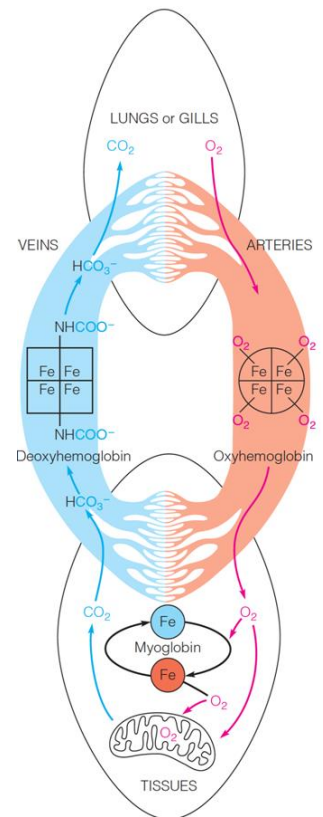


主題：Chapter 7- Protein Function and Evolution	
教師：余兆松	日期：2014/03/06
撰稿組：葉佳雯、黃郁紋、蔡慧雯	審稿組：陳欣佑、邱琳凌、陳加宜、林芷儀

Two groups of proteins whose functions are binding other molecules: Globins and Immunoglobulins

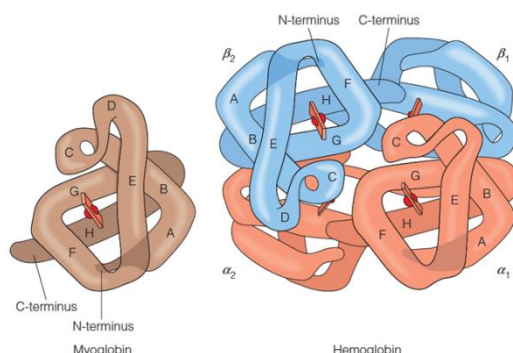
Introduction

1. 脊椎動物使用血紅蛋白(hemoglobin)和肌紅蛋白(myoglobin)，以提供他們的組織具有連續氧氣供應。
2. hemoglobin 運輸氧氣從肺或鰓到耗氧的組織中，氧氣在線粒體中被用來行有氧代謝。
3. 在細胞內，溶解在體內液體中的氧自由擴散或被 myoglobin 綁定，而有助於氧氣運輸到線粒體。
4. myoglobin 也可以儲存氧氣供以後使用（如深潛哺乳動物），最先是在肌肉組織中找到此類蛋白的存在。
5. 進行完氧化代謝過程後，在組織中產生的 CO_2 被血紅蛋白移回肺或鰓釋放。
6. 免疫球蛋白(immunoglobulins/antibody molecules)是能夠以多種變型來生產蛋白質的結構，並且各變體真有其特異性，並有本質上的不同，與受質形成專一的結合並完成特定的目標。
7. 對傳染性疾病的主要防禦依賴於 immunoglobulins，以識別和結合外來分子（非自體物質）作為免疫反應的部分能力。



Oxygen Transport: The Roles of Hemoglobin and Myoglobin

1. myoglobin 是由單肽鏈折疊而成，中間包圍著一個輔基和血紅素(heme group)，其中具有 O_2 結合位。
2. hemoglobin 是一個四聚體蛋白質，由四個多肽鏈每一個都結合一個 heme group，非常類似於 myoglobin 的結構。
3. hemoglobin 含有兩個相同的 α 鏈和兩條相同的 β 鏈。字母 A-H 表示一個 α 螺旋區域。
4. α 和 β 鏈是非常相似的，但具有不同的一級結構和褶皺（ α 鏈不具有“D”螺旋）。



The Mechanism of Oxygen Binding by Heme Proteins

一、攜氧蛋白

(1) 攜氧蛋白由血色素(hemoglobin)和肌紅素(myoglobin)組成，血液中與 hemoglobin 結合，組織中與 myoglobin 結合，結合程度不同。

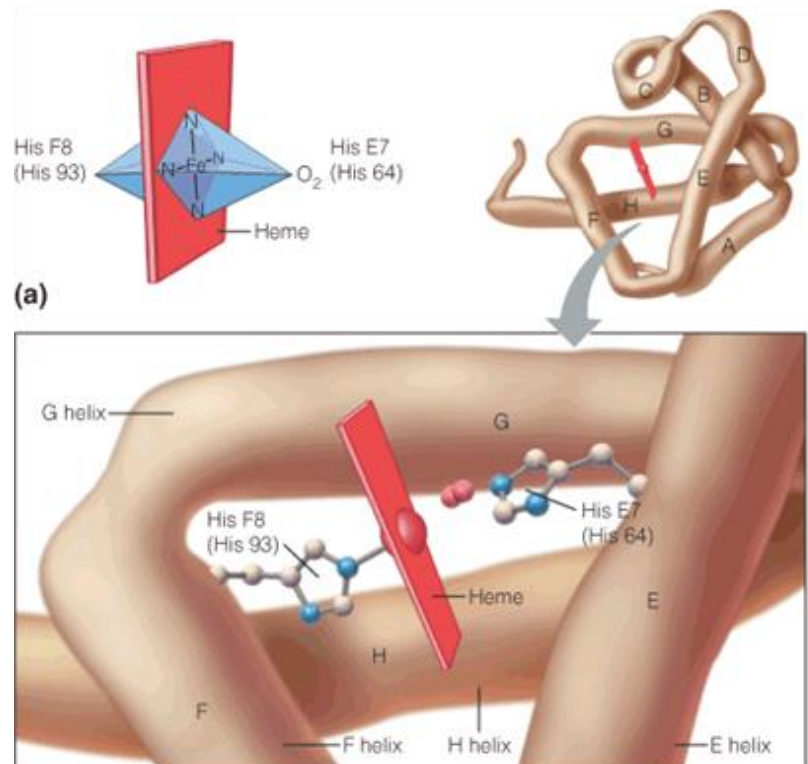
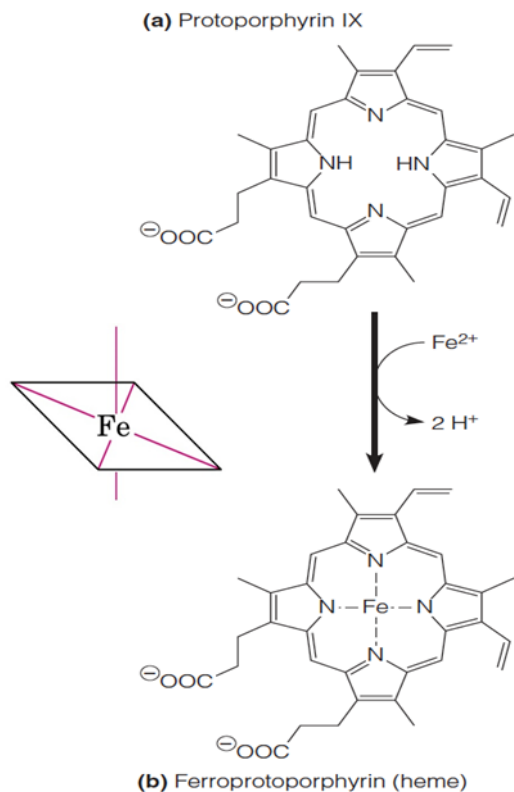
(2) Hemoglobin: 四個單體($2\alpha+2\beta$)、四個 heme groups

二、Heme

(1) 主要攜氧構造，包含一平板狀有機環 protoporphyrin IX 及 Fe^{2+} → 為 prosthetic group(非胺基酸的有機小分子，固定在蛋白質中)

(2) Fe^{2+} 有六個配位鍵，與 protoporphyrin IX 上的四個 N 原子結合形成平面，與平面垂直則為 histidine (F8, or His 93) 和 O_2 ，[第五個配位鍵接上 myoglobin 中 His F8 (又稱 His93、proximal His) 的側鏈，第六個則與 O_2 結合]

(3) 因環狀結構有電子共振效應，在 heme 中所有 N-Fe bonds 相同

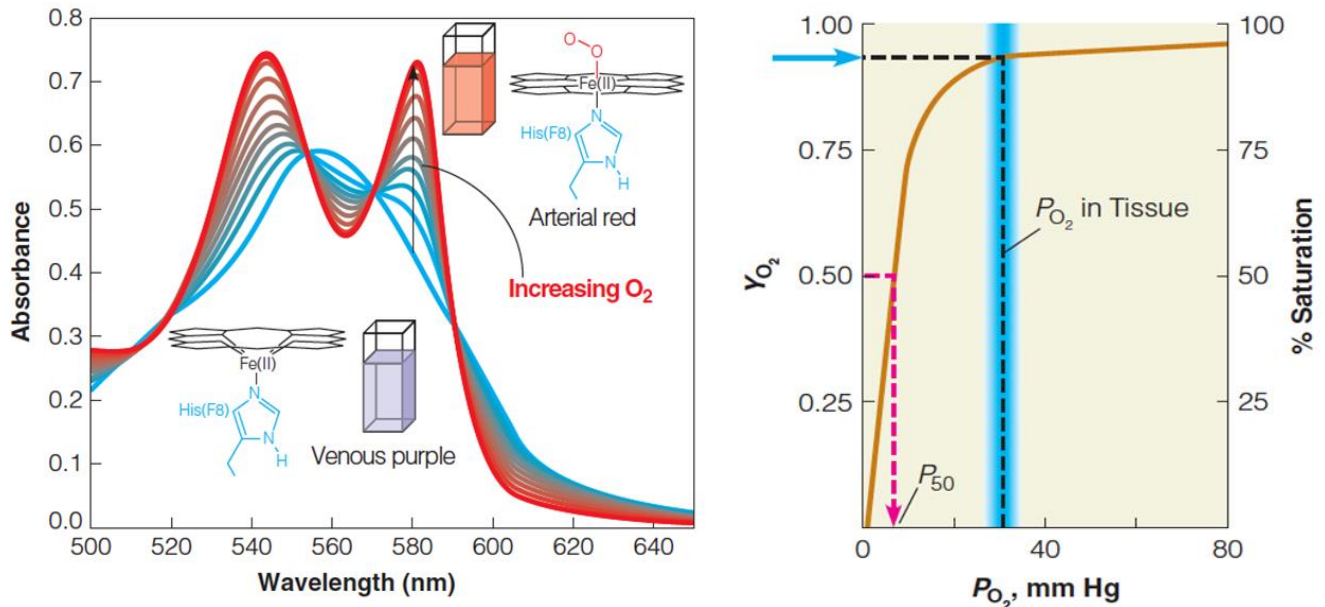


(4) His E7 (the distal histidine)與 O_2 形成的 H 鍵增加血紅素與 O_2 的親和力，但 CO 卻沒此鍵結

(5) CO 與血紅素結合為 O_2 的 200 倍，但若 O_2 沒有與 His E7 之間的 H 鍵則 CO 與血紅素結合合力將變成 O_2 的結合力的 6000 倍

三、Hemoglobin 的吸收光譜曲線(左下圖)

- (1)非氧結合態時為藍紫色(venous purple)，氧氣結合態為鮮紅色
- (2)圖中非氧結合態為藍線，氧氣結合態為紅線，當血紅素與氧結合越多，曲線由藍線向紅線移動



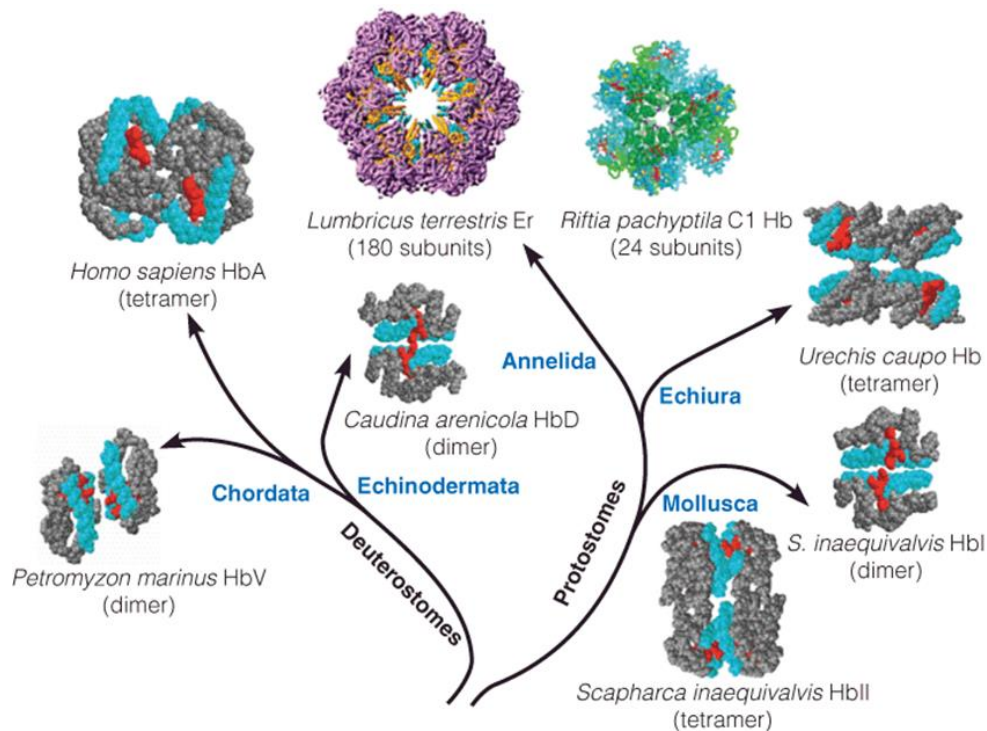
四、Myoglobin 的氧氣結合曲線(右上圖)

- (1) P_{O_2} 為氧氣分壓， Y_{O_2} 氧氣結合分壓
- (2) P_{50} 為 50% 結合率時所需的氧氣分壓， P_{50} 越大，越不易結合。氧氣結合率大者， P_{50} 越小；與氧氣結合率小者， P_{50} 越大
- (3) P_{50} 是球蛋白與配體的相對結合親和力的一種指標
- (4) $P_{O_2}=30$ mmHg 時結合率達到 90%
- (5) myoglobin 的動態運動有利於配體結合和釋放
- (6) myoglobin 的演化使之能在低氧氣分壓下結合或釋放氧氣

Oxygen Transport: Hemoglobin

一、hemoglobin 的結構多樣性

高等動物使用的 O_2 結合蛋白從肺或鰓將氧氣輸送到行呼吸作用的組織，支持新陳代謝。hemoglobin 不是動物使用的唯一氧結合蛋白。大多數軟體動物和節肢動物具有一些不同的蛋白，血藍蛋白(hemocyanin)，它含有銅在 O_2 結合位。還是其他無脊椎動物使用名為 hemerythrin 的含鐵蛋白。即使是無脊椎動物中的 hemoglobin 有多種多樣的結構，大小不等，從二聚體複合物到 180 subunits 複合物，這多樣性表明相同的功能通常可以由幾個獨立的進化路線到達。



(Hb 的空間模型：heme groups 以紅色表示，E and F helices 以青色表示，其餘主鏈以灰色表示)

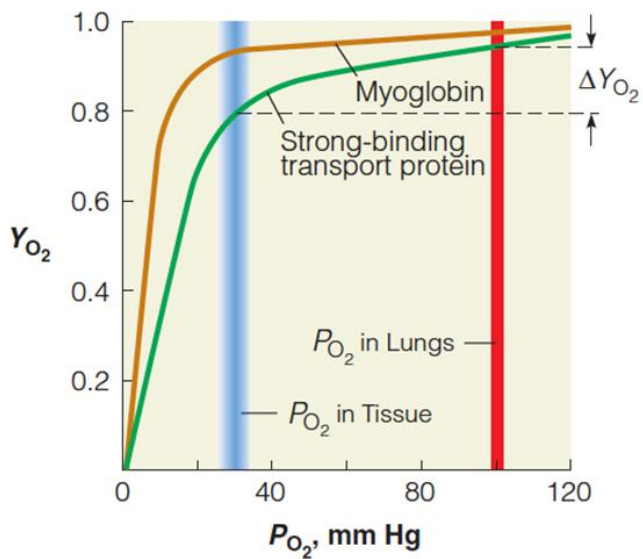
二、Cooperative Binding and Allostery

具有效率的氧氣運輸是通過協同結合在多結合位點的蛋白質，並以 S 形結合曲線描述其情況。合作型氧氣結合曲線(Cooperative O₂-binding Curves)的形成有利於調節結合能力，立即對環境的改變產生適應和相對的反應，通常是由強和弱的結合運輸蛋白共同作用而成，在低氧氣分壓下的血紅蛋白結合氧的親和力低，隨著越來越多的氧氣被束縛，對氧的親和性變得更大。這種行為必須意味著一個合作互動存在於 O₂ 結合位點之間。配體結合到第一個空的結合位上，以某種方式增加剩餘部位的氧親和力，從而促進蛋白質的 O₂ 完全飽和。這種行為需要某種形式的結合位點間的分子訊息傳遞。只具有一個亞基的蛋白，如 myoglobin，無法實現這種配體結合親和力的調控，這樣的模式是可存在於多亞基的蛋白，如 hemoglobin 亞基之間。

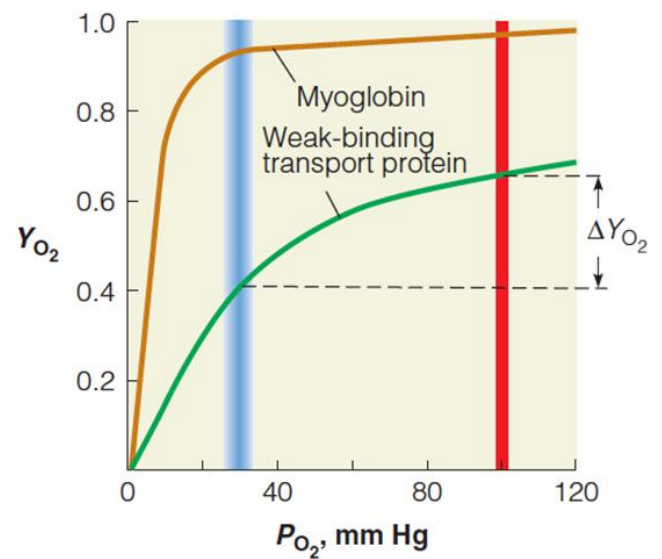
脊椎動物的 hemoglobin，從 myoglobin 的單體結構演變成四聚體結構。hemoglobin 可以綁定 4 個 O₂ 分子的四個亞基組成。雖然每個亞基都有類似的 myoglobin 的一級、二級和三級結構，氨基酸側鏈中的 hemoglobin 還提供其他必要的互動，如鹽橋、氫鍵和疏水相互作用，穩定一個特定的四級結構。

hemoglobin 和 myoglobin 之間的功能區別在於通過 hemoglobin 的配體結合位表現出的協同性。這個協同性是可能的，因為一個結合位的氧合狀態（有結合或沒結合）可被傳遞到另一個地方，而影響其性質的改變。

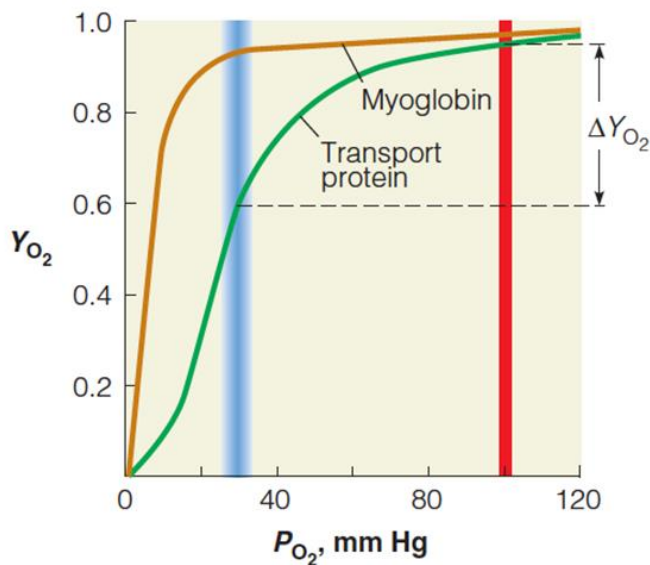
三、Cooperative vs. noncooperative O₂-binding curves :



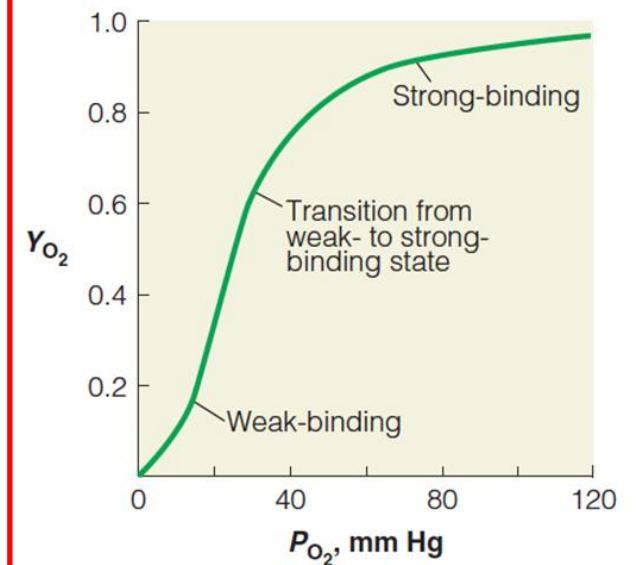
(a) Transport protein efficient in binding but inefficient in unloading (hyperbolic binding curve).



(b) Transport protein efficient in unloading but inefficient in binding (hyperbolic binding curve).



(c) Transport protein efficient in both binding and unloading because it can switch between higher and lower affinity states (sigmoidal binding curve).



(d) Switch from lower to higher affinity states yields the sigmoidal curve.

四、The Hill equation：(老師說這裡不會考!!!所以就附上僅供參考)

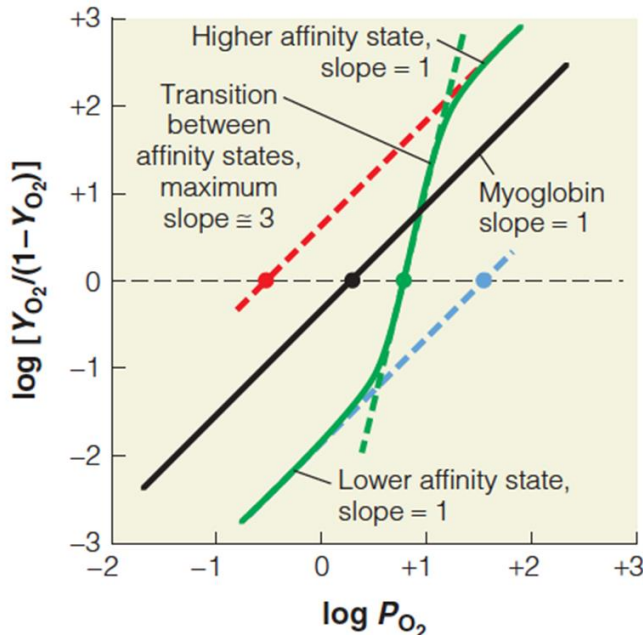
$$\log\left(\frac{Y_{O_2}}{1 - Y_{O_2}}\right) = h \log P_{O_2} - h \log P_{50}$$

(A plot of the Hill equation indicates positive, negative, or no cooperativity.)

For both cooperative and noncooperative systems, the Hill plot gives the value of h as the slope at $\log[Y_{O_2}/(1 - Y_{O_2})] = 0$.

Four cases may be considered for a molecule with n binding sites:

- (1) $h = 1$: There is no interaction between the sites; thus, the molecule binds ligands noncooperatively (e.g., as for myoglobin).
- (2) $1 < h < n$: There is interaction between the sites. This situation is the usual one for a protein that binds ligands with so-called “positive” cooperativity, as depicted for hemoglobin.
- (3) $h = n$: The energy of interaction between sites approaches infinity. In this hypothetical situation the molecule is wholly, or infinitely, cooperative.
- (4) $h < 1$: In this case, ligand binding at one site reduces binding affinity at other binding sites and is called “negative cooperativity.”



Hill plots of oxygen binding for myoglobin and hemoglobin under physiological conditions: The plot for myoglobin, which binds oxygen noncooperatively, is a solid black line with a slope of 1.

The plot for hemoglobin, which binds cooperatively, shows the switch from a lower-affinity state (larger P_{50}) to a higher-affinity state (smaller P_{50}) and has a Hill coefficient of about 3.

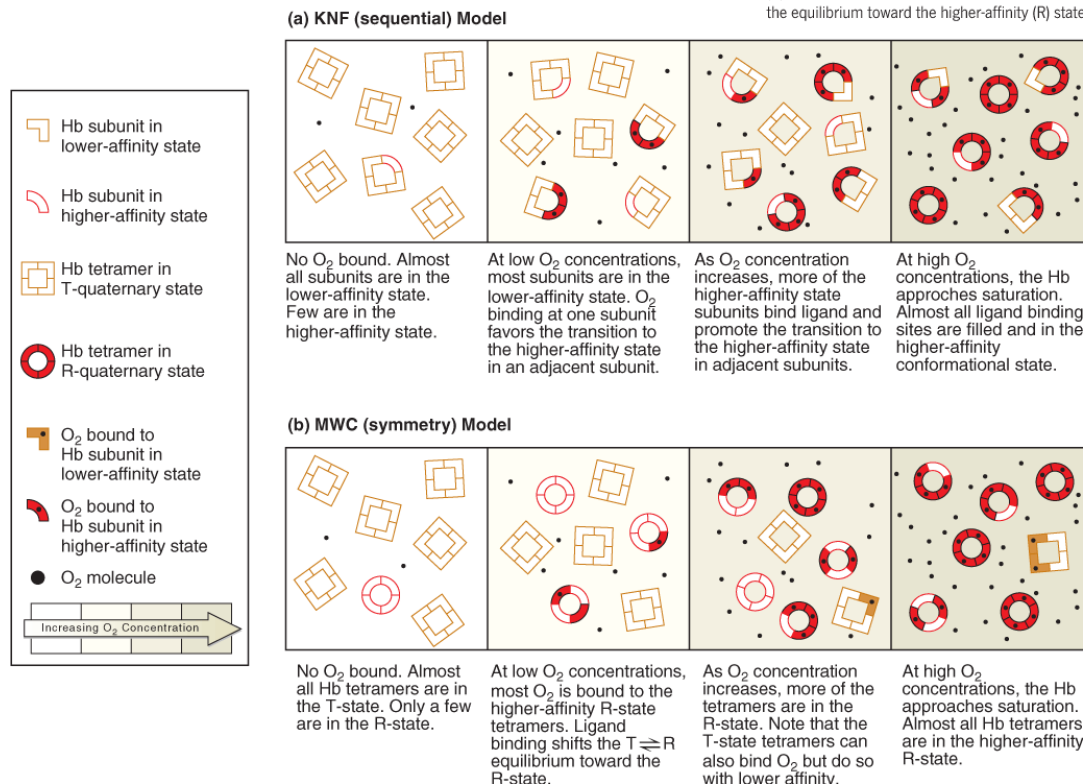
氧合血紅蛋白的協同結合是異位效應(allosteric effect)的一個例子。在變構結合中，一個配體結合氧氣與否影響其餘未填充的結合位點的親和力。該配體可以是相同種類的，如在結合到 hemoglobin 的情況下，或者它們也可以是不同的。allosteric effect 也是用於調節酶的活性之重要機制。

五、解釋 Allosteric change in hemoglobin 的兩個典型模型：

- (1) KNF (sequential) Models: Hb 的四個 subunits 由 lower-affinity state 完全形變到 higher-affinity state 有一段過渡期。
 - (2) MWC (concerned/symmetry) Models: 整個 Hb 四聚體分子只有兩種狀態「*tense(T) state*」和「*relaxed (R) state*」，構形變化類似全有全無的概念。Hemoglobin 的構型會在 T-state 和 R-state 之間轉換。在 O₂ 充足的環境中如肺或鰓，Hb 結構會傾向於 R-state (higher-affinity state)，所以 O₂ 易與之結合；在 O₂ 不足的組織，Hb 結構傾向於 T-state (lower-affinity state)，O₂ 從 Hb 釋放。
- R-state 的 hemoglobin 與 O₂ 有較高結合力(低 P₅₀)
 - T-state 的 hemoglobin 與 O₂ 有較低結合力(高 P₅₀)

FIGURE 7.12

Two classical models for the cooperative ligand binding by hemoglobin. (a) The Koshland, Nemethy, and Filmer (KNF) model. As each subunit binds a ligand, it promotes a change in an adjacent subunit to the higher-affinity conformation. (b) The Monod, Wyman, and Changeux (MWC) model. The entire molecule has two different quaternary states—tense (T) and relaxed (R)—which are in equilibrium. Binding of ligands shifts the equilibrium toward the higher-affinity (R) state.

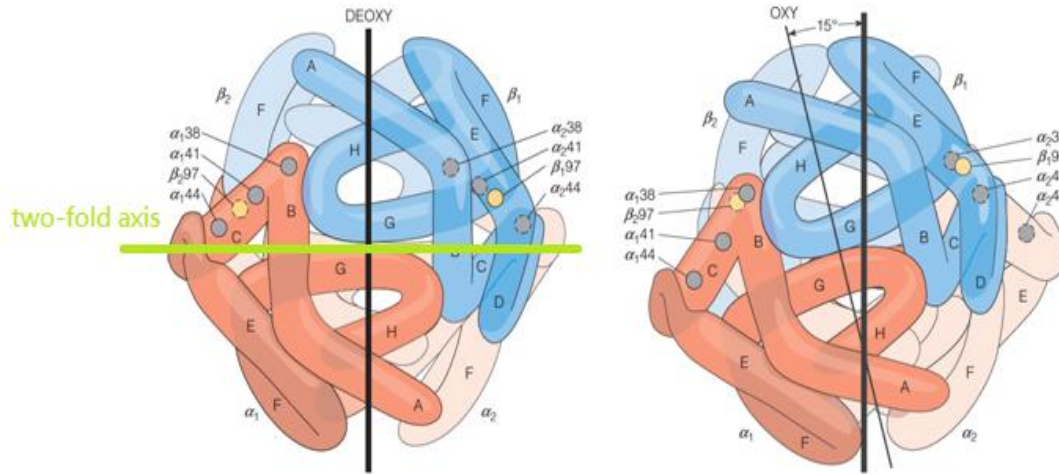


六、Perutz 以 MWC Model 為基礎，解釋了 hemoglobin 的同體異位性(allostery)：

- (1) 高等脊椎動物的 hemoglobin 是由與 myoglobin 類似的 α 和 β 多肽鏈組成的四聚體，且 α 和 β 各有兩條($\alpha_2\beta_2$)。
- (2) 氧合作用(oxygenation) → 造成 $\alpha\beta$ 二聚體相對於另一個 $\alpha\beta$ 二聚體轉動和滑動 → hemoglobin 四級結構的改變

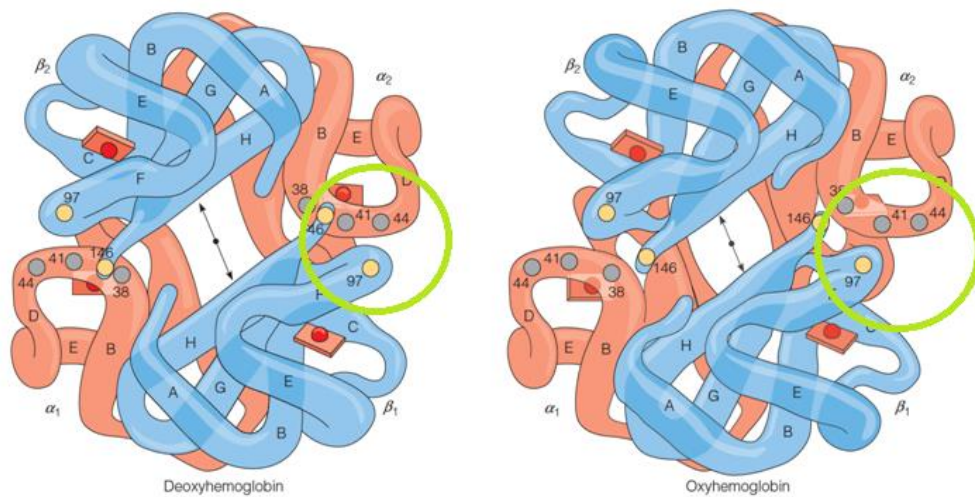
A. 整體來看

沿著垂直於 **two-fold axis**(下圖綠色的線)的軸：大約 15° 的轉動伴隨滑動，因為旋轉中心並不位於 Hb 中心



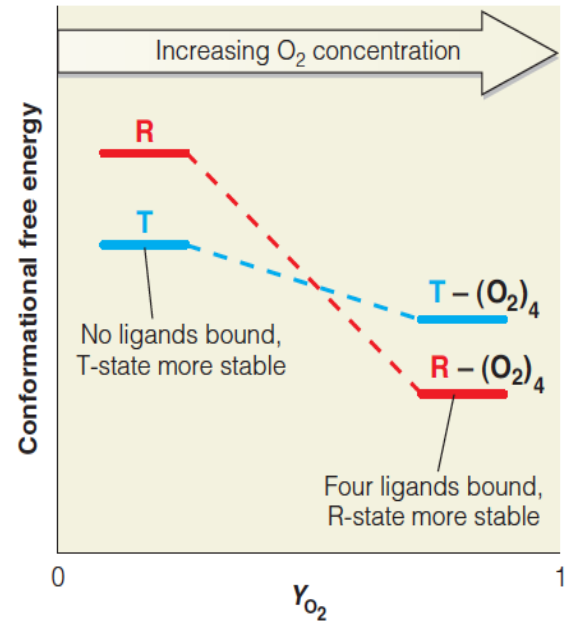
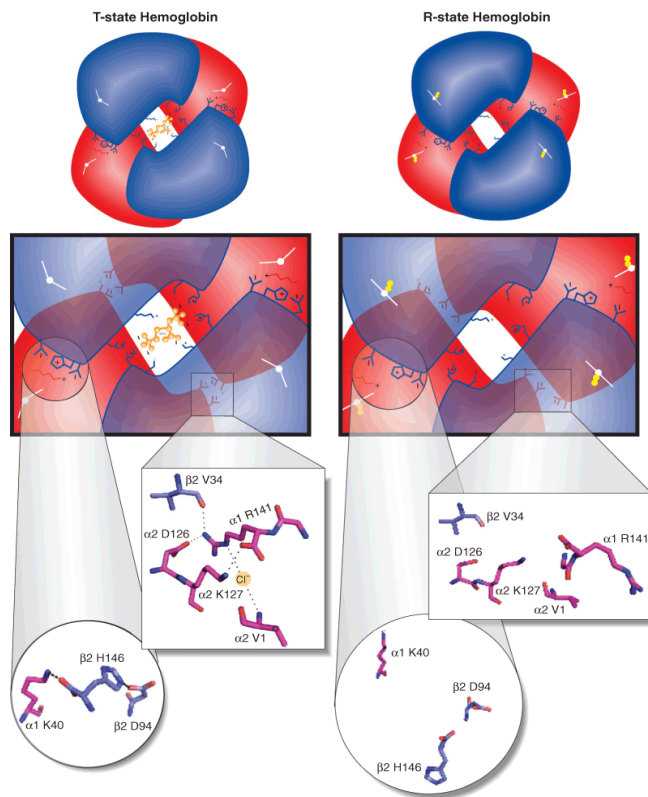
(左圖為 deoxy state，右圖為 oxy state)

從上面往下看 **two-fold axis**(中間的黑點)：由中間空腔的縮小，以及 β_{97} 和 α_{41} 、 α_{44} 的相對位移明顯看出 Hb 結構的改變



B. 放大來看(左下圖)

當 Hb 由 T-state 轉換成 R-state 時，重要的鹽橋(salt bridge)會被打斷，其能量來自於 R-state 中 Fe-O₂ 鍵的形成。



(紅色表示 α 鏈, 藍色表示 β 鏈, 白色是 Heme , 黃色表示 2,3-BPG)

(3) 右上圖是 ligand binding and conformation energies in hemoglobin 的簡化圖：

→ 在沒有 ligand 結合的時候，由於非共價相互作用(noncovalent interactions)增加，較傾向於 T-state

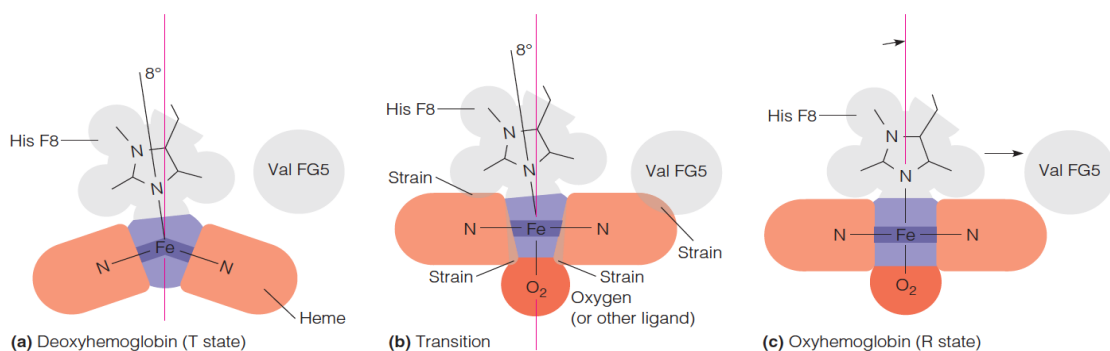
→ 當 Y_{O_2} 增加(即更多 ligand 結合)，透過形成的 Fe-O₂ 鍵所提供的能量來打斷 T-state 的穩定相互作用(stabilizing interactions)

(4) O₂ 和 deoxyhemoglobin 的結合導致 Heme 結構變化(對照下圖)

(a) 在 deoxy state 時 heme 呈現圓頂形狀(dome shape)

(b) O₂ 的結合拉 Fe 進入 heme，造成 heme 上下兩側的壓力(strain)，使 heme 呈一平面

(c) 藉由 His F8 的方向移位以及 Val FG5 被推到右側減輕了壓力，heme 的結構改變傳遞到 FG corner。



- (5) 在 Perutz 的理論中，整個 helix F 因 O_2 和 heme iron 的結合而整個被向右拉，進而導致整個 helix 所在之 subunit 起了結構的變化，再導致與此 subunit 有所交互作用（hydrogen bond 等）之其他 subunit 產生改變。而此構型的改變，可以使對於氧氣的結合率得到提升。