

Hemoglobín




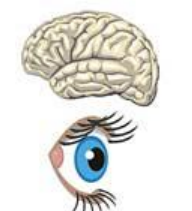
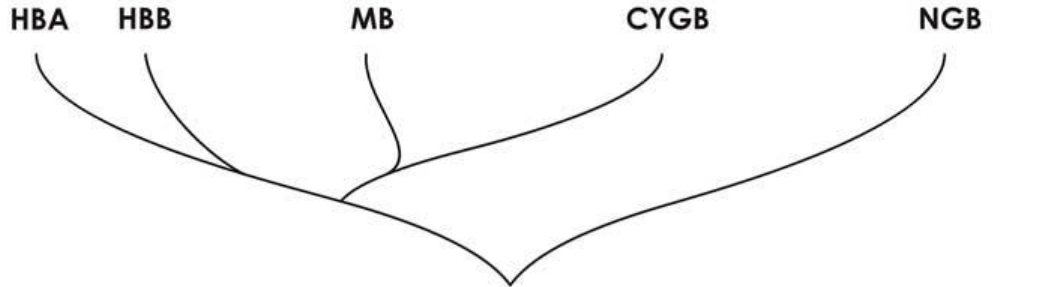
(Prednáška 5)

PRECHOD OD ANAERÓBNEHO K AERÓBNEMU ŽIVOTU

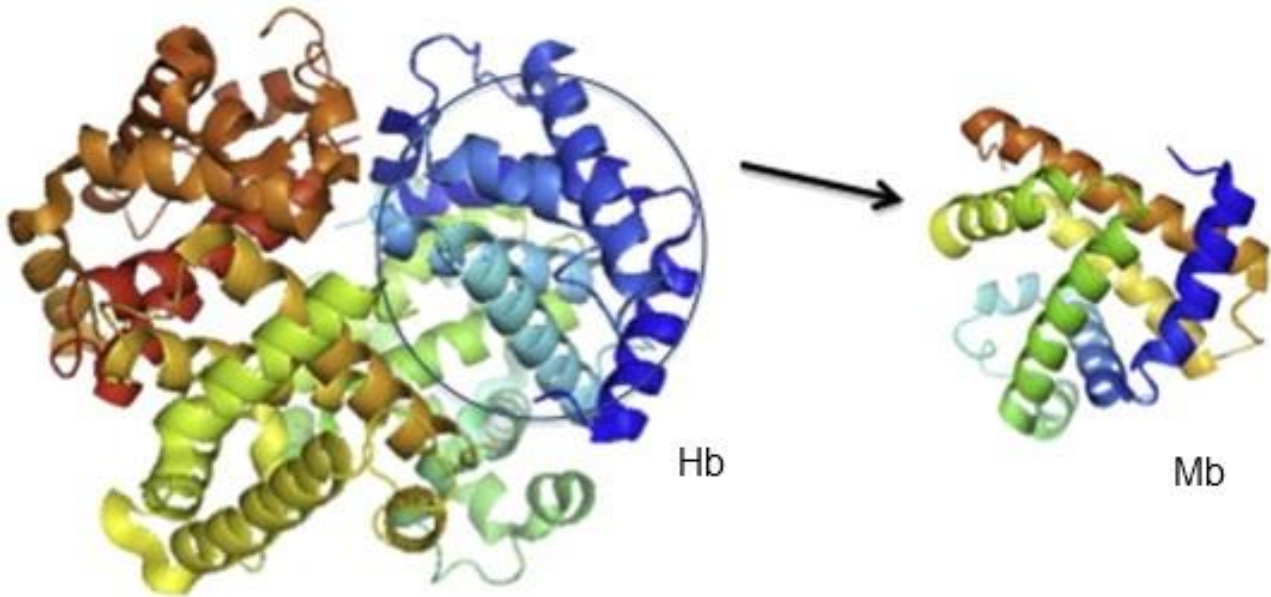
- uvoľnil veľký rezervoár energie – z glukózy získavame 15-krát viac energie v prítomnosti kyslíka ako bez kyslíka (budeme to preberať pri metabolických dráhach)
- stavovce vyvinuli v princípe 2 základné mechanizmy ako dodávať bunkám dostatok kyslíka:
 - (i) krvný obeh,
 - (ii) kyslík-transportné a kyslík-skladujúce proteíny akými sú hemoglobín a myoglobin.
- **Hemoglobín** je zvlášť zaujímavá molekula, ktorá pozostáva zo 4 proteínov, homológnych s myoglobínom. Nachádza sa v červených krvinkách a plní úlohu efektívneho prenášača kyslíka z pľúc do tkanív (až 90% naviazaného kyslíka v pľúcach vie uvoľniť v tkanivách) a taktiež prispieva k prenosu oxidu uhličitého a protónov z tkanív naspäť do pľúc.
- **Myoglobin** viaže tiež kyslík, ale nie je účinným prenášačom (dokáže odovzdať nanajvýš 7% zo svojej kapacity naviazaného kyslíka), slúži ako zásobník kyslíka vo svaloch. Teda až špeciálne spojenie 4 molekúl podobných myoglobínu (v hemoglobíne) vytvorilo účinný prenášač kyslíka.
- Kombinácia 4 proteínov vytvorilo kooperatívnu jednotku so zmenenými vlastnosťami väzby kyslíka a navyše s alosterickým miestom, na ktoré sa viaže špeciálna molekula so schopnosťou modulovať väzbu/viazanie kyslíka do hemoglobínu

GLOBÍNY U STAVOVOVCOV A ICH ZÁKLADNÉ VLASTNOSTI

Všetky uvedené globíny pozostávajú z proteínovej časti – polypeptidového reťazca a z hému - porfyrín obsahujúci koordinačne viazané železo, ktoré môže byť v penta- (jedno väzobné miesto na železe je voľné) alebo hexa- (všetky väzobné miesta hemového železa sú obsadené) koordinačnom stave. Hemové železo môže byť v stave Fe(3+) - oxidovaný stav, alebo v stave Fe(2+) – redukovaný stav.

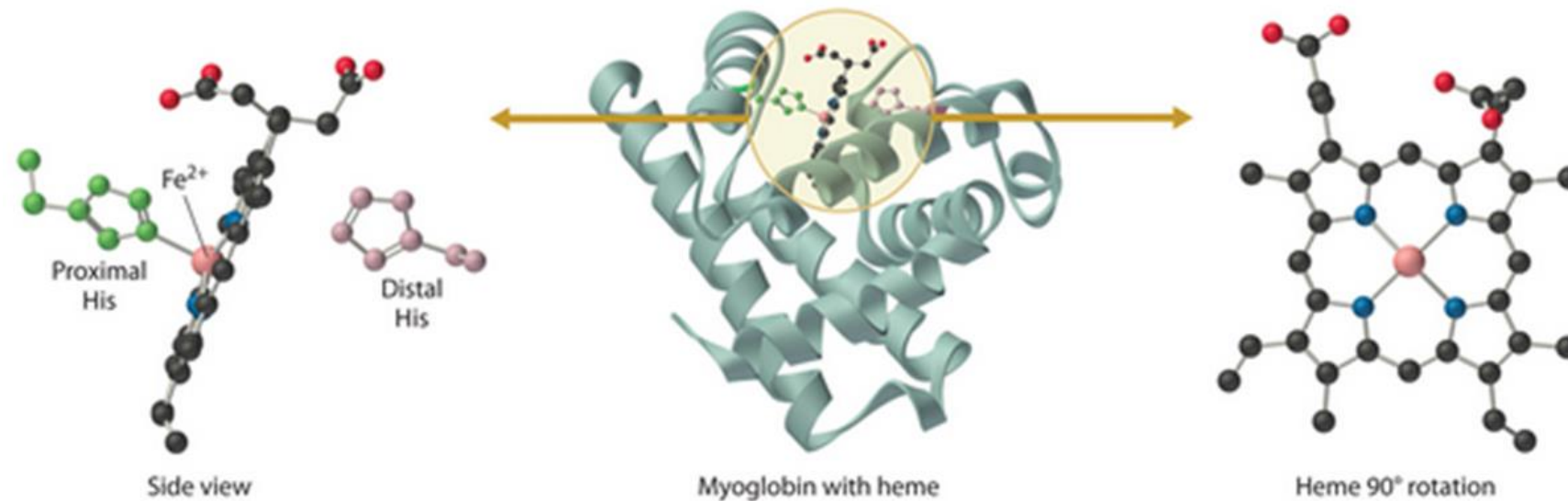
	hemoglobin	myoglobin	cytoglobin	neuroglobin
				
expression sites	red blood cells	skeletal muscle heart smooth muscle	fibroblast cell lineage liver stellate cells CNS/PNS	neurons (CNS,PNS) retina endocrine tissue fish gills
Fe-atom coordination	penta	penta	hexa	hexa
oxygen affinity (P ₅₀ (O ₂) in torr)	26	1	1	1
gene location (human)	α-cluster 16p13 β-cluster 11p15	22q13	14q24	17q25
locus link	(α) 83587 (β) 64162	4151	114757	58157
phylogeny				

Podobnosť 3D štruktúry monomérov hemoglobínu (Hb) s molekulou myoglobínu (Mb)

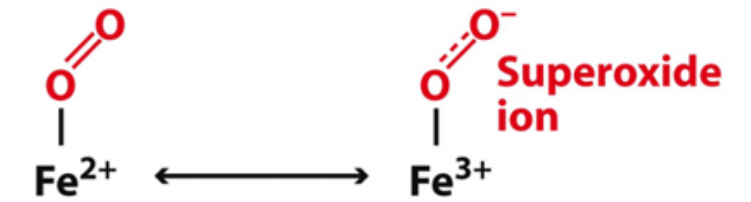


MYOGLOBÍN A HEMOGLOBÍN – HEMOVÁ OBLASŤ

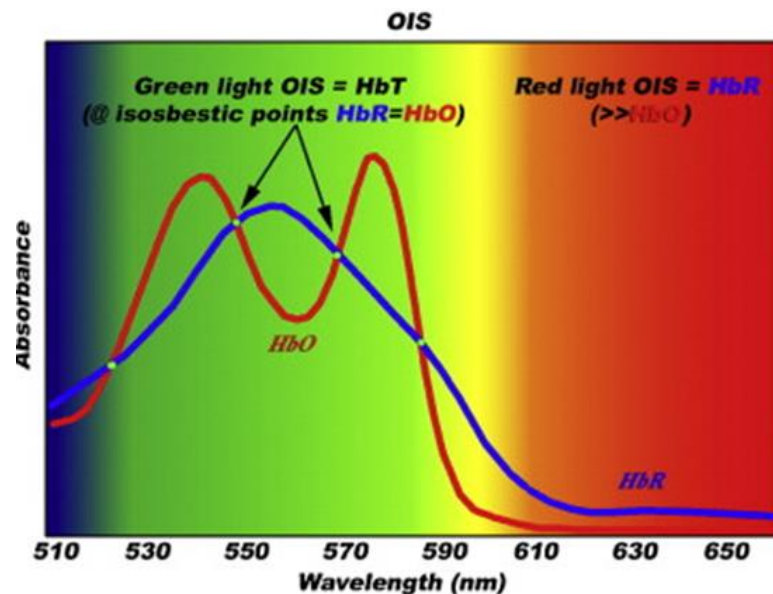
Aby mohli Mb a HB viazať kyslík, ich železo musí byť v penta-koordinačnom stave (4 miesta sú obsadené väzbou s pyrolovými jadrami porfyrínu a tzv. proximálnym His) a v redukovanej forme.



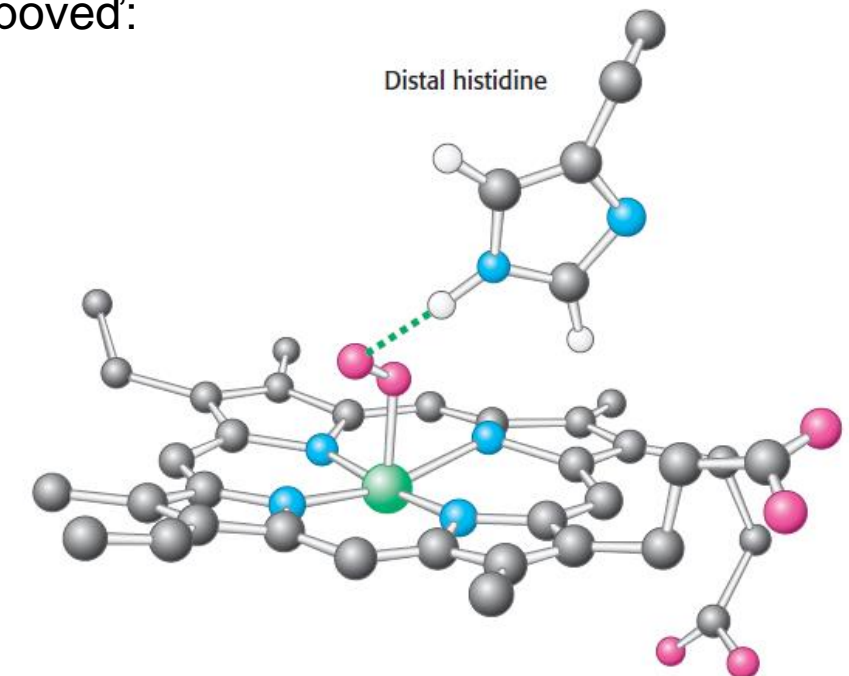
Prítomnosť distálneho His je nevyhnutná pre to, aby sa superoxidový anión, ktorý vzniká pri väzbe kyslíka na $\text{Fe}(2+)$ predčasne neuvoľnil (ako to His zabezpečí?)



Väzba kyslíka na hemové železo sa dá jednoducho sledovať pomocou absorpčnej spektroskopie v oblasti 500-600 nm

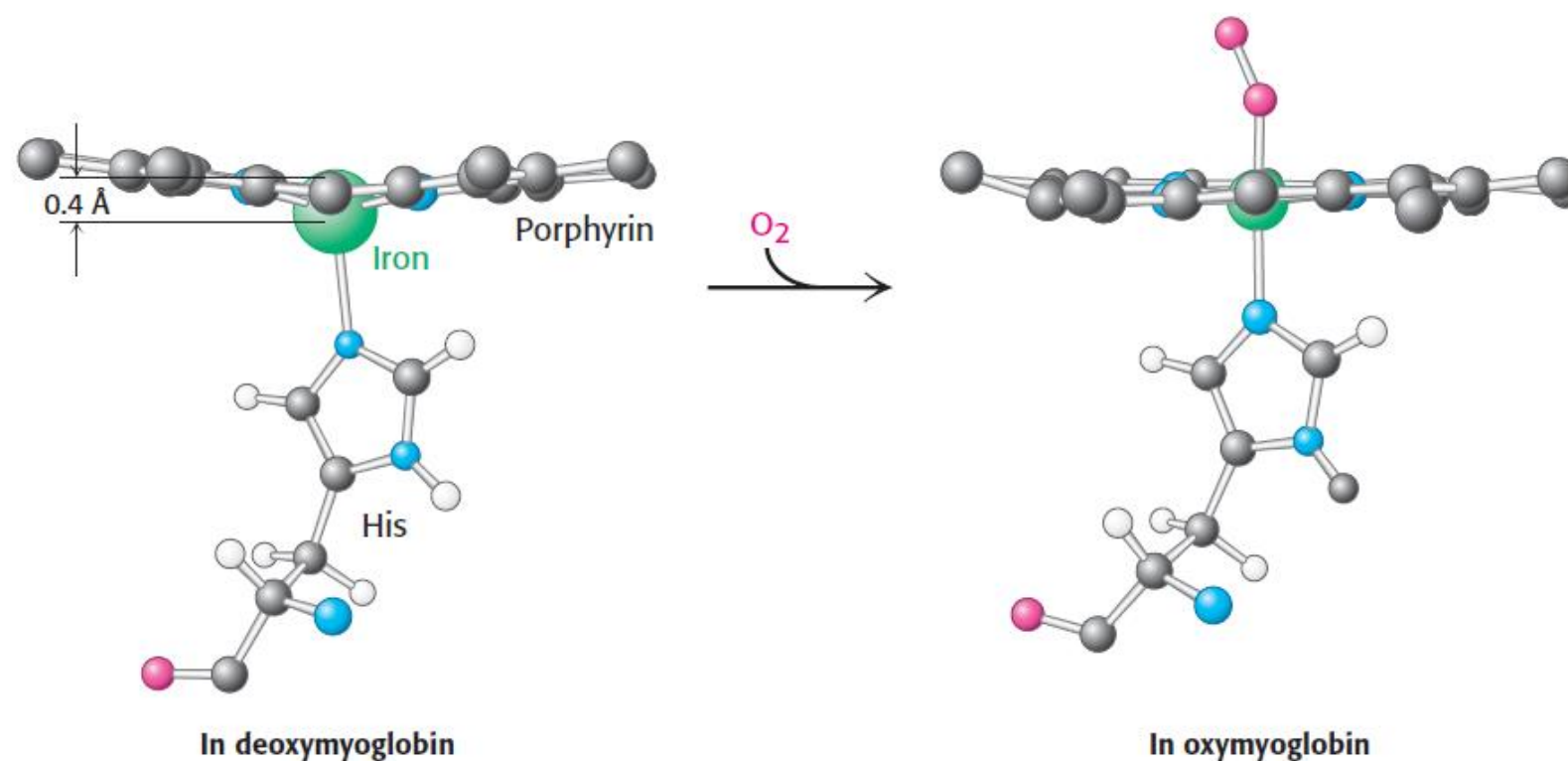


Odpoveď:

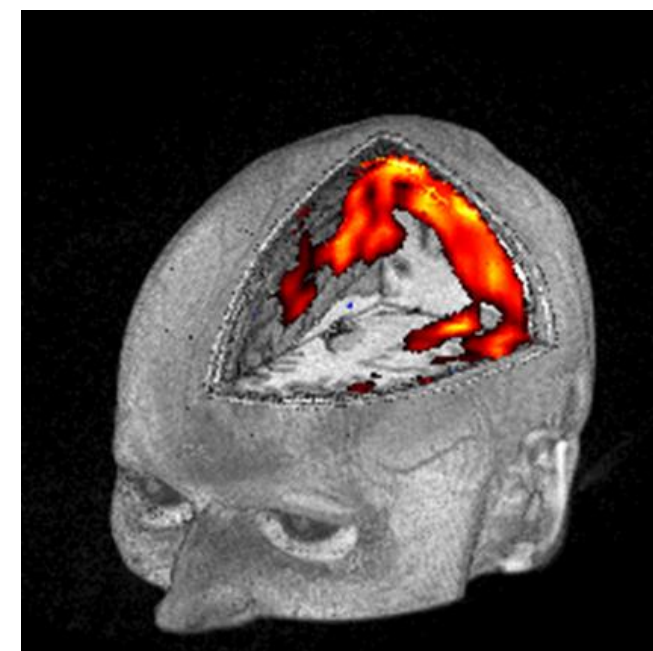


HEMOGLOBÍN

Železo je trochu väčšie ako jeho väzobné miesto priestor v porfyríne, preto leží mierne, $\sim 0.4 \text{ \AA}$, mimo rovinu. Väzba kyslíka spôsobí jeho posun do roviny porfyrínu s vplyvom na rozmiestnenie elektrónov v porfyríne a taktiež na jeho magnetické vlastnosti (tento efekt predpovedal Linus Pauling v roku 1936, takmer 25 rokov pred určením štruktúr Mb a Hb (tomu vravím vedecká intuícia!).

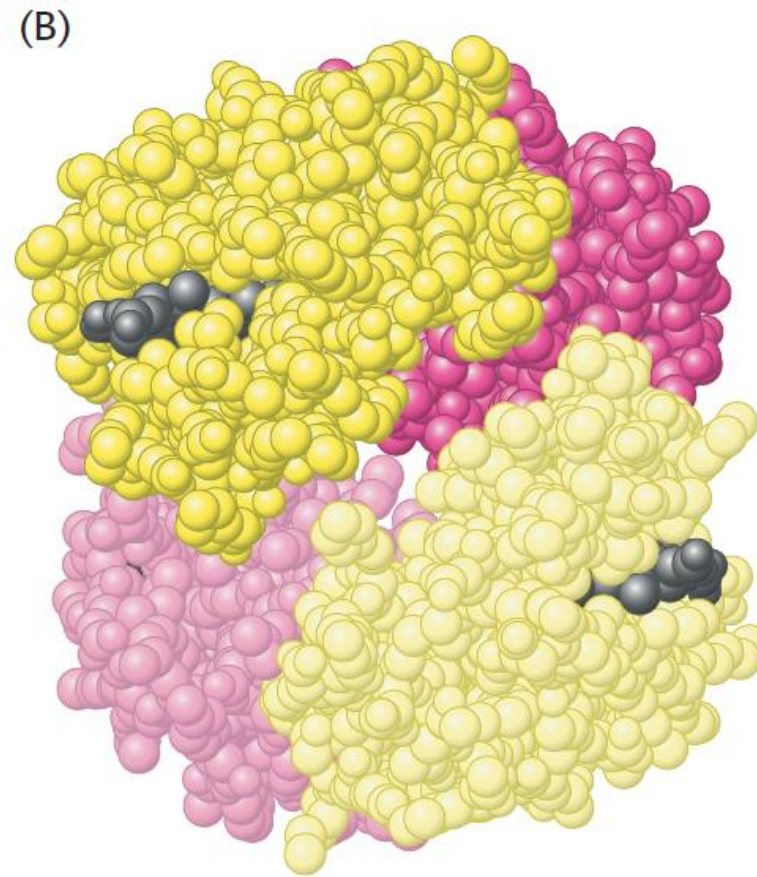
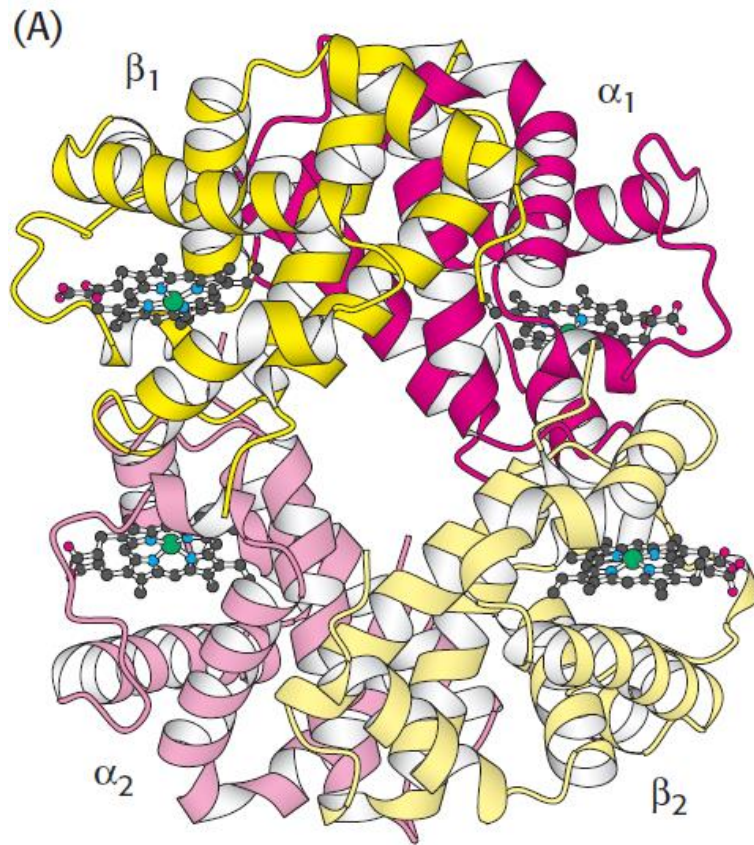


Takto indukovaná zmena v magnetických vlastnostiach je základom – funkčného zobrazovania pomocou magnetickej rezonancie (functional magnetic resonance imaging – fMRI), napr. pri funkcii mozgu – vyvolá sa vnem, napr. čuchový a tá časť mozgu, ktorá vnem spracováva sa viac prekrví/okyslíči, čo spôsobí zmenu v magnetických vlastnostiach Hb



HEMOGLOBÍN – MOLEKULA ZLOŽENÁ ZO 4 PODJEDOTIEK PODOBNÝCH MYOGLOBÍNU

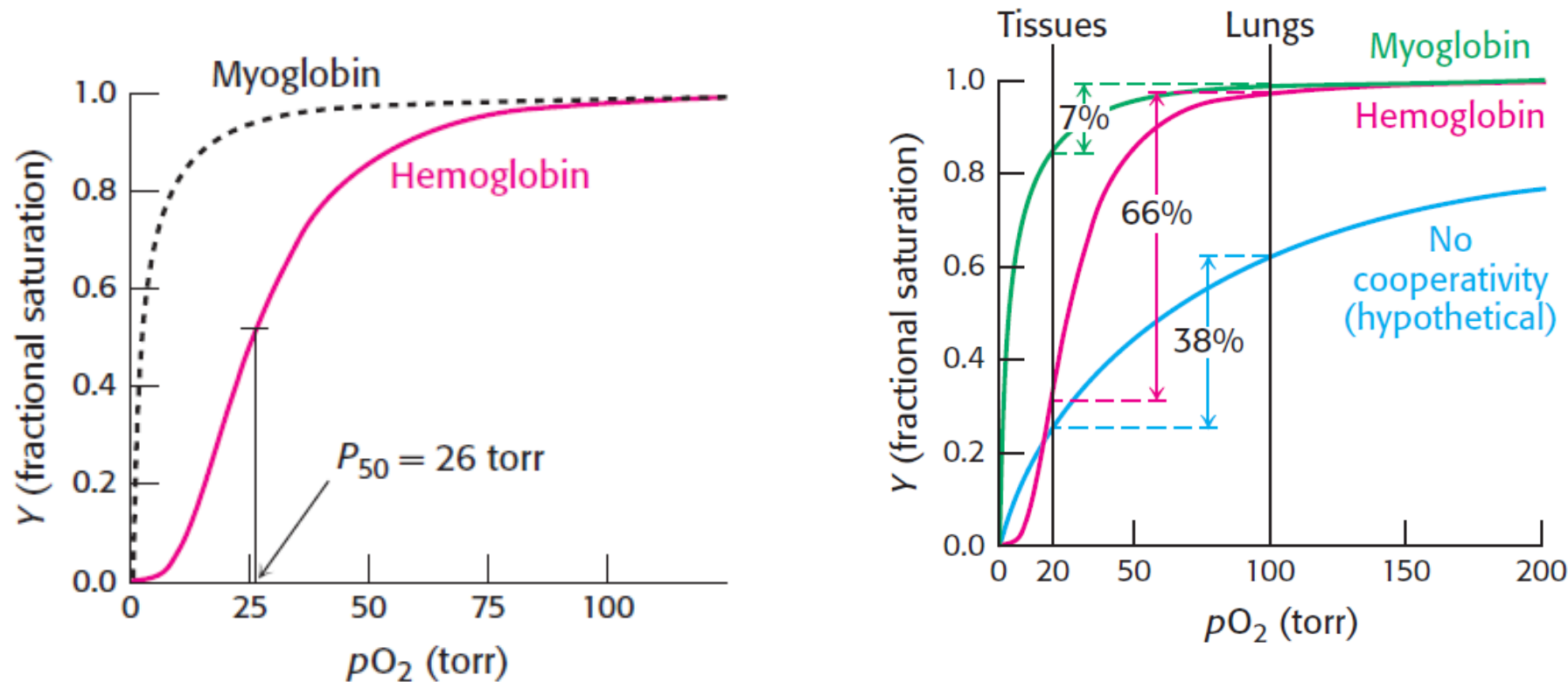
3D štruktúra hemoglobínu z konského srdca bola vyriešená v roku 1959 Max Perutzom (rakúsky chemik), za čo mu bola udelená Nobelova cena za chémiu v roku 1962 spolu s John Kendrewom (anglický biochemik).



- Hemoglobín je tetramér – pozostáva z dvoch $\alpha\beta$ dimérov.
- Základom štruktúry Mb ako aj týchto podjednotiek je tzv. „globin fold“.
- Podjednotky ľudského Hb sú identické s Mb veľryby na úrovni ~25%
- Mb a α a β reťazce Hb sú zrejme produktami divergentnej evolúcie

HEMOGLOBÍN VIAŽE KYSLÍK KOOPERATÍVNE

Z porovnania viazania kyslíka do molekúl Mb a Hb (vyjadrené ako parciálna saturácia populácie kyslíkom týchto molekúl) jasne vyplýva ich rozdielny spôsob interakcie s kyslíkom. Viazanie kyslíka myoglobínom sa dá popísať hyperbolickou závislosťou (čiarkovaná) – tzv. Langmuirovou izotermou, v prípade Hb má krivka tvar S, tzv. sigmoidálny tvar (ružová), ktorý poukazuje na kooperativitu viazania, t.j. viazanie ďalšej molekuly závisí od viazania predchádzajúcej molekuly kyslíka.

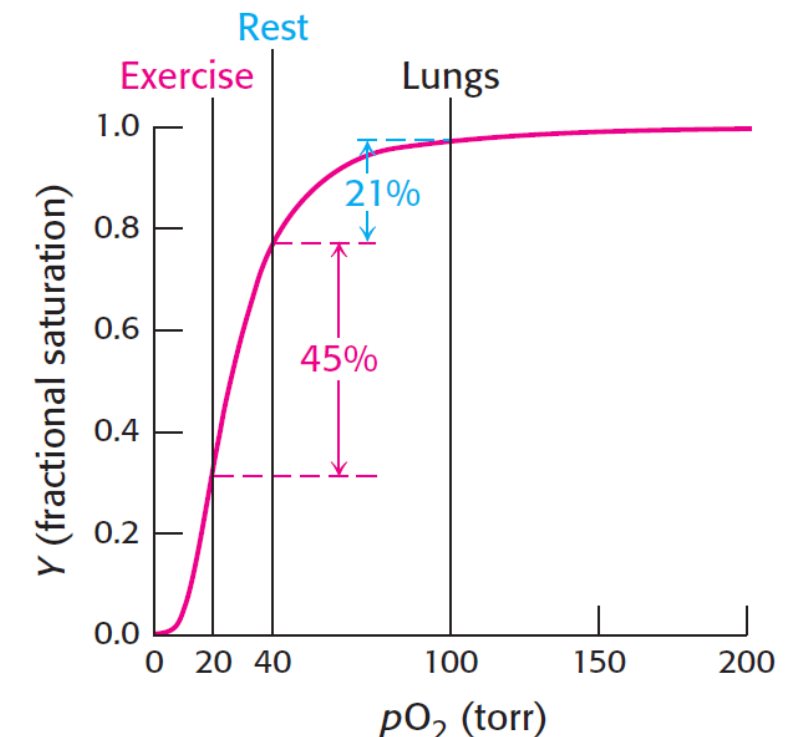


Torr

A unit of pressure equal to that exerted by a column of mercury 1 mm high at 0°C and standard gravity (1 mm Hg). Named after Evangelista Torricelli (1608–1647), inventor of the mercury barometer.

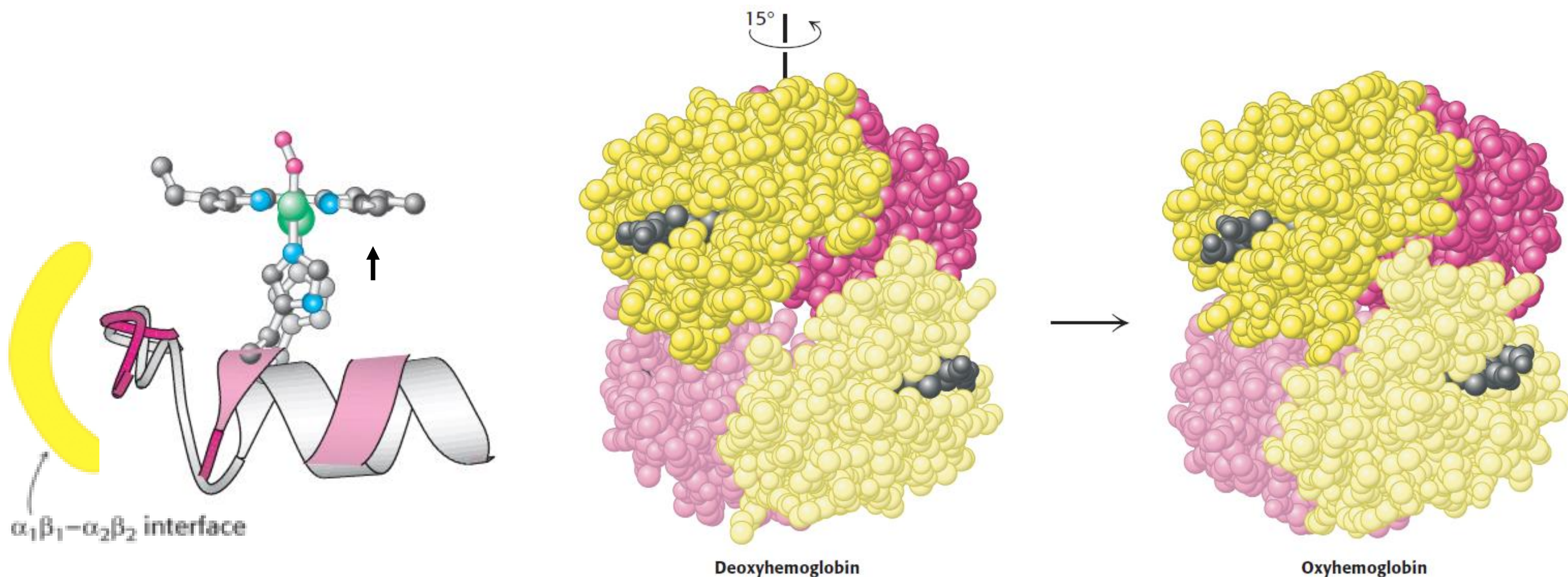
V dôsledku kooperatívneho spôsobu viazania kyslíka, Hb môže dodať do tkanív viac kyslíka v porovnaní s Mb: Hb 66%, Mb 7%.

Význam kooperatívneho viazania kyslíka sa prejaví pri fyzickej činnosti: efektívnosť prenosu kyslíka sa zvýši z 21% na 66%.



VÄZBA KYSLÍKA DO HB MENÍ JEHO KVARTÉRNÚ ŠTRUKTÚRU

Kooperativita znamená, že jednotlivé väzobné miesta sa musia „cítiť“. Ako je to možné, keď sú od seba tak ďaleko? Odpoveď je, že podjednotky medzi sebou „komunikujú“ cez vzájomné rozhrania, cez dotykové plochy. Informácia o naviazaní sa kyslíka do väzobného miesta je sprostredkovaná vďaka pohybu hemového Fe o 0.4 Å, ktorý sa cez polypeptidový reťazec prenesie až na rozhranie podjednotiek.



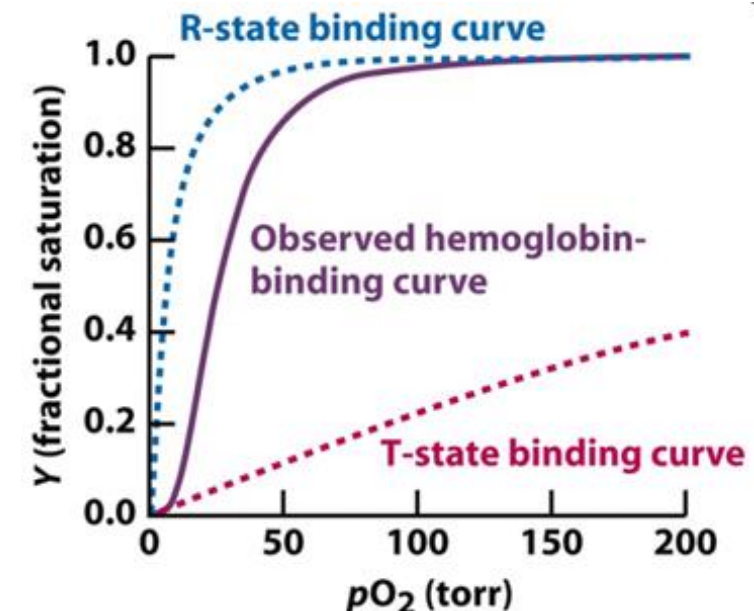
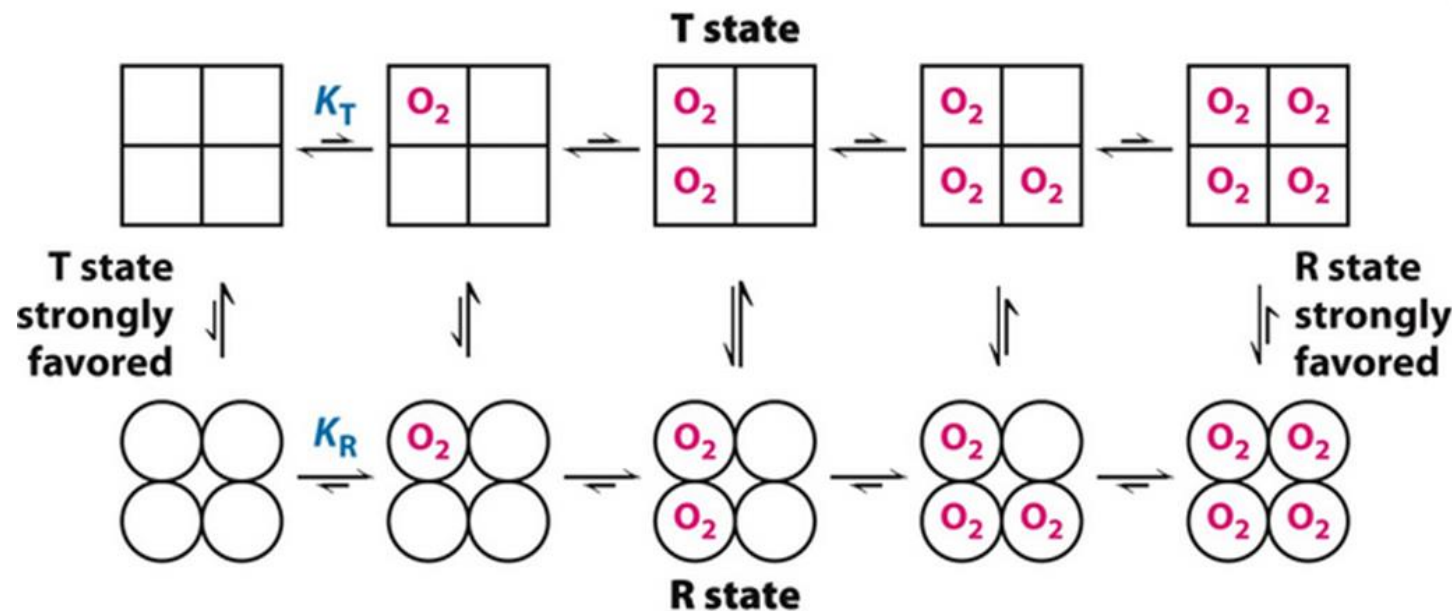
V dôsledku oxygenácie jeden $\alpha\beta$ dimer sa voči druhému otočí o 15°

MODELY VIAZANIA KYSLÍKA DO HB

Sekvenčný model, Koshland-Nemethy-Filmer model, popisuje viazanie kyslíka tak, že podjednotka, do ktorej sa naviaže kyslík zmení svoju konformáciu, a to ovplyvní (uľahčí) viazanie kyslíka do vedľajšej podjednotky.



Koordinovaný (z angl. concerted) model, Monod-Wyman-Changeaux model, popisuje viazanie kyslíka tak, že predpokladá, že Hb môže existovať v 2 stavoch, tzv. T (tenzný, napätý) stav s nízkou afinitou ku kyslíku a R (relaxovaný) stav s vysokou afinitou ku kyslíku. V stave bez kyslíka je rovnováha medzi T a R stavom výrazne posunutá k T stavu. Naviazanie kyslíka spôsobí, že sa rovnováha posunie k R stavu. Experimentálna sigmoidálna krivka sa dá popísať kombináciou kriviek popisujúcich viazanie kyslíka do T a R stavov.

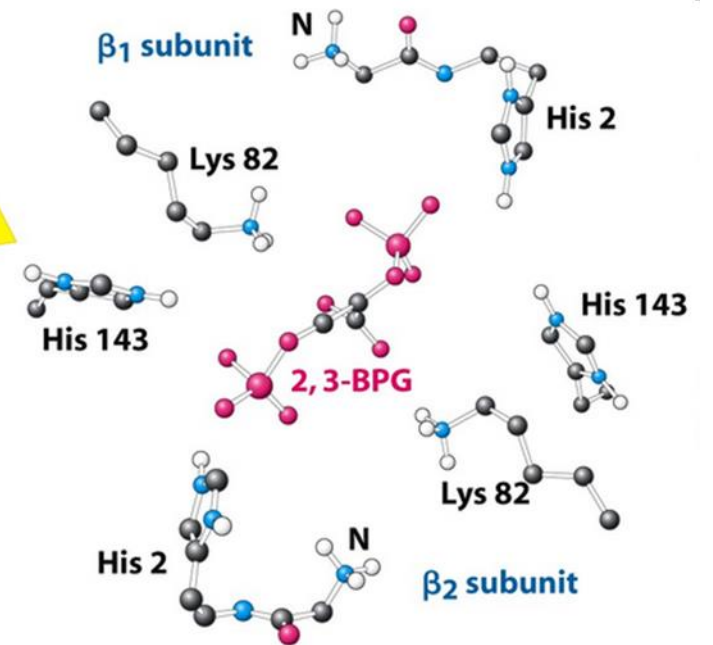
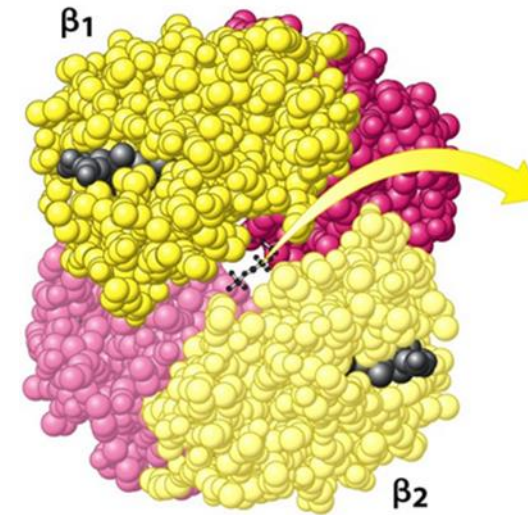
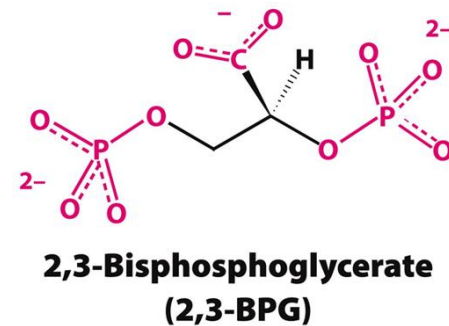
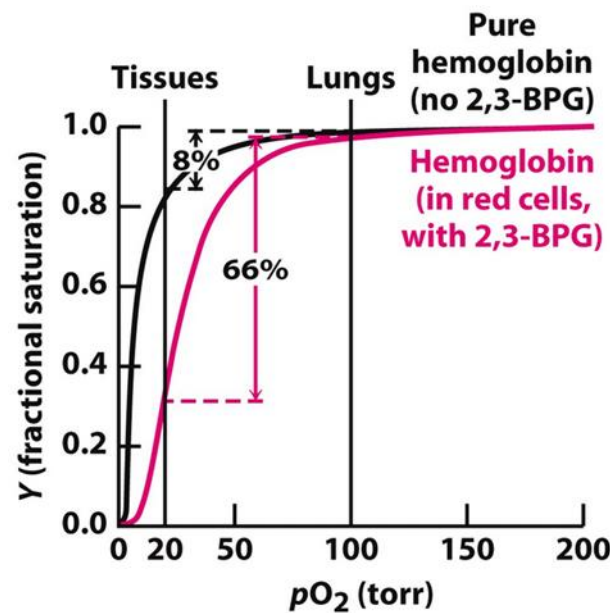


Obidva modely popisujú viazanie kyslíka s porovnateľnou presnosťou.

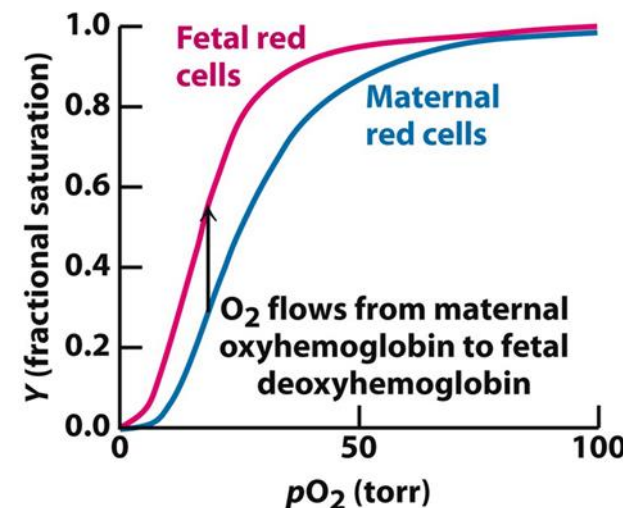
Hb – PŘÍKLAD PROTEÍNU S ALOSTERICKÝM SPÔSOBOM REGULÁCIE VIAZANIA LIGANDU

Z porovnania viazania kyslíka do purifikovaného Hb a Hb v červených krvinkách vyplynula existencia molekuly v červených krvinkách, ktorá stabilizuje T stav.

Tou molekulou je anión 2,3-bisfosfoglycerát (2,3-BPG), ktorá sa viaže do centrálnej oblasti Hb a je tak príkladom alosterického modifikátora (z gréckeho „allos“ – iný, „stereos“ – štruktúra). Väzba kyslíka je modifikovaná molekulou nepodobnou ligandu.

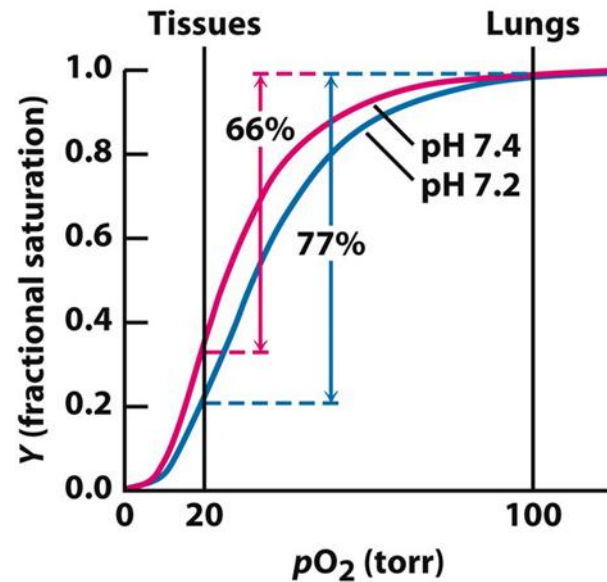


Existencia 2,3-BPG ponúka vysvetlenie ako dochádza k prenosu kyslíka medzi matkou a plodom. Efektívny prenos kyslíka je v tomto prípade zabezpečený tým, že plod má iný Hb, pozostávajúci z $\alpha\gamma$ dimerov. γ reťazec má mutáciu vo väzobnom mieste kyslíka, His143 je nahradený Ser - to spôsobuje nižšiu afinitu 2,3-BPG, destabilizáciu T stavu a teda vyššiu afinitu kyslíka do Hb plodu.



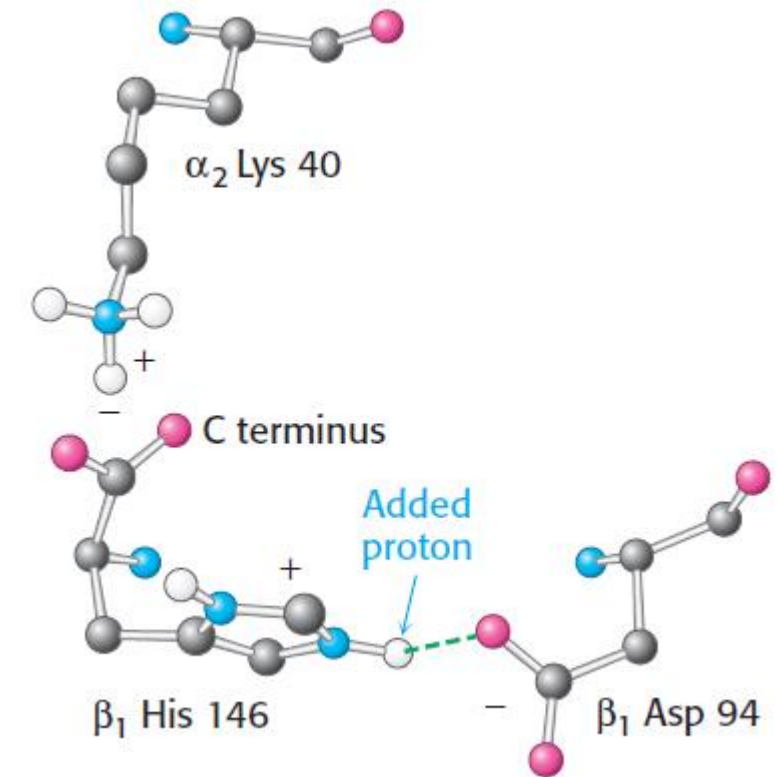
BOHROV EFEKT – EFEKT pH

Rýchlo metabolizujúce tkanivá, namáhané svaly, produkujú veľké množstvá kationov vodíka a oxidu uhličitého. Zvýšené koncentrácie vodíkových kationov a oxidu uhličitého zvyšujú uvoľňovanie kyslíka z Hb. Vodíkové kationy (pH) a oxid uhličitý sú príkladom ďalších alosterických regulátorov Hb. Tento efekt sa volá Bohrov efekt (popísaný v roku 1904 Christianom Bohrom).



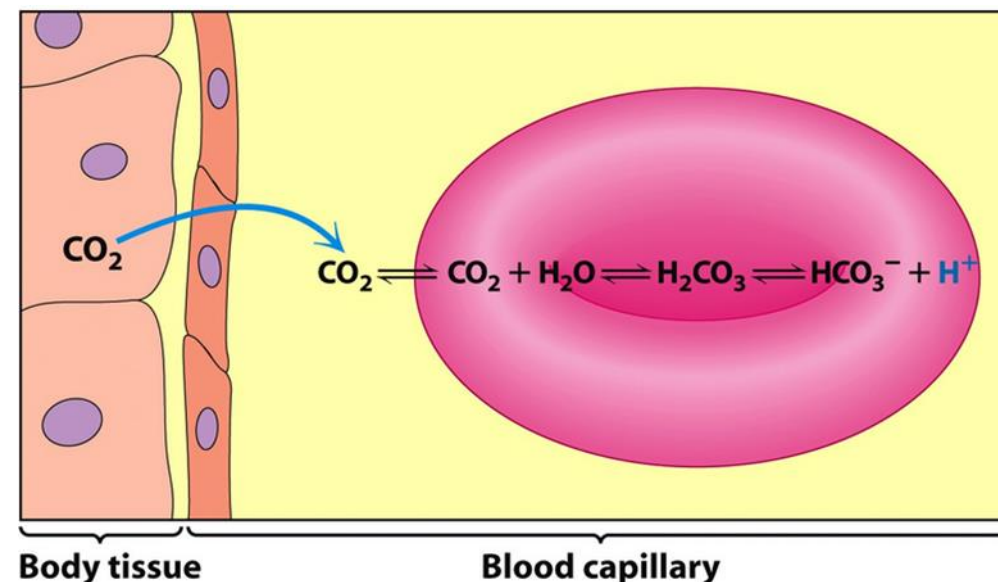
Chemical basis of the Bohr effect.

In deoxyhemoglobin, three amino acid residues form two salt bridges that stabilize the T quaternary structure. The formation of one of the salt bridges depends on the presence of an added proton on histidine b146. The proximity of the negative charge on aspartate β 94 in deoxyhemoglobin favors protonation of this histidine. Notice that the salt bridge between histidine β 146 and aspartate β 94 is stabilized by a hydrogen bond (green dashed line).



Ako dochádza k poklesu pH?

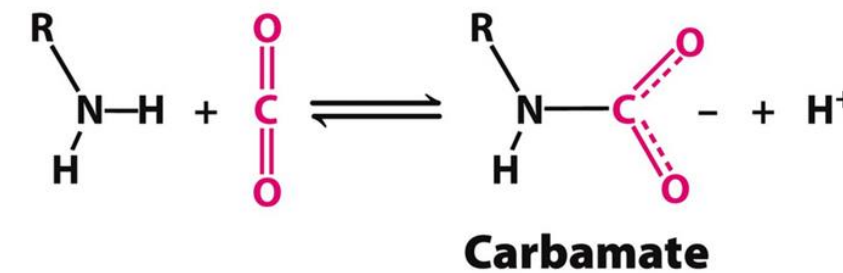
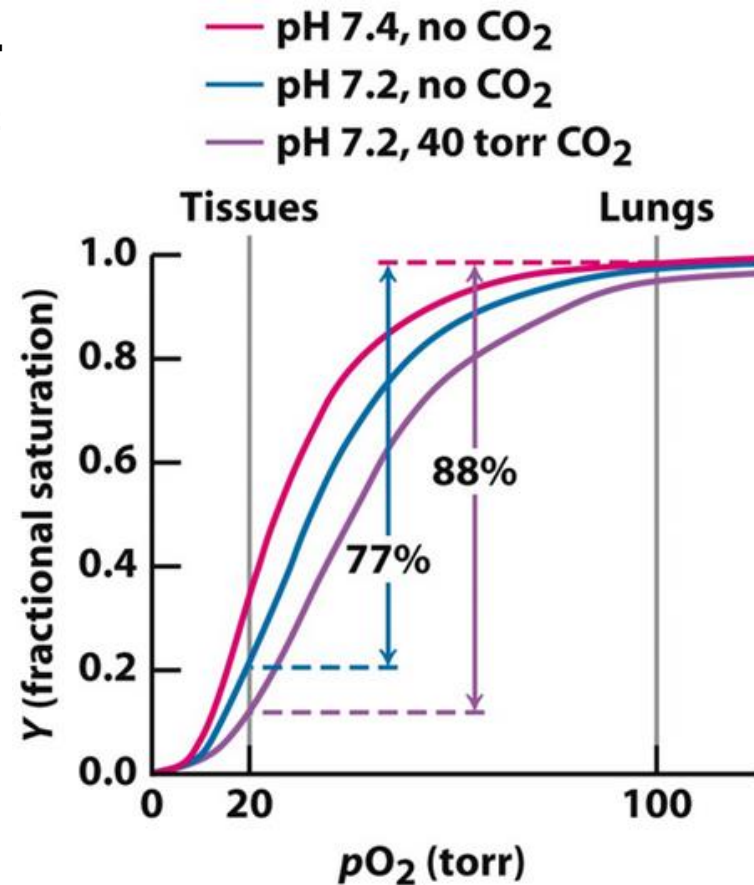
Oxid uhličitý z tkanív difunduje do červených krviniek. V červených krvinkách dochádza k premene oxidu uhličitého na kyselinu uhličitú v dôsledku reakcie katalyzovanej enzýmom – karbonická anhydráza. Kyselina uhličitá disociuje na HCO_3^- a H^+ , čo spôsobuje pokles pH.



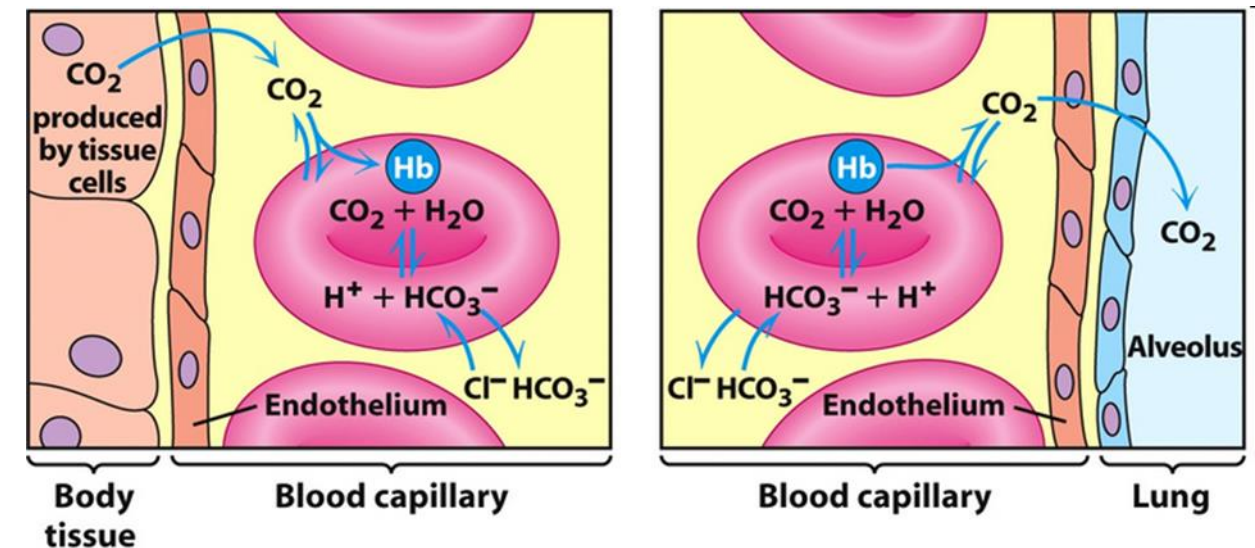
BOHROV EFEKT – EFEKT OXIDU UHLIČITÉHO

Oxid uhličitý stimuluje uvoľňovanie kyslíka z Hb dvoma mechanizmami – už spomínaným poklesom pH v červených krvinkách a priamou chemickou reakciou s Hb. Pri 2.mechanizme oxid uhličitý stabilizuje deoxyHb reakciou s terminálnou amino skupinou za vzniku karbamátovej skupiny, ktorá má na rozdiel od voľnej amino skupiny negatívny náboj. Táto zmena náboja vedie k stabilizácii T stavu Hb.

Bohrov efekt – efekt pH a CO₂

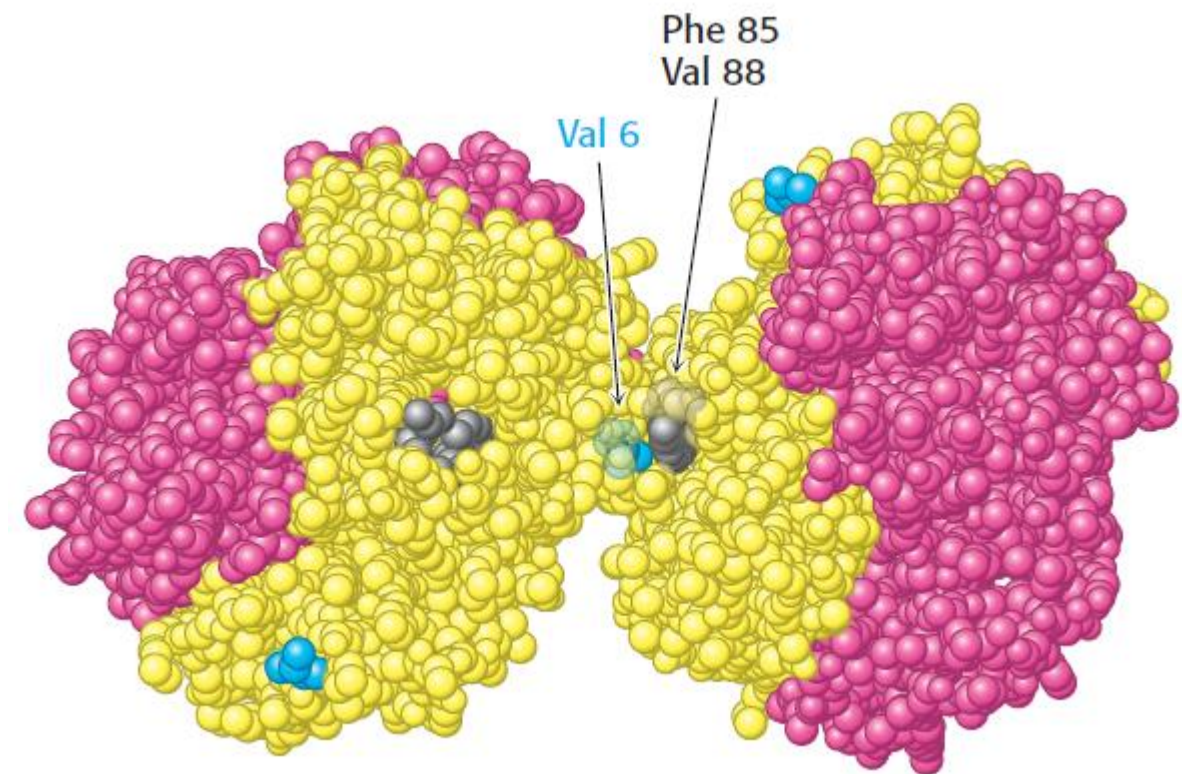


Vznik karbamátu je aj jedným zo spôsobov prenosu oxidu uhličitého (~14% z celkového množstva oxidu uhličitého) z tkanív do pľúc. Väčšina oxidu uhličitého sa prenáša vo forme kyseliny uhličitej (ktorú možno považovať za vo vode rozpustnú formu oxidu uhličitého).



MUTÁCIE V GÉNOCH KÓDUJÚCICH HB VEDÚ K VÁŽNYM CHOROBÁM

Kosáčikovitá anémia (sickle cell disease) je dôsledok zámény jednej aminokyseliny Glu6 za Val na β reťazci Hb – takto mutovaný Hb sa volá hemoglobín S (HbS). Predpoklad, že kosáčikovitá anémia je dôsledok „molecular defect“ bol vyslovený Linusom Paulingom v roku 1949 (4 roky pred určením štruktúry DNA a možnosti vysvetlenia takéhoto „molecular defect“ – opäť skvelá intuícia!). Táto jediná zmena vedie k agregácii deoxyHb, čo následne vedie k typickému prejavu tejto choroby na úrovni buniek - zmene tvaru červených krviniek. Takéto krvinky majú tendenciu upchávať malé cievne kapiláry s rizikom mrtvice a/alebo bakteriálnych infekcií.

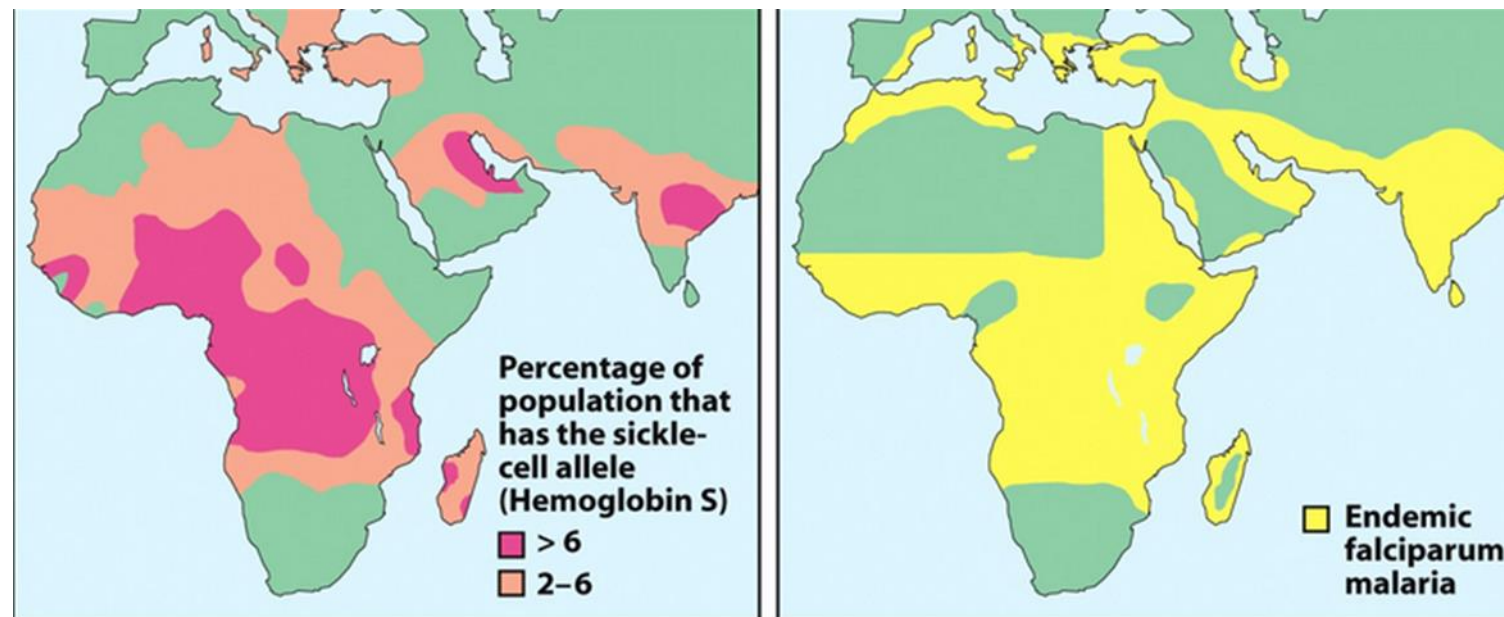


Deoxygenated hemoglobin S. The interaction between Val6 (blue) on a β chain of one hemoglobin molecule and a hydrophobic patch formed by Phe85 and Val88 (gray) on a β chain of another deoxygenated hemoglobin molecule leads to hemoglobin aggregation. The exposed Val6 residues of other β chains participate in other such interactions in hemoglobin S fibers. [Drawn from 2HBS.pdb.]

PREČO JE DOBRÉ BYŤ HETEROZYGOTOM HbS V KRAJINÁCH POSTIHNUTÝCH MALÁRIOU ? TALASÉMIA.

Sickle-cell trait and malaria.

A significant correlation is observed between regions with a high frequency of the HbS allele and regions with a high prevalence of malaria.



Približne 1 zo 100 západoafričanov trpí kosáčikovitou anémiou. Vzhľadom na často devastujúce následky choroby vzniká otázka, prečo je HbS mutácia tak rozšírená v Afrike a niektorých ďalších regiónoch? Treba povedať, že obidva alely génu HbB sú mutované u ľudí s kosáčikovitou anémiou. Ľudia s jednou kópiou génu HbB a jednou kópiou HbS (heterozygoti) sú relatívne neovplyvnení. Hovorí sa, že majú kosáčikovité rysy, pretože môžu preniesť HbS gén na ich potomstvo. Ľudia s kosáčikovitou črtou sú však rezistentní voči malárii, chorobe prenášanou parazitom, *Plasmodium falciparum*, ktorý žije v červených krvinkách v jednej fáze svojho životného cyklu. Negatívny efekt malárie na zdravotnú a reprodukčnú úroveň v regiónoch, kde sa vyskytovala a vyskytuje malária, zvýhodňoval ľudí s kosáčikovitými črtami, ktorí mali zvýšenú odolnosť, menšie negatívne prejavy malárie.

Talasémia (angl. thalassemia), iné prevládajúce dedičné ochorenie hemoglobínu, ktoré je spôsobená stratou alebo podstatnou redukciou jedného hemoglobínového reťazca. Výsledkom je nízka úroveň funkčnosti hemoglobínu a znížená tvorba červených krviniek, ktoré môžu viesť k anémii, únave, bledej koži, poruche sleziny a pečene. Thalassémia je súbor súvisiacich chorôb. V **α -talasémii** α reťazec hemoglobínu sa nevytvára v dostatočnom množstve. V dôsledku toho tetramér hemoglobínu obsahuje iba β reťazec. Tieto tetraméry, sa nazývajú hemoglobín H (HbH), viažu kyslík s vysokou afinitou a bez kooperativity. Uvoľňovanie kyslíka v tkanivách je teda neefektívne.

Pri **β -talasémii** β reťazec hemoglobínu sa nevytvára v dostatočnom množstve. V neprítomnosti β reťazcov tvoria α reťazce nerozpustné agregáty, ktoré sa zrážajú vnútri nezrelých červených krviniek. Výsledkom je strata červených krviniek a chudokrvnosť. Najzávažnejšia forma β -talasémie sa nazýva *majorita talasémie* alebo *Cooleyho anémia*.

ČO BY STE MALI VEDIEŤ

- Rozdiel v štruktúrnych a funkčných vlastnostiach Mb a Hb.
- Základné modely viazania kyslíka do Hb.
- Ako sa líšia jednoduché a kooperatívne viazanie ligandov do molekuly.
- Vysvetliť alosterickú moduláciu vlastností proteínov.
- Vysvetliť Bohrov efekt.
- Vysvetliť pojmy kosáčikovitá anémia a talasémia.