

Biofísicoquímica de Metaloproteínas

Departamento de Física

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL



Trabajo Practico nº1

Estructura de Proteínas / Uso del “Protein Data Bank” / Visualización y edición gráfica.

Introducción

La hemoglobina (Hb o Hgb) es una metalo-proteína de Fe presente en las células rojas de la sangre de todos los vertebrados y en los tejidos de algunos invertebrados. La función primaria de la Hb en la sangre (establecida por el fisiólogo francés Claude Bernard) es el transporte de O₂ desde los órganos respiratorios (pulmones o branquias) al resto del cuerpo (tejidos), donde se libera el O₂ para permitir la respiración aeróbica. La Hb humana tiene una capacidad de unión a oxígeno de ~1,34 mL O₂ / g de Hb, esto es ~70 veces más que el O₂ libre disuelto en la sangre.

La Hb también está implicada en el transporte de otros gases: a) une el CO₂ generado por el metabolismo celular en la forma carbamino-Hb, b) puede transportar el NO (molécula de señalización celular) unido a grupos tioles de la cadena polipeptídica y liberarlo al mismo tiempo que al O₂ en la célula/tejido.

La Hb también puede encontrarse fuera de los glóbulos rojos y sus líneas celulares progenitoras. Por ejemplo en i) neuronas dopaminérgicas A9 en la sustancia negra del cerebro, ii) macrófagos, iii) células alveolares del pulmón, iv) células mesangiales del riñón. En estas células/tejidos la Hb cumple el rol de agente antioxidante y regulador del metabolismo de Fe.

En 1959, Max Perutz determinó la estructura de la mioglobina (similar a la hemoglobina pero monomérica!) por cristalografía de rayos X. Por esto recibió el Premio Nobel de Química compartido con el cristalógrafo John Kendrew. Años más tarde, en 1977 Max Perutz y colaboradores reportaron la primer estructura de la Hb (Deoxy-Hb fetal humana).

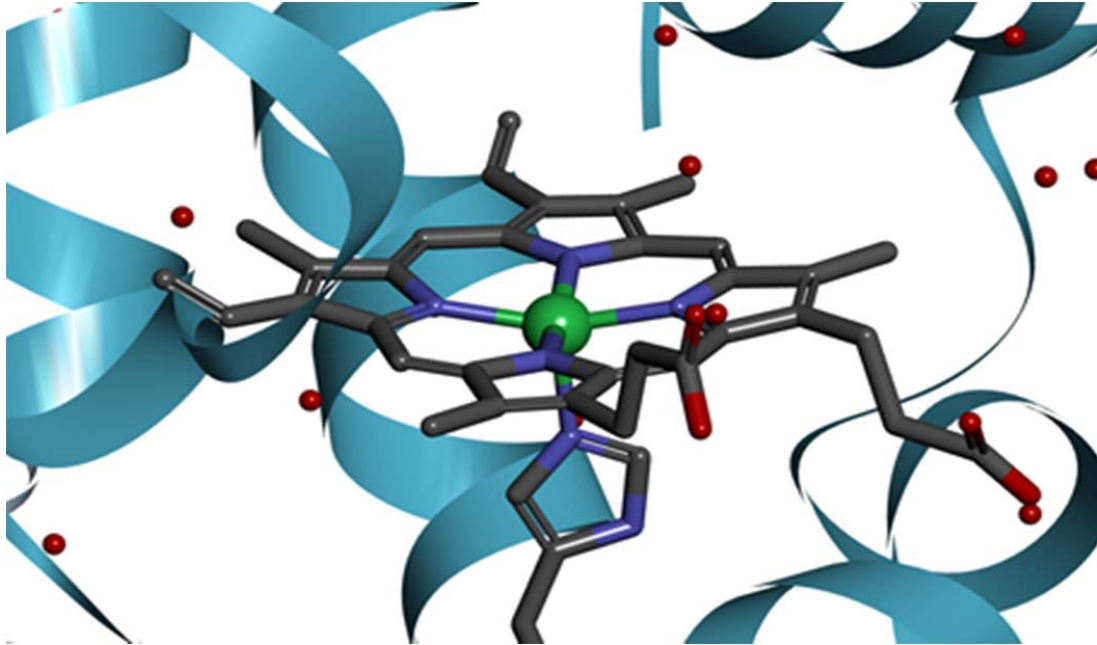
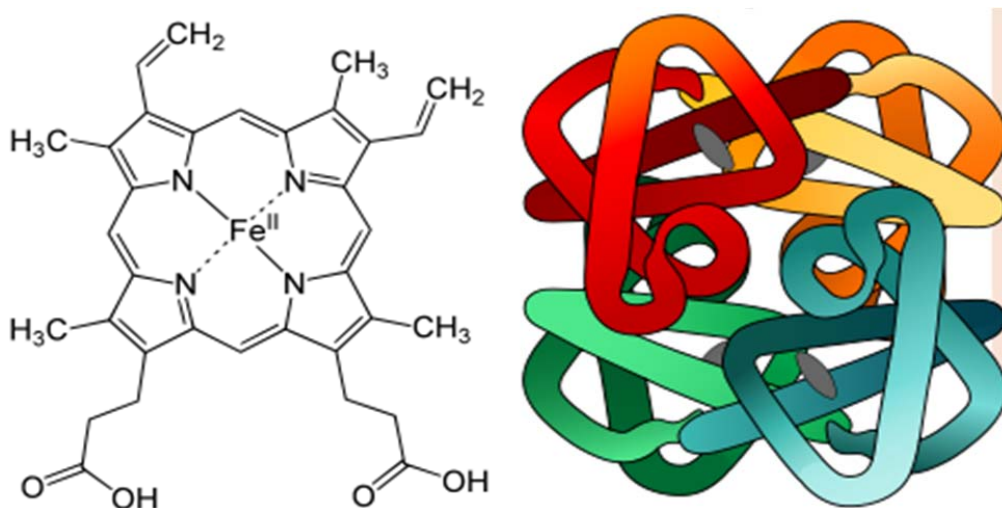


Fig.1: estructura del cofactor hemo-*b* de la forma deoxy-Hb humana. En verde se observa el catión Fe(II) coordinado en el plano ecuatorial por 4 átomos de N de la porfirina. El ligando axial del lado proximal es un átomo de N del anillo imidazólico de la cadena lateral de una histidina.

La Hb tiene una estructura cuaternaria característica de proteínas globulares oligoméricas. Cada una de las 4 subunidades está compuesta de una cadena proteica fuertemente asociada a un grupo hemo tipo *b*.



En humanos adultos, el tipo más común de Hb es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ (Hb-A). Las subunidades α y β son estructuralmente similares y aproximadamente del mismo tamaño (141 y 146 aa,

respectivamente) con masas moleculares de ~16 kDa (MW del tetrámero de ~64 kDa). En el recién nacido, la Hb tiene una composición $\alpha_2\gamma_2$. Sin embargo, las cadenas γ son reemplazadas por cadenas β a medida que el individuo crece.

La molécula de hemoglobina de mamíferos puede unir hasta cuatro moléculas de O_2 (1 molécula de O_2 /subunidad \rightarrow 1 molécula de O_2 /hemo). Cada grupo hemo contiene un átomo de hierro en estado ferroso (Fe^{2+}) que puede unir la molécula de $O_{2(g)}$ a través de fuerzas dipolares. Notar que aunque la molécula de O_2 no es dipolar, se genera un dipolo inducido por las cargas positivas del catión ferroso. Tras la unión, el O_2 se convierte temporalmente en el radical anión superóxido (O_2^-) y oxida **reversiblemente** el Fe^{2+} (estado ferroso) a Fe^{3+} (estado férrico).

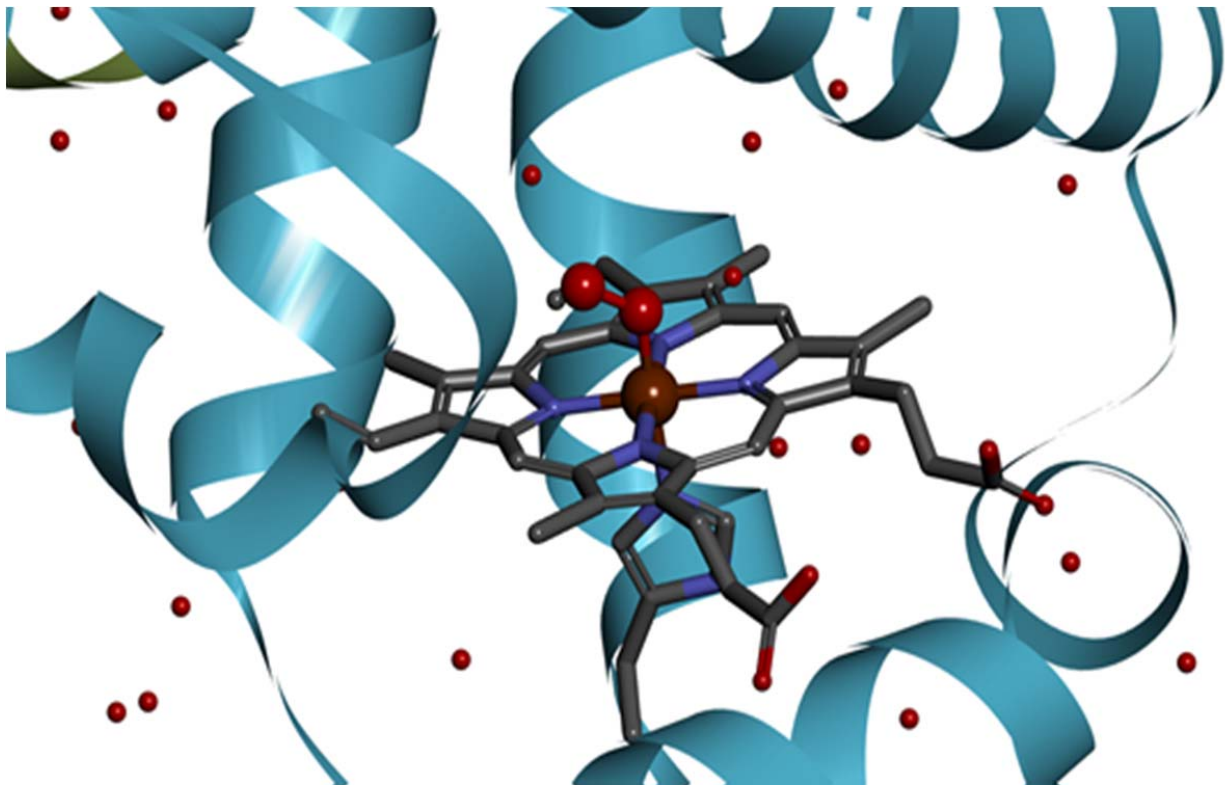


Fig.2: estructura del cofactor hemo-b de la forma Oxy-Hb humana. En marrón se observa el catión $Fe(III)$ coordinado en el plano ecuatorial por 4 átomos de N de la porfirina. El ligando axial del lado proximal es un átomo de N del anillo imidazólico de la cadena lateral de una histidina, mientras el ligando del lado distal es un átomo de O de la molécula de O_2 .

Cuando la Oxy-Hb llega a los tejidos, libera el O_2 y se reduce nuevamente a Fe^{2+} . Sin embargo, si el O_2^- asociado a Fe^{3+} es protonado, puede “soltarse” del Fe-hemo dejando el Fe en estado ferrico, el cual es incapaz de volver a unir O_2 . Cuando esto ocurre, una enzima llamada met-hemoglobina reductasa devuelve el Fe del hemo al estado ferroso $Fe(II)$.

Funcionamiento de la Hb

(Leer capítulo 5 del Lehninger!!!)

La Hb puede existir en dos formas, una forma tensa (T) y una forma relajada (R). Factores tales como pH bajo, y altas $[\text{CO}_2]$ y [2,3-BPG] (2,3-BisPhosphoGlyceric acid) que ocurren a nivel de los tejidos favorecen la forma T, la cual tiene una baja afinidad por O_2 (por eso se libera O_2 en los tejidos). Por el contrario, pH elevado, y bajas $[\text{CO}_2]$ y [2,3-BPG] favorecen la forma R, la cual puede unir mejor el O_2 . Por supuesto, la $p\text{O}_2$ también afecta a la afinidad de la Hb por el O_2 . Una $p\text{O}_2$ alta (tales como la presente en alvéolos pulmonares) favorece el estado R. Inversamente, una baja $p\text{O}_2$ (tales como la presente en tejidos que consumen O_2) favorece el estado T.

La Oxihemoglobina se forma durante la respiración pulmonar cuando el O_2 se une al Fe^{2+} -hemo de la Hb presente en glóbulos rojos. Este proceso se da en los capilares pulmonares adyacentes a los alvéolos pulmonares. Los glóbulos rojos viajan por el torrente sanguíneo hasta los tejidos donde liberan el O_2 por las condiciones, antes mencionadas, que favorecen la forma T.

Cuando la molécula de O_2 se une al Fe^{2+} -hemo en el lado Distal, hace que el Fe se mueva y quede exactamente en el plano del anillo de la porfirina. Este desplazamiento del catión Fe “arrastra” a la cadena lateral de la histidina que está unida al Fe del lado opuesto, conocido como lado Proximal. Este reordenamiento hace que el plano de la porfirina se desplace hacia un lado, más precisamente hacia el exterior del tetrámero, e induzca una tensión en la hélice α que contiene la histidina proximal. Esta tensión se transmite a los otros tres monómeros restantes en el tetrámero $\alpha_2\beta_2$, induciendo un cambio conformacional similar en los otros monómeros de la Hb, afectando directamente los sitios Fe^{2+} -hemo. Esto aumenta la afinidad de las otras 3 cadenas por el O_2 . Esto se conoce como efecto cooperativo o efecto alostérico positivo. Como consecuencia, la curva de unión a oxígeno de la hemoglobina es sigmoideal en lugar de hiperbólica (esta última se observa en casos no cooperativos, en enzimas que se ajustan perfectamente al modelo de Michaelis-Menten).

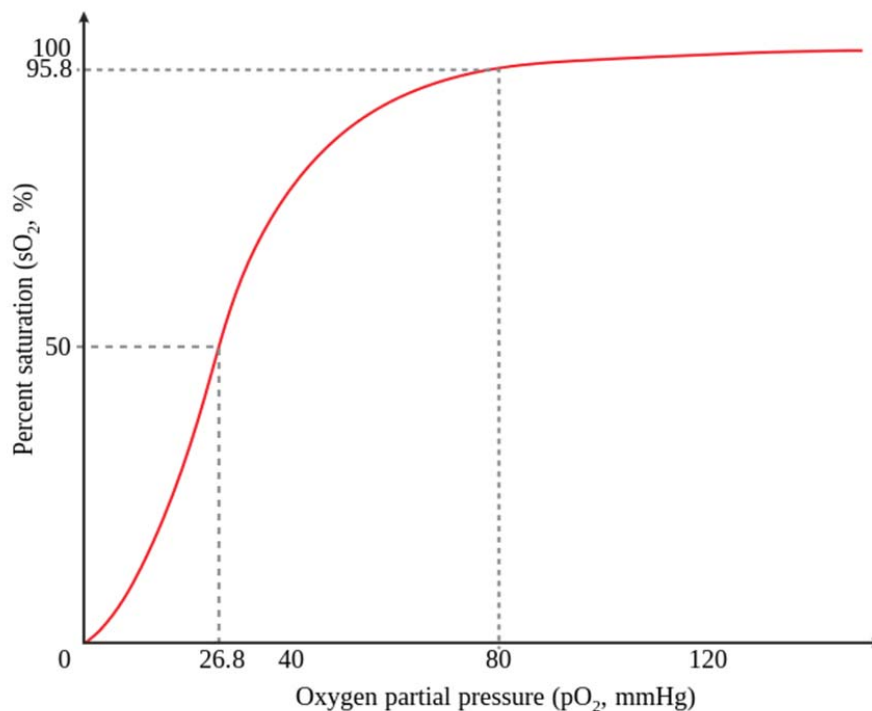


Fig.3: curva de saturación de la Hb humana.

La **carbamino-Hb** se forma cuando el CO₂ se une a la Hb. El CO₂ se disuelve más fácilmente en sangre con baja pO₂ (e.g. tejidos) facilitando su eliminación. La mayor afinidad de la Hb por el CO₂ en sangre venosa se conoce como el efecto Haldane: la enzima anhidrasa carbónica convierte el CO₂ liberado en los tejidos en ácido carbónico, el cual se descompone en bicarbonato y protones según: **[CO₂ + H₂O] → [H₂CO₃] → [HCO₃⁻ + H⁺]**. Esta acidificación hace que los H⁺ se unan a diferentes grupos aniónicos de la Hb neutralizándolos, mientras que el CO_{2[_{aq}]} se une a grupos α-amino (i.e. en los N-terminal de cada subunidad). Esto produce un efecto alostérico negativo (disminuye la afinidad de la Hb por el O₂) conocido como el efecto Bohr (i.e. la afinidad de la hemoglobina el O₂ es inversamente proporcional a las [H⁺] y [CO₂]).

Dado que la función de la Hb es transportar O₂ y liberarlo en los tejidos (...y no retenerlo para siempre...), este intercambio de CO₂ y H⁺ por O₂ es un balance finamente controlado por el efecto alostérico que ocurre gracias a la particular estructura de la Hb.

Objetivos:

- Aprender a usar el Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org).
- Aprender a usar software de visualización de biomoléculas.
- Observar las diferentes formas de la Hb humana (Oxy-, Deoxy-) y sus diferencias estructurales.

Metodología:

Buscar y bajar estructuras desde el Protein Data Bank

- 1- Ir a www.rcsb.org.
- 2- Buscar las estructuras usando los códigos 2dn1 y 2dn2.
- 3- Verifique cual es la resolución a la cual fueron resultas ambas estructuras, la técnica usada, y como citaría el trabajo de los autores responsables del trabajo.
- 4- Comente que otra información relevante puede encontrar en la página.
- 5- Baje el archivo donde se encuentran todas las coordenadas de los átomos que conforman las proteínas (Download Files → PDB format).

Visualizar la Deoxy-Hb y Oxy-Hb

- 1- Abra el programa Discovery Studio.
- 2- Cargue los archivos 2dn1.pdb y 2dn2.pdb.
- 3- Siga las instrucciones del profesor para mostrar apropiadamente los cofactores (hemos), la estructura cuaternaria, medir distancias y ángulos, encontrar interacciones no covalentes.

Nota: Eventualmente tendrá que hacer esto para los archivos 8paz, 1snr y 2p80. Preparar figuras apropiadas donde se muestre cofactores y estructura cuaternaria.