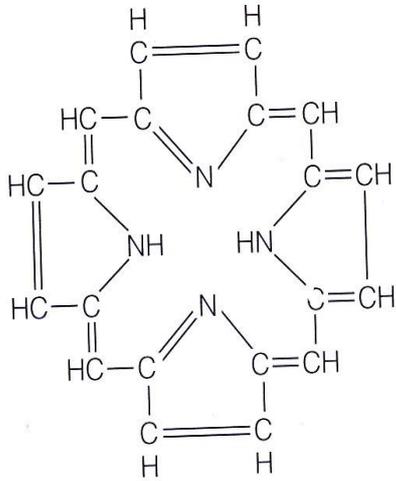
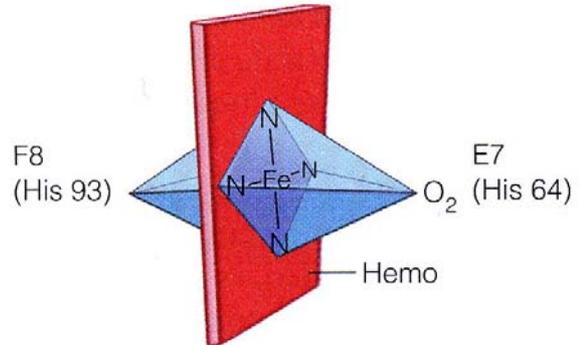


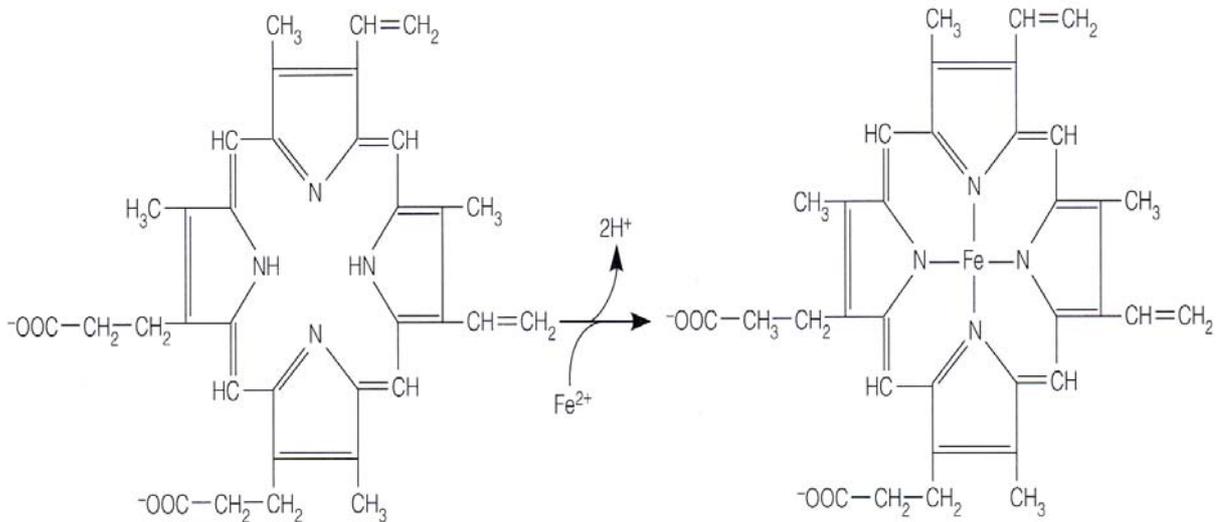
Lugar de unión del oxígeno



Porfirina ($C_{20}H_{14}N_4$)



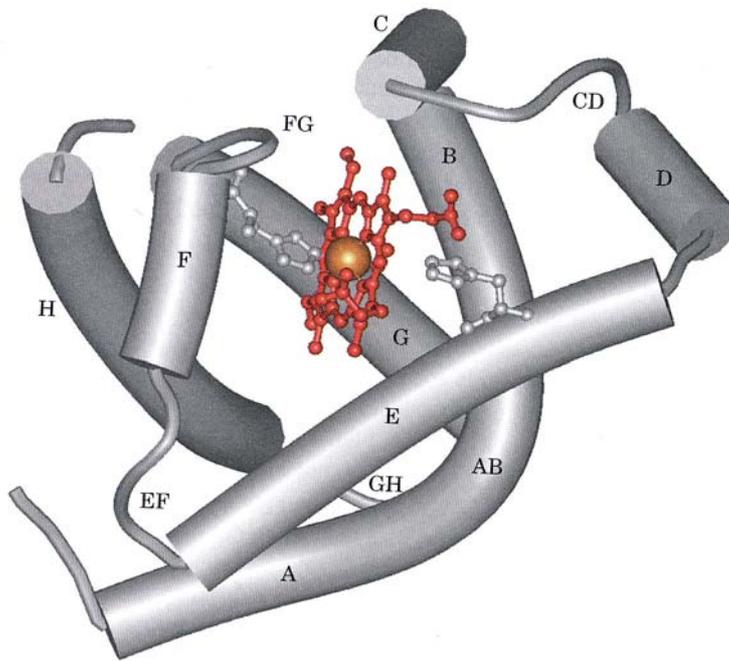
Geometría de la coordinación del hierro. Coordinación octaédrica del átomo de hierro. El hierro y los cuatro átomos de nitrógeno de la protoporfirina IX se encuentran próximos en un plano. Una histidina F8 ocupa una de las posiciones axiales, y el O₂ se mantiene en el otro lado por la histidina E7.



Protoporfirina IX

Ferroprotoporfirina (hemo)

El hemo consta de una parte orgánica y un átomo de hierro. La parte orgánica, la protoporfirina, está formada por cuatro grupos pirrólicos. Los cuatro pirroles están unidos por medio de puentes metino para formar un anillo tetrapirrólico, están enlazados cuatro metilos, dos vinilos y dos cadenas laterales de propionato.



Estructura de la mioglobina (MW 16700 y 151 aa), los 8 segmentos de hélice α , están marcados de la A hasta la H. Los residuos de conexión, que no forman parte de las hélices, se nombran como AB, CD EF, etc. indicando los segmentos que interconectan. Algunos giros, tales como BC y DE, son abruptos y no contienen residuos, no existiendo un nombre específicos para ellos. El grupo hemo está unido a una bolsa formada principalmente por las hélices E y F, aunque también participan algunos aa de otros segmentos.

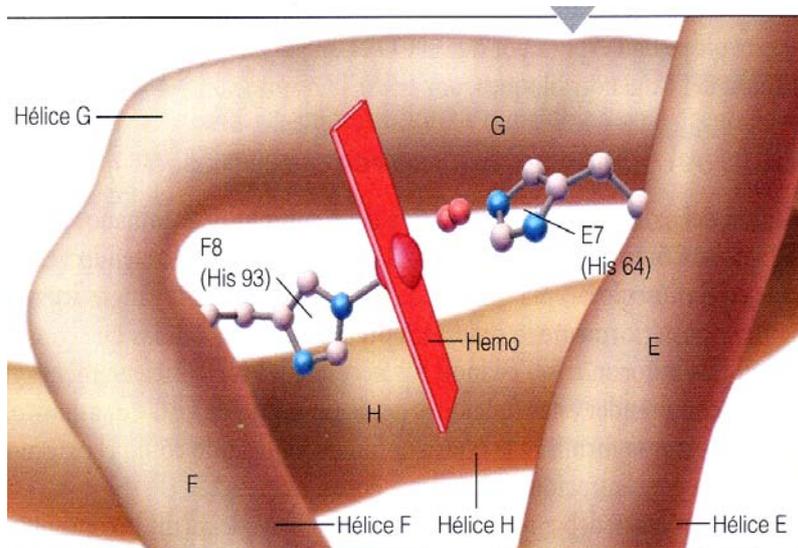
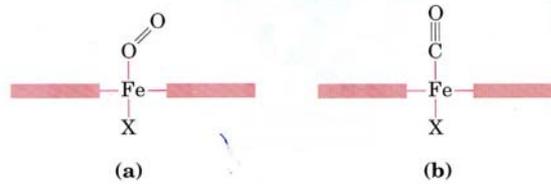
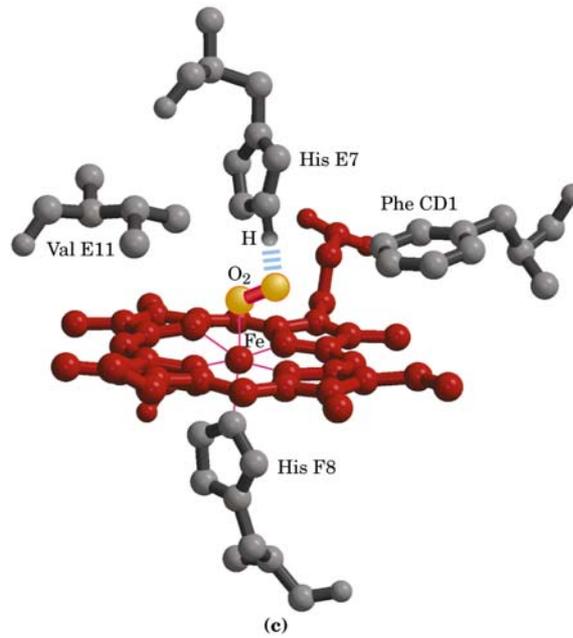


Imagen ampliada del bolsillo del hemo, en la que se muestran las cadenas laterales de la histidina proximal (F8) y distal (E7).



Efectos estéricos de la unión de ligandos al grupo hemo de la mioglobina. El oxígeno se une al grupo hemo con el eje del O_2 en ángulo, una conformación del enlace fácilmente encajada por la mioglobina. (b) El monóxido de carbono se une al grupo hemo libre con el eje del CO perpendicular al plano del anillo de porfirina. La unión del CO al grupo hemo en la mioglobina está forzada a adoptar un ligero ángulo debido a que la disposición perpendicular está bloqueada estéricamente por la His E7, la His distal. Este efecto debilita la unión del CO a la mioglobina. (c) Otra perspectiva muestra la disposición de los aminoácidos clave alrededor del grupo hemo de la mioglobina. El O_2 unido tiene un enlace de hidrógeno con la His distal, la His E7, facilitando más aún la unión del O_2 .

Análisis de la unión del oxígeno por la mioglobina



$$K_d = \frac{[\text{Mb}] [\text{O}_2]}{[\text{MbO}_2]}; \quad [\text{MbO}_2] = \frac{[\text{Mb}] [\text{O}_2]}{K_d}$$

$$Y_{\text{O}_2} = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}] + [\text{MbO}_2]} = \frac{[\text{Mb}] [\text{O}_2] / K_d}{[\text{Mb}] + [\text{Mb}] [\text{O}_2] / K_d} =$$

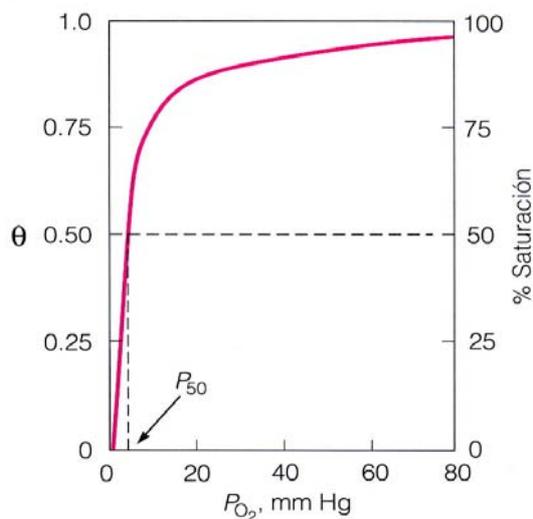
$$\frac{[\text{Mb}] [\text{O}_2] / K_d}{K_d [\text{Mb}] + [\text{Mb}] [\text{O}_2] / K_d} \text{ Simplificar } K_d; \quad \frac{[\text{Mb}] [\text{O}_2]}{K_d [\text{Mb}] + [\text{Mb}] [\text{O}_2]} =$$

$$\text{Factor común } [\text{Mb}] \quad \frac{[\text{Mb}] [\text{O}_2]}{[\text{Mb}] (K_d + [\text{O}_2])} \text{ Simplificar } [\text{Mb}]$$

$$Y_{\text{O}_2} = \frac{[\text{O}_2]}{K_d + [\text{O}_2]}$$

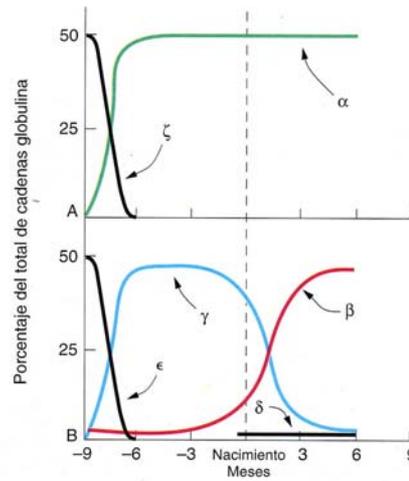
P_{50} es aquella $p\text{O}_2$ a la cual Y_{O_2} es igual a 0.5; $P_{50} = K_d$

$$Y_{\text{O}_2} = \frac{p\text{O}_2}{P_{50} + p\text{O}_2}$$

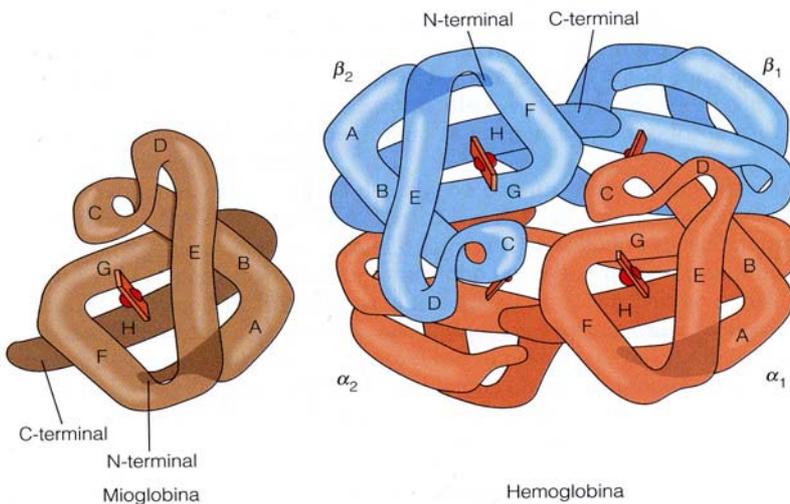


Curva de unión del oxígeno a la mioglobina. La concentración de oxígeno libre se expresa como $p\text{O}_2$, la presión parcial de oxígeno. La fracción de saturación en el eje de las y (a la izquierda) y en porcentajes de saturación a la derecha. Cuando la $p\text{O}_2$ se hace grande, la saturación se aproxima de manera asintótica, como describe la ecuación anterior. El valor de P_{50} , la presión parcial de oxígeno a una saturación del 50%, también se indica.

La hemoglobina consta de cuatro cadenas polipeptídicas



Expresión de los genes de hemoglobina en los diferentes estadios del desarrollo humano. (A) genes α y ζ . (B) genes β , γ , δ y ϵ .

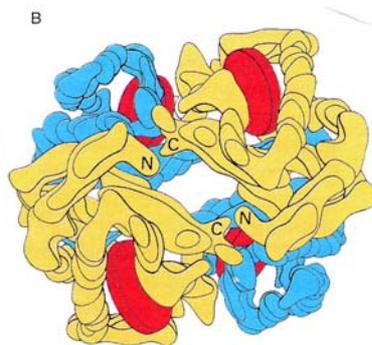
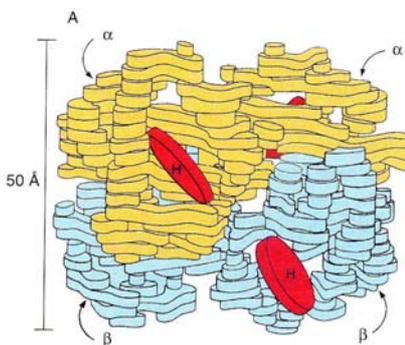


Interacciones entre cadenas

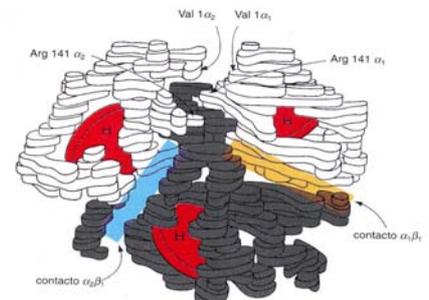
$\alpha_1 \beta_1 = 35$ residuos implicados

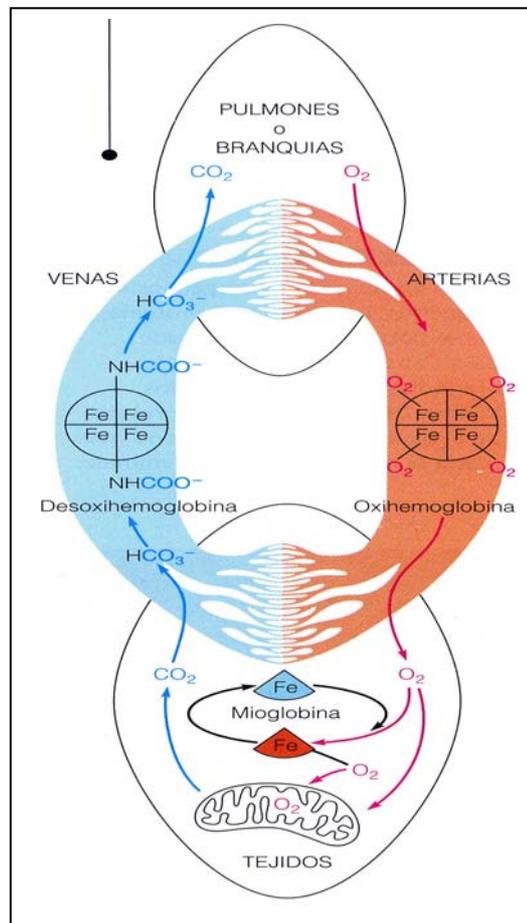
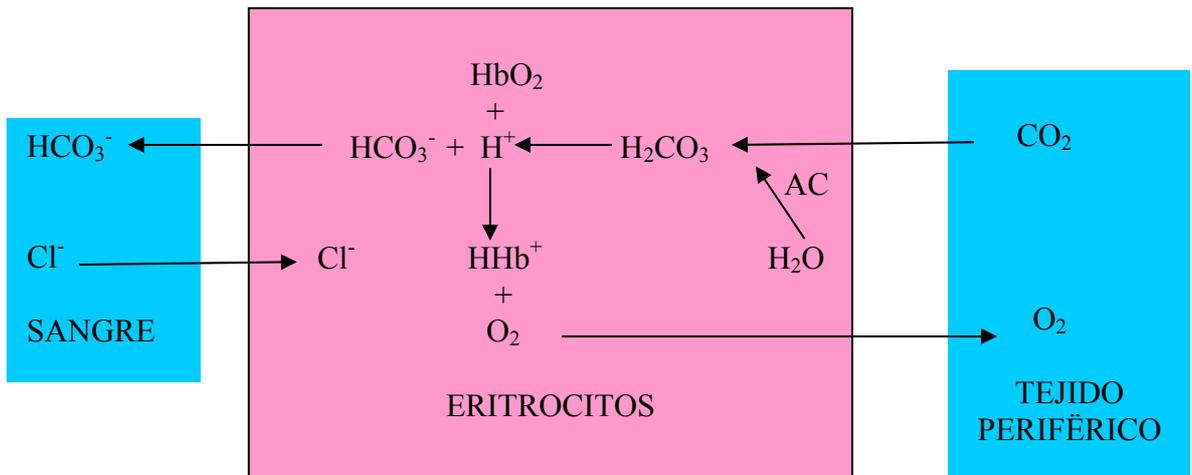
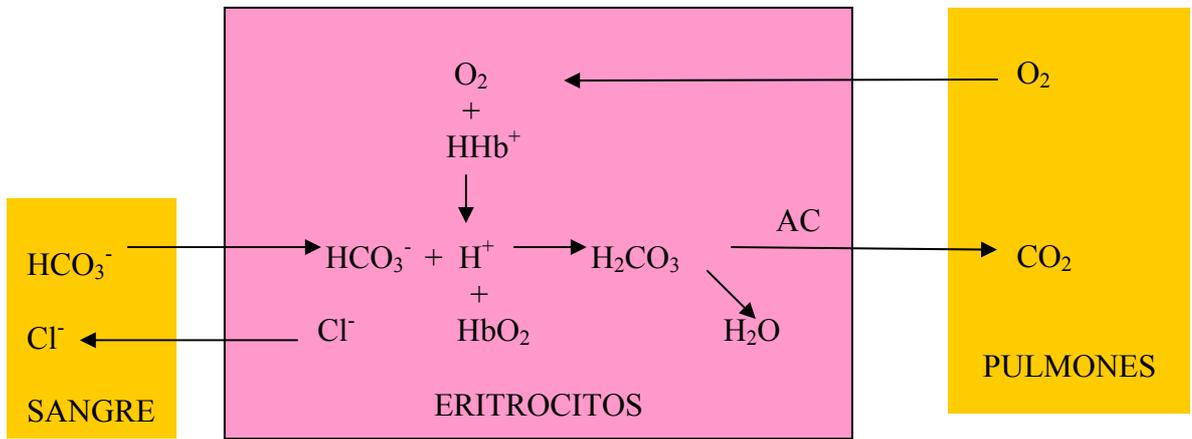
$\alpha_1 \beta_2 = 19$ residuos implicados

$\alpha_1 \alpha_2$ y $\beta_1 \beta_2 =$ son escasas



Oxihemoglobina





Unión de oxígeno a la hemoglobina

Consideremos una proteína E, constituida por n subunidades que pueden unirse cada una con una molécula S, supóngase que el ligando se une con cooperatividad infinita, todo o nada.



$$K_d = \frac{[E] [S]^n}{[ES_n]}; \quad [ES_n] = \frac{[E] [S]^n}{K_d}$$

$$Y_S = \frac{n[ES_n]}{n([E] + [ES_n])} = \frac{n[E] [S]^n / K_d}{n[E] + n[E] [S]^n / K_d} =$$

factor común n[E] en el denominador

$$\frac{n[E] [S]^n / K_d}{n[E] (1 + [S]^n / K_d)} \quad \text{Simplificar } n[E] \quad ; \quad \frac{[S]^n / K_d}{(1 + [S]^n / K_d)} =$$

$$\frac{[S]^n / K_d}{(K_d + [S]^n) / K_d} \quad \text{Simplificar } [K_d] \quad Y_S = \frac{[S]^n}{K_d + [S]^n}$$

Ecuación de Hill

Describe el grado de saturación de una proteína multisubunidades como función de la concentración de los ligandos.

Linearización de la ecuación de Hill.

$$Y_S = \frac{[S]^n}{K_d + [S]^n}; \quad Y_S K_d + Y_S [S]^n = [S]^n$$

$$Y_S K_d = [S]^n - Y_S [S]^n \quad \text{Factor común } [S]^n$$

$$Y_S K_d = [S]^n (1 - Y_S)$$

$$K_d = [S]^n (1 - Y_S) / Y_S \quad \text{Tomamos logaritmos}$$

$$\log K_d = n \log [S] + \log (1 - Y_S) / Y_S$$

$$\log (1 - Y_S) / Y_S = -n \log [S] + \log K_d \quad \text{Cambiamos de signo}$$

$$\log Y_S / (1 - Y_S) = n \log [S] - \log K_d$$

Pendiente = n Cuando Y = 0 X = log K_d / n
Para el caso de la hemoglobina sustituir [S] por pO₂ :

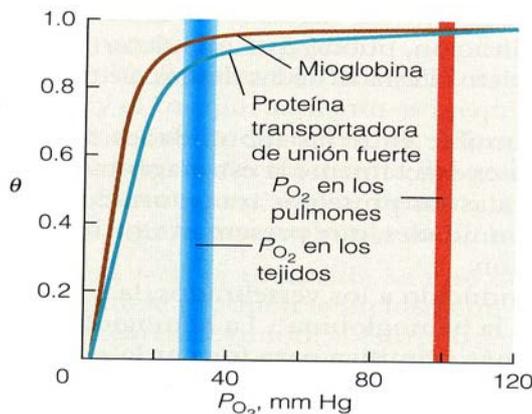
$$Y_{O_2} = \frac{(pO_2)^n}{K_d + (pO_2)^n}$$

Se define P₅₀ como el valor de pO₂ para que Y_{O₂} sea igual a 0.5

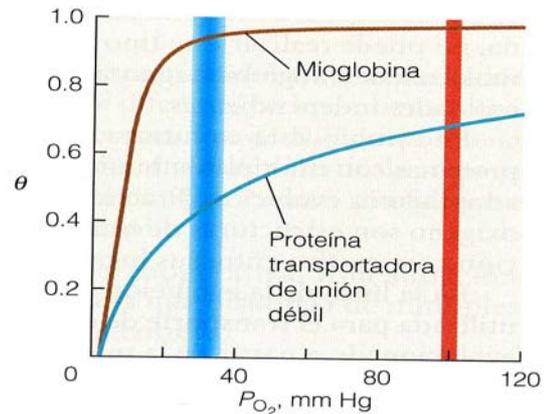
$$Y_{O_2} = \frac{(P_{50})^n}{K_d + (P_{50})^n}; \quad K_d = (P_{50})^n \text{ por tanto } Y_{O_2} = \frac{(pO_2)^n}{(P_{50})^n + (pO_2)^n}$$

$$\text{Log} (Y_{O_2} / 1 - Y_{O_2}) = n \text{ log } pO_2 - n \text{ log } P_{50}$$

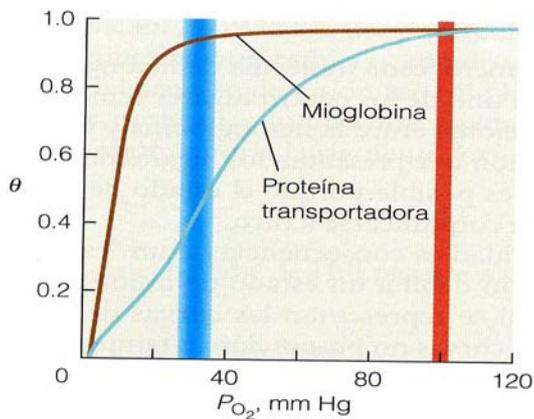
Pendiente = n Cuando Y = 0 X = log P₅₀



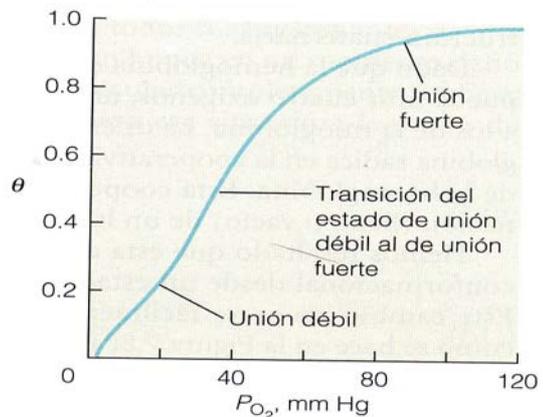
(a) Proteína transportadora eficaz en la unión pero ineficaz en la descarga (curvas de unión hiperbólica)



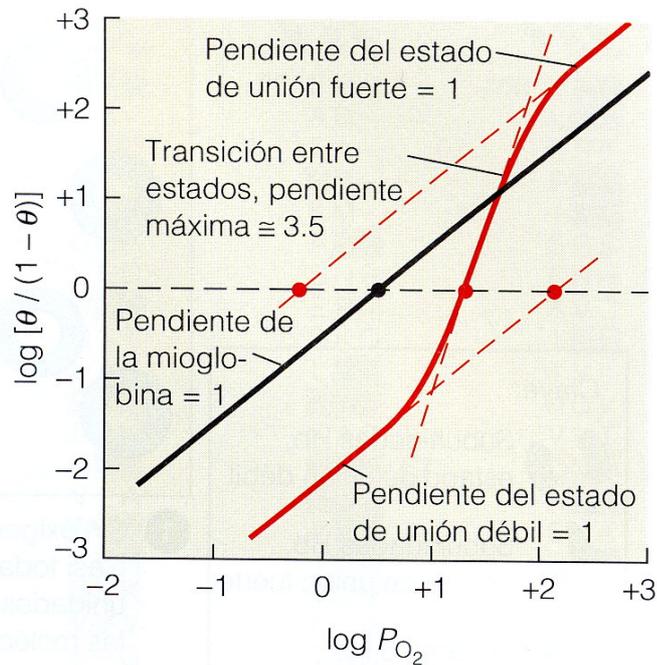
(b) Proteína transportadora eficaz en la descarga pero ineficaz en la unión (curvas de unión hiperbólicas)



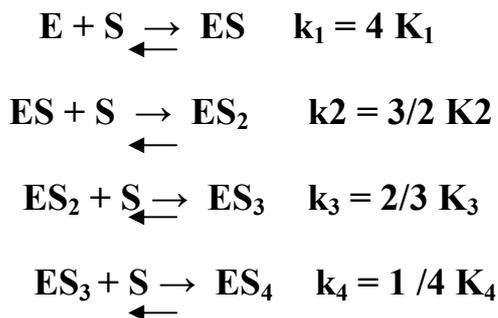
(c) Proteína transportadora eficaz en la unión y la descarga ya que tiene una curva de unión sigmoidea



(d) El paso de un estado de unión débil a uno de unión fuerte explica la curva sigmoidea



Ecuación de Adair (para una proteína tetramérica)



En la que K_i son las **constantes de disociación aparentes o macroscópicas** para la unión de i ligandos a la proteína, en general:

$$\mathbf{K_i = \frac{[ES_{i-1}] [S]}{[ES_i]}}$$

y las k_i , son las **constantes de disociación intrínsecas o microscópicas**, es decir, las constantes de disociación individuales para los sitios de unión de los ligandos. Las constantes de disociación intrínsecas son iguales a las constantes de disociación aparentes multiplicadas por **factores estadísticos**, 4, 3/2, 2/3 y 1/4, que tienen en cuenta el número de sitios de unión de ligandos en la molécula de la proteína.

En general, los factores estadísticos en una proteína con n sitios de unión equivalentes:

$$\mathbf{K_i = \frac{(n - i + 1) [ES_{i-1}] [S]}{i [ES_i]} = \left(\frac{n - i + 1}{i} \right) K_i}$$

Cte microscópica

Cte macroscópica

Ya que $(n - i + 1) [ES_{i-1}]$ es la concentración de sitios de unión de ligandos libres en ES_{i-1} e $i[ES_i]$ es la concentración de ligando unido en ES_i . Por tanto, resolviendo secuencialmente para la concentración de cada especie ligando-proteína, en una proteína tetramérica se obtiene:

$$\begin{aligned}
 [ES] &= [E] [S] / K_1 &= 4 [E] [S] / k_1 \\
 [ES_2] &= [ES] [S] / K_2 &= 3 / 2 [ES] [S] / k_2 = 6 [E] [S]^2 / k_1 k_2 \\
 [ES_3] &= [ES_2] [S] / K_3 &= 2 / 3 [ES_2] [S] / k_3 = 4 [E] [S]^3 / k_1 k_2 k_3 \\
 [ES_4] &= [ES_3] [S] / K_4 &= 1 / 4 [ES_3] [S] / k_4 = [E] [S]^4 / k_1 k_2 k_3 k_4
 \end{aligned}$$

La fracción de saturación de unión de los ligandos, fracción de los sitios de unión de ligandos ocupados dividida por la concentración total de sitios de unión de ligandos, se expresa por:

$$Y_S = \frac{[ES] + 2 [ES_2] + 3 [ES_3] + 4 [ES_4]}{4 ([E] + [ES] + [ES_2] + [ES_3] + [ES_4])}$$

Sustituyendo en las relaciones anteriores y anulando los términos, se obtiene:

$$Y_S = \frac{\frac{[S]}{k_1} + \frac{3 [S]^2}{k_1 k_2} + \frac{3 [S]^3}{k_1 k_2 k_3} + \frac{[S]^4}{k_1 k_2 k_3 k_4}}{1 + \frac{4 [S]}{k_1} + \frac{6 [S]^2}{k_1 k_2} + \frac{4 [S]^3}{k_1 k_2 k_3} + \frac{[S]^4}{k_1 k_2 k_3 k_4}}$$

Ecuación de Adair

Si las constantes de disociación microscópicas de la ecuación de Adair no son iguales la curva de saturación fraccionada describirá unión de ligandos cooperativa. La disminución o el incremento de los valores de estas constantes conduce a cooperatividad positiva y negativa, respectivamente. Por supuesto que los valores de las constantes de disociación microscópicas pueden, también, alternar de modo que, por ejemplo:

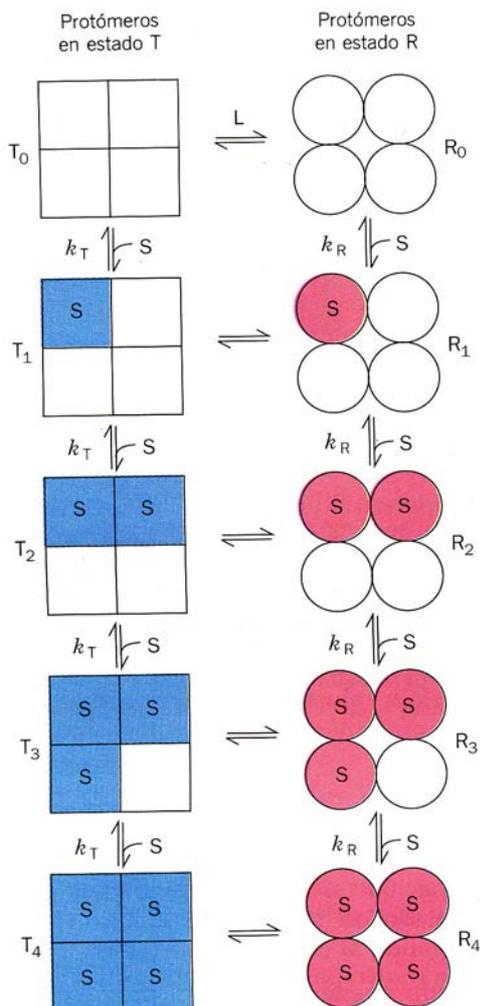
$$k_1 < k_2 > k_3 < k_4$$

En la curva de disociación de oxígeno de la Hb se pueden obtener los valores de k_1 y k_4 por extrapolación de las asíntotas, inferior y superior, de la representación de Hill sobre el eje de pO_2 . Las constantes de disociación microscópicas restantes pueden evaluarse adaptando la ecuación de Adair a la representación de Hill.

Constantes de Adair para la hemoglobina A a pH 7,40

Disolución	k_1 (torr)	k_2 (torr)	k_3 (torr)	k_4 (torr)
Sin adiciones	8.8	6.1	0.85	0.25
0.1 M NaCl	41	13	12	0.14
2 mM BPG	74	112	23	0.24
0.1 M NaCl + 2 mM BPG	97	43	119	0.09

Aunque la ecuación de Adair es la relación más general para la descripción de la unión de ligandos a una proteína, y se emplea profusamente con este objeto, no proporciona una visión física de por qué las diversas constantes de disociación microscópicas difieren unas de otras. Pero si la proteína está constituida por subunidades idénticas que se hallan relacionadas simétricamente, resulta deseable el comprender como la unión de un ligando en un sitio influye en la afinidad de unión del ligando en un sitio, al parecer, idéntico. Esta necesidad conduce al desarrollo de modelos de unión de ligandos que racionalicen cómo los sitios de unión de las proteínas oligoméricas pueden exhibir afinidades diferentes. **Modelos “simétrico” o de MWC y “secuencial”**

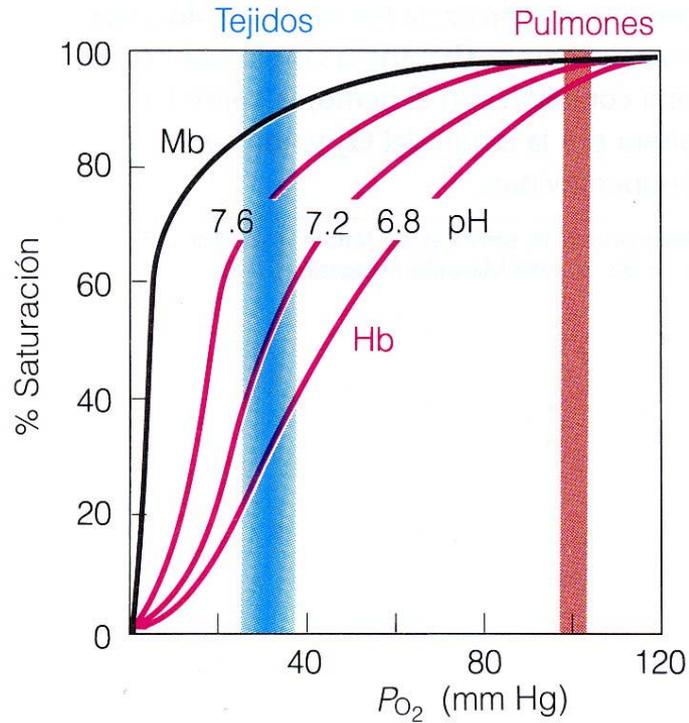
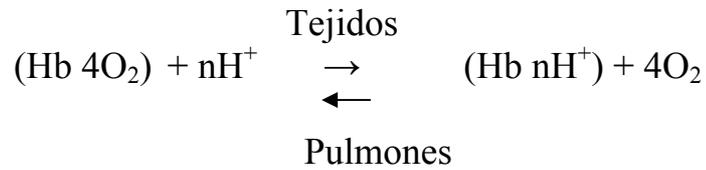


Uno de los modelos (simétrico) generales para la interconversión de las formas inactiva y activa de proteínas con unión cooperativa a ligando. A pesar de que el modelo puede aplicarse a cualquier proteína –incluyendo las enzimas que presenten unión cooperativa–, se muestran cuatro subunidades debido a que el modelo fue propuesto originalmente para la hemoglobina. En el modelo concertado de todo o nada, se proponen que todas las subunidades están en la misma conformación, ya sea todas □ (baja afinidad o inactivas) o todas ○ (alta afinidad o activas). Dependiendo del equilibrio, **L**, entre las formas □ y ○ la unión de una o más moléculas de ligando (S) desplazará el equilibrio hacia la forma ○. Las subunidades con un (S) unido están sombreadas.

Figura

Especies y reacciones permitidas por el modelo simétrico de alosterismo. Los cuadrados y los círculos representan a los protómeros en los estados T y R respectivamente

Respuesta a los cambios de pH: Efecto Bohr



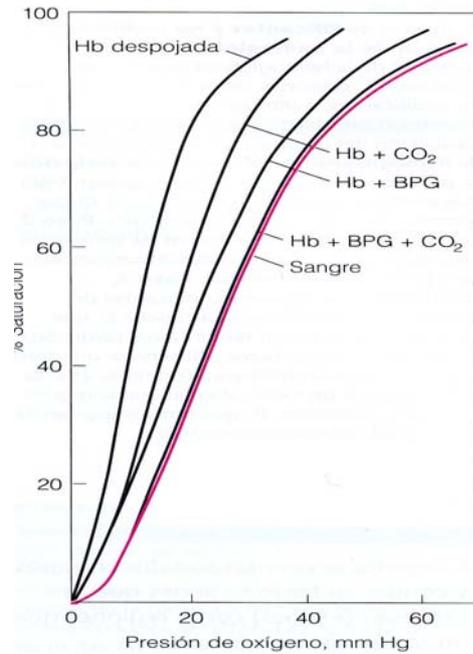
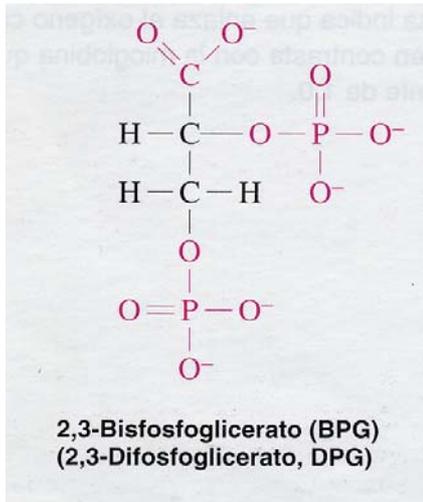
Efecto Bohr en la hemoglobina. Se muestran las curvas de unión del oxígeno para la hemoglobina (Hb) a pH 7.6, 7.2, y 6.8. Obsérvese que la eficacia de la descarga del oxígeno, medida por las diferencias en las curvas a $p\text{O}_2 = 30$ mm Hg, aumenta en gran manera a medida que baja el pH. Cuando la sangre va de los pulmones a los tejidos, el pH inferior hace que se desplace la unión del oxígeno a las curvas de menor afinidad. La mioglobina (Mb) muestra poco efecto Bohr, por lo que su curva de unión de oxígeno es aproximadamente la misma a los tres valores de pH.

Transporte de dióxido de carbono



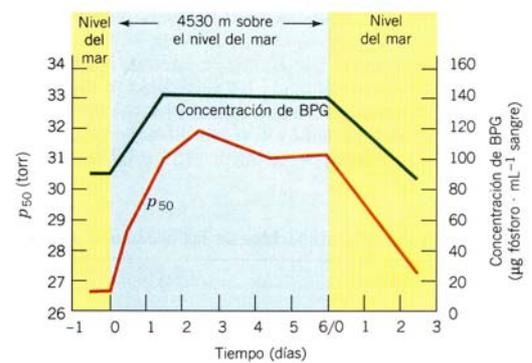
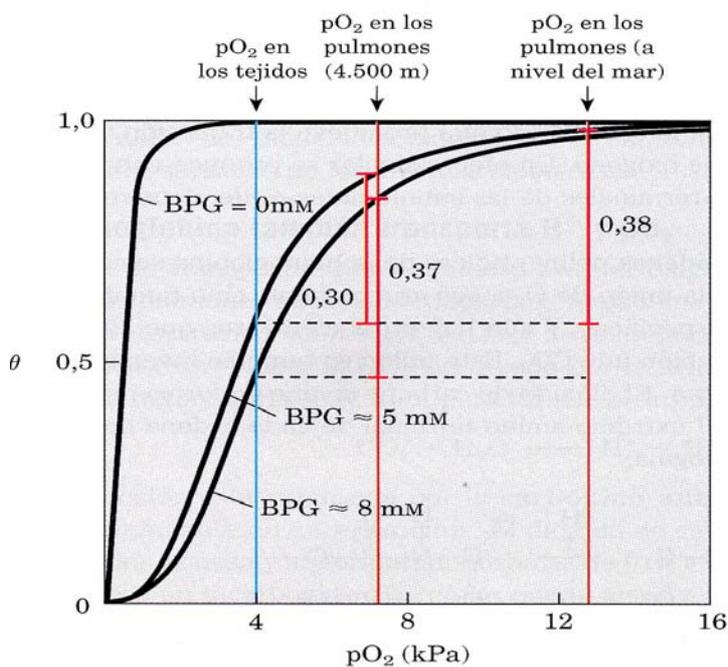
El CO_2 modula la unión de O_2 directamente al combinarse reversiblemente con los grupos amino N-terminales de las proteínas de la sangre para formar carbamatos.

Efecto del BPG sobre la unión de oxígeno



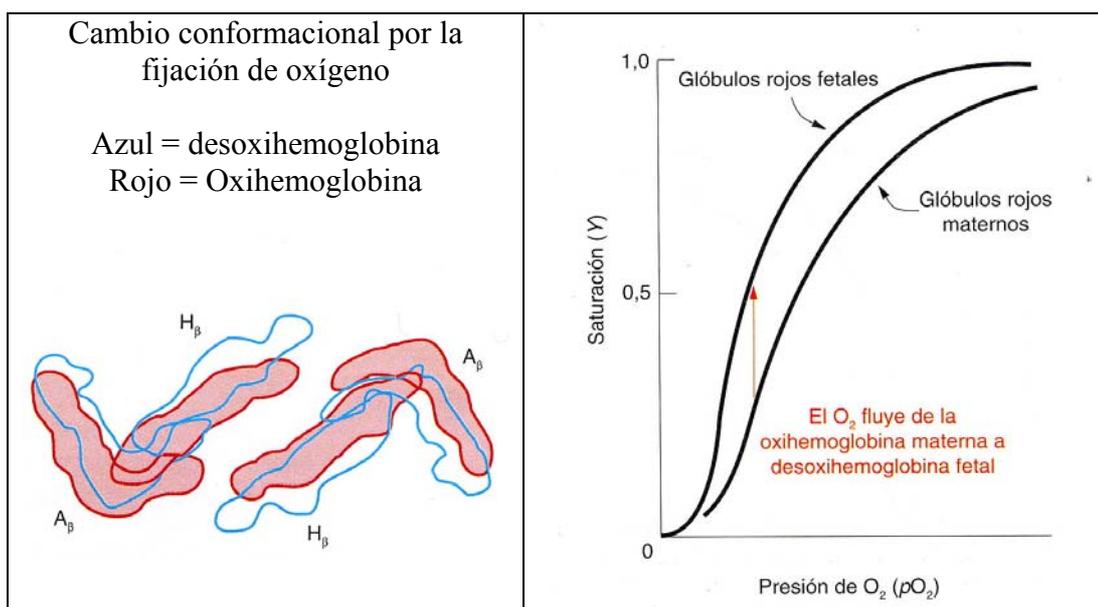
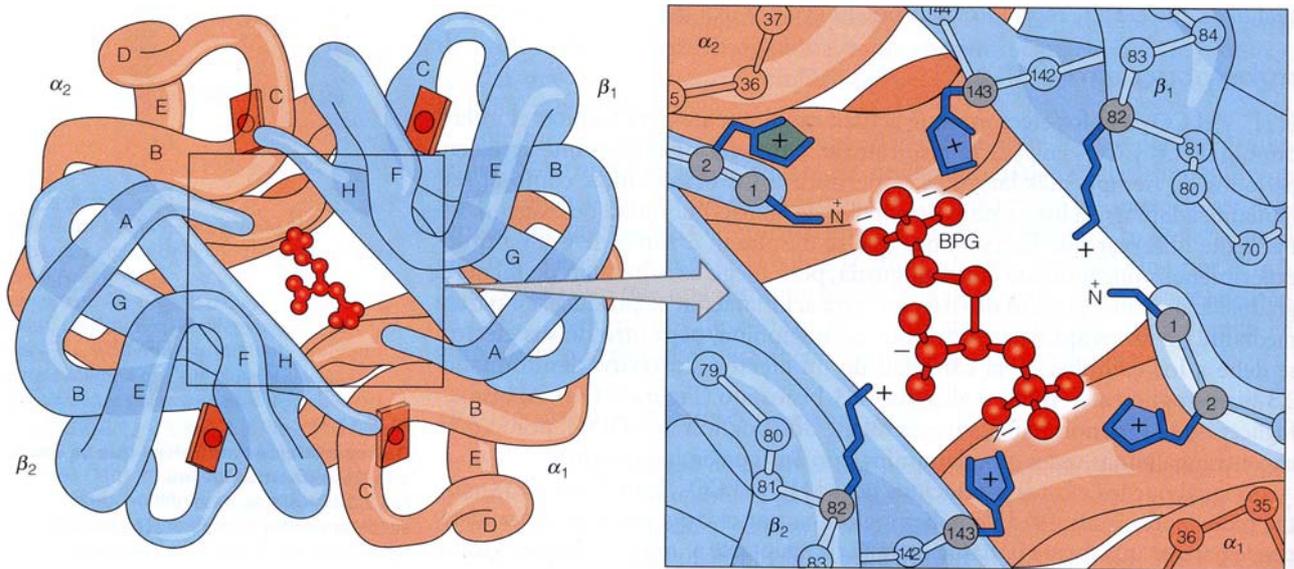
Efectos combinados del CO₂ y del BPG sobre la unión de oxígeno por la hemoglobina.

La hemoglobina desprovista de CO₂ y de BPG tiene una afinidad elevada por el oxígeno. Cuando se añaden ambas sustancias a la hemoglobina a las concentraciones que se dan en la sangre que sale de los capilares, la hemoglobina presenta casi exactamente la misma curva de unión que se observa para la sangre total.

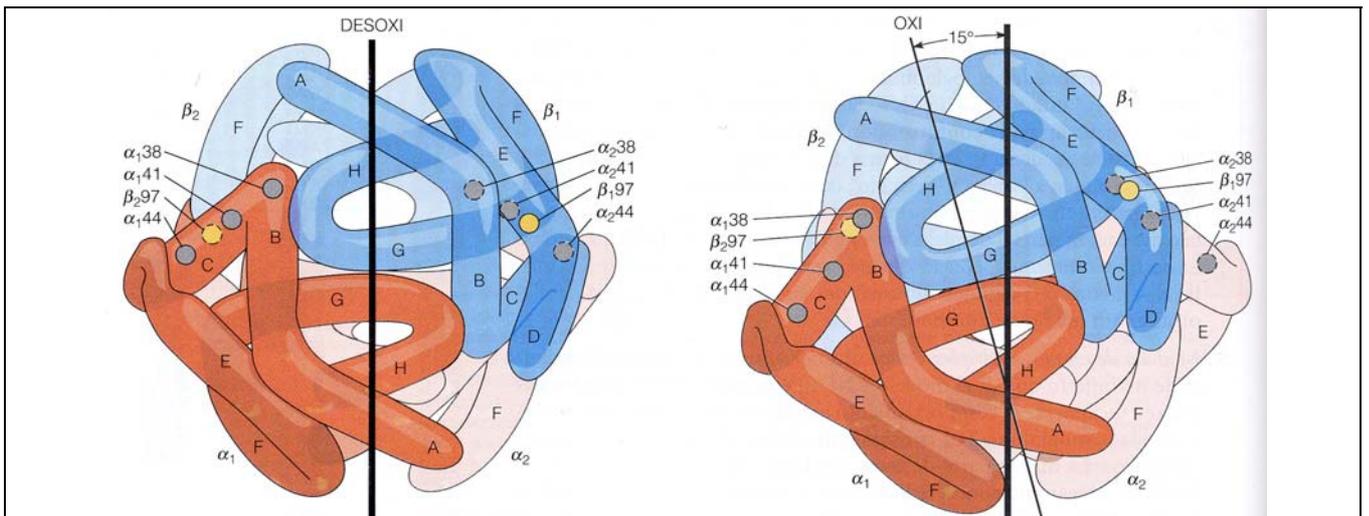


Efecto de la exposición a una altura elevada sobre P₅₀ y la concentración de BPG en la sangre de individuos adaptados al nivel del mar. La región de la derecha "nivel del mar" indica los efectos de la exposición al nivel del mar en individuos adaptados a alturas elevadas.

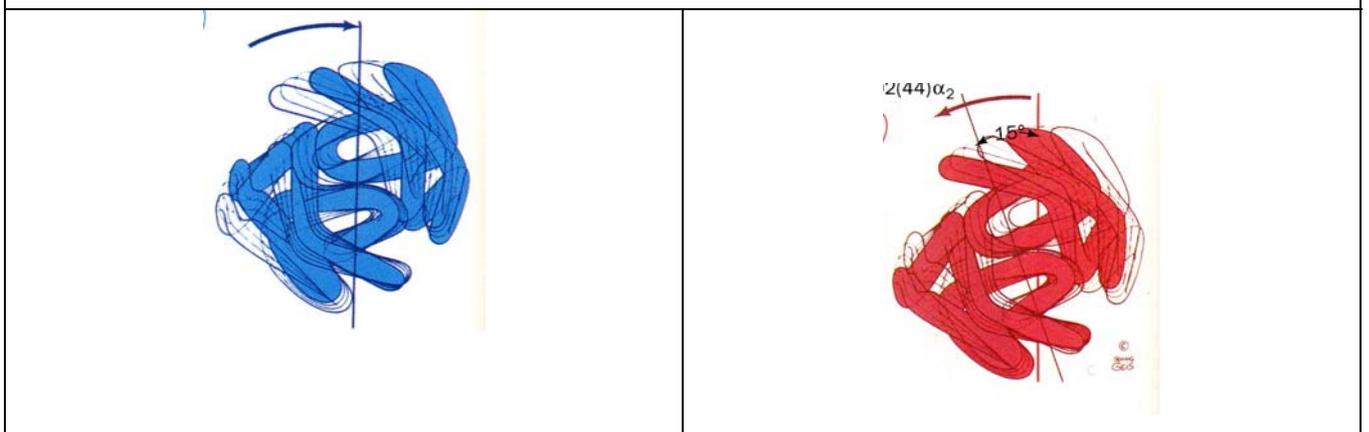
La concentración de BPG en la sangre humana normal es de 5 mM al nivel del mar y 8 mM a grandes altitudes. Obsérvese que la hemoglobina une oxígeno muy fuertemente en ausencia de BPG, presentando entonces una curva de unión hiperbólica. En realidad el coeficiente de Hill observado para la cooperatividad de unión de O_2 disminuye solo ligeramente (de 3 a 2.5) cuando se extrae el BPG de la hemoglobina, pero la parte creciente de la curva sigmoidea está confinada a una región muy pequeña cercana al origen. A nivel del mar, la hemoglobina está prácticamente saturada con O_2 en los pulmones pero su nivel de saturación es sólo de un 60% en los tejidos, de manera que la cantidad de oxígeno liberado en los tejidos es cercano al 40% del máximo que puede ser transportado por la sangre. A grandes altitudes la liberación de O_2 disminuye en una cuarta parte, alcanzando como máximo el 30%. No obstante, un aumento en la concentración de BPG disminuye la afinidad de la hemoglobina por el O_2 haciendo que de nuevo se libere a los tejidos cerca de un 40% del que se transporta.



El 2,3-BPG se une solamente a la desoxihemoglobina; en la oxihemoglobina las hélices H de las subunidades β están muy cerca y no hay espacio para la unión del polianión. El lugar de unión es en la cavidad central del tetrámero de hemoglobina cerca de los grupos N-terminales de las subunidades β . Esta recubierto con ocho grupos de carga positiva 2 X (N-terminal cadena β histidina 2, lisina 82 e histidina 143)) que facilitan la unión de la molécula de BPG de carga negativa. Obsérvese que los residuos de histidina (β 143) están sustituidos por serina en la hemoglobina



Cambio de la estructura cuaternaria de la hemoglobina durante la oxigenación. Se muestra la transición a lo largo de un eje perpendicular al eje binario, con el dímero $\alpha_1\beta_1$ (áreas de color azul y rojo oscuro) enfrente del dímero $\alpha_2\beta_2$. La desoxihemoglobina se muestra en el lado izquierdo, y la oxihemoglobina en el derecho. Obsérvese la rotación $\alpha_1\beta_1$ con respecto a $\alpha_2\beta_2$ y el desplazamiento de β_97 (His FG4) con respecto a α_41 (Thr C6) y α_44 (Pro CD2). La rotación de aproximadamente 15° se acompaña de un deslizamiento, puesto que el centro de rotación no tiene una localización central.



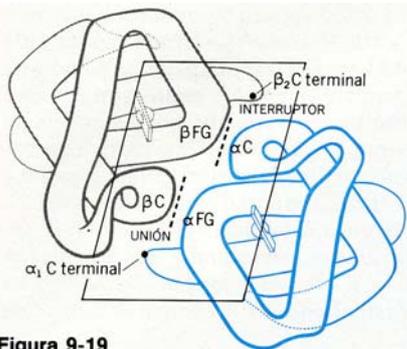
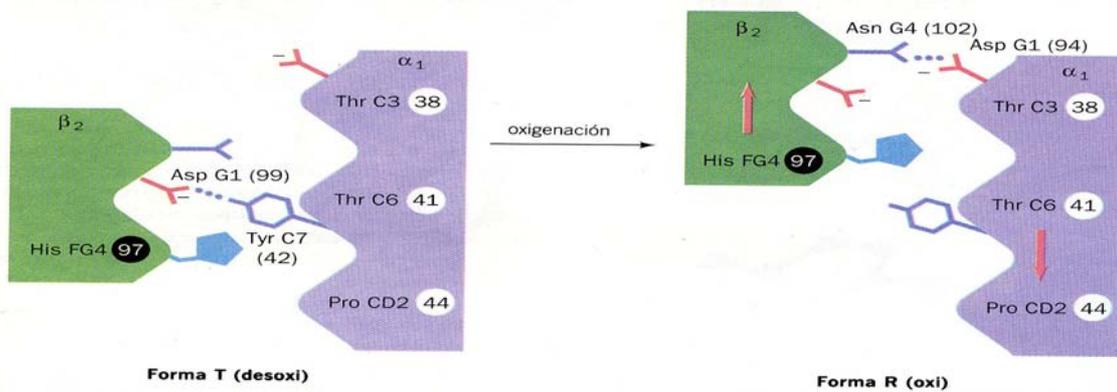
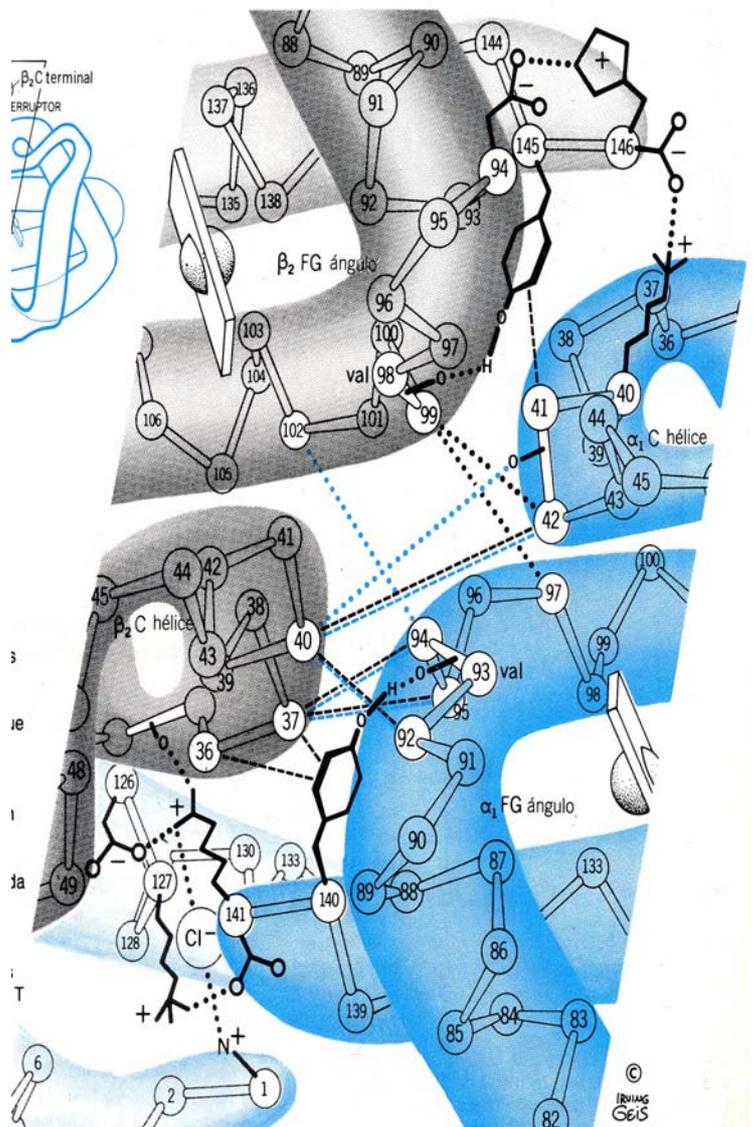
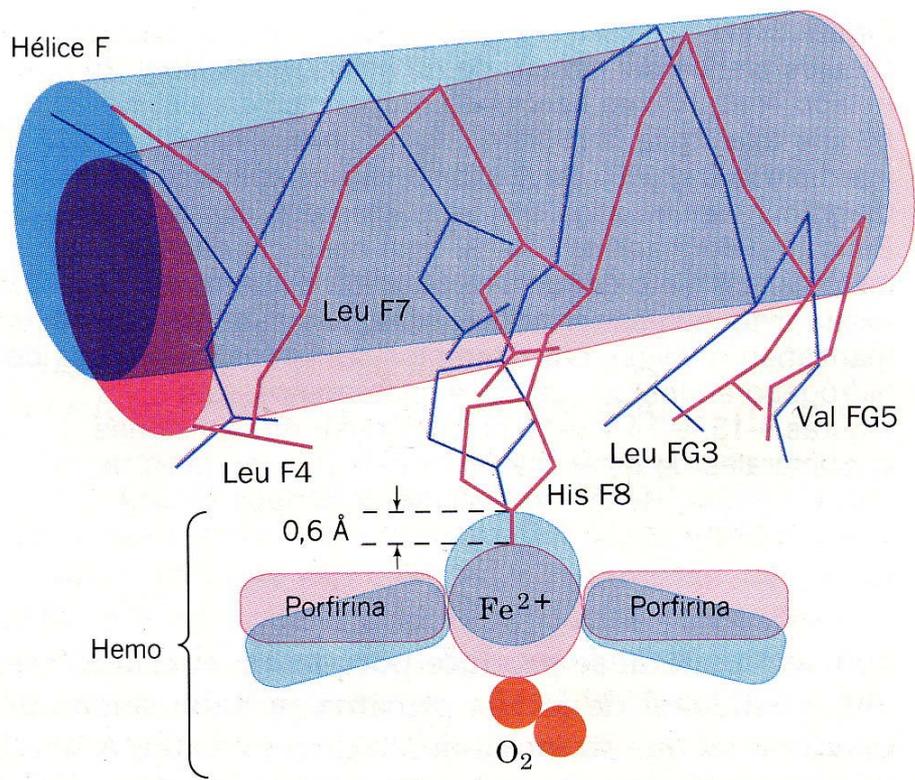


Figura 9-19

La interfase $\alpha_1\beta_2$ de la hemoglobina el área encuadrada en la figura de arriba aparece más detallada en la figura de la derecha. Los enlaces de hidrógeno e iónicos se representan por líneas discontinuas, negras para la desoxiHb y azules para la oxiHb, mientras que los contactos de Van der Waals se indican de modo análogo, por líneas discontinuas. Obsérvese que la interfase $\alpha_1\text{C}-\beta_2\text{FG}$ (región del interruptor) experimenta un reajuste significativo en la transición $T \rightarrow R$ mientras que la interfase $\alpha_1\text{FG}-\beta_2\text{C}$ (la unión flexible) relacionada pseudosimétricamente solamente experimenta reorientaciones pequeñas. Obsérvese también que los enlaces iónicos del estado T que implican a restos C-terminales [(Arg 141 α abajo) e His 146 β (arriba)] se rompen en la transición $T \rightarrow R$.



**El desplazamiento de Fe (II) hacia el interior del plano del hemo
Dispara el cambio de conformación T → R**

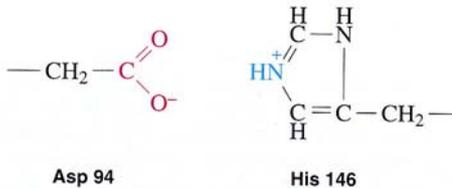


Mecanismo que dispara la transición T → R en Hb. En la forma T (azul), el Fe se encuentra 0,6 Å por encima del anillo de porfirina abombado. Al adoptar la forma R (rojo), el Fe se sitúa en el plano del hemo, de la porfirina aplanada, en donde puede unir O₂ con facilidad y al hacerlo así atrae a la His proximal F8 y, a través de ella, queda ligado a la hélice F. Por esta razón el enlace Fe-O₂ se fortifica debido a la relajación de la interferencia espacial entre O₂ y el hemo.

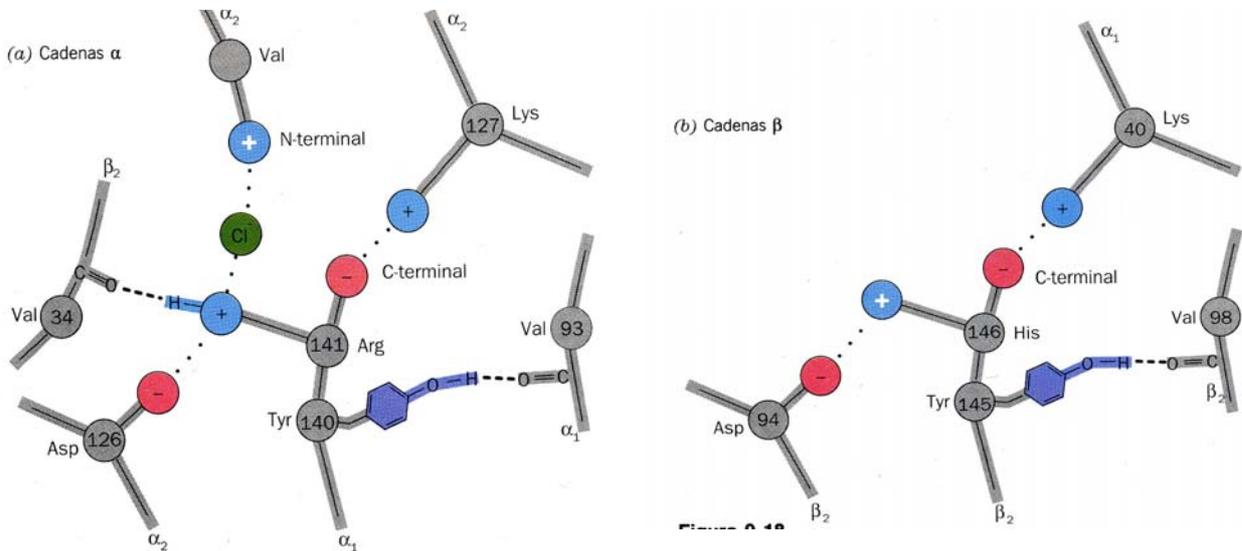
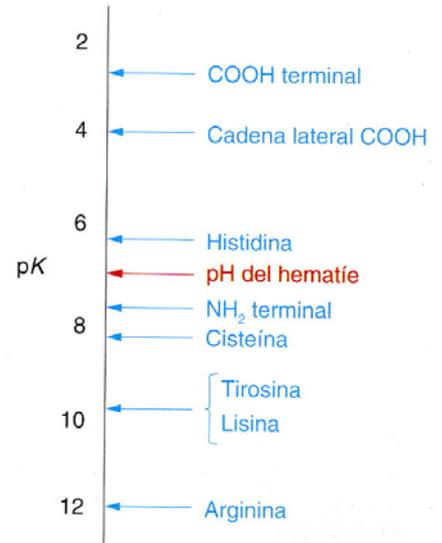
La desoxigenación aumenta la afinidad de varios sitios de unión de protones: Efecto Bohr.

La hemoglobina absorbe unos 0.5 H⁺ por cada molécula de O₂ que libera. Esta fijación de H⁺ en los tejidos metabólicamente activos. Esto indica que la desoxigenación incrementa la afinidad de algunos centros por el H⁺. Específicamente, los pKs de algunos grupos deben ser elevados en la transición de la hemoglobina de la forma oxigenada a la desoxigenada. De aquí que los candidatos más idóneos para participar en el efecto Bohr son la histidina, la cisterna y el grupo amino terminal, que normalmente tienen valores de pKs próximos a 7.

Los tres grupos específicos responsables del efecto Bohr son:
las cadenas de la histidinas 146 β y 122 α
y el grupo α-amino de la cadena α.



El aspartato 94 aumenta el pK de la histidina 146 en la desoxihemoglobina pero no en la oxihemoglobina. En la desoxihemoglobina, la proximidad de la carga negativa del aspartato 94 favorece la protonación de la histidina 146.



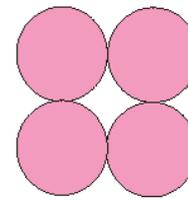
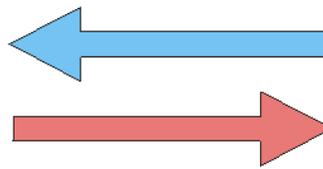
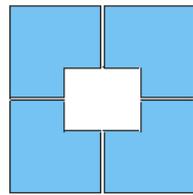
Enlaces iónicos y puentes de Hidrógeno referentes a los dos últimos restos de (a) las cadenas α y (b) las cadenas β de desoxiHb. Todos estos enlaces se rompen en la transición T → R. Los dos grupos que participan en el efecto Bohr al desprotonarse parcialmente en el estado R se indican por signos + blancos.

Disminuyen la afinidad de la Hb hacia el oxígeno

2,3 BPG
CO₂
H⁺

Forma T de baja afinidad

Forma R de afinidad alta



O₂

Los efectos alostéricos son recíprocos, esto es, el oxígeno disminuye la afinidad de la hemoglobina hacia el 2,3 BPG, el CO₂ y el H⁺

Aumenta la afinidad de la Hb hacia el oxígeno