
Bioorganická chemie

Funkce proteinů

Kateřina Hofbauerová

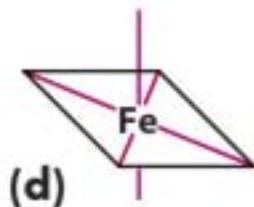
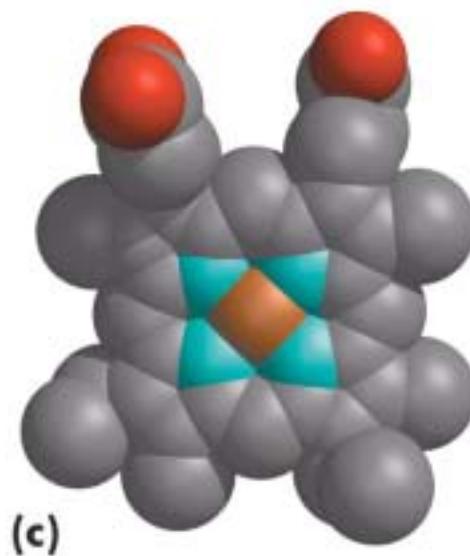
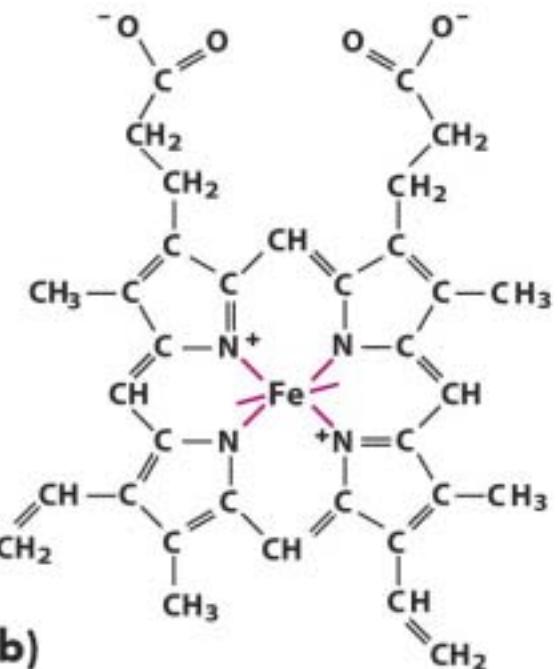
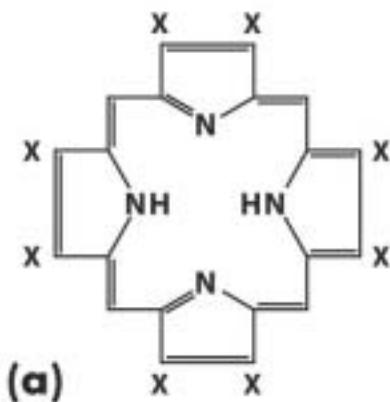
Hemoglobin / myoglobin

reverzibilní vazba ligandu na protein

Hemoglobin – reversibilní vazba ligandu na protein

- Ligand
- Vazebné místo pro ligand
- Transport kyslíku do tkání:
 - Rozpustnost a difuse O_2 ?
 - Vazba O_2 na protein – AA ?
 - Železo/měď – toxicita (oxidativní poškození)
- Hem
- Protoporfyrin
- Myoglobin vs. hemoglobin

Hem – součást hemoglobinu



Vazba hemu na protein

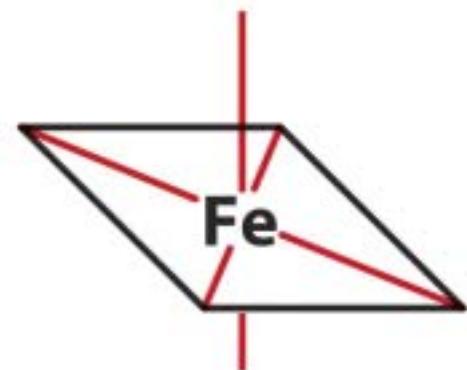
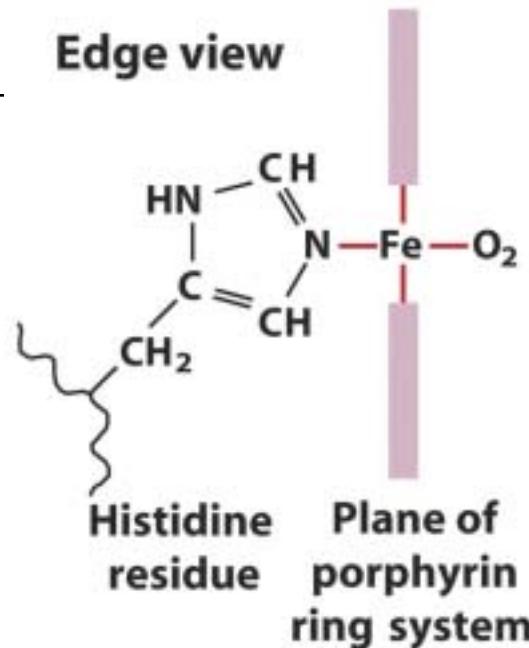
- 6 koordinačních vazeb Fe
- Role proximálního His
- $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$

Ireversibilní reakce dvou volných Fe^{2+} na 2Fe^{3+} (či vázaných v hemu bez proteinu) v přítomnosti kyslíku by bránila správné funkci, tj. přenosu kyslíku, v hemoglobinu či myoglobinu se to nemůže stát díky tomu, že hem je zanořen hluboko v proteinu a nemohou se tak sejít dva pospolu.

Vazba kyslíku na hemoglobin způsobuje barevnou změnu krve (žilní vs. tepenná).

Do vazebného místa se může vázat i CO (toxicita) či NO, protein tomu částečně brání.

Edge view

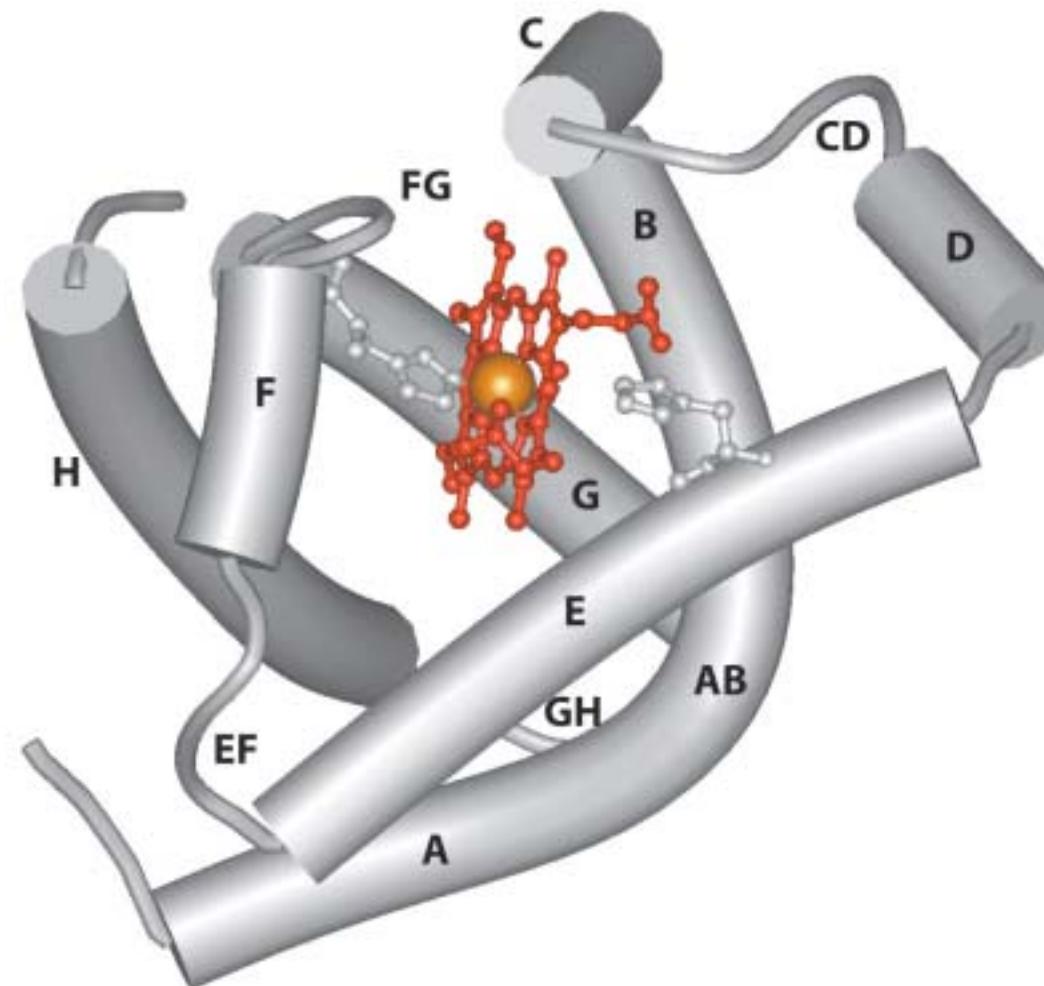


Struktura myoglobinu PDB ID 1MBO

Myoglobin – oxymyoglobin =
zásobárna kyslíku ve tkáni

MW 17 000 – 153AA
polární povrch molekuly
H93&H64 – koordinace
železnatého iontu

(His F8 a His E7) – vazba O₂
globulární bílkovina
4.5x3.5x2.5nm
8 alfa helixů (A-H) - 75% Amk
Hem – cyklický tetrapyrrol&Fe²⁺
(pyrrol&methyleneový
můstek – porfyrin)
výskyt v monomerní formě
vazba kyslíku, oxidu uhelnatého



Vazba ligandu

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_d}{k_a}$$

$$\theta = \frac{[PL]}{[PL] + [P]}$$

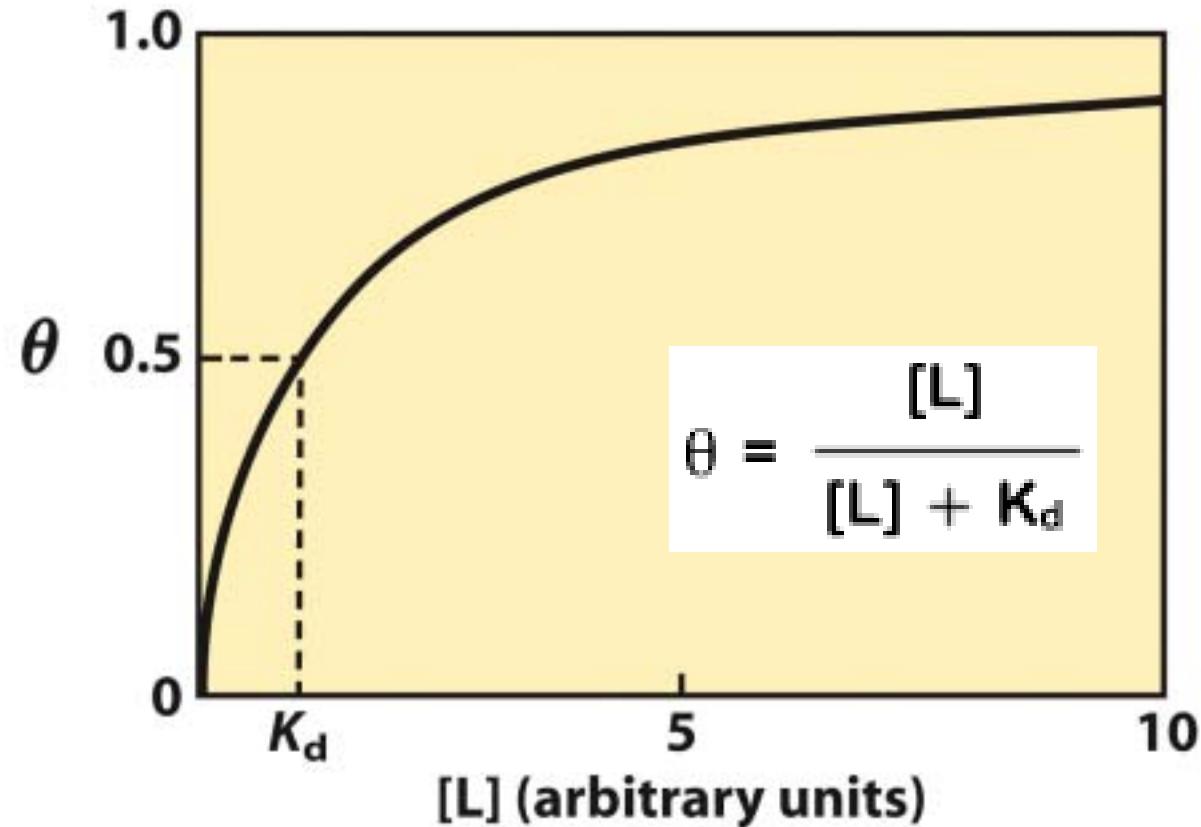


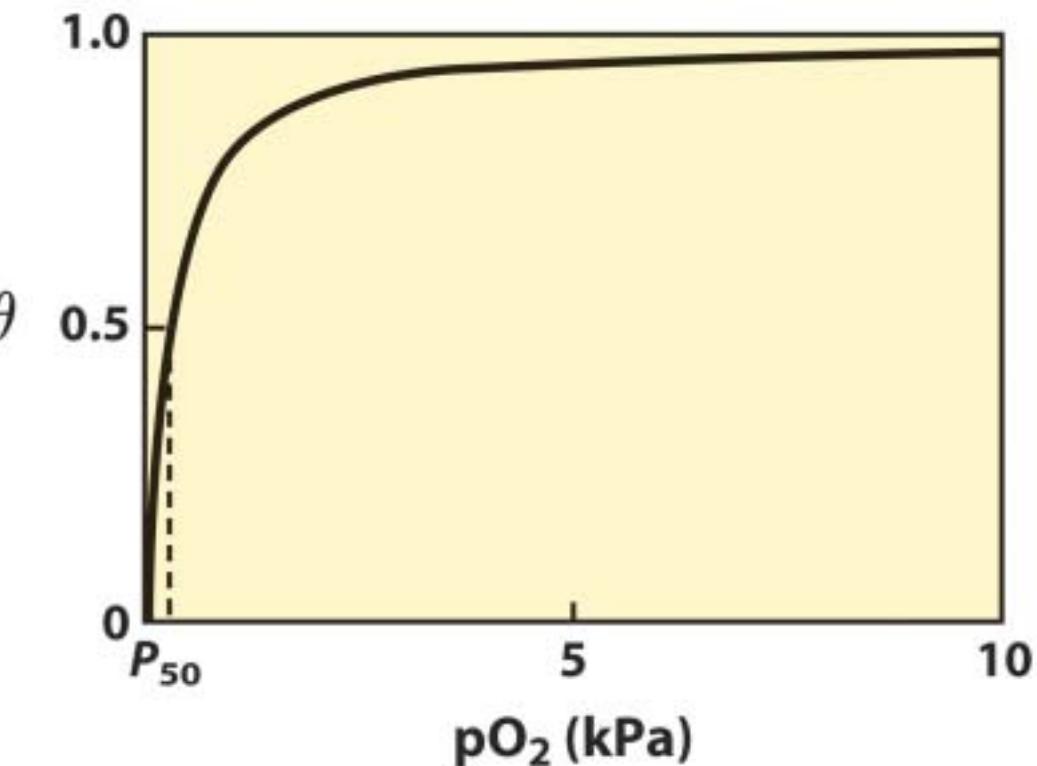
Figure 5-4a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Vazba ligandu na myoglobin

P50 – pro vazbu O₂ na myoglobin je 0,26 kPa – odpovídá disociační konstantě Kd (Kd=1/Ka – associační konstanta)

Theta je frakce obsazených vazebných míst (ku všem)

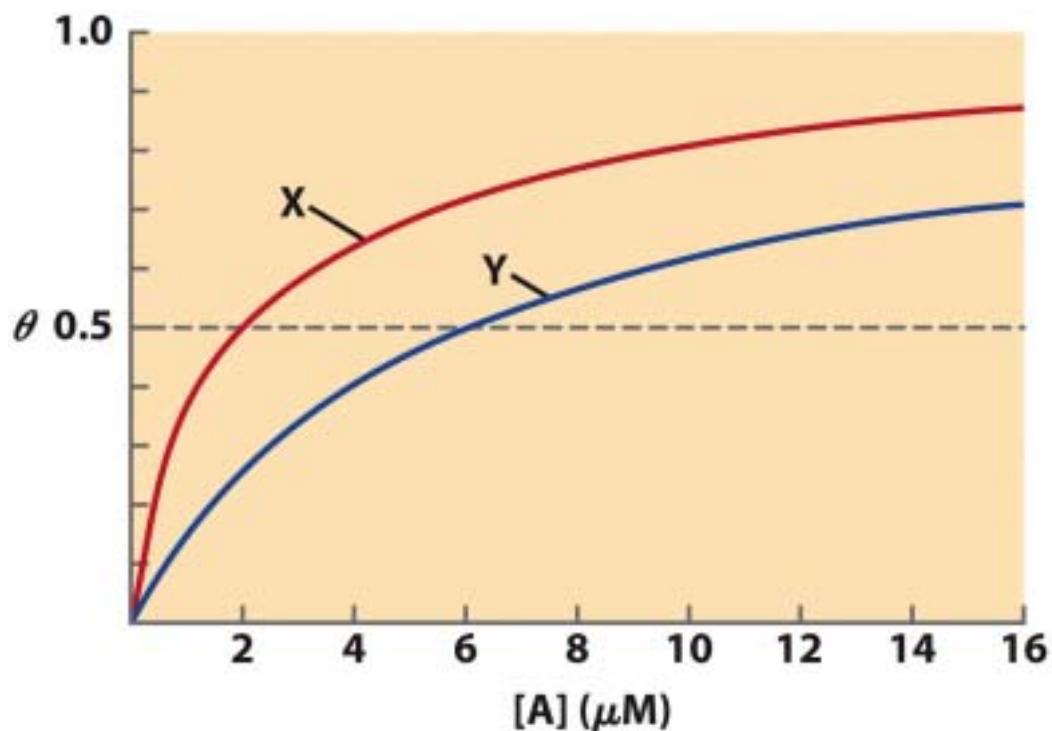
$$\theta = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}}$$



Jaká je disociační konstanta pro proteiny X a Y ?
Který z proteinů má vyšší afinitu k ligandu A ?

$$K_d(X) = 2 \mu M / K_d(Y) = 6 \mu M$$

Afinitu má pochopitelně větší X (protože má nižší K_d)



Typické disociační konstanty...

TABLE 5-1

Some Protein Dissociation Constants

Protein	Ligand	K_d (M)*
Avidin (egg white) [†]	Biotin	1×10^{-15}
Insulin receptor (human)	Insulin	1×10^{-10}
Anti-HIV immunoglobulin (human) [‡]	gp41 (HIV-1 surface protein)	4×10^{-10}
Nickel-binding protein (<i>E. coli</i>)	Ni^{2+}	1×10^{-7}
Calmodulin (rat) [§]	Ca^{2+}	3×10^{-6}
		2×10^{-5}

Typical receptor-ligand interactions

Sequence-specific protein-DNA

Biotin-avidin

Antibody-antigen Enzyme-substrate

K_d (M)

high affinity low affinity

The range of dissociation constants for interactions in biological systems. Colors denote the range for each class of interaction. A few interactions, such as that between the protein avidin and the enzyme cofactor biotin, fall outside the normal ranges. The avidin-biotin interaction is so tight it may be considered irreversible. Sequence-specific protein-DNA interactions reflect proteins that bind to a particular sequence of nucleotides in DNA, as opposed to general binding to any DNA site.

Vazba ligandů na hem myoglobinu

Deoxy – Fe 0.3 Å nad rovinou hemu k proximálnímu His F8

Oxy – Fe 0.1 Å nad rovinou hemu k His F8 → změna konformace

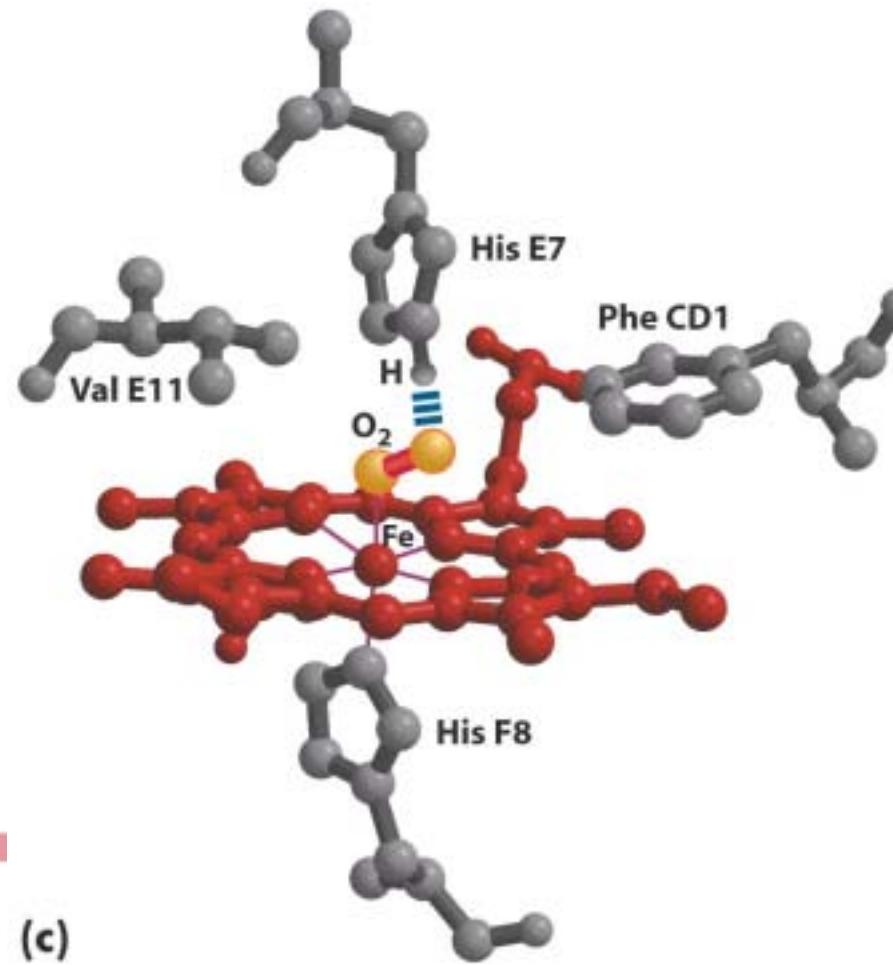
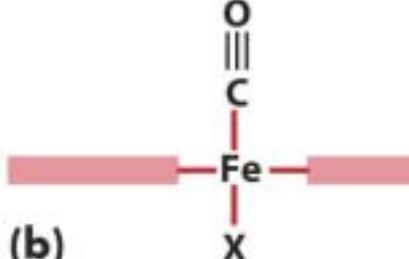
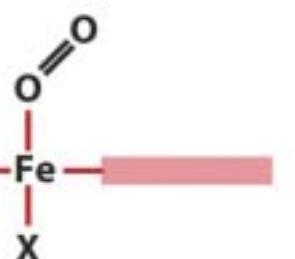
Role distálního His E7

O=O – úhel cca 120°

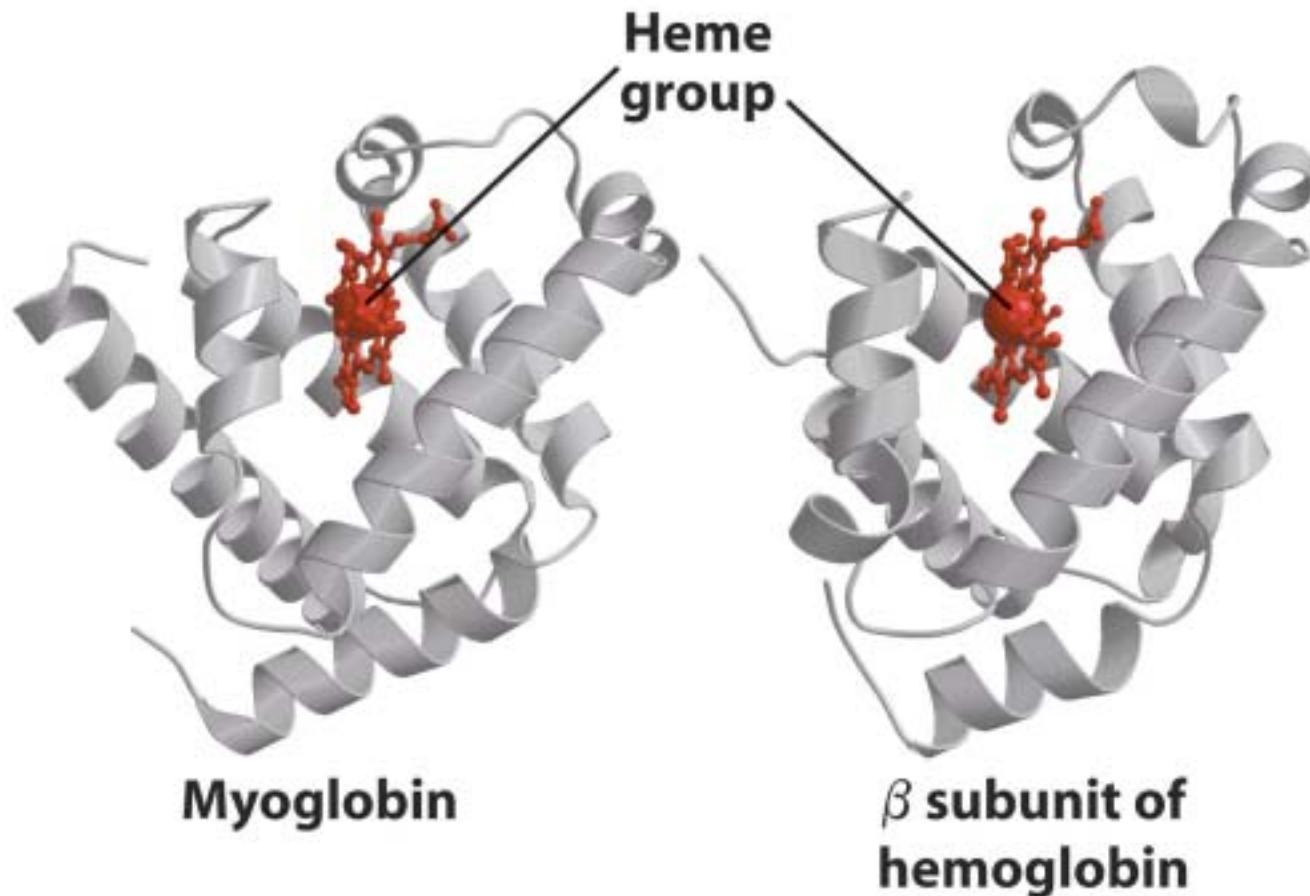
C≡O – cca 25 000x pevnější vazba

Sterické omezení – distální His → jen cca 250x pevnější vazba než O

Carbon monoxide :C≡O:



Podjednotky hemoglobinu jsou strukturně podobné myoglobinu



myoglobin (PDB ID 1MBO) a β podjednotka hemoglobinu (PDB ID 1HGA).

Hemoglobin vs. myoglobin

	Mb	Hb α	Hb β		Mb	Hb α	Hb β		Mb	Hb α	Hb β		Mb	Hb α	Hb β		Mb	Hb α	Hb β				
NA1--	IV	IV	IV			K	A	A			*	*				*	*	*			*	*	
	—	—	H			K	H	H			H	V				V	T	C			V		
L	L	L				K	V	L			L	L				L	L	A			L		
A1	—	S	T	—		G	D	D			A	A				S	A	H			A		
E	P	P				H	D	N			H	A				H	L	L			L		
G	A	E				H	M	L			S	A				S	A	H			A		
E	D	E				E	P	K			H	L				H	L	F			L		
W	K	K				A	N	G			P	P				120P	P	G			P		
Q	T	S				E	A	T			E	T				G	A	120K			A		
L	N	A				F1	—	L	80L	F	—	—	—			D	E	E			E		
V	V	V				K	S	A			F	F				D	E	F			F		
L	K	T				P	A	T			K	Y				R	H	S			F		
H	A	A				L	L	L			F	F				F	F	F			F		
V	A	L				A	S	S			K	—	G			H	D	D			D		
W	W	W				Q	D	E			H	D	D			L	L	L			A		
A	G	G				S	L	L			L	L	L			K	S	S			V		
K	K	K				F8	H	H			K	S	S			A	H	Q			A		
V	V	V				His	F9	—	A	A	C	—	—			E	A	S			V		
A16	—	E	G	—		T	H	D			T	H	T	—		Q	H	A			M		
B1	—	D	H	N	—	K	K	K			A	—	D			M	L	Y			D		
V	—	20D	H	N	—	H	L	L			E	—	A			N	D	Q			A		
A	—	20V	A	V		K	R	H			M	—	V			K	K	K			V		
G	E	E	D			G1	—	100P	D	D	—	D7	A	G	G	—	A	F	V			A	
H	Y	V	Y	V		I	V	V			E1	—	S	S	N	—	L	L	V			L	
G	G	G	G	G		I	P	100P			D	—	A	P		E	A	S			S		
Q	A	G	A	G		K	V	E			60D	Q	K			D	S	G			V		
D	E	E	E	E		Y	N	N			L	V	60V			F	S	V			A		
I	A	A	A	A		N	F	F			K	K	K			R	S	T			V		
L	L	L	L	L		L	E	K			K	G	A			140K	T	N			T		
I	E	G	E	G		F	100L	L			H	H	H			D	V	140A			A		
R	R	R	R	R		I	L	L			G	G	G			I	L	L			L		
L	M	L	M	L		S	S	G			V	60K	K			A	T	T			A		
F	F	L	F	L		S	H	N			T	K	K			T	D	H			T		
K	L	V	L	V		E	C	V			V	V	V			L	A	L			H		
B16	—	S	S	V	—	I	L	V			L	D	G			T	D	G			H		
	—	—	—	—		—	—	—			A	A	A			A	L	F			L		
	—	—	—	—		—	—	—			—	—	—			G	T	S			G		
	—	—	—	—		—	—	—			—	—	—			A	N	D			Y		
	—	—	—	—		—	—	—			—	—	—			I	A	G			Q		

Hb α and
Hb β only

Sekvence velrybího myoglobinu a lidského hemoglobinu (alfa i beta řetězců)
 Čárkovaně – hranice helixů, růžově a modře – konzervovaná rezidua, alfa
 podjednotky nemají krátké D helixy

Dominantní interakce mezi podjednotkami hemoglobinu

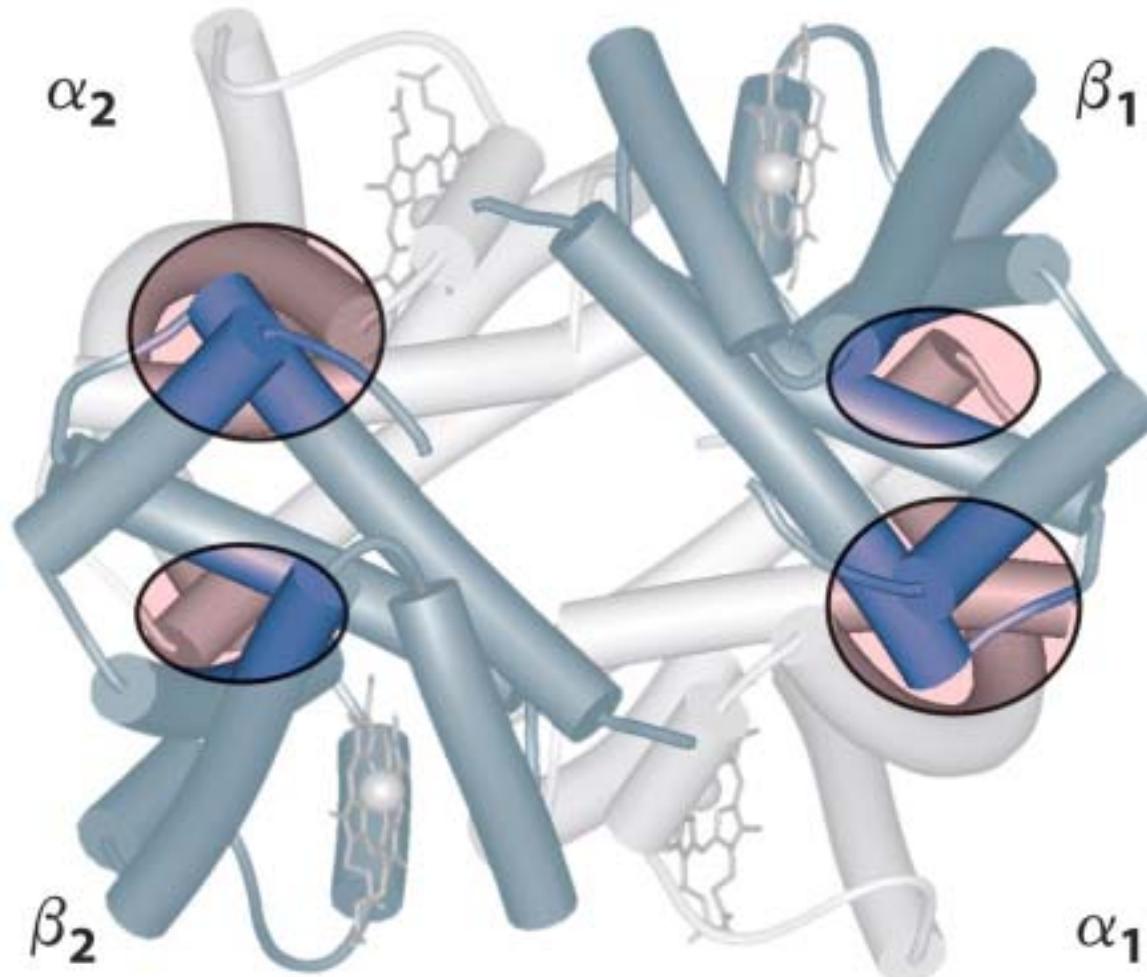
HbA ($\alpha_2\beta_2$) - normální,

HbF ($\alpha_2\gamma_2$) - fetální,

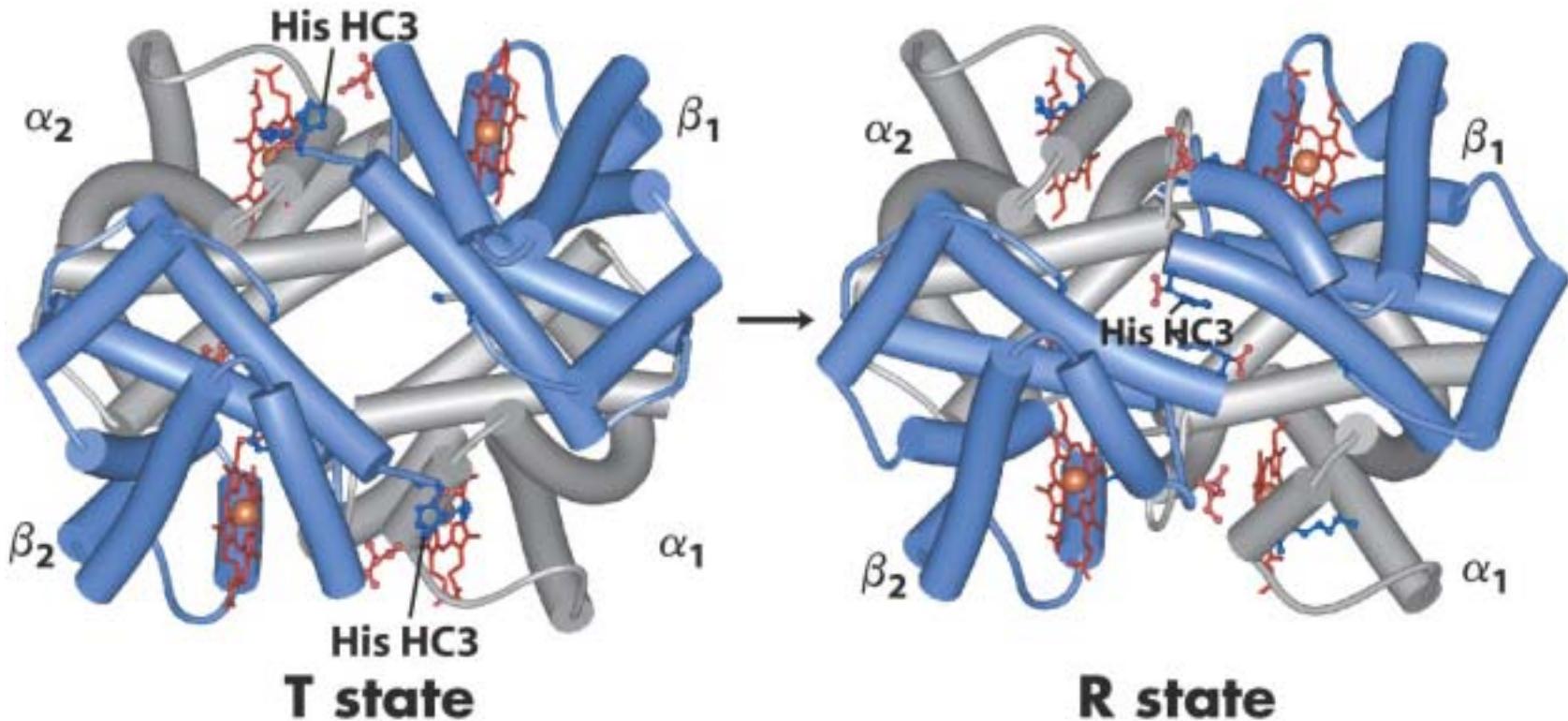
HbS (α_2S_2) – srpková

anémie, HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) - minoritní

Do interakcí na kontaktech mezi podjednotkami je zapojeno cca 30 interagujících residuí – hydrofobní interakce, H-můstky i pár solních můstek – iontových interakcí

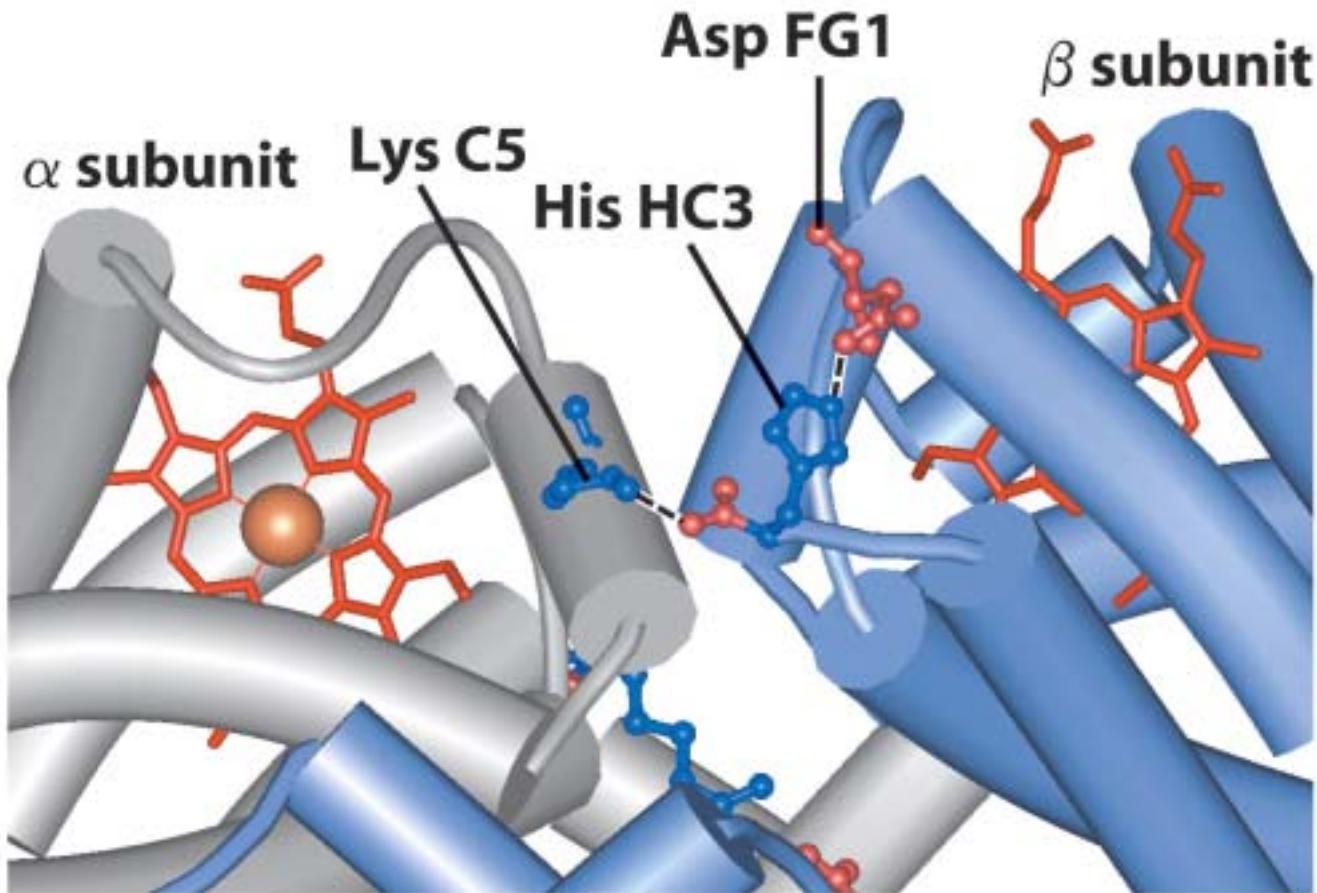


$T \rightarrow R$ přechod



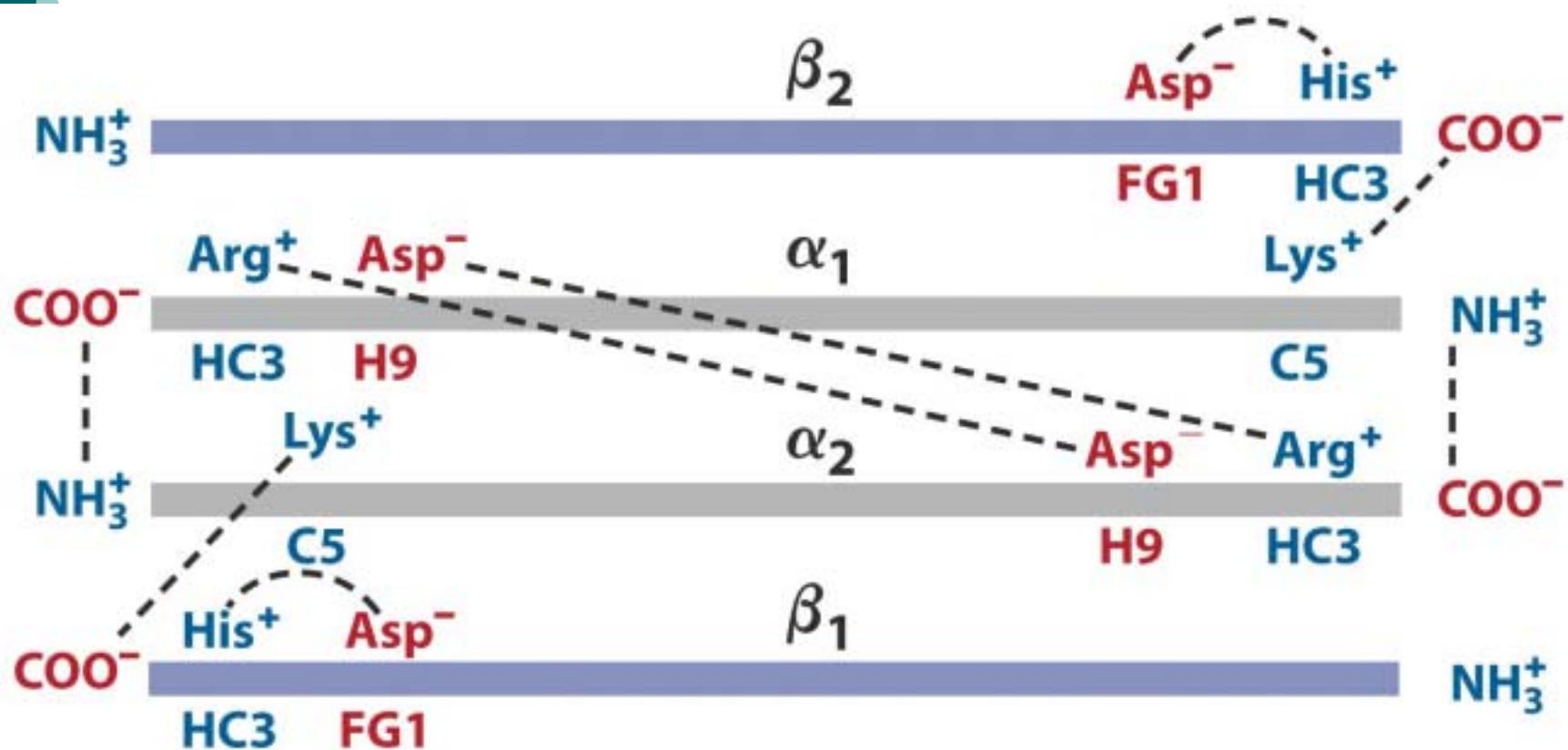
T stav (tense) a R stav (relaxed) – T má ovšem signifikantně vyšší afinitu ke kyslíku a navíc vazba kyslíku stabilizuje R stav. T stav je stabilnější a převládající konformace deoxyhemoglobinu.

Iontové páry stabilizující T-stav deoxyhemoglobinu



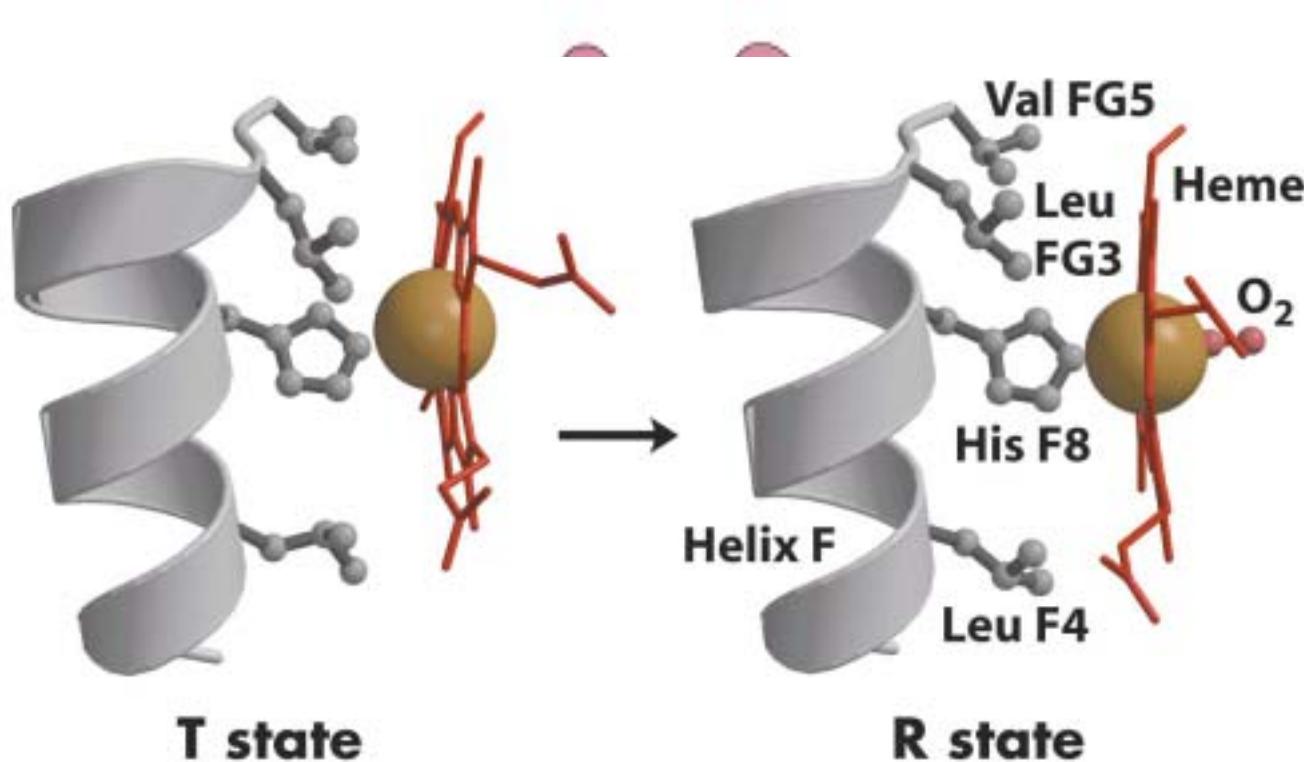
Solné můstky stabilizující strukturu T stavu deoxyhemoglobinu na rozhraní alpha1beta2 či alpha2beta1

Iontové páry stabilizující T-stav deoxyhemoglobinu



Některé iontové páry, které stabilizují T stav deoxyhemoglobinu

Konformační změny po navázání kyslíku na hem



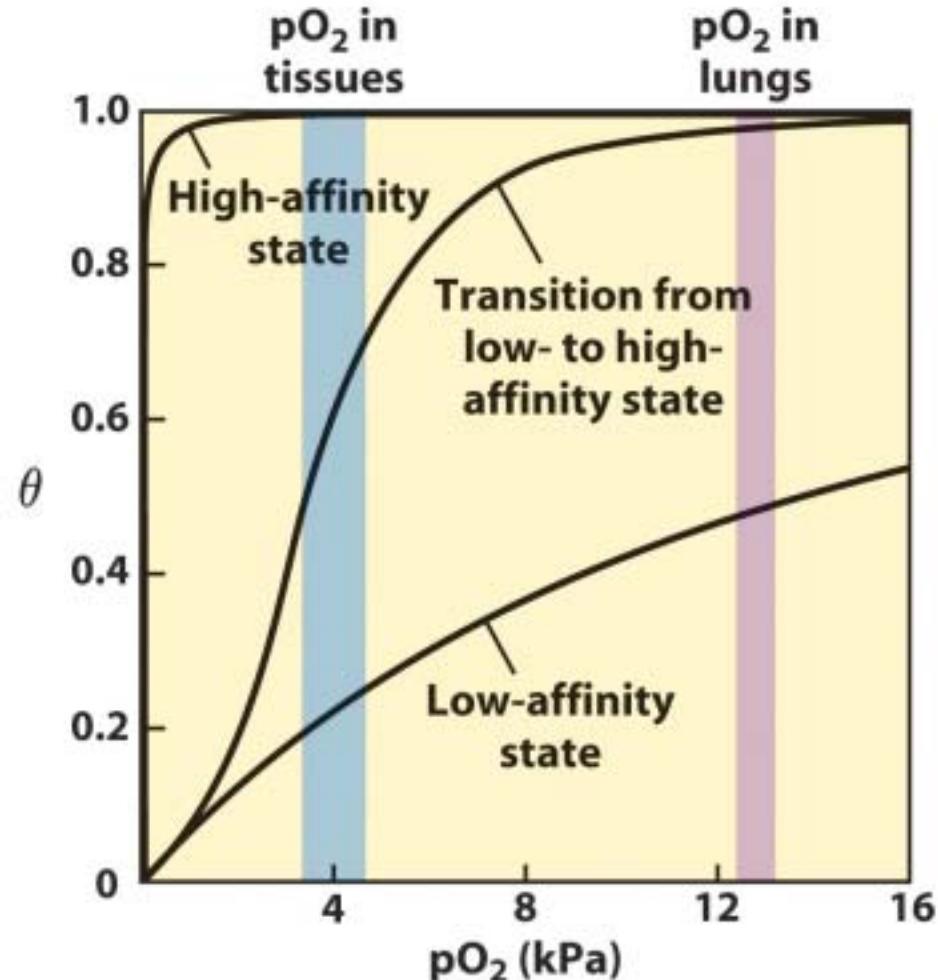
V T stavu je hem prohnutý směrem k proximálnímu His a Fe je zasunuto směrem k němu o 0,3A vůči rovině hemu. Navázání kyslíku způsobí vyrovnání hemu a posuv Fe směrem od proximálního His cca o 0,2 A.

Kooperativita vazby kyslíku na hemoglobinu

- Hillova rovnice

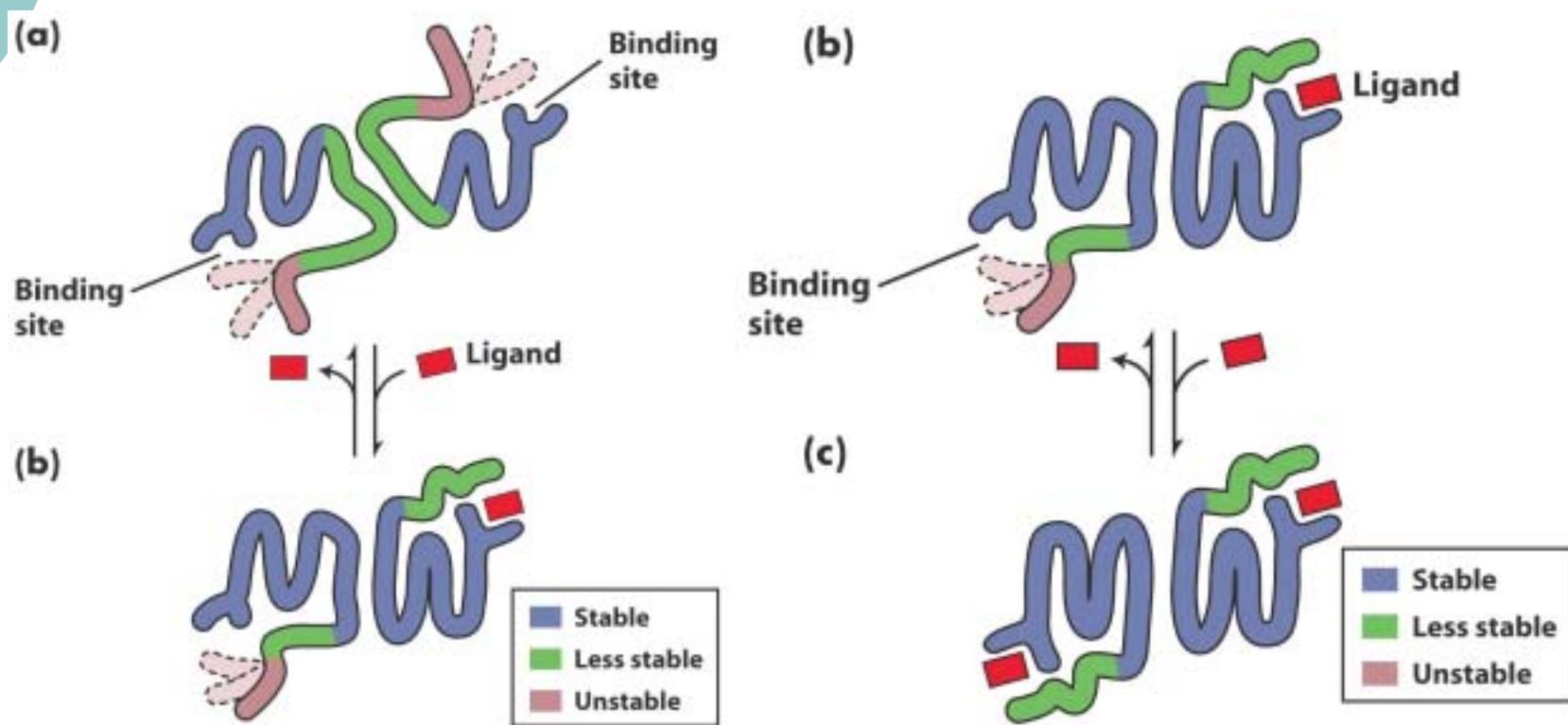
$$\theta = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}}$$

Parciální tlak kyslíku v plicích je cca 13,3kPa, zde hemoglobin váže kyslík nejlépe, při parciálním tlaku kolem 4kPa – release/uvolnění kyslíku v tkáních, pro což myoglobin není uzpůsoben (horní hyperbola). Myoglobin by dobře vázal kyslík v plicích, ale neuvolňoval jej v tkáních



Strukturální změny v multimerním proteinu při kooperativní vazbě ligandu

- Allosterický protein
- Homotropní / heterotropní allosterický modulátor (efektor)

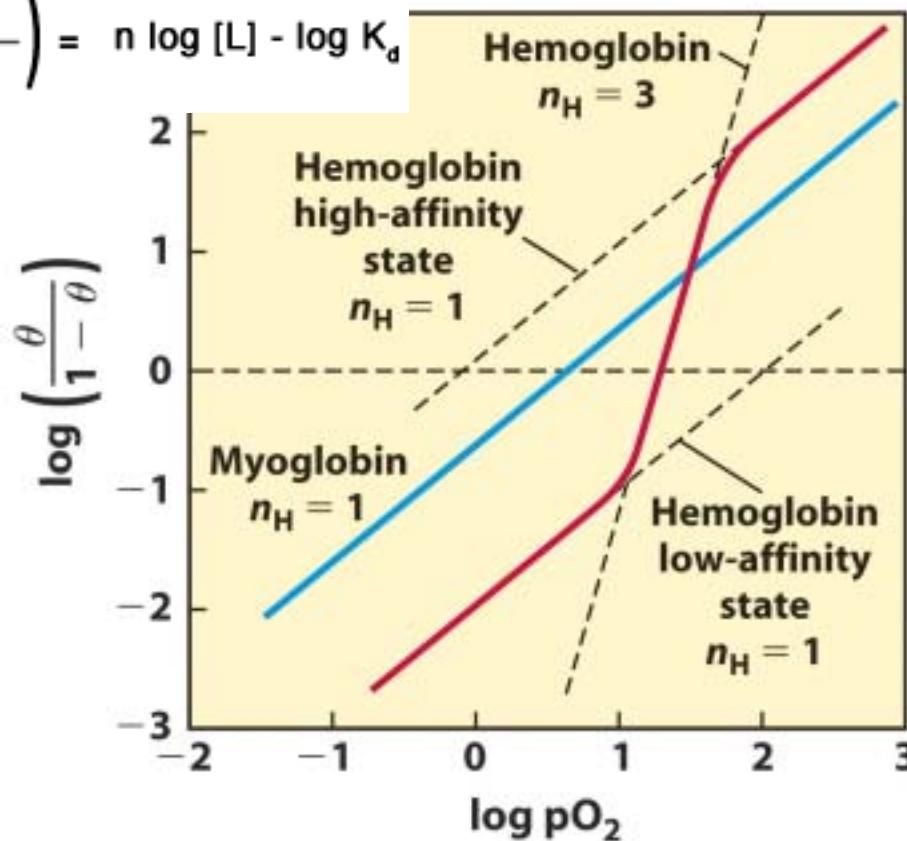


Hillův graf – kvantitativní popis kooperativní vazby ligandu

$$\theta = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}}$$

$$\log \left(\frac{\theta}{1 - \theta} \right) = n \log [L] - \log K_d$$

Hillův koeficient – míra kooperativity, teoretické absolutní kooperativity ($n=4$ pro 4 podjednotky hemoglobinu) není v praxi obvykle dosaženo, Hemoglobin má přibližně $n=3$, $n < 1$ indikuje negativní kooperativitu při níž vazba ligandu brání vazbě další molekuly ligandu na jinou podjednotku.



Mechanismy allosterie

- a) "symetrická" MWC hypotéza
 - b) sekvenční KNF hypotéza

MWC:

Podjednotky jsou funkčně identické a mohou přejít z T (low affinity - kruh) stavu do R (high affinity - čtverec) stavu po navázání ligandu jen všechny současně, čím více molekul ligandu je navázáno, tím pravděpodobnější je „concerted“ přechod do R stavu. Ligand se může vázat do T i R, ale pochopitelně s odlišnými afinitami.

KNF:

Vazba ligandu může způsobit změnu T→R v každé individuální podjednotce. Konformační změna v jedné podjednotce může změnit konformaci přilehlé podjednotky stejně jako navázání ligandu na ni.

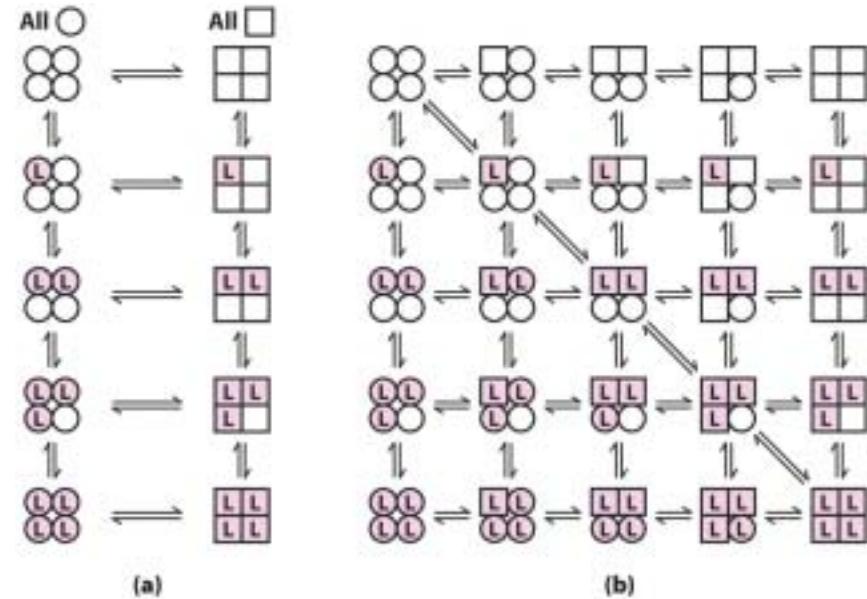
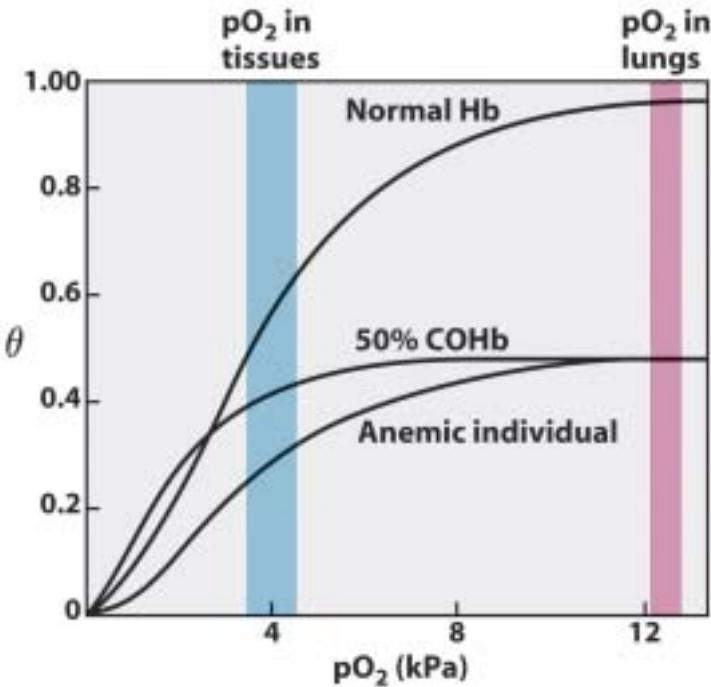
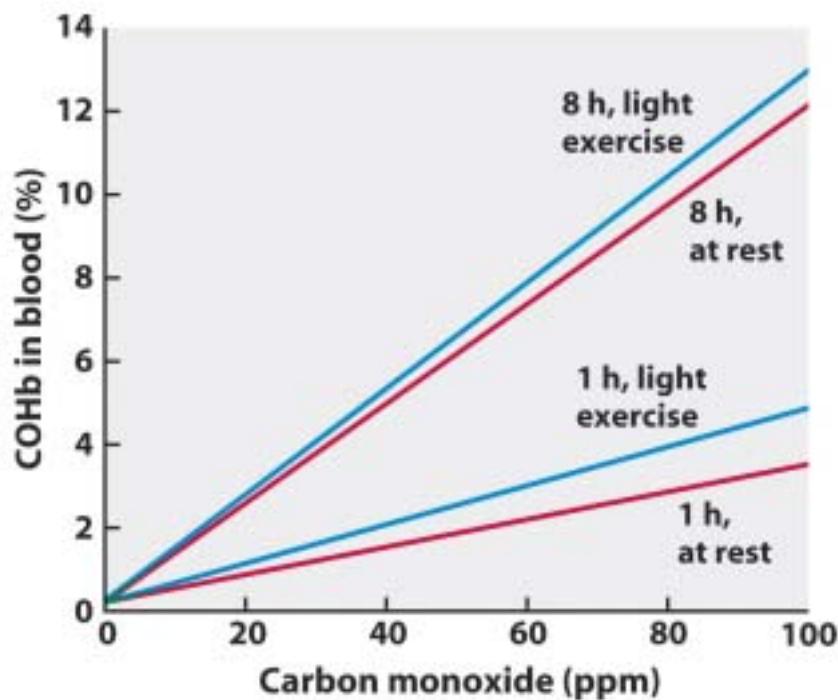


Figure 5-15
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

MWC a KNF se vzájemně nevylučují !!!

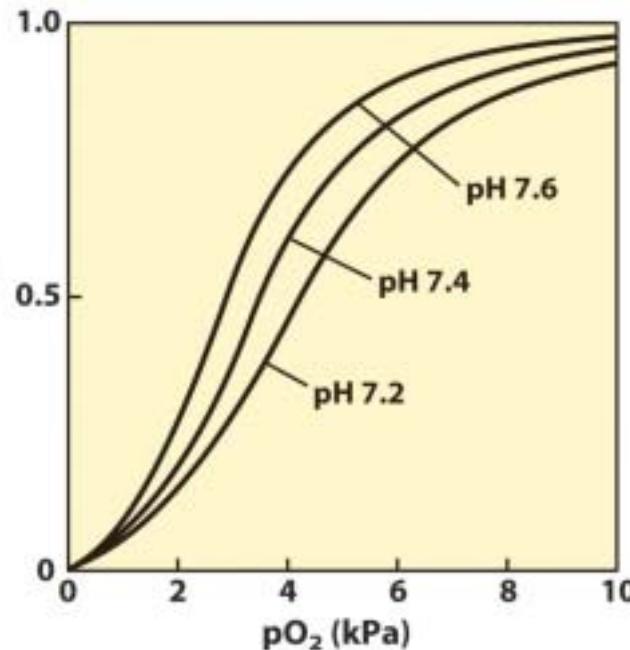
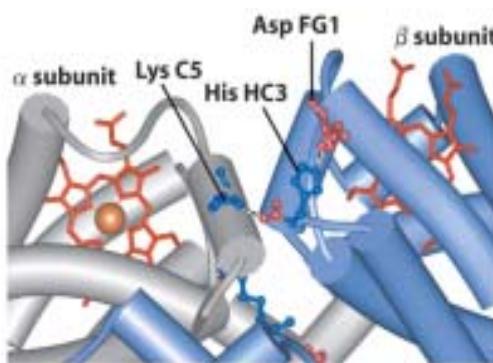
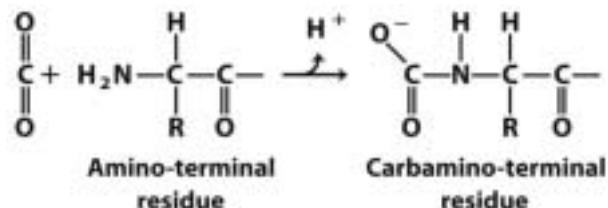
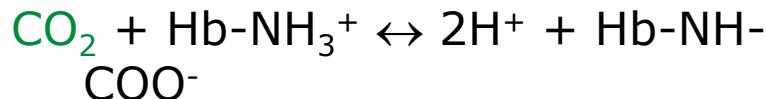
Otrava oxidem uhelnatým



CO bezbarvý plyn bez zápachu. Normálně v ovzduší cca 0,05ppm CO v neobydlených oblastech a 3-4ppm ve městech severní polokoule. Zdravý člověk 1% hemoglobinu či méně je zkomplexováno s CO jako COHb, kuřáci obvykle cca 3-8% COHb, náruživí kuřáci potom až 15% COHb. Při dlouhodobém vdechování 500ppm [tj. 0.05%] CO se hladina COHb ustálí na 50%, pod 10% obvykle nejsou pozorovány žádné symptomy otravy, kolem 15% se objevují slabé bolesti hlavy, kolem 20-30% silné bolesti hlavy, nausea, závratě/točení hlavy, zmatenosť, poruchy vidění. Tyto symptomy obvykle odeszní, pokud je postižený "ošetřen kyslíkem".

Hemoglobin transportuje H^+ a CO_2

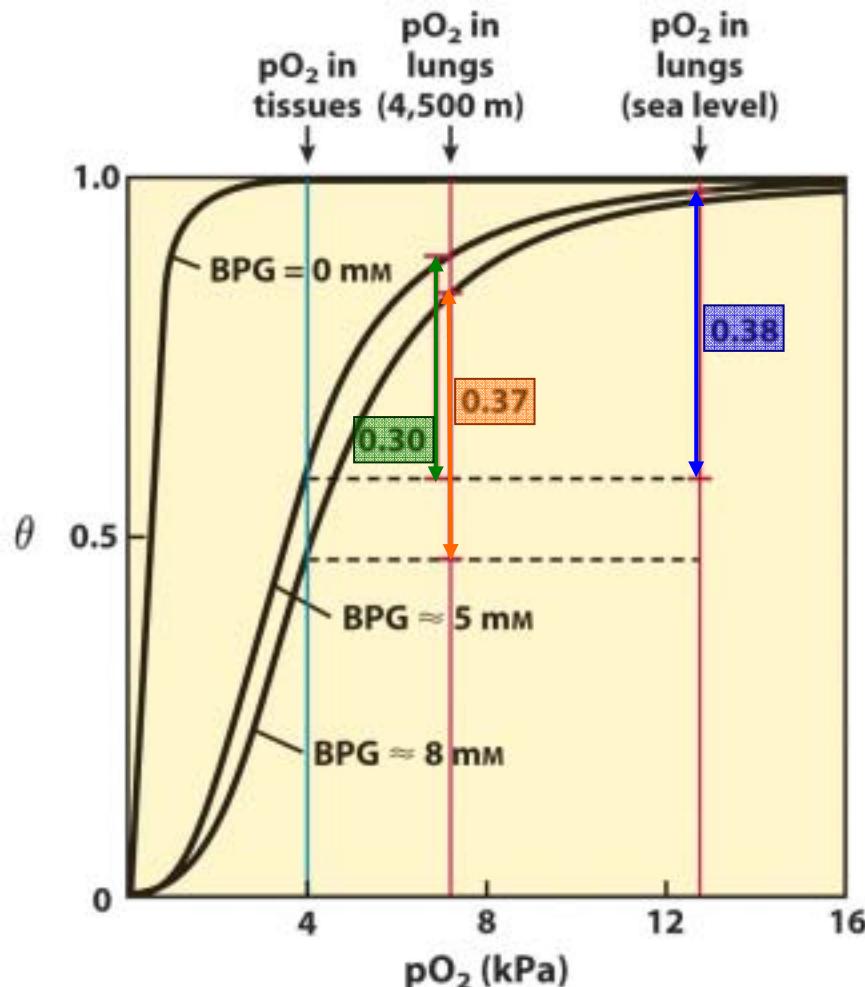
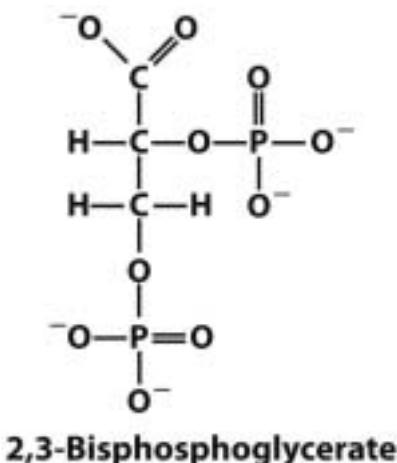
Bohrův efekt:



Transport kyslíku do tkání, transport oxidu uhličitého (cca 20%) a protonů (cca 40%) do plic a ledvin, zbytek protonů je absorbován karbonátovým pufrem a CO_2 je transportováno ve formě HCO_3^- ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$) (karbonátový puf). Vazba kyslíku na Hb je ovlivněna CO_2 i pH. Bohrův efekt (objev 1904 - Christian Bohr otec Nielse Bohra)

Regulace 2,3-bifosfoglycerátem (BPG)

- Aklimatizace ve vyšších nadmořských výškách
- Normální hladina – 5mM



Vazba BPG na hemoglobin

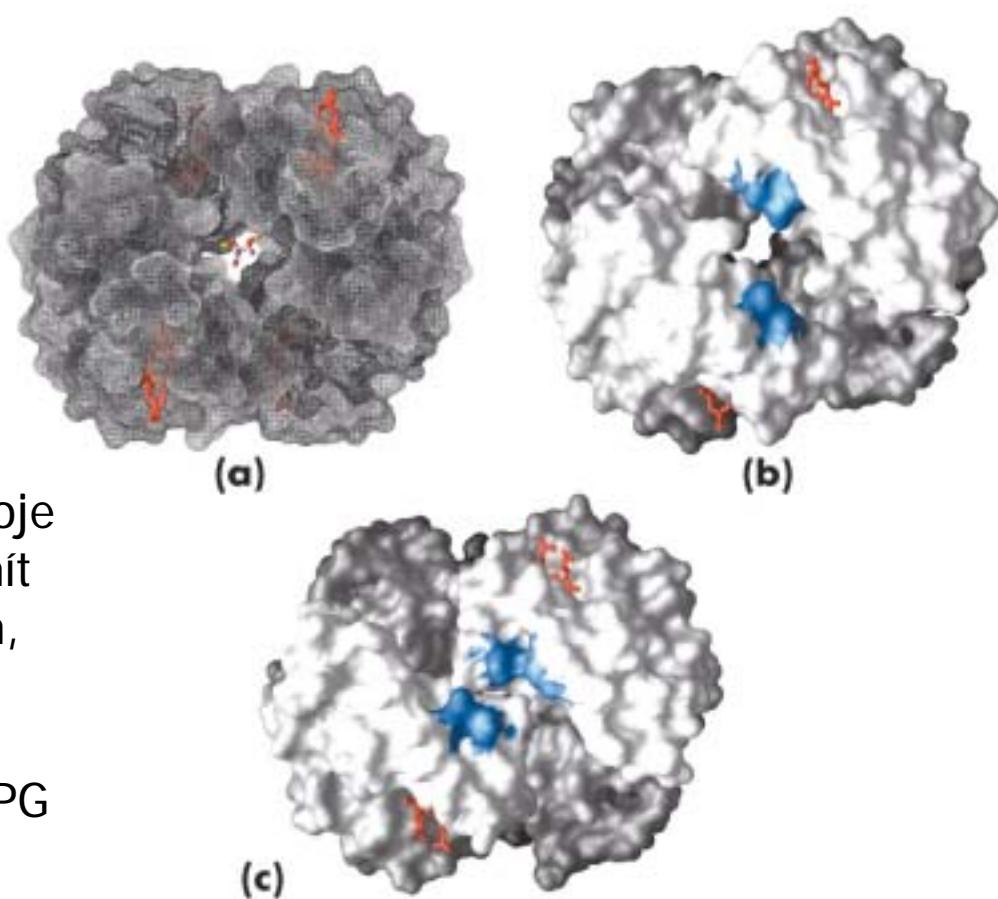
a) T deoxyHb s BPG

b) T deoxyHb

(vazebné místo pro BPG)

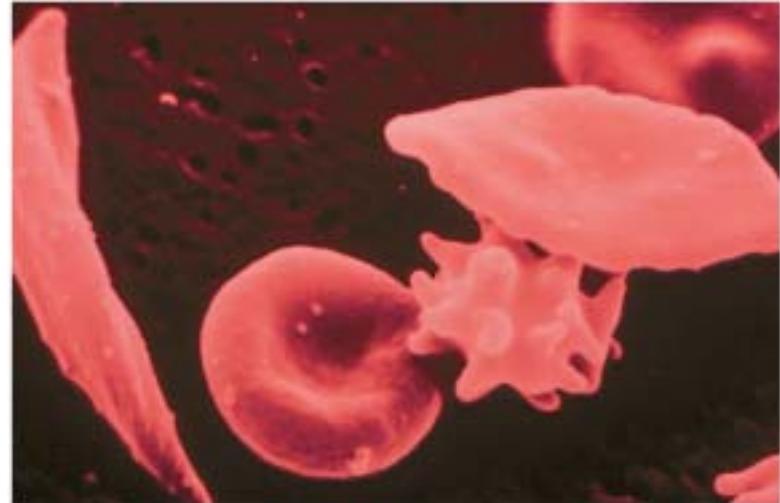
c) R oxyHb

(vazebné místo pro BPG)



BPG má důležitou roli během vývoje plodu. Fetální hemoglobin musí mít vyšší afinitu ke kyslíku než matčin, fetální hemoglobin má místo beta podjednotek podjednotky gama, které mají daleko nižší afinitu k BPG než u dospělých, což zajistí vyšší afinitu fetálního Hb ke kyslíku

Srpkovitá anémie



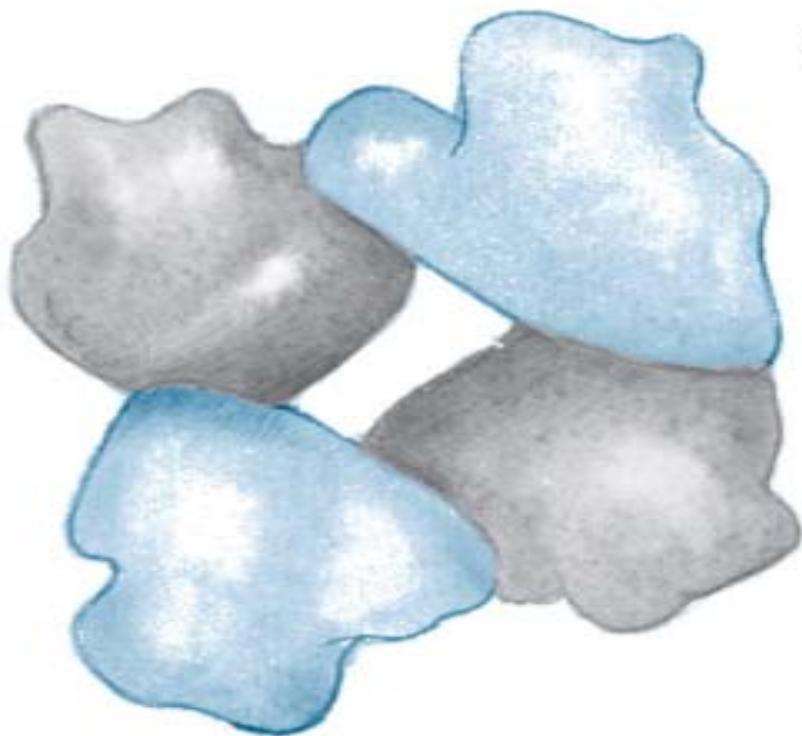
HbA – A2 Glu vs. HbS – A2 Val

Srpkovitá anémie - 4 z 1000, smrtelné onemocnění před 30 rokem věku

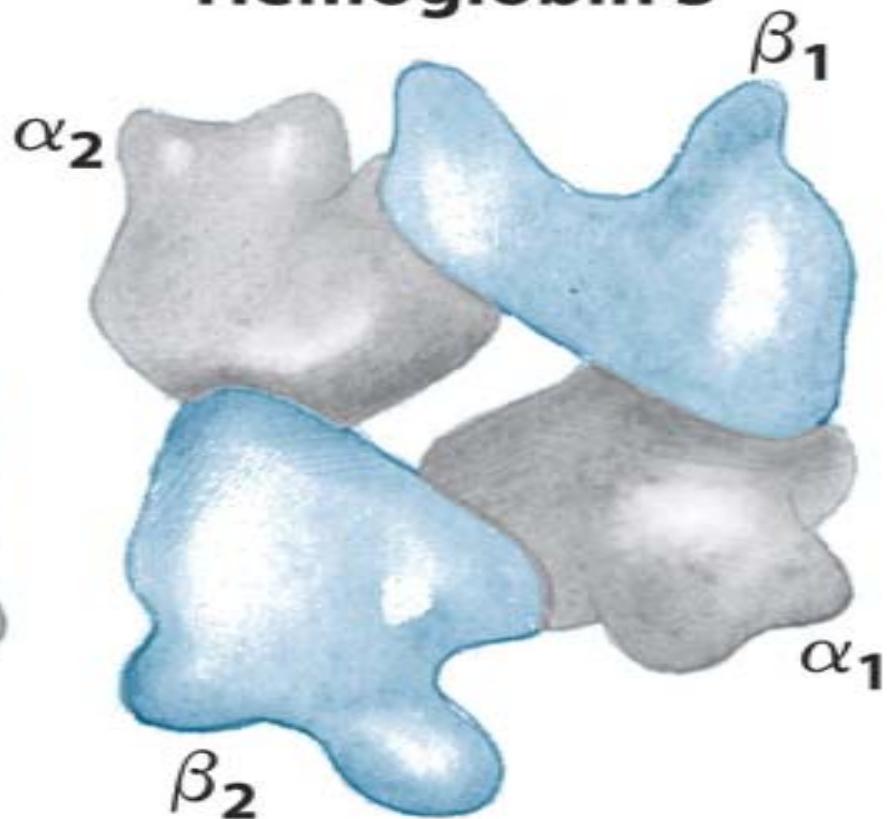
Poškození téměř všech tělních orgánů - 1904 – James Herrick

Abnormální gen poskytuje ochranu proti nejsmrtelnějším formě malárie
40% výskyt v určitých oblastech Afriky

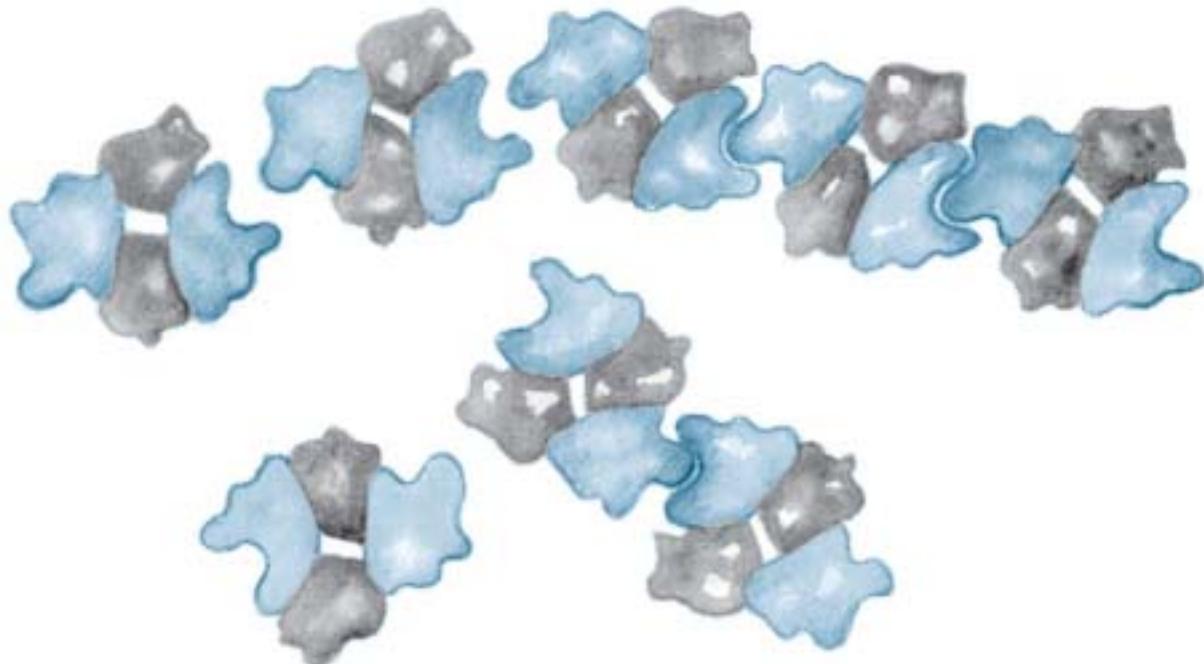
Hemoglobin A



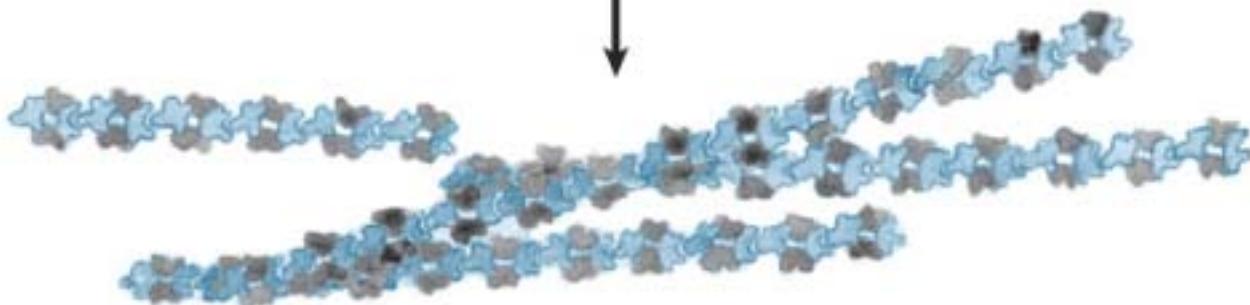
Hemoglobin S



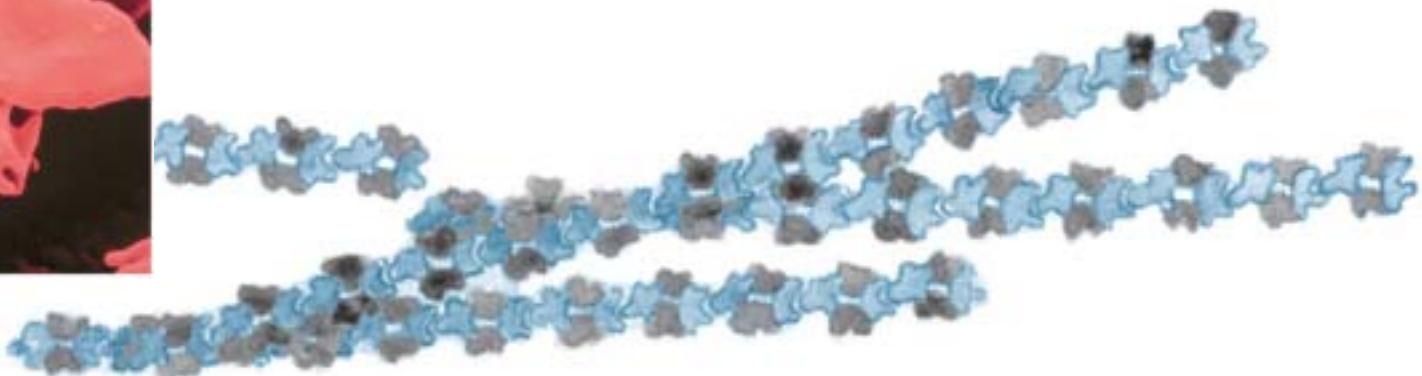
U srpkové anémie dochází ke strukturní změně u beta podjednotek a odkrytí hydrofóbních oblastí.



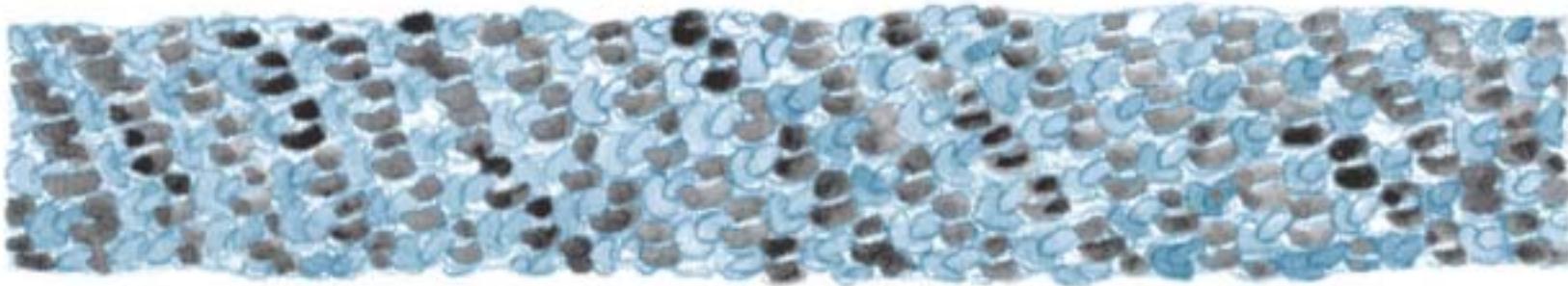
Interaction between molecules



Strand formation



Strand formation



**Alignment and crystallization
(fiber formation)**