

CBPF-NF-040/86

LAS HEMOPROTEINAS*

por

George Bemski

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas - CBPF/CNPq
Rua Dr. Xavier Sigaud, 150
22290 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil

*Conferência proferida na Universidad Técnica Federico Santa María, Chile, em 18 de julho de 1986, durante o 1º Simposio Nacional de Física Experimental y Aplicada, realizado de 14-19 de julho de 1986.

Las hemoproteínas representan un grupo de proteínas de gran importancia para los biólogos y físicos.

Para estos últimos las hemoproteínas (hemoglobina, mioglobina, etc.) equivalen en su utilidad al átomo de hidrógeno en la física atómica, o al de silicio en las décadas 1950-1960 en la física de sólidos y se han transformado en moléculas modelo de la biofísica.

La curiosidad de los físicos ha sido despertada por causa de una feliz combinación de circunstancias. De un lado existía una descripción detallada de su estructura ya que la hemoglobina y la mioglobina han sido las primeras proteínas cuya estructura tridimensional ha sido descifrada por la difracción de rayos X^(1,2). Este trabajo titánico fue efectuado por Perutz (hemoglobina) y Kendrew (mioglobina) en los años 1950 y 1960 y constituye el inicio de un periodo en el cual se comenzaba a obtener mapas tridimensionales de las macromoléculas biológicas. La eficiencia de este proceso ha aumentado mucho, y su resolución también. Hoy en día el límite está más bien en la cristalización de estas moléculas. Los cristales necesarios para obtener las estructuras pueden ser microscópicos, pero aun así la tecnología de crecimiento de cristales no acompaña la de difracción de rayos X.

Por otro lado las hemoproteínas contienen iones de hierro. La hemoglobina tiene cuatro hierros por molécula, la mioglobina un solo^(7,2). La presencia de estos iones es esencial para el papel biológico desempeñado por estas proteínas.

El hierro es un metal con propiedades magnéticas bien conocidas. Su magnetismo permite el uso de varias técnicas fi

sicas desarrolladas desde la década de los 40, tales como la susceptibilidad magnética, la resonancia paramagnética y la absorción óptica, las primeras técnicas utilizadas en estos estudios. Con el tiempo este catálogo creció y ahora incluye la espectroscopia Mössbauer, el efecto Raman, la resonancia magnética nuclear, etc.

En consecuencia, se ha conseguido una descripción bastante razonable de la estructura electrónica del hierro en varias circunstancias, varias de ellas correspondientes a situaciones fisiológicas.

En las condiciones fisiológicas la hemoglobina está en el estado de oxihemoglobina, con moléculas de O_2 ligadas al Fe (Fig. 1), o en estado desoxigenado, con esta misma posición desocupada. Ya in vitro, en hemoglobina extraída de la sangre, el hierro liga una variedad de pequeñas moléculas, como CO , H_2O , NO , CN , etc. Lo interesante de este fenómeno, es que el ligante determina el estado de carga de hierro (Fe^{2+} o Fe^{3+}) y el estado de su spin (fig. 2). De esta manera la naturaleza ofrece al físico un vasto campo de estudios de magnetismo con posibilidad de fáciles manipulaciones en la preparación de las muestras⁽³⁾.

Los resultados de estos estudios han sido muy interesantes. El ion de Fe se encuentra casi en el plano de la heme (fig. 3) cuando este está ligado. En el estado desoxi el hierro sale del plano por casi un Å .

Este pequeño movimiento es suficiente para desencadenar vastos cambios en la proteína entera produciendo desplazamientos atómicos de varios Å . La hemoglobina, que contiene cuatro hier

ros por molécula, muestra bien estos efectos cuando observada por difracción de rayos X. Otra singularidad de la hemoglobina de mucha importancia ya que es responsable por nuestra existencia puede apreciarse en la fig. 4. Ella muestra la fracción (f) de los átomos de hierro con moléculas de O_2 ligadas ($f=0$ sin O_2 , $f=1$ con 4 moléculas de O_2). La circulación de la sangre en el organismo lleva cada molécula de hemoglobina a regiones arteriales de alta presión parcial de O_2 y venales de baja presión. En mioglobina $f=1$ corresponde al único Fe ligado a O_2 y la curva es una hipérbola, correspondiente a una interacción bimolecular. Ya la saturación de hemoglobina está descrita por una sigmoide (Fig. 4). La diferencia entre estas dos curvas es acentuada y al mismo tiempo fundamental. De un lado se nota que la mioglobina no sirve como distribuidora de O_2 ya que su saturación es casi igual para las dos presiones extremas existentes en el organismo. Verdaderamente, la función de la mioglobina es de almacenar oxígeno en los músculos. Ya la curva de saturación de la hemoglobina muestra que unos 35% del O_2 se desprenden en regiones pobres en O_2 y la molécula se satura nuevamente en los pulmones. Impresiona aquí el alto grado de reserva de O_2 mantenida para los casos especiales (ejercicio, altas montañas, etc.).

Las curvas de saturación tienen relación con las diferentes conformaciones de la hemoglobina antes mencionadas. En efecto, la oxygenación de la hemoglobina corresponde a un efecto cooperativo, los sucesivos hierros de cada molécula ligan el oxígeno con cada vez mayor facilidad.

Existen modelos que describen este comportamiento. El más

simple y conocido es el de Monod-Changeux⁽⁴⁾ que simplemente considera la existencia de dos conformaciones de hemoglobina diferentes, cada una con diferente constante de reacción $K(\text{Fe} + 4\text{O}_2 \xrightleftharpoons{K} \text{Fe}4\text{O}_2)$. K_1 y K_2 corresponden a las dos conformaciones extremas (oxihemoglobina y desoxihemoglobina). También entra en la teoría la concentración relativa de moléculas en las dos conformaciones. Con estos tres parámetros se reproducen las curvas experimentales de la figura 4. La hipérbola correspondiente a la mioglobina significa simplemente que existe solo un hierro y un valor de K . Si para la hemoglobina K_1 fuera igual a K_2 la curva también sería hiperbólica, pero no se conocen casos de este tipo.

Estos modelos no atacaban el problema fundamental de una descripción en un nivel molecular de como se difunde el ligante del solvente hacia el ion de hierro. Faltaba un modelo microscópico de los acontecimientos.

Una buena parte de las respuestas ya era conocida porque Landau demostró que un sistema compuesto de N componentes tiene e^N estados de energía casi degenerados⁽⁵⁾. Aplicado a una proteína esto significa que hay un enorme número de estados ($N_{\text{Hb}} \approx 146$) con energías del estado fundamental casi idénticas.

En estas condiciones la difracción de rayos X nos da solamente una media tomada sobre un conjunto de moléculas, cada una de las cuales tiene una conformación un poco diferente y una energía ligeramente diferente. En esta situación media no se detecta un camino (canal) para el pasaje del ligante.

La respuesta reside en la dinámica de las proteínas, tal como ha sido analizada en los últimos 10 años^(6,7).

Experimentalmente los estudios en hemoproteínas incluyen principalmente la cinética que sigue después de la foto-disociación del ligante. Un impulso de luz de longitud de onda apropiada disocia el ligante (fig. 5). En experimentos efectuados en bajas temperaturas (<40K) se llega a comprobar que el ligante disociado no se aleja mucho del ion de hierro y, una vez el impulso termina, se asocia vía efecto tunel (fig. 6).

En temperaturas un poco más altas (40-200K) el ligante recorre una distancia más larga, hasta que, en temperaturas cercanas a las del ambiente, se escapa de la proteína.

La reasociación ha sido analizada en función de varias barreras de potencial que el ligante tiene que atravesar en el camino hacia el ion de hierro (fig. 7). La primera corresponde a la penetración del ligante del solvente a través de la superficie de la proteína. Las otras barreras todavía no han sido identificadas.

Experimentalmente se obtiene curvas como las de la fig. 5. Si la reasociación consistiese simplemente de un salto por encima de una barrera de potencial, la dependencia de la concentración de las moléculas reasociadas en función del tiempo, sería exponencial y así:

$$K = A \exp(-E/kT)$$

donde E representa la altura de la barrera, y K la constante de reacción. Se obtiene un acuerdo entre la teoría y los resultados experimentales postulando una distribución $g(E)$ de las energías E, cada una de ellas correspondiente a una conformación un poco diferente. Las moléculas congeladas desde la temperatura ambiente se quedan en una de estas conformaciones dependiendo de

la rapidez del enfriamiento, etc. Abajo de 200K la energía térmica no es suficiente para permitir que una molécula congelada en una conformación pase a una conformación diferente. Por encima de 200K cada molécula pasa por una variedad de conformaciones.

La difracción de rayos X ha dado un apoyo a estas ideas. Medidas en función de la temperatura (entre 80 e 300K) han sido analizadas para obtener la amplitud cuadrada media, $\langle X^2 \rangle$ de los movimientos atómicos de casi todos los átomos de mioglobina⁽⁸⁾.

Ha sido demostrado que $\langle X^2 \rangle$ es de la orden de 10 \AA^2 , siendo mayor para los átomos de superficie y menor para los del interior de la proteína (fig. 8) de acuerdo con lo esperado.

La espectroscopia de Mössbauer también ha sido efectivamente utilizada en estos estudios⁽⁹⁾. El factor f (Debye-Waller) corresponde a la fracción de los núcleos de Fe^{57} que emiten los rayos gamma sin emisión de fonons. Este factor permite el cálculo de $\langle X^2 \rangle$ del núcleo de Fe (fig. 9). Las medidas de f en función de la temperatura sirven para obtener un tipo más de información relacionada con los procesos dinámicos. Como la vida media del estado excitado del Fe^{57} es de 10^{-8} s, los fenómenos que ocurren con frecuencias mayores que 10^8 /s serán sentidos por el γ , en cuanto procesos más lentos que 10^8 s^{-1} no serán notados. El efecto Mössbauer muestra que en temperaturas alrededor de 200K se pasa de una situación a otra.

Mucho esfuerzo teórico ha sido dirigido en busca de una interpretación detallada de la dinámica de proteínas⁽¹⁰⁾. Existen varias escuelas con interpretaciones bastante diferentes de las cinéticas de foto disociación. La complejidad del problema es grande y no se debe esperar una descripción completa en un futuro próximo.

-7-

Por otro lado, está en juego una descripción microscópica que permita juntar las cantidades observadas en las cinéticas de fotodisociación con las constantes macroscópicas observadas en experimentos de oxigenación.

FIGURAS

- Fig. 1 - Heme, la parte principal de la mioglobina y hemoglobina. El círculo representa al ligante (p.e. O_2 en condiciones fisiológicas). El ion de Fe no está exactamente en el plano de cuatro N's (Ver fig. 3).
- Fig. 2 - Los estados de carga y el spin s del Fe dependen del ligante.
- Fig. 3 - La posición del Fe y de la histidina próxima para (a) el caso del Fe sin ligante, y (b) con ligante X (de la ref. 11).
- Fig. 4 - La saturación con O_2 vs presión parcial de O_2 para mioglobina y hemoglobina.
- Fig. 5 - La cinética de la reasociación después de la fotodisociación de O_2 en la mioglobina. $N(t)$ - la fracción de ligantes no-reasociados en función de tiempo y temperatura (de la ref. 6).
- Fig. 6 - Los dos posibles mecanismos de transición de un electrón o molécula del pozo B al pozo A. En el caso de los ligantes de hemoproteínas predomina el efecto túnel abajo de 40K, y proceso Arrhenius acima de 40K.
- Fig. 7 - Vision esquemática de las varias barreras de potencial entre el solvente y el átomo de Fe (estado ligado).
- Fig. 8 - Movimiento $\langle x^2 \rangle$ de los átomos en la mioglobina obtenido por difracción de raios X. El ancho de la faja es proporcional a $\langle x^2 \rangle$ (de la ref. 8).
- Fig. 9 - Variación del desplazamiento $\langle x^2 \rangle$ del Fe en mioglobina en función de la temperatura. Resultados de experimentos del efecto Mössbauer (de la ref. 8).

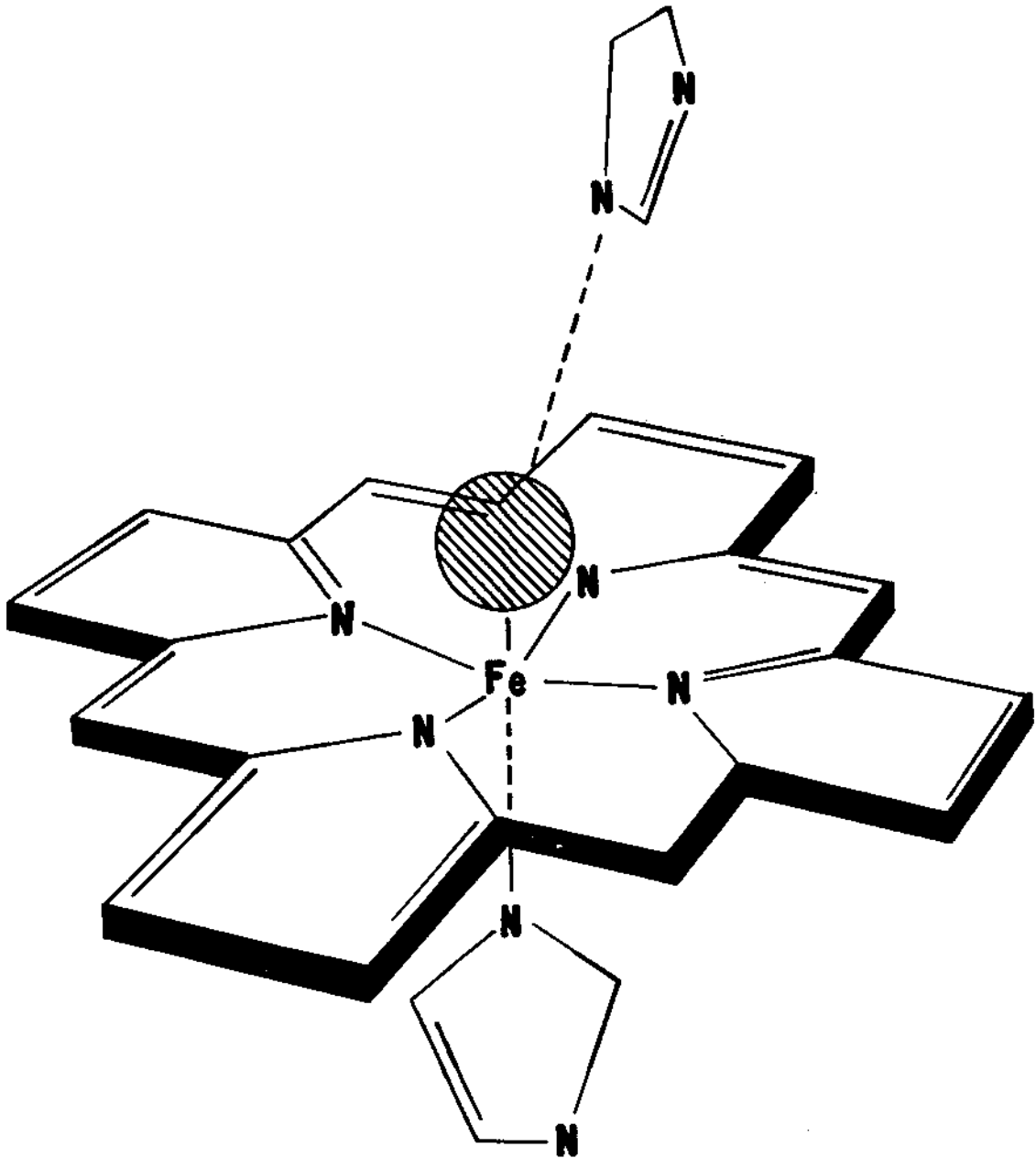


Fig. 1

$Fe^{3+}(3d)^5 :$ 

$S = \frac{5}{2} \quad Hb - H_2O$



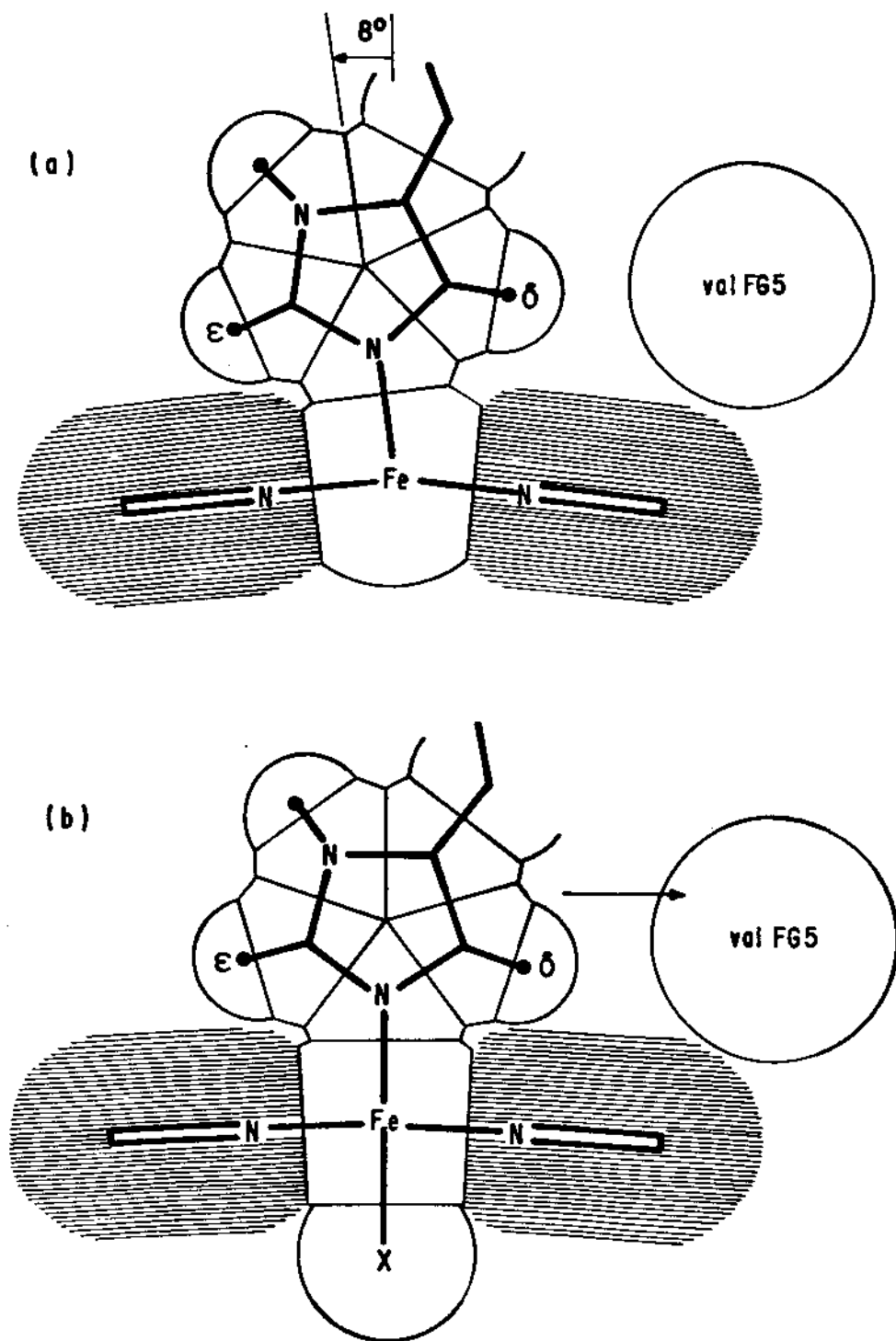
$S = \frac{1}{2} \quad Hb - CN$

 $Fe^{2+}(3d)^6 :$ 

$S = 2 \quad Hb$



$S = 0 \quad Hb O_2$



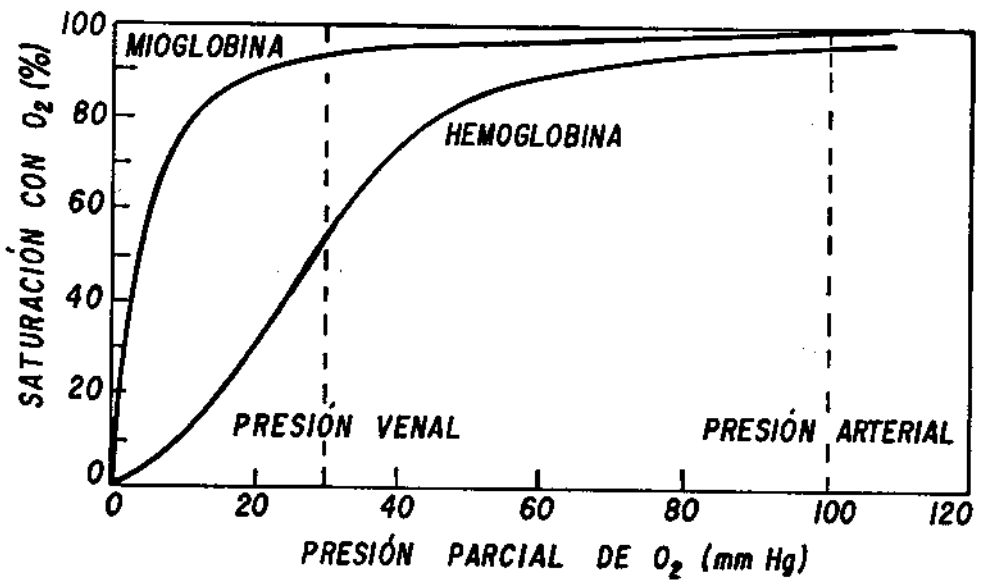


Fig. 4

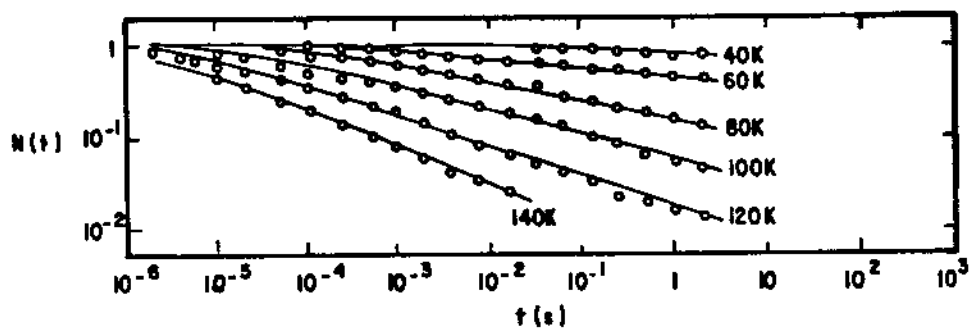


Fig. 5

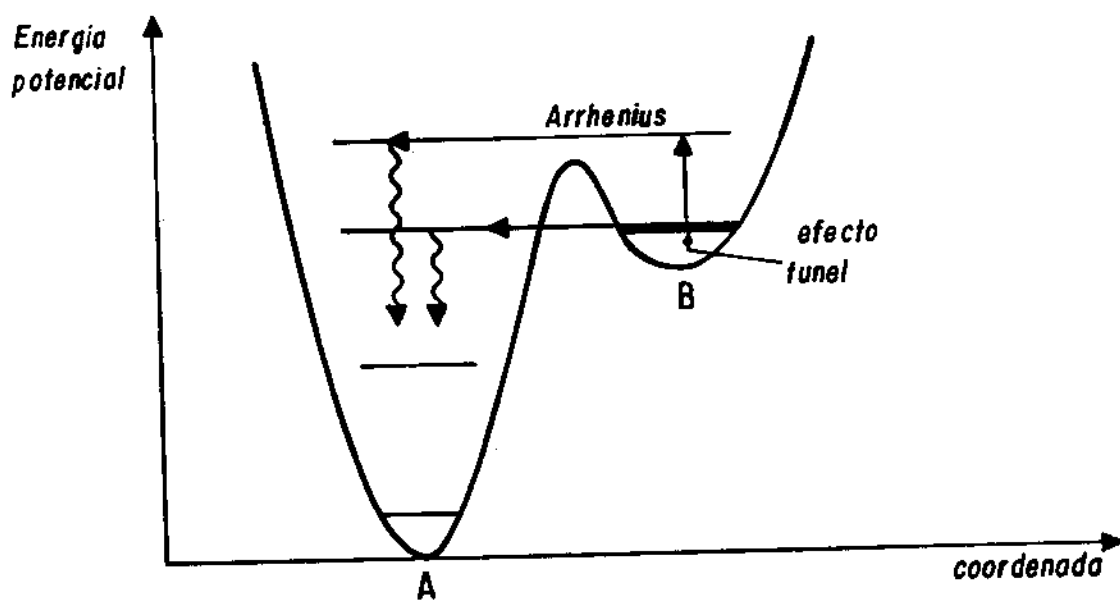


Fig. 6

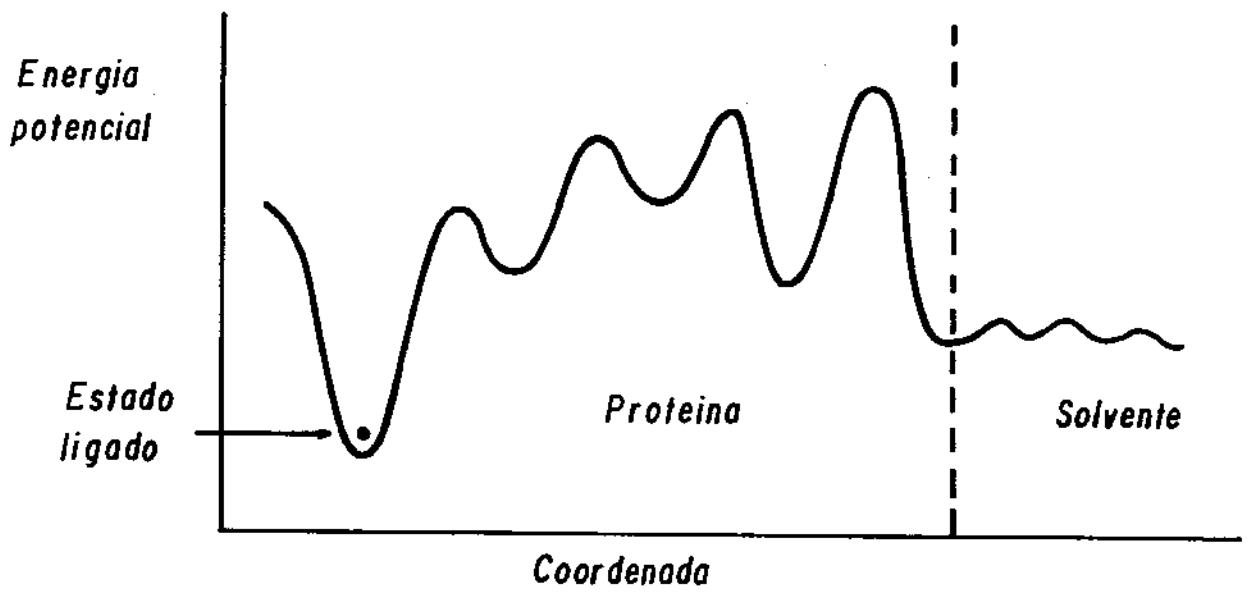


Fig. 7

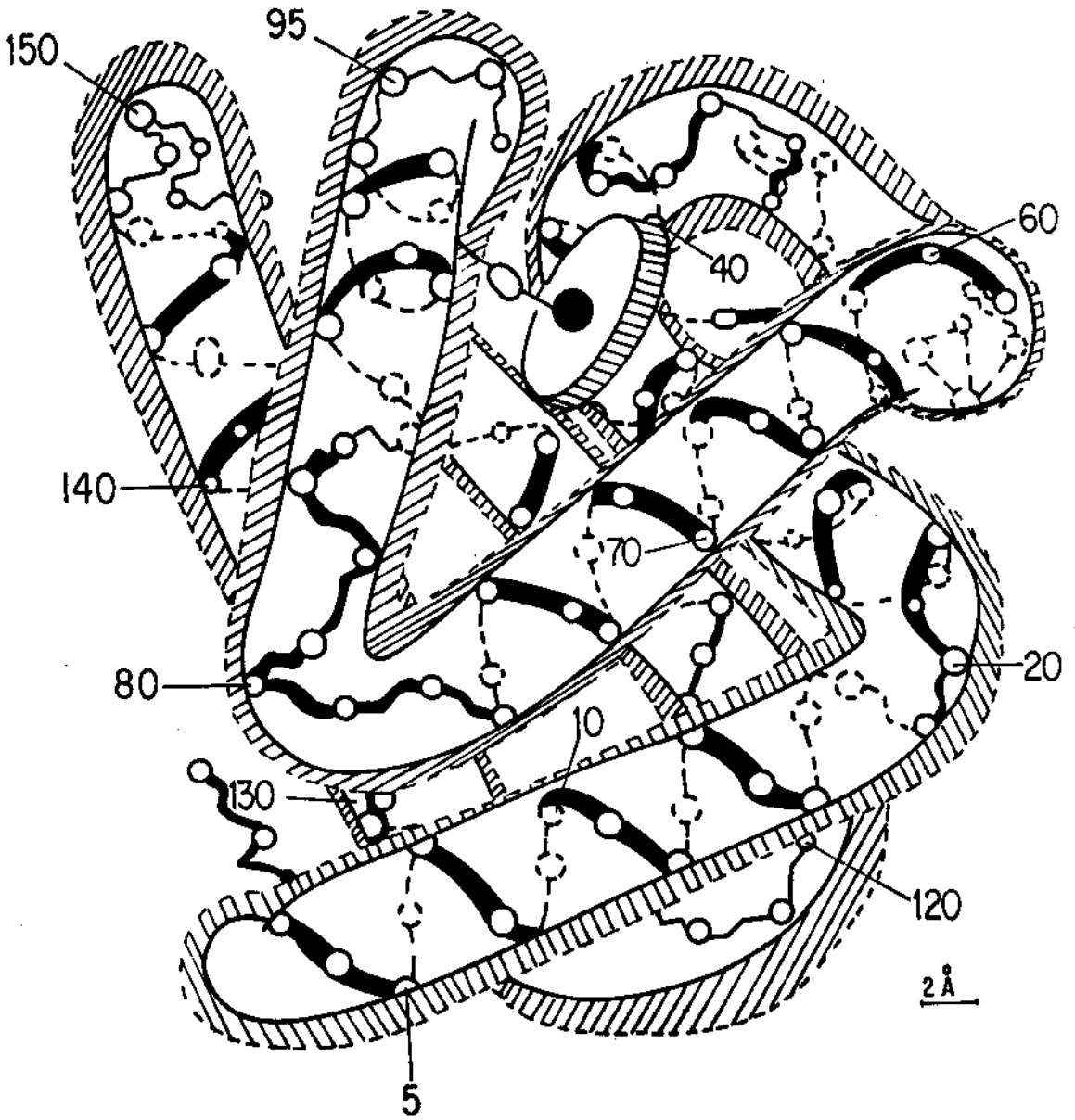


Fig. 8

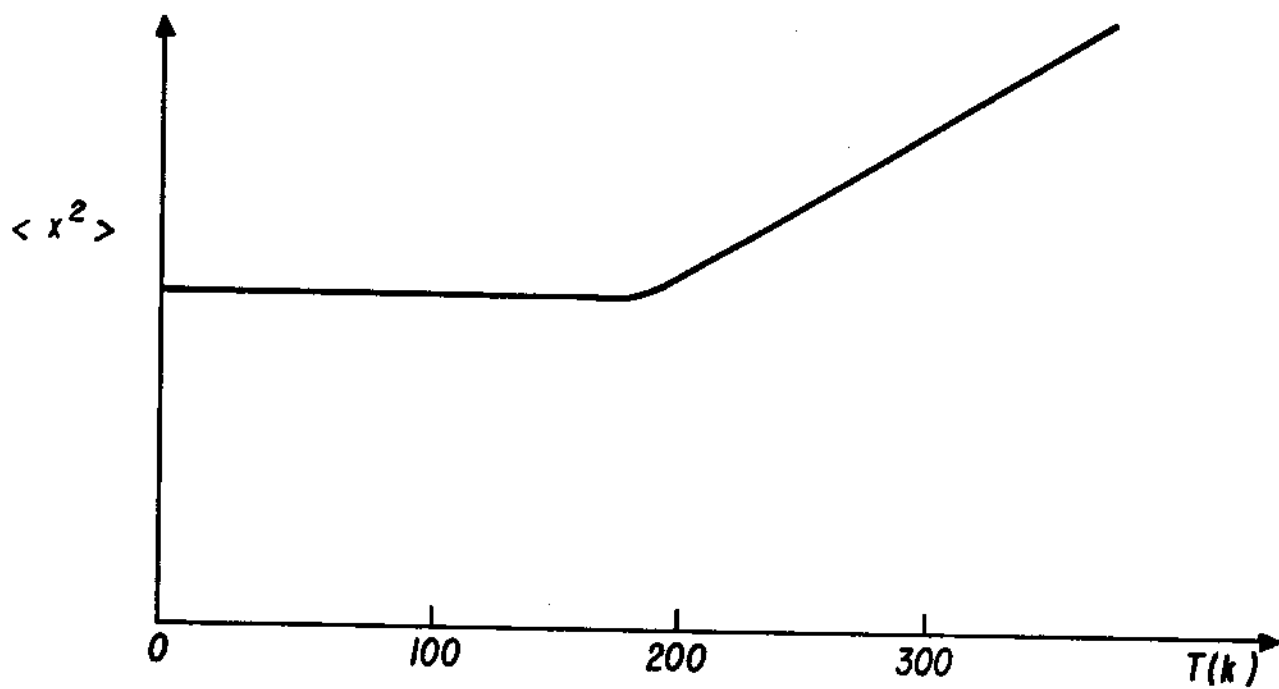


Fig. 9

REFERENCIAS

1. J.C. Kendrew, R.E. Dickerson, B.E. Strandberg, R.G. Hart, D.R. Davies, D.C. Phillips, V.C. Shore.
Nature 185, 422-427 (1960)
2. M.P. Perutz, Scientific American, Nov. 64-76 (1964)
3. M. Weissbluth. "Hemoglobin", ed. Springer-Verlag (1974)
4. J. Mondó, J. Wyman, J.P. Changeux, J. Mol. Biol. 12, 88-118 (1965)
5. L.D. Landau, E.M. Lifshitz - "Statistical Physical" ed. Pergamon, London (1958)
6. R.H. Austin, K.W. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, I.C. Gunsalus Biochem. 14, 5355-5373 (1975)
7. A. Ansari, J. Berendzen, S. Bowne, H. Frauenfelder, I. Iben, T. Sauke, E. Shyamsunder, R. Young, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5000-5004 (1985)
8. H. Frauenfelder, G. Petsko, D. Tsernoglou, Nature 280, 558-563 (1979)
9. F. Parak, E.N. Frolov, R.L. Mossbauer, V.I. Goldanski, J. Mol. Biol. 145, 825-833 (1981)
10. H. Frauenfelder, P.G. Wolynes, Science 229, 337-345 (1985)
11. R.E. Dickerson, I. Geis - "Hemoglobin: Structure, function, evolution, and pathology", ed. The Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc., (1983).