojedinci mogu živjeti sasvim normalan život ako izbjegavaju snažnu vježbu i drugi stres za krvožilni sustav.

Srpasta anemija je bolna i po život opasna bolest. Ljudi sa srpastom anemijom pate od ponovljenih kriza uzrokovanih fizičkim naporom. Oni postaju slabi, ošamućeni, ponestaje im daha, dolazi do šumova srca i povećanog pulsa. Sadržaj hemoglobina u njihovoj krvi je oko polovice normalne vrijednost od 15 do 16 g/100 mL, jer su srpaste stanice jako krhke i lako pucaju; to rezultira anemijom. Ozbiljnija posljedica je da kapilare postaju blokirane zbog dugih, abnormalno oblikovanih stanica, što uzrokuje jaku bol i ometa normalno funkcioniranje organa što je glavni uzrok rane smrti mnogih ljudi s ovom bolesti.

Bez liječenja, osobe sa srpastom anemijom obično umru u djetinjstvu. Ipak, srpasta anemija je iznenađujuće česta u nekim dijelovima Afrike. Istraga o prisutnosti alela koji je očito jako štetan u homozigotnim pojedincima dovela je do saznanja da u heterozigotnim pojedincima, alel daje malu, ali značajnu otpornost na smrtonosne oblike malarije. Prirodna selekcija je rezultirala u populaciji alela koji balansira štetne učinke homozigotnog stanja s otpornošću na malariju koju daje heterozigotno stanje.[2]

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman & Co., New York, 2013, str. 184-195
2. D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4. izdanje, M.; W.H. Freeman and Company, New York, 2005, str. 87, 134, 144, 158-159, 162-174.
3. M. F. Perutz, M. G. Rossmann, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will, A. C. T. North, *Nature* **185** (1960) 416–422.
4. S. Park, T. Yokoyama, N. Shibayama, Y. Shiro, J. Tame, *J. Mol. Biol.* **360** (2006) 692-697.
5. S. Pin, B. Alpert, A. Michalowicz, *FEBS Letters* **147** (1982) 107-109.