

Puesto que las proteínas participan de un modo u otro en todos los procesos químicos de un organismo vivo, se podría esperar que la elucidación de sus estructuras y de sus transformaciones permitiera obtener información altamente significativa para el ámbito de la química biológica.

—Emil Fischer, artículo en *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft zu Berlin*, 1906

# Función de las proteínas

- 5.1 Unión reversible de una proteína a un ligando: proteínas de unión a oxígeno 154
- 5.2 Interacciones complementarias entre proteínas y ligandos: el sistema inmune y las inmunoglobulinas 170
- 5.3 Interacciones proteicas moduladas por energía química: actina, miosina y motores moleculares 175

El conocimiento de la estructura tridimensional de una proteína es un paso importante para poder entender cómo funciona. Sin embargo, la estructura bidimensional estática que se muestra sobre una página tiene poco que ver con la realidad. Las proteínas son moléculas dinámicas cuyas funciones dependen, de modo casi invariable, de las interacciones con otras moléculas. Estas interacciones se ven afectadas por cambios, a veces espectaculares y otras sutiles, de la conformación proteica que pueden desencadenar importantes efectos fisiológicos. En este capítulo estudiaremos cómo interaccionan las proteínas con otras moléculas y cómo se relacionan estas interacciones con la estructura dinámica de las proteínas. Es muy difícil sobreestimar la importancia de las interacciones moleculares para la función proteica. Como vimos en el Capítulo 4, la función de las proteínas fibrosas como elementos estructurales de las células y los tejidos, se basa en interacciones cuaternarias estables entre cadenas polipeptídicas idénticas. En este capítulo veremos que las funciones de otras muchas proteínas implican interacciones con una variedad de moléculas diferentes. La mayoría de estas interacciones son transitorias, a pesar de que pueden constituir la base de complejos procesos fisiológicos, tales como el transporte de oxígeno, la función inmunitaria y la contracción muscular, los temas que examinamos con detalle en este capítulo. Las proteínas que llevan a cabo estos procesos ilustran los principios fundamentales de la función proteica que se explican a continuación, algunos de los cuales resultarán familiares del capítulo anterior:

Las funciones de muchas proteínas implican la unión reversible de otras moléculas. Una molécula unida de manera reversible por una proteína se conoce con el nombre de **ligando**. Un ligando puede ser cualquier tipo de molécula, incluidas

otras proteínas. La naturaleza transitoria de las interacciones proteína-ligando es crítica para la vida, ya que permiten al organismo responder de manera rápida y reversible al medio ambiente cambiante y a las circunstancias metabólicas.

El ligando se une a un lugar de la proteína llamado **sitio de fijación**, que es complementario al ligando en tamaño, forma, carga y carácter hidrofóbico o hidrofílico. Además, la interacción es específica: la proteína puede discriminar entre las miles de moléculas diferentes de su entorno y unir selectivamente sólo una o unas pocas. Una proteína puede tener diferentes sitios de fijación para diferentes ligandos. Estas interacciones moleculares específicas son cruciales para mantener el alto grado de orden de un sistema vivo. (Esta discusión excluye la unión de agua, que puede interaccionar débilmente y de manera no específica con diferentes partes de una proteína. En el Capítulo 6 se estudia el agua como un ligando específico para muchos enzimas.)

Las proteínas son flexibles. Los cambios en su conformación pueden ser sutiles, reflejando vibraciones moleculares y pequeños movimientos de los residuos de aminoácidos a lo largo de la proteína. De una proteína que se flexiona de este modo se dice a veces que “respira”. Los cambios en la conformación pueden ser también muy grandes, con segmentos importantes de la estructura de la proteína desplazándose incluso varios nanómetros. Ciertos cambios específicos de la conformación acostumbran a ser esenciales para la función proteica.

La unión de una proteína con un ligando está asociada con un cambio conformacional que hace que el sitio de fijación sea más complementario al ligando, lo que permite una unión más fuerte. La adaptación estructural que se produce entre la proteína y el ligando se llama **encaje inducido**.

En una proteína con varias subunidades, un cambio de conformación en una subunidad afecta a menudo a la conformación de las otras subunidades.

Las interacciones entre ligandos y proteínas pueden ser reguladas, habitualmente mediante interacciones específicas con uno o más ligandos adicionales. Estos otros ligandos pueden provocar cambios conformacionales que afecten a la unión del primer ligando.

Los enzimas representan un caso especial en la función proteica. Los enzimas unen y transforman químicamente otras moléculas: catalizan reacciones. Las moléculas sobre las que actúan los enzimas se llaman **sustratos** de la reacción, en lugar de ligandos, y el sitio de fijación del ligando se llama **sitio catalítico** o **sitio activo**. En este capítulo insistiremos sobre las funciones no catalíticas de las proteínas. En el Capítulo 6 trataremos la catálisis enzimática, un tema central en bioquímica. Veremos como el tratamiento de los temas de este capítulo (unión, especificidad y cambios de conformación) continúan en el próximo capítulo, con el elemento añadido de que las proteínas actuarán en transformaciones químicas.

## 5.1 Unión reversible de una proteína a un ligando: proteínas de unión a oxígeno

La mioglobina y la hemoglobina son posiblemente las dos proteínas más estudiadas y mejor conocidas. Fueron las primeras de las que se determinó su estructura tridimensional, y con estas dos moléculas se ilustran casi todos los aspectos de uno de los procesos bioquímicos más importantes: la unión reversible de un ligando a una proteína. Este modelo clásico de la función proteica nos dará una gran cantidad de información sobre cómo trabajan las proteínas. **Proteínas de unión a oxígeno – Mioglobina: almacenamiento de oxígeno**

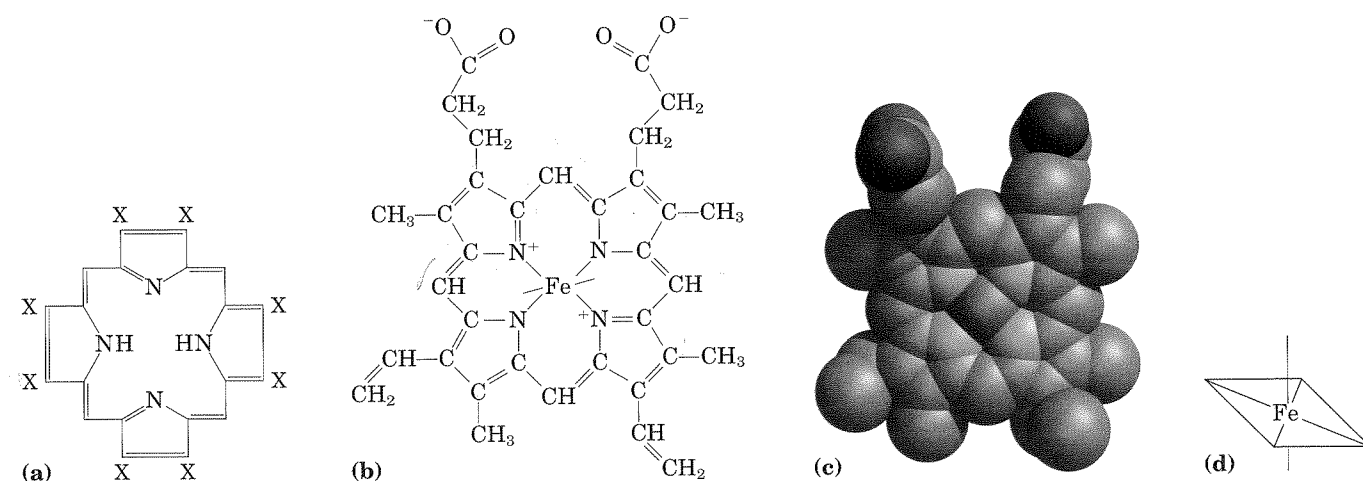
### El oxígeno puede estar unido a un grupo prostético hemo

El oxígeno no es muy soluble en el agua (véase la Tabla 2-3) y no puede transportarse a los tejidos en cantidad suficiente por simple disolución en el suero sanguíneo. La difusión del oxígeno a través de los tejidos es también insuficiente a lo largo de distancias superiores a pocos milímetros. La evolución de animales multicelulares grandes dependió de la evolución de proteínas que pudiesen transportar y almacenar oxígeno. Sin embargo, ninguna de las cadenas laterales de los aminoácidos proteicos es adecuada para la unión reversible de moléculas de oxígeno.

Este papel es desempeñado por ciertos metales de transición, entre ellos el hierro y el cobre, que tienen una fuerte tendencia a unir oxígeno. Los organismos multicelulares explotan las propiedades de los metales, normalmente del hierro, para el transporte de oxígeno. Sin embargo, el hierro libre provoca la formación de especies altamente reactivas del oxígeno, tales como los radicales hidroxilo, que pueden dañar el DNA u otras macromoléculas. Por lo tanto, el hierro utilizado en las células está presente en formas que lo secuestran, lo hacen menos reactivo o las dos cosas a la vez. En los organismos multicelulares, especialmente en aquellos en los que el hierro, en su calidad de transportador de oxígeno, debe ser transportado a lo largo de grandes distancias, el hierro suele estar incorporado a un grupo prostético unido a una proteína, llamado grupo **hemo**. (Recuerde que en el Capítulo 3 vimos que un grupo prostético es un compuesto asociado permanentemente a una proteína y que contribuye a su función.)

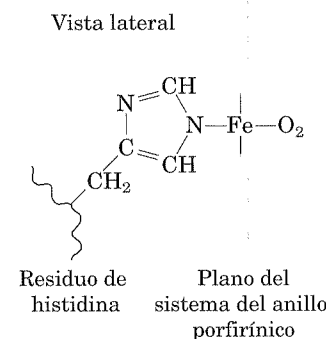
El grupo hemo tiene una estructura de anillo orgánico complejo, **protoforpirina**, al cual está unido un único átomo de hierro en su estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Fig. 5-1). El átomo de hierro tiene seis enlaces de coordinación, cuatro con átomos de nitrógeno que forman parte del sistema plano del **anillo de porfirina** y dos perpendiculares a la porfirina. Los átomos de nitrógeno coordinados (que tienen carácter de dadores de electrones) ayudan a evitar la conversión del hierro hemo al estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). El hierro en estado  $\text{Fe}^{2+}$  une oxígeno de manera reversible, mientras que en el estado  $\text{Fe}^{3+}$  no une oxígeno. El grupo hemo se encuentra en muchas proteínas transportadoras de oxígeno, y también en algunas proteínas, como los citocromos, que participan en reacciones de oxidación-reducción (transferencia de electrones) (Capítulo 19).

Las moléculas de hemo libres (no unidas a proteínas), dejan al  $\text{Fe}^{2+}$  con dos enlaces de coordinación "abiertos". La reacción simultánea de una molécula de  $\text{O}_2$  con dos moléculas de hemo libres (o con dos  $\text{Fe}^{2+}$  libres) puede dar lugar a la conversión irreversible del  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . En las proteínas que contienen el hemo, esta reacción se evita secuestrando cada grupo hemo en un lugar suficientemente profundo dentro de la estructura



**FIGURA 5-1 El grupo hemo.** El grupo hemo está presente en la mioglobina, hemoglobina y en muchas otras proteínas llamadas proteínas hemo o hemo-proteínas. El grupo hemo consiste en un anillo orgánico complejo, la protoforpirina IX, al cual se une un átomo de hierro en su estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). (a) Las porfirinas, de las que la protoforpirina IX es sólo un ejemplo, consisten en cua-

tro anillos pirrol unidos por puentes meteno, con sustituciones en una o más de las posiciones marcadas como X. (b, c) Se muestran dos representaciones del grupo hemo (de PDB ID 1CCR). El átomo de hierro del grupo hemo posee seis enlaces de coordinación: cuatro de ellos unidos al anillo plano de la porfirina y en su mismo plano, y (d) otros dos perpendiculares a este plano.



**FIGURA 5-2 Vista lateral del grupo hemo.** Esta perspectiva muestra los dos enlaces de coordinación del  $\text{Fe}^{2+}$  perpendiculares al sistema del anillo porfirina. Uno de estos dos enlaces está ocupado por un residuo His, a veces llamada His próxima; el otro es el sitio de fijación del oxígeno. Los cuatro enlaces de coordinación restantes están unidos al sistema de anillo porfirínico y se encuentran en el mismo plano.

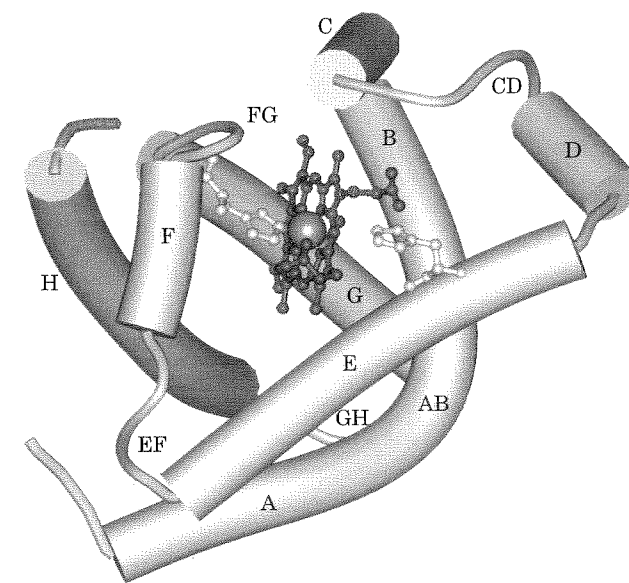
proteica. Así, el acceso a los dos enlaces de coordinación abiertos está restringido. Uno de esos dos enlaces de coordinación está ocupado por el nitrógeno de la cadena lateral de un residuo His. El otro es el sitio de fijación del oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) (Fig. 5-2). Las propiedades electrónicas del hierro del grupo hemo cambian cuando se une el oxígeno, provocando el cambio de color de la sangre desde el púrpura oscuro de la sangre venosa sin oxígeno al rojo brillante de la sangre arterial rica en oxígeno. Algunas moléculas pequeñas, como el monóxido de carbono (CO) y el óxido nítrico (NO) pueden coordinarse con el hierro del grupo hemo con mayor afinidad que el  $\text{O}_2$ . Cuando una molécula de CO se une al grupo hemo el  $\text{O}_2$  queda excluido, siendo ésta la razón por la que el CO es altamente tóxico para los organismos aeróbicos (como se puede ver en el Recuadro 5-1). Las proteínas de unión a oxígeno regulan el acceso del CO y otras moléculas pequeñas al hierro del grupo hemo mediante el secuestro e inclusión del grupo hemo en su estructura.

### La mioglobina tiene un único sitio de fijación para el oxígeno

La mioglobina ( $M_r$  16.700; abreviada Mb) es una proteína de unión a oxígeno relativamente simple y que está presente en prácticamente todos los mamíferos, sobre todo en el tejido muscular. Al ser una proteína de transporte, facilita la difusión del oxígeno en el músculo. Es especialmente abundante en el músculo de los animales que se sumergen, tales como focas y ballenas, que deben almacenar suficiente oxígeno para estancias prolongadas bajo el mar. Hay proteínas muy similares a la mioglobina que están ampliamente distribuidas, presentes incluso en algunos organismos unicelulares.

La mioglobina consta de un único polipéptido de 153 aminoácidos con una molécula de hemo. Es un ejemplo típico de la familia de proteínas llamadas **globinas**, que poseen estructuras primarias y terciarias similares. El polipéptido está formado por ocho segmentos de hélice  $\alpha$  conectados por giros (Fig. 5-3). Alrededor de un 78% de los residuos aminoácidos presentes en la proteína se encuentran en estas hélices  $\alpha$ .

Cualquier discusión detallada sobre la función de una proteína implica inevitablemente su estructura. La introducción de algunas convenciones estructurales propias de las globinas facilitará nuestro tratamiento de la mioglobina. Tal como se ve en la



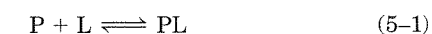
**FIGURA 5-3 Mioglobina.** (PDB ID 1MBO) Los ocho segmentos de hélice  $\alpha$  (mostrados aquí como cilindros) están marcados de la A a la H. Los residuos de conexión, que no forman parte de las hélices, se nombran como AB, CD, EF..., indicando los segmentos que interconectan. Algunos giros, tales como BC y DE, son abruptos, y no contienen residuos; normalmente no hay un nombre específico para ellos. (El segmento corto visible entre D y E es un artefacto de la representación por ordenador.) El grupo hemo está unido a una bolsa formada principalmente por las hélices E y F, aunque también participan algunos aminoácidos de otros segmentos.

Figura 5-3, los segmentos helicoidales se nombran de la A a la H. Un residuo aminoácido individual puede designarse por su posición en la secuencia de aminoácidos o por su localización dentro de la secuencia de un segmento concreto de hélice  $\alpha$ . Por ejemplo, el residuo His coordinado al grupo hemo en la mioglobina, His<sup>93</sup> (el aminoácido n° 93 desde el extremo amino-terminal de la secuencia polipeptídica de la mioglobina) se llama también HisF8 (el 8° residuo de la hélice  $\alpha$  F). Los giros en la estructura se denominan AB, CD, EF, FG, etc., indicando los segmentos de hélice  $\alpha$  que conectan.

### Las interacciones proteína-ligando se pueden describir cuantitativamente

La función de la mioglobina depende no sólo de la capacidad de la proteína de unir oxígeno, sino también de ser capaz de liberarlo cuando y donde sea necesario. La función bioquímica depende a menudo de una interacción reversible proteína-ligando de este tipo. Una descripción cuantitativa de esta interacción es, por tanto, un aspecto clave en muchas investigaciones bioquímicas.

En general, la unión reversible de una proteína (P) a un ligando (L) puede describirse por una simple **expresión de equilibrio**:



La reacción se caracteriza por una constante de equilibrio  $K_a$ , de manera que

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{k_a}{k_d} \quad (5-2)$$

donde  $k_a$  y  $k_d$  son constantes de velocidad (insistiremos en ellos más adelante). El término  $K_a$  es una **constante de asociación** (no hay que confundirla con la  $K_a$  que representa la constante de disociación de un ácido; p. 58) que describe el equilibrio entre el complejo y sus componentes libres no unidos. La constante de asociación proporciona una medida de la afinidad del ligando L por la proteína. La  $K_a$  tiene unidades de  $M^{-1}$ ; un valor más alto de  $K_a$  corresponde a una mayor afinidad del ligando.

El término del equilibrio  $K_a$  es también equivalente a la relación entre las velocidades de reacción hacia la derecha (asociación) y hacia la izquierda (disociación) relacionadas con la formación del complejo PL. La velocidad de asociación se describe con la constante de velocidad  $k_a$  y la de disociación con la constante de velocidad  $k_d$ . Como se discutirá en el capítulo siguiente, las constantes de velocidad son constantes de proporcionalidad que describen la fracción del total de reactivo que reacciona en una fracción de tiempo determinada. Cuando en la reacción interviene una sola molécula, como en la disociación  $PL \rightarrow P + L$ , la reacción es de *primer orden* y las unidades de la constante de velocidad ( $k_d$ ) se expresan como inversos del tiempo ( $s^{-1}$ ). Cuando en la reacción intervienen dos moléculas, como en la reacción de asociación  $P + L \rightarrow PL$ , se llama de *segundo orden* y las unidades de su constante de velocidad ( $k_a$ ) son  $M^{-1}s^{-1}$ .

**CONVENCIÓN CLAVE:** Las constantes de equilibrio se representan con una  $K$  y las constantes de velocidad con una  $k$ .

La redistribución de la primera parte de la ecuación 5-2 muestra que la relación entre proteína unida y proteína libre es directamente proporcional a la concentración de ligando libre:

$$K_a[L] = \frac{[PL]}{[P]} \quad (5-3)$$

Cuando la concentración de ligando es mucho mayor que la concentración de sitios de fijación de ligando, la unión de ligando por parte de la proteína no afecta de manera significativa a la concentración de ligando libre (no unido), con lo que  $[L]$  permanece constante. Esta situación es aplicable en general a la mayoría de ligandos que se unen a las proteínas en las células y simplifica nuestra descripción del equilibrio de unión.

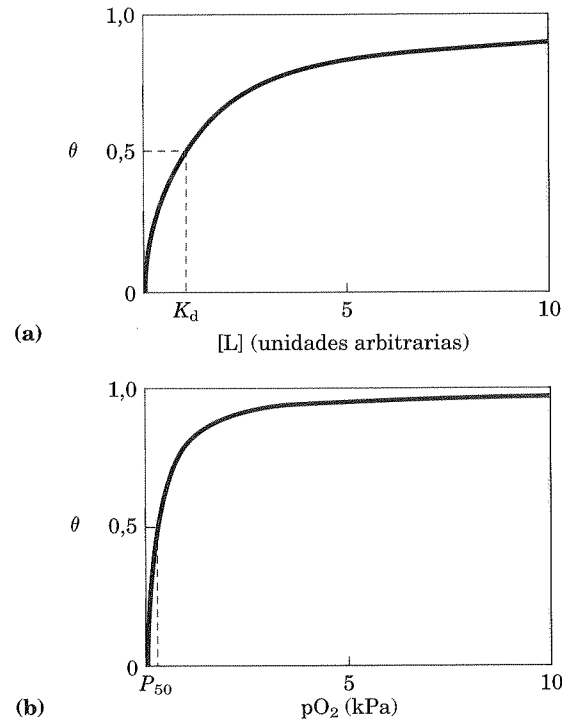
Podemos ahora considerar la constante de equilibrio en función de la fracción,  $\theta$  (teta), de sitios de fijación de ligando de la proteína que están ocupados por el ligando:

$$\theta = \frac{\text{sitios de fijación ocupados}}{\text{sitios de fijación totales}} = \frac{[PL]}{[PL] + [P]} \quad (5-4)$$

Sustituyendo  $K_a[L][P]$  por  $[PL]$  (véase la ecuación 5-3) y reorganizando los términos tenemos:

$$\theta = \frac{K_a[L][P]}{K_a[L][P] + [P]} = \frac{K_a[L]}{K_a[L] + 1} = \frac{[L]}{[L] + \frac{1}{K_a}} \quad (5-5)$$

El término  $K_a$  puede ser determinado a partir de una representación de  $\theta$  frente a la concentración de ligando libre,  $[L]$  (Fig. 5-4a). Cualquier ecuación de la forma  $x = y/(y+z)$  describe una hipérbola, por lo que  $\theta$  es una función hiperbólica de  $[L]$ . La fracción de sitios de fijación de ligando ocupados tiende a la saturación de manera asintótica al aumentar  $[L]$ .



**FIGURA 5-4** Representaciones gráficas de la unión de ligando. Se representa a proporción de centros de unión a ligando ocupados,  $\theta$ , frente a la concentración de ligando libre. Ambas curvas son hipérbolas rectangulares. (a) Curva hipotética de unión a un ligando L. La  $[L]$  necesaria para ocupar la mitad de los centros de unión a ligando disponibles es equivalente a  $1/K_a$  o  $K_d$ . La curva tiene una asíntota horizontal en  $\theta = 1$  y una asíntota vertical (no mostrada) en  $[L] = -1/K_a$ . (b) Curva representativa de la unión de oxígeno a la mioglobina. La presión parcial de  $O_2$  en el aire sobre la solución se expresa en kilopascales (kPa). El oxígeno se une con fuerza a la mioglobina con una  $P_{50}$  de sólo 0,26 kPa.

La  $[L]$  a la que la mitad de los sitios de fijación de ligando disponibles están ocupados (es decir,  $\theta = 0,5$ ) corresponde a  $1/K_a$ .

Sin embargo, a veces es más frecuente (e intuitivamente más sencillo) considerar la **constante de disociación,  $K_d$** , que es el recíproco de  $K_a$  ( $K_d = 1/K_a$ ) y que se expresa en unidades de concentración molar (M).  $K_d$  es la constante de equilibrio para la liberación del ligando. Las ecuaciones cambian a:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_d}{k_a} \quad (5-6)$$

$$[PL] = \frac{[P][L]}{K_d} \quad (5-7)$$

$$\theta = \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad (5-8)$$

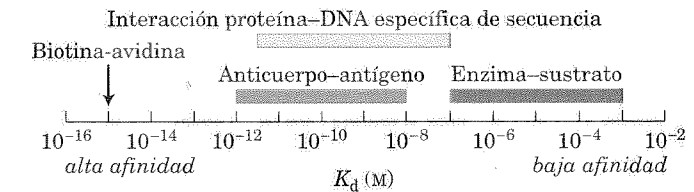
Cuando  $[L]$  es igual a  $K_d$  la mitad de los sitios de fijación de ligando están ocupados. Cuando  $[L]$  desciende por debajo de  $K_d$ , cada vez hay menos proteína con ligando unido. Para que un 90% de los sitios de fijación de ligando disponibles estén ocupados,  $[L]$  debe ser nueve veces mayor que  $K_d$ .

En la práctica,  $K_d$  se utiliza mucho más a menudo que  $K_a$  para expresar la afinidad de una proteína por su ligando. Observe que un valor más bajo de  $K_d$  corresponde a una mayor afinidad del ligando por la proteína. Las operaciones matemáticas pueden reducirse a frases simples:  $K_d$  equivale a la concentración molar de ligando a la cual la mitad de los sitios de fijación

**TABLA 5-1** Constantes de disociación para algunas proteínas

Proteína	Ligando	$K_d$ (M)*
Avidina (clara de huevo)	Biotina	$1 \times 10^{-15}$
Receptor de insulina (humano)	Insulina	$1 \times 10^{-10}$
Inmunoglobulina anti-VIH (humana) <sup>†</sup>	gp41 (prot. de superficie del VIH-1)	$4 \times 10^{-10}$
Proteína de unión a níquel ( <i>E. coli</i> )	$Ni^{2+}$	$1 \times 10^{-7}$
Calmodulina (rata) <sup>‡</sup>	$Ca^{2+}$	$3 \times 10^{-6}$
		$2 \times 10^{-5}$

Interacciones receptor-ligando típicas



Las barras coloreadas indican el intervalo de valores de las constantes de disociación de diversas clases de interacciones en sistemas biológicos. Unas pocas interacciones, como la de la proteína avidina y el cofactor enzimático biotina, caen fuera de los márgenes normales. La interacción avidina-biotina es tan fuerte que se considera irreversible. Las interacciones proteína-DNA dirigidas por la secuencia se refieren a proteínas que se unen a una secuencia particular de nucleótidos en el DNA, en contraste con la unión general a cualquier sitio del DNA.

\*La constante de disociación citada es válida tan sólo para las condiciones de disolución en las cuales fue determinada. Los valores de  $K_d$  para una interacción proteína-ligando pueden ser alterados, en ocasiones en varios órdenes de magnitud, por cambios en variables de la solución tales como la concentración de sales, el pH u otras variables.

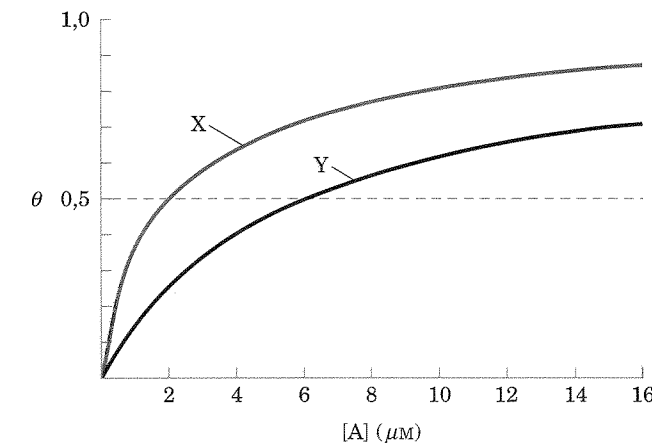
<sup>†</sup>Esta inmunoglobulina fue aislada en el intento del desarrollo de una vacuna frente al VIH. Las inmunoglobulinas (descritas en este capítulo) son altamente variables, y la  $K_d$  citada aquí no debe considerarse característica de todas las inmunoglobulinas.

<sup>‡</sup>La calmodulina tiene cuatro sitios de fijación para el calcio. Los valores mostrados reflejan los sitios de fijación de menor y mayor afinidad observados en una serie de medidas.

de ligando disponibles están ocupados. En este punto, se dice que la proteína ha alcanzado su punto medio de saturación con respecto a la unión de ligando. Cuanto más fuerte es la unión de una proteína a su ligando, menor será la concentración de ligando requerida para que estén ocupados la mitad de los sitios de fijación, y por tanto menor será el valor de  $K_d$ . En la tabla 5-1 se proporcionan algunas constantes de disociación significativas; la escala muestra el intervalo de valores observado normalmente por las constantes de disociación en sistemas biológicos.

### EJEMPLO PRÁCTICO 5-1 Constantes de disociación receptor-ligando

Dos proteínas X e Y se unen al mismo ligando A, y presentan las curvas de unión que se muestran a continuación.



¿Cuál es la constante de disociación,  $K_d$ , para cada proteína? ¿Qué proteína (X o Y) tiene mayor afinidad por A?

**Solución:** Podemos determinar las constantes de disociación examinando la gráfica. Ya que  $\theta$  representa la fracción de sitios de fijación ocupados por el ligando, la concentración de ligando a la que están ocupados la mitad de los sitios, es decir, el punto en el que la curva de fijación cruza la línea donde  $\theta = 0,5$ , es la constante de disociación. Para X,  $K_d = 2 \mu M$ ; para Y,  $K_d = 6 \mu M$ . Al llegar al punto medio de saturación por  $[A]$  a valores más bajos, X tiene mayor afinidad por el ligando.

La unión de oxígeno a la mioglobina sigue los patrones descritos anteriormente. Sin embargo, al ser el oxígeno un gas, debemos hacer algunos ajustes mínimos en las ecuaciones para poder proceder con más facilidad a los experimentos necesarios. En primer lugar sustituimos la concentración de oxígeno disuelto por  $[L]$  en la ecuación 5-8 para tener

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + K_d} \quad (5-9)$$

Como para cualquier ligando,  $K_d$  es igual a la  $[O_2]$  a la que están ocupados la mitad de los sitios de fijación de ligando disponibles, o  $[O_2]_{0,5}$ . La ecuación 5-9 pasa a ser

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + [O_2]_{0,5}} \quad (5-10)$$

En los experimentos en los que el oxígeno es el ligando, el parámetro que varía es la presión parcial de oxígeno ( $pO_2$ ) en la fase gaseosa que se encuentra sobre la disolución debido a que es más fácil de medir que la concentración de oxígeno disuelto. La concentración de una sustancia volátil en disolución es siempre proporcional a la presión parcial local en la fase gaseosa. Si definimos la presión parcial de oxígeno a  $[O_2]_{0,5}$  como  $P_{50}$ , la sustitución en la ecuación 5-10 da

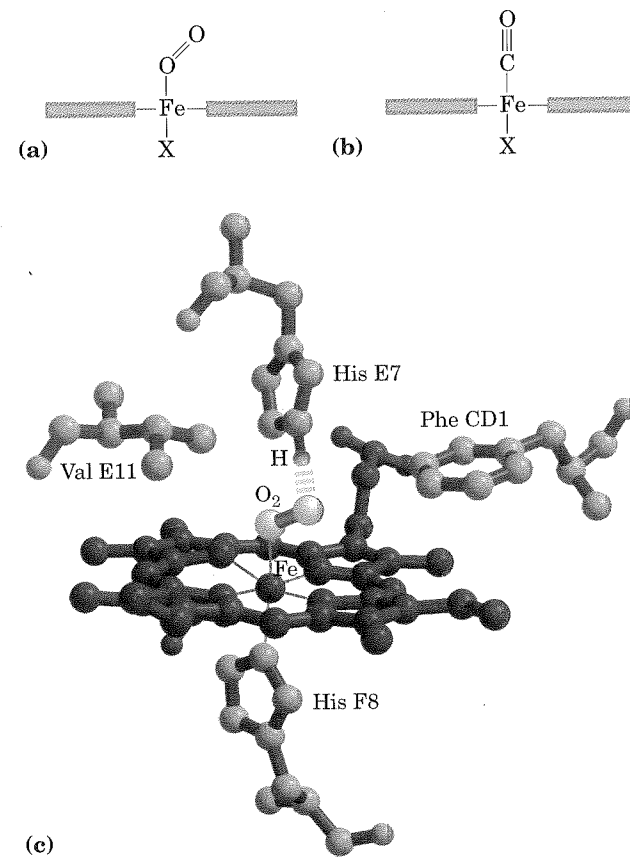
$$\theta = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}} \quad (5-11)$$

Una curva de unión para la mioglobina que relaciona  $\theta$  con  $pO_2$  se muestra en la Figura 5-4b.

### La estructura proteica afecta al modo de unión del ligando

La unión de un ligando a una proteína no acostumbra a ser tan simple como podrían hacer pensar las ecuaciones vistas anteriormente. La interacción se ve afectada en gran medida por la estructura proteica y suele estar acompañada por cambios conformacionales. Por ejemplo, la especificidad con la que el grupo hemo se une a sus diversos ligandos se ve alterada cuando el hemo es un componente de la mioglobina. El monóxido de carbono se une unas 20.000 veces mejor que el  $O_2$  a las moléculas libres de grupo hemo (es decir, la  $K_d$  o  $P_{50}$  para la unión del CO es más de 20.000 veces menor que la del  $O_2$ ) pero se une tan solo unas 200 veces mejor que el  $O_2$  cuando el grupo hemo está unido a la mioglobina. La diferencia se explica en parte por un impedimento estérico. Cuando el  $O_2$  se une al grupo hemo libre, el eje de la molécula de oxígeno forma un ángulo respecto al enlace Fe-O (Fig. 5-5a). Por el contrario, cuando el CO se une al hemo libre, los átomos de Fe, C y O se sitúan en línea recta (Fig. 5-5b). En ambos casos, la unión refleja la geometría de orbitales híbridos de cada ligando. En la mioglobina la His<sup>64</sup> (His E7) del sitio de fijación de  $O_2$  del hemo está demasiado lejos para coordinarse con el hierro hemo, pero interacciona con un ligando unido al grupo hemo. Este residuo, llamado *His distal* (distinta de la *His próxima*, His F8), forma un enlace de hidrógeno con el  $O_2$  (Fig. 5-5c) pero puede impedir la formación del enlace lineal del CO, dando así una explicación para la disminución selectiva de la unión del CO al hemo de la mioglobina (y de la hemoglobina). La reducción en la unión del CO es importante fisiológicamente, debido a que el CO es un subproducto de baja concentración del metabolismo celular. Otros factores, no bien definidos aún, parecen intervenir en la modulación de la interacción del hemo con el CO en estas proteínas.

La unión del  $O_2$  al hemo en la mioglobina también depende de movimientos moleculares, o “respiración”, en la estructura proteica. La molécula de hemo está profundamente sepultada en el polipéptido plegado, sin que haya un camino directo para el oxígeno desde la disolución hasta el sitio de fijación de ligando. Si la proteína fuese rígida, el  $O_2$  no podría entrar o salir de la bolsa de hemo a una velocidad significativa. Sin embargo, la rápida flexión molecular de las cadenas laterales de los aminoácidos provoca la formación de cavidades transitorias en la estructura de la proteína, de manera que el  $O_2$  puede abrirse paso moviéndose a través de esas cavidades. Las simulaciones por ordenador de las rápidas fluctuaciones estructurales de la mioglobina sugieren que hay muchos caminos para el oxígeno.



**FIGURA 5-5 Efectos estéricos causados por la unión de ligando al grupo hemo de la mioglobina.** (a) El oxígeno se une al grupo hemo con el eje del  $O_2$  en ángulo, una conformación del enlace facilitada por la mioglobina. (b) El monóxido de carbono se une al hemo libre con el eje del CO perpendicular al plano del anillo de porfirina. Cuando se une al hemo en la mioglobina, el CO está forzado 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 (PDB ID 1MBO) muestra la disposición de los aminoácidos clave alrededor del hemo de la mioglobina. El  $O_2$  unido forma un enlace de hidrógeno con la His distal, la His E7 (His<sup>64</sup>), facilitando más aún la unión del  $O_2$ .

Una de las rutas principales viene proporcionada por la rotación de la cadena lateral de la His distal (His<sup>64</sup>), que tiene lugar en una escala de nanosegundos ( $10^{-9}$  s). Incluso cambios conformacionales sutiles pueden ser claves para la actividad proteica.

### El oxígeno es transportado en la sangre por la hemoglobina

**Proteínas de unión a oxígeno—Hemoglobina: Transporte de oxígeno** Prácticamente todo el oxígeno transportado por la sangre en los animales es unido y transportado por la hemoglobina de los eritrocitos (glóbulos rojos sanguíneos). Los eritrocitos humanos normales son discos bicóncavos pequeños (de 6 a 9  $\mu m$  de diámetro). Se forman a partir de células madre precursoras llamadas **hemocitoblastos**. En el proceso de maduración, las células madre generan células hija que producen grandes cantidades de hemoglobina y a continuación pierden sus órganos intracelulares (núcleo, mitocondria y retículo endoplasmático). Los eritrocitos son por lo tanto células vestigiales incompletas, incapaces de reproducirse y, en los humanos, destinadas a sobrevivir durante tan sólo unos 120 días. Su principal función es

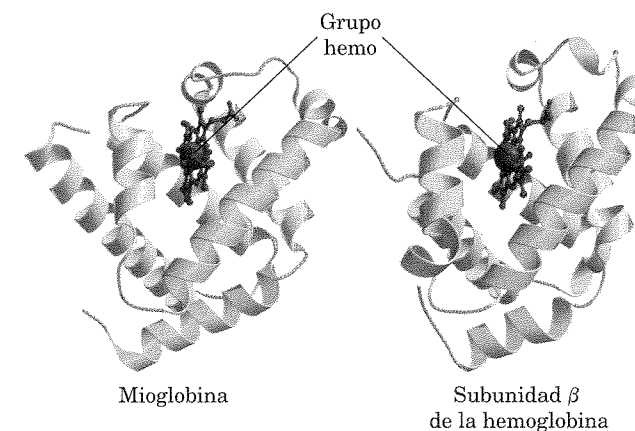
transportar hemoglobina la cual está disuelta en su citosol a una concentración muy alta (aproximadamente un 34% de su peso).

En la sangre arterial que pasa de los pulmones a través del corazón a los tejidos periféricos la hemoglobina está saturada con oxígeno en un 96%. En la sangre venosa que vuelve al corazón está saturada sólo en un 64%. Por lo tanto, cada 100 mL de sangre que pasa a través de los tejidos libera aproximadamente un tercio del oxígeno que transporta, o 6,5 mL de  $O_2$  gaseoso a presión atmosférica y temperatura corporal.

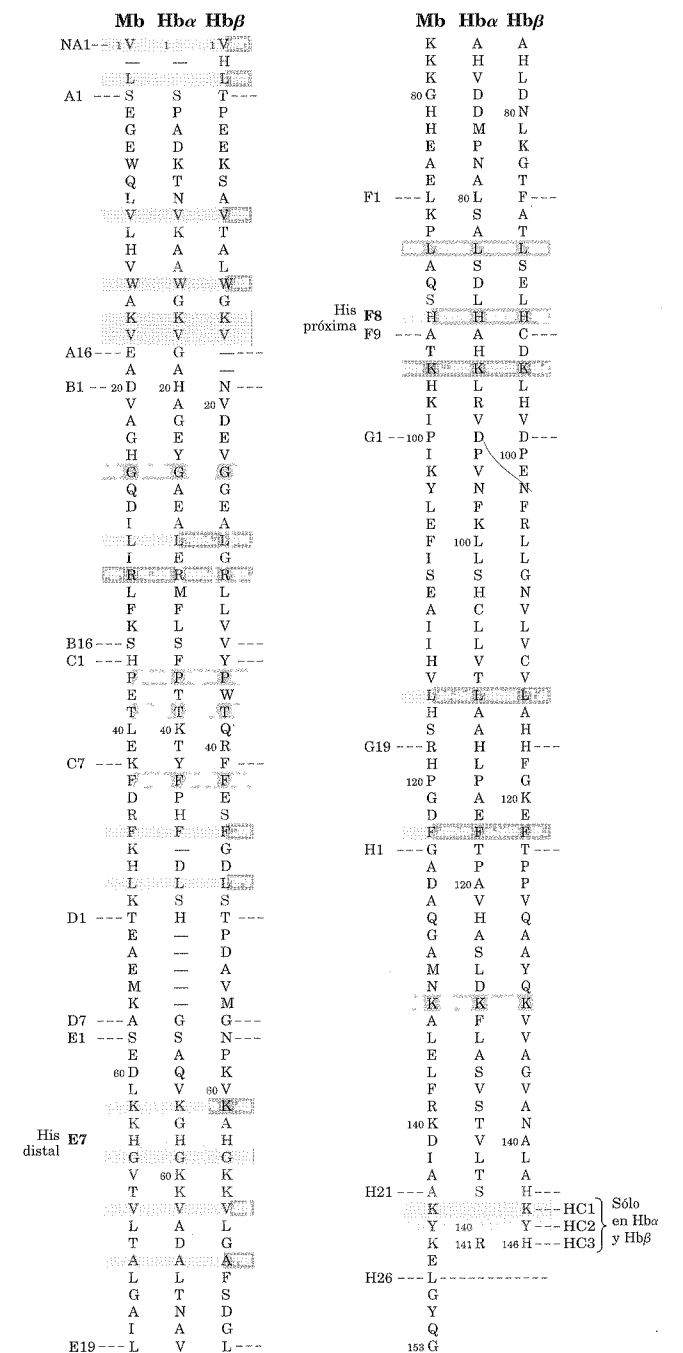
La mioglobina, con su curva hiperbólica de unión al oxígeno (Fig. 5-4b), es relativamente insensible a pequeños cambios en la concentración del oxígeno disuelto y por lo tanto funciona bien como una proteína de almacenamiento de oxígeno. La hemoglobina, con sus múltiples subunidades y sitios de fijación de  $O_2$ , está mejor preparada para el transporte de oxígeno. Tal como veremos, las interacciones entre las subunidades de una proteína multimérica pueden permitir una respuesta altamente sensible a pequeños cambios en la concentración de ligando. Las interacciones entre las subunidades de la hemoglobina provocan cambios conformacionales que alteran la afinidad de la proteína por el oxígeno. La modulación de la unión del oxígeno permite a la proteína transportadora de  $O_2$  responder a los cambios en la demanda de oxígeno por parte de los tejidos.

### Las subunidades de la hemoglobina son estructuralmente similares a la mioglobina

La hemoglobina ( $M_r$  64.500; abreviada como Hb) es más o menos esférica, con un diámetro de 5,5 nm. Es una proteína tetramérica que contiene cuatro grupos prostéticos hemo, cada uno asociado a una de las cadenas polipeptídicas. La hemoglobina de un adulto contiene dos tipos de globina, dos cadenas  $\alpha$  (de 141 residuos cada una) y dos cadenas  $\beta$  (de 146 residuos cada una). A pesar de que menos de la mitad de los residuos de aminoácidos de las secuencias polipeptídicas de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son idénticos, las estructuras tridimensionales de los dos tipos de subunidades son muy similares. Aún es más, sus estructuras son muy similares a la de la mioglobina (Fig. 5-6), a pesar de que las secuencias de aminoácidos de los tres polipéptidos son idénticas en tan solo 27 posiciones (Fig. 5-7). Los tres polipéptidos son miembros de la familia proteica de las globinas.

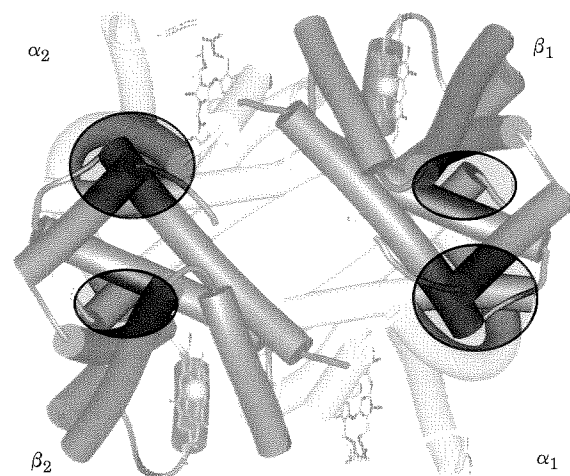


**FIGURA 5-6** Comparación de las estructuras de la mioglobina (PDB ID 1MBO) y de la subunidad  $\beta$  de la hemoglobina (de PDB ID 1HGA).



**FIGURA 5-7** Secuencias de aminoácidos de la mioglobina de cachalote y de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la hemoglobina humana. Las líneas discontinuas señalan los límites entre hélices. Para alinear las secuencias de una manera óptima se han incluido algunos huecos en las dos secuencias de Hb en los lugares en donde hay un exceso de aminoácidos en las otras secuencias comparadas. Con la excepción de la hélice D, ausente en la Hb $\alpha$ , este alineamiento permite la designación por letras de las hélices que ayuda a destacar la posición común de los aminoácidos idénticos en las tres estructuras (sombreados en gris). Los residuos destacados en rosa están conservados en todas las globinas conocidas. Hay que tener en cuenta que una misma designación de letra y número, para aminoácidos presentes en dos o tres estructuras diferentes, no corresponde necesariamente con una posición común en la secuencia lineal de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas. Por ejemplo, el residuo His distal es His E7 en las tres estructuras pero corresponde a la His<sup>64</sup>, His<sup>58</sup> y a la His<sup>63</sup> en las secuencias lineales de la Mb, Hb $\alpha$  y Hb $\beta$ , respectivamente. Los residuos amino y carboxilo terminales que no pertenecen a hélices, situados más allá del primer (A) y último (H) de los segmentos hélice  $\alpha$ , se designan como NA y HC respectivamente.





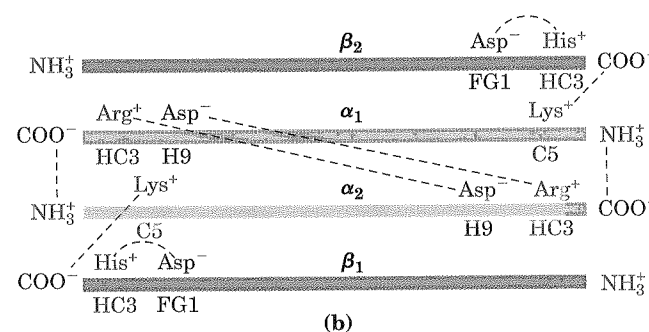
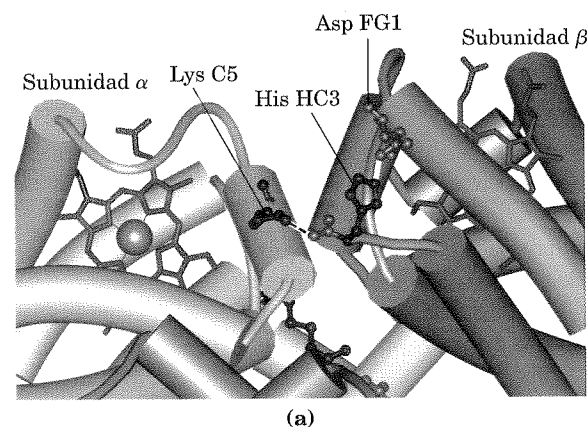
**FIGURA 5-8 Interacciones dominantes entre las subunidades de hemoglobina.** En esta representación, las subunidades  $\alpha$  están en tono claro y las subunidades  $\beta$  en oscuro. Las interacciones más fuertes (destacadas) se producen entre subunidades no iguales. Cuando se une el oxígeno, el contacto  $\alpha_1\beta_1$  cambia ligeramente; sin embargo, se produce un cambio sustancial en el contacto  $\alpha_1\beta_2$ , donde se rompen varios pares iónicos (PDB ID 1HGA).

La convención para nombrar las hélices descrita en el caso de la mioglobina es también aplicable para los polipéptidos de la hemoglobina, excepto que la subunidad  $\alpha$  carece de la corta hélice D. La bolsa de unión del hemo está formado principalmente por las hélices E y F de cada una de las subunidades.

La estructura cuaternaria de la hemoglobina muestra fuertes interacciones entre subunidades diferentes. La interfase  $\alpha_1\beta_1$  (y su equivalente  $\alpha_2\beta_2$ ) implica más de 30 residuos y es suficientemente fuerte como para que, aunque un tratamiento suave con urea provoca una disociación del tetrámero en dímeros  $\alpha\beta$ , estos permanezcan intactos. La interfase  $\alpha_1\beta_2$  (y la  $\alpha_2\beta_1$ ) implica unos 19 residuos (**Fig. 5-8**). Las interacciones hidrofóbicas predominan en todas las interfases, pero también hay muchos enlaces de hidrógeno y unos pocos pares iónicos (o puentes salinos) cuya importancia se discute más adelante.

### La hemoglobina experimenta un cambio estructural al unirse al oxígeno

El análisis por rayos X ha revelado dos conformaciones principales de la hemoglobina: el **estado R** y el **estado T**. A pesar de que el oxígeno se une a la hemoglobina en cualquiera de estos dos estados tiene una afinidad considerablemente mayor por la hemoglobina en estado R. La unión del oxígeno estabiliza el estado R. Cuando el oxígeno está ausente experimentalmente, el estado T es más estable y es entonces la conformación predominante de la **desoxihemoglobina**. Los estados T y R fueron denominados originalmente como “tenso” y “relajado”, debido a que el estado T está estabilizado por un mayor número de pares iónicos, muchos de los cuales pertenecen a la interfase  $\alpha_1\beta_2$  (y a la  $\alpha_2\beta_1$ ) (**Fig. 5-9**). La unión del  $O_2$  a una subunidad de hemoglobina en el estado T promueve un cambio conformacional hacia el estado R. Cuando toda la proteína sufre esta transición, las estructuras de las subunidades individuales cambian poco, pero los pares de subunidades  $\alpha\beta$  se deslizan uno sobre otro y rotan, estrechando la bolsa entre las subunidades  $\beta$



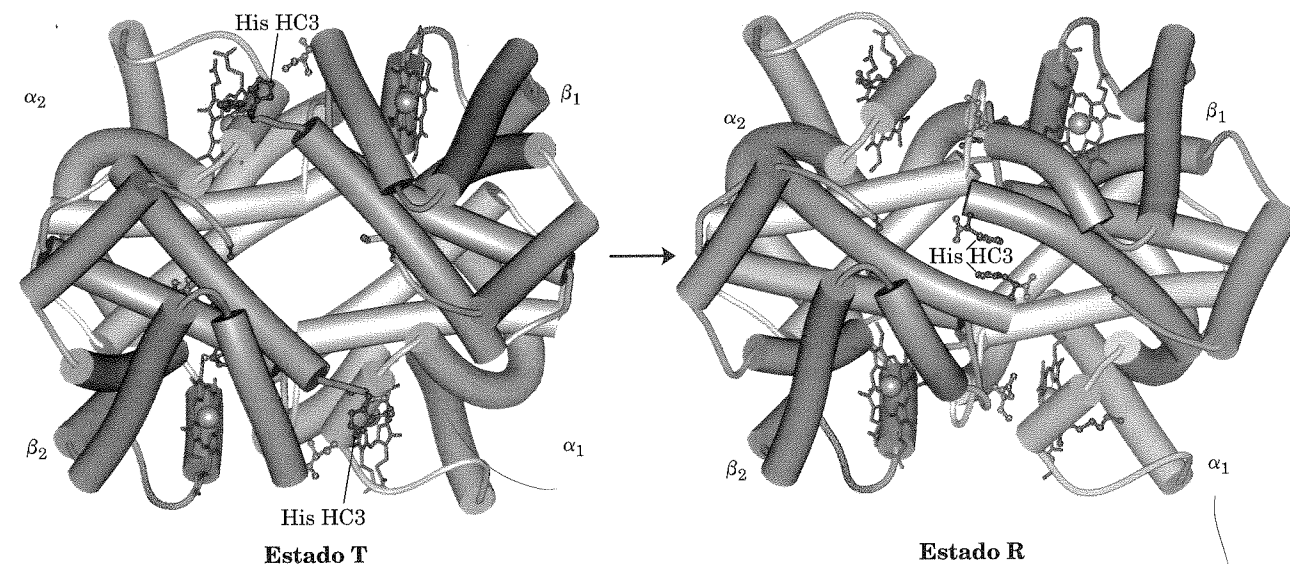
**FIGURA 5-9 Algunos pares iónicos que estabilizan el estado T de la desoxihemoglobina.** (a) Visión en detalle de una porción de una molécula de desoxihemoglobina en estado T (PDB ID 1HGA). Las interacciones entre los pares iónicos His HC3 y Asp FG1 de la subunidad  $\beta$  (en azul) y entre la Lys C5 de la subunidad  $\alpha$  (en gris) y el grupo  $\alpha$ -carboxilo de la His C3 de la subunidad  $\beta$  se muestran con líneas discontinuas. (Recuérdese que el HC3 es el residuo carboxi-terminal de la subunidad  $\beta$ .) (b) Las interacciones entre estos pares iónicos y otros no mostrados en (a) se esquematizan en esta representación de las cadenas de polipéptido extendido de la hemoglobina.

(**Fig. 5-10**). En este proceso, algunos de los pares iónicos que estabilizan el estado T se rompen y se forman otros nuevos.

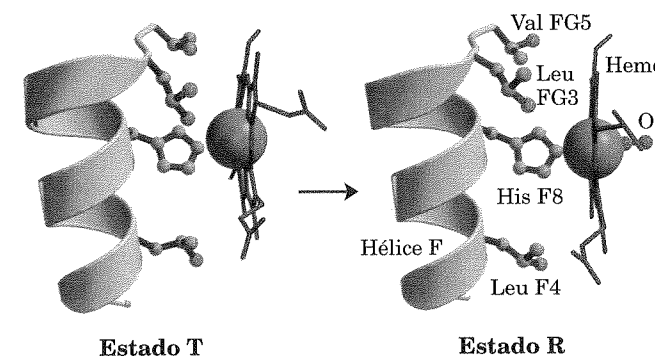
Max Perutz propuso que la transición  $T \rightarrow R$  está provocada por cambios en las posiciones de cadenas laterales de aminoácidos clave que rodean al hemo. En el estado T, la porfirina está ligeramente curvada, provocando que el hierro hemo sobresalga ligeramente hacia la His próxima (His F8). La unión del  $O_2$  provoca que el hemo adquiera una conformación más plana, cambiando la posición de la His próxima y de la hélice F unida (**Fig. 5-11**). Estos cambios conducen a ajustes en los pares iónicos de la interfase  $\alpha_1\beta_2$ .

### La hemoglobina une oxígeno de manera cooperativa

La hemoglobina debe unir oxígeno eficientemente en los pulmones, donde la  $pO_2$  es aproximadamente de 13,3 kPa, y liberar oxígeno en los tejidos, donde la  $pO_2$  es de unos 4 kPa. La mioglobina, como cualquier proteína que une oxígeno siguiendo una curva hiperbólica de unión, está poco preparada para esta función, por los motivos que se ilustran en la **Figura 5-12**. Una proteína que uniese  $O_2$  con una alta afinidad lo uniría eficientemente en los pulmones pero no liberaría gran parte del mismo en los tejidos. Si la proteína uniese oxígeno con una afinidad suficientemente baja para liberarlo en los tejidos, no recogería demasiado oxígeno en los pulmones.



**FIGURA 5-10 La transición  $T \rightarrow R$ .** (PDB ID 1HGA y 1BBB) En estas representaciones de la desoxihemoglobina, igual que en la Figura 5-9, las subunidades  $\beta$  se muestran en azul y las subunidades  $\alpha$  en gris. Las cadenas laterales cargadas positivamente y los extremos de la cadena implicados en la formación de pares iónicos se muestran en azul y sus correspondientes parejas cargadas negativamente se muestran en rojo. La Lys C5 de cada subunidad  $\alpha$  y el Asp FG1 de cada subunidad  $\beta$  son visibles aunque no están marcados (compárese con la Fig. 5-9a). Hay que destacar

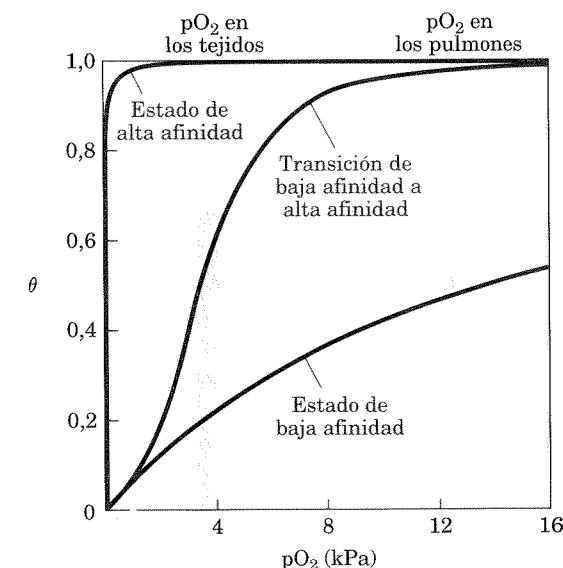


**FIGURA 5-11 Cambios de conformación en el entorno del hemo por la unión del  $O_2$  a la desoxihemoglobina.** (PDB ID 1HGA y 1BBB) El cambio de posición de la hélice F cuando el hemo une  $O_2$  es uno de los ajustes que se cree que desencadena la transición  $T \rightarrow R$ .

La hemoglobina resuelve este problema mediante una transición de un estado de baja afinidad (el estado T) a un estado de alta afinidad (el estado R) a medida que se le unen más moléculas de  $O_2$ . Como resultado, la hemoglobina tiene una curva de unión a oxígeno híbrida, en forma de S o curva sigmoidea (**Fig. 5-12**). Una proteína de una sola subunidad con un único sitio de fijación de sustrato no puede tener una curva de unión sigmoidea (ni siquiera si la unión provocase un cambio conformacional) debido a que cada molécula de ligando se une independientemente y no podría afectar a la unión de otra molécula. Por el contrario, la unión del  $O_2$  a las subunidades individuales de la hemoglobina puede alterar la afinidad para el  $O_2$  de las subunidades adyacentes. La primera molécula de  $O_2$  que interacciona con la desoxihemoglobina se une débilmente, debido a que se une a una subunidad en el estado T. Sin embargo, esta unión conduce a unos cambios conformacionales que se comu-

que la molécula tiene una orientación ligeramente diferente de la mostrada en la Figura 5-9. La transición del estado T al R desplaza de manera sustancial las parejas de subunidades, afectando a algunos de sus pares iónicos. Es destacable el caso de los residuos His HC3 del extremo carboxilo de las subunidades  $\beta$ , implicados en pares iónicos en el estado T, y que rotan hacia el centro de la molécula cuando se pasa al estado R, dejando de formar pares iónicos. Otra consecuencia destacable de la transición  $T \rightarrow R$  es un estrechamiento de la bolsa entre las subunidades  $\beta$ .

nican a las subunidades adyacentes, haciendo más fácil la unión de moléculas de  $O_2$  adicionales. En efecto, la transición  $T \rightarrow R$  se produce más rápidamente en la segunda subunidad una vez que el  $O_2$  se ha unido a la primera subunidad. La última molécula de  $O_2$  (la cuarta) que se une al hemo lo hace a una subunidad



**FIGURA 5-12 Curva de unión sigmoidea (cooperativa).** Una curva de unión sigmoidea puede contemplarse como una curva híbrida que refleja la transición de un estado de baja afinidad a un estado de alta afinidad. La unión cooperativa, tal como se manifiesta por la curva de unión sigmoidea, hace que la hemoglobina sea más sensible a pequeñas diferencias en la concentración de  $O_2$  entre los tejidos y los pulmones, lo que permite que la hemoglobina una oxígeno en los pulmones (donde la  $pO_2$  es alta) y lo libere en los tejidos (donde la  $pO_2$  es baja).

que ya está en el estado R y por tanto se une con una afinidad mucho mayor que la de la primera molécula.

Una **proteína alostérica** es aquella en la cual la unión de un ligando afecta a las propiedades de unión de otro sitio de la misma proteína. El término "alostérico" proviene del griego *allos*, "otro", y *stereos*, "sólido" o "forma". Las proteínas alostéricas son aquellas que tienen "otras formas" o conformaciones inducidas por la unión de ligandos conocidos como moduladores. Los cambios conformacionales inducidos por el/los modulador(es) interconvierten formas más activas y menos activas de la proteína. Los moduladores de las proteínas alostéricas pueden ser tanto inhibidores como activadores. Cuando el ligando normal y el modulador son idénticos la interacción se denomina **homotrópica**. Cuando el modulador es una molécula diferente del ligando normal la interacción es **heterotrópica**. Algunas proteínas tienen dos o más moduladores y por lo tanto pueden tener interacciones homotrópicas y heterotrópicas.

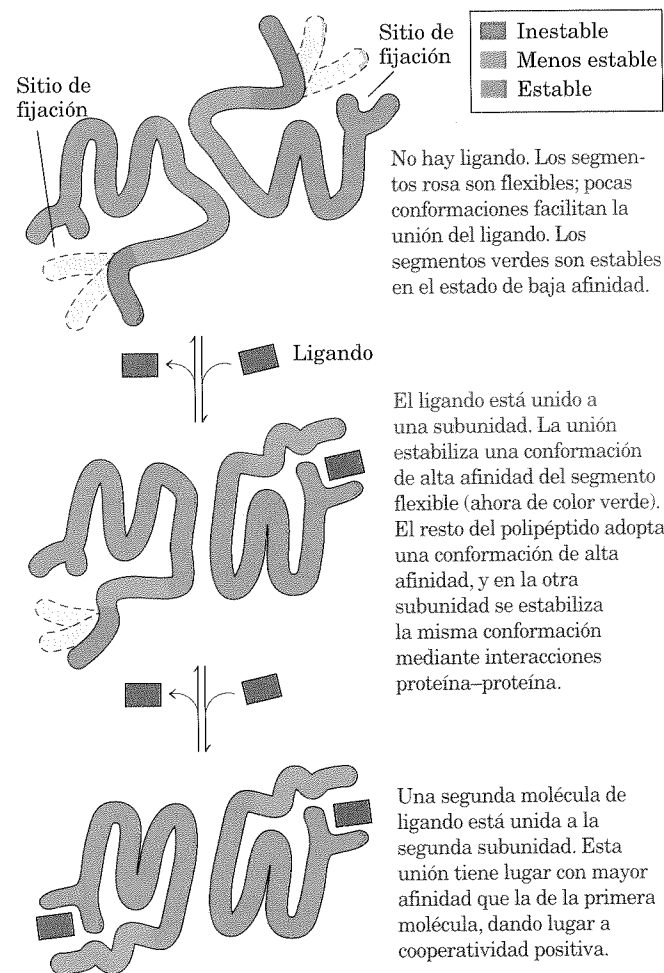
La unión cooperativa de un ligando a una proteína multimérica, tal como la que se produce con la unión del O<sub>2</sub> a la hemoglobina, es una forma de unión alostérica. La unión de un ligando afecta a las afinidades de cualquiera de los restantes sitios de fijación no ocupados, y el O<sub>2</sub> puede ser considerado tanto un ligando normal como un modulador homotrópico activador. Hay sólo un sitio de fijación para el O<sub>2</sub> en cada subunidad, de modo que los efectos alostéricos que dan lugar a la cooperatividad están mediados por cambios conformacionales transmitidos de una subunidad a otra por interacciones subunidad-subunidad. Una curva de unión sigmoidea es diagnóstico de una unión cooperativa. Permite una respuesta mucho más sensible a las concentraciones de ligando y es importante para la función de muchas proteínas multiméricas. El principio del efecto alostérico puede extenderse fácilmente al caso de los enzimas reguladores, tal como veremos en el Capítulo 6.

Los cambios conformacionales cooperativos dependen de variaciones en la estabilidad estructural de partes diferentes de la proteína, como se vio en el Capítulo 4. Los sitios de fijación de una proteína alostérica suelen consistir en segmentos estables próximos a segmentos relativamente inestables, siendo éstos últimos capaces de sufrir cambios frecuentes en su conformación o de llevar a cabo movimientos desorganizados (Fig. 5-13). Cuando se produce la unión de un ligando, las partes móviles del sitio de fijación de una proteína pueden quedar estabilizadas en una conformación determinada que afecta a la conformación de las subunidades de polipéptido adyacentes. Si la totalidad del sitio de fijación tuviera una gran estabilidad, al unirse en él un ligando tan sólo serían posibles cambios estructurales limitados que se propagan a otras partes de la proteína.

Al igual que ocurre con la mioglobina, la hemoglobina puede unir ligandos diferentes al oxígeno. Un ejemplo importante es el monóxido de carbono, que se une a la hemoglobina con una eficiencia unas 250 veces superior a la del oxígeno. La exposición de humanos al CO puede tener consecuencias trágicas (Recuadro 5-1).

### La unión cooperativa de ligando puede ser descrita cuantitativamente

La unión cooperativa del oxígeno por la hemoglobina fue analizada por primera vez por Archibald Hill en el año 1910. A partir



**FIGURA 5-13 Cambios estructurales en una proteína con varias subunidades que se une cooperativamente a un ligando.** La estabilidad estructural no es uniforme en una molécula de proteína. Aquí se muestra una proteína dimérica hipotética formada por regiones de estabilidad alta (azul), media (verde) y baja (rojo). Los sitios de fijación de ligando están compuestos de segmentos de alta y baja estabilidad, por lo que la afinidad por el ligando es relativamente baja. Los cambios conformacionales producidos al unirse el ligando hacen que la proteína pase desde un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad, una forma de encaje inducido.

de sus descubrimientos se enunció un método general para el estudio de la unión cooperativa de ligandos a proteínas multi-subunitarias.

Para una proteína con  $n$  sitios de fijación el equilibrio de la ecuación 5-1 se convierte en



y entonces la expresión para la constante de asociación pasa a ser

$$K_a = \frac{[PL_n]}{[P][L]^n} \quad (5-13)$$

La ecuación para  $\theta$  (vea la ecuación 5-8) es

$$\theta = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d} \quad (5-14)$$

### RECUADRO 5-1

### MEDICINA

### Monóxido de carbono: un asesino silencioso

Lake Powell, Arizona, en agosto de 2000. Una familia se encontraba de vacaciones en una casa flotante arrendada. Pusieron en marcha el generador de electricidad para poder conectar un aparato de aire acondicionado y un televisor. Aproximadamente 15 minutos después, dos hermanos de 8 y 11 años saltaron desde la cubierta de popa. Justo debajo de la cubierta estaba situado el tubo de escape del generador. En el lapso de dos minutos, los dos hermanos quedaron rendidos a causa de la inhalación del monóxido de carbono del tubo de escape, que había quedado concentrado debajo de la cubierta. Ambos se ahogaron. Estas muertes, junto con otras más que ocurrieron en la década de 1990 y que estaban relacionadas con casas flotantes de diseño similar, hicieron que se reconsiderara y rediseñara el montaje de los tubos de escape de los generadores.

El monóxido de carbono (CO), un gas incoloro e inodoro, causa más de la mitad de las muertes por envenenamiento en el mundo. El CO tiene una afinidad por la hemoglobina unas 250 veces mayor que la del oxígeno. Por ello, niveles relativamente bajos de CO pueden tener importantes y trágicos efectos. Cuando el CO se combina con la hemoglobina, el complejo resultante se denomina carboxihemoglobina o COHb.

Algunos procesos naturales generan cierta cantidad de CO, pero los niveles elevados localizados suelen ser el resultado de la actividad humana. Los tubos de escape de motores y estufas constituyen fuentes importantes de CO, al ser éste un producto secundario de la combustión incompleta de combustibles fósiles. Tan sólo en Estados Unidos, casi 4.000 personas mueren cada año a causa de envenenamiento por CO, ya sea accidental o intencionadamente. Muchas de las muertes accidentales se producen por un aumento no detectado de CO en espacios cerrados, como el que se produce cuando una estufa doméstica no funciona bien o tiene pérdidas e insufla CO dentro de la casa. Sin embargo, también es posible la intoxicación por CO en espacios abiertos, en los que personas desprevenidas pueden inhalar los gases de escape de generadores, motores fuera borda, motores de tractor o cortadoras de césped.

Es poco frecuente que los niveles de monóxido de carbono en la atmósfera sean peligrosos, ya que oscilan entre menos de 0,05 partes por millón (ppm) en áreas remotas e inhabitadas y 3 a 4 ppm en algunas ciudades del hemisferio norte. En Estados Unidos el límite impuesto por el gobierno (por la Occupational Safety and Health Administration, OSHA) en lugares de trabajo es de 50 ppm para personas que trabajen en turnos de ocho horas. La fuerte unión del CO a la hemoglobina implica que la COHb se puede acumular a lo largo del tiempo si las personas se exponen a un bajo nivel pero constante de CO.

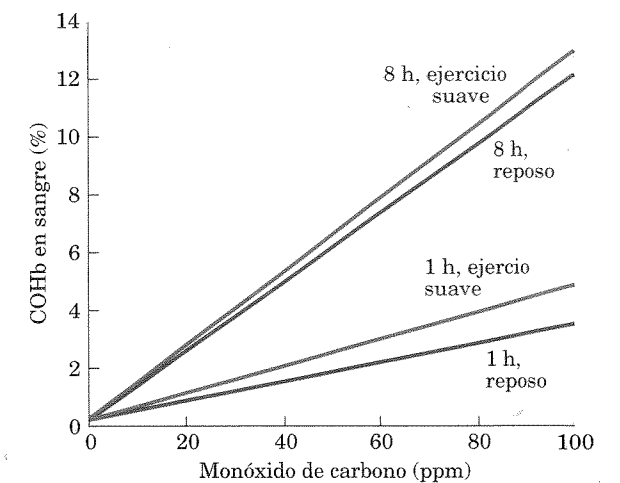
En un individuo sano, el 1% o menos de la hemoglobina total forma complejo en forma de COHb. Al ser el CO un producto del humo del tabaco, muchos fumadores tienen niveles de COHb en un intervalo del 3% al 8% de su hemoglobina total, pudiendo aumentar hasta el 15% en fumadores compulsivos. Los niveles de COHb se equilibran al 50% en las personas que aspiran aire que contiene 570 ppm de CO durante varias horas. Se han desarrollado métodos para relacionar el contenido de CO en la atmósfera con los niveles de COHb en sangre (Fig. 1). En

pruebas efectuadas con generadores de casas flotantes como el responsable de las muertes de Lake Powell, los niveles de CO subieron hasta 6.000 o 30.000 ppm bajo cubierta, y los niveles de O<sub>2</sub> atmosférico bajaron desde un 21% a un 12%. Incluso por encima de la cubierta se detectaron niveles de CO de 7.200 ppm, suficientes para provocar la muerte en pocos minutos.

¿De qué manera afecta al organismo humano la COHb? Raramente se observan síntomas a niveles de menos del 10% de la hemoglobina total. Al 15% se empieza a experimentar ligeros dolores de cabeza. Entre el 20% y el 30%, el dolor de cabeza es muy agudo y está acompañado de náuseas, vértigo, confusión, desorientación y algunas molestias visuales; estos síntomas suelen desaparecer si se trata al individuo con oxígeno. A niveles de COHb del 30% al 50%, los síntomas neurológicos se hacen más graves y a niveles superiores al 50% se pierde la conciencia hasta caer en coma. Seguidamente puede producirse una parada respiratoria. Si la exposición ha sido prolongada pueden producirse daños permanentes. Niveles superiores al 60% son mortales. La autopsia de los niños que murieron en Lake Powell reveló que sus niveles de COHb eran del 59% y del 52%.

La unión de CO a la hemoglobina está afectada por muchos factores, entre los que se incluye el ejercicio (Fig. 1) y los cambios en la presión del aire relacionados con la altitud. Al tener los fumadores niveles basales más elevados de COHb, los que se exponen a una fuente de CO suelen presentar síntomas más rápidamente que los no fumadores. Las personas afectadas de enfermedades cardíacas, pulmonares o sanguíneas que reducen la disponibilidad del oxígeno a los tejidos también experimentan los síntomas a niveles más bajos de exposición. Los fetos corren un riesgo elevado de envenenamiento por CO porque la hemoglobina fetal tiene una afinidad ligeramente más elevada por el CO que la adulta. Se han registrado casos en los que el feto ha muerto pero la madre ha sobrevivido.

(continúa en la página siguiente)



**FIGURA 1** Relación entre los niveles de COHb en sangre y la concentración de CO en el aire circundante. Se muestran cuatro condiciones de exposición diferentes, comparando los efectos de una exposición corta con otra más prolongada y una exposición en reposo con una exposición durante el ejercicio.

Puede parecer chocante que la pérdida de la mitad de la hemoglobina en forma de COHb resulte fatal, puesto que sabemos que personas con diversos tipos de anemia suelen vivir razonablemente bien con la mitad de la cantidad total de hemoglobina. Sin embargo, la unión de CO a la hemoglobina tiene efectos más allá del de eliminar parte de proteína del total disponible para la unión del oxígeno. También afecta a la afinidad del resto de subunidades de la hemoglobina para con el oxígeno. Al unirse CO a una o dos subunidades de un tetrámero de hemoglobina, la afinidad hacia el O<sub>2</sub> se incrementa sustancialmente en las restantes subunidades (Fig. 2). De este modo, un tetrámero de hemoglobina con dos moléculas de CO unidas puede fijar O<sub>2</sub> de modo eficiente en los pulmones pero liberarlo con poca eficiencia en los tejidos. Con ello, los tejidos sufren pronto una privación de oxígeno. El problema se acentúa porque los efectos del CO no se limitan a su interferencia con la función de la hemoglobina. El CO se une a otras proteínas con grupos hemo y a una variedad de metaloproteínas. Todavía no se conocen bien los efectos de estas interacciones, pero pueden ser responsables de algunos de los efectos a largo plazo del envenenamiento agudo y no mortal por CO.

Cuando se sospecha un envenenamiento por CO, resulta esencial una rápida evacuación de la persona afectada de la fuente de CO, aunque esto no garantiza una recuperación rápida. Cuando se produce el traslado desde un lugar contaminado con CO a una atmósfera exterior normal, el O<sub>2</sub> empieza a sustituir el CO de la hemoglobina. Sin embargo, los niveles de COHb descienden bastante lentamente; el tiempo medio es de 2 a 6,5 horas, en función del individuo y de factores ambientales. Si se administra oxígeno al 100% a través de una máscara, la velocidad de recambio puede aumentar hasta cuatro veces; el tiempo medio del intercambio O<sub>2</sub>-CO puede reducirse a deca-

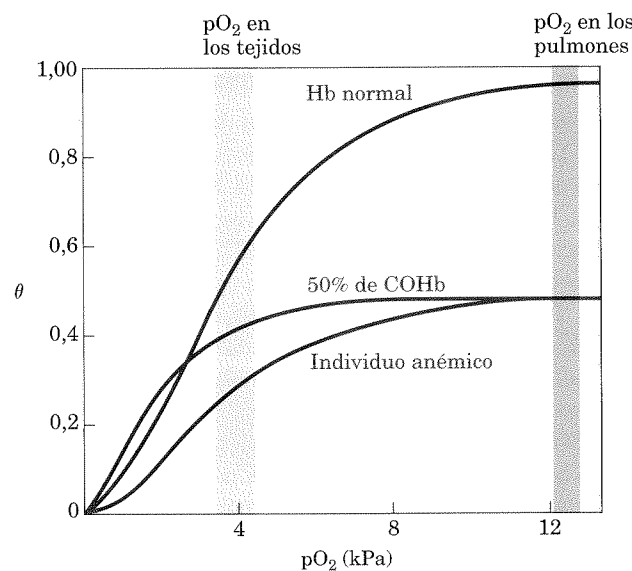
Reordenando los términos y calculando el logaritmo de ambos lados obtenemos

$$\frac{\theta}{1-\theta} = \frac{[L]^n}{K_d} \quad (5-15)$$

$$\log \left( \frac{\theta}{1-\theta} \right) = n \log [L] - \log K_d \quad (5-16)$$

donde  $K_d = [L]_{0.5}^n$ .

La ecuación 5-16 es la **ecuación de Hill**, y una representación del  $\log [\theta/(1-\theta)]$  frente al  $\log [L]$  se denomina **representación de Hill**. Basándose en la ecuación, la representación de Hill debería tener una pendiente igual a  $n$ . Sin embargo, la pendiente determinada experimentalmente no refleja el número de sitios de fijación sino el grado de interacción entre ellos. La pendiente para una curva de Hill se indica por tanto como  $n_H$ , el **coeficiente de Hill**, que es una medida del grado de cooperatividad. Si  $n_H$  es igual a 1, la unión al ligando no es cooperativa, una situación que puede producirse incluso en una proteína multimérica si las subunidades no se comunican. Un  $n_H$  mayor que 1 indica que hay una cooperatividad positiva en la unión del ligando.



**FIGURA 2** Diversas curvas de unión a oxígeno: de hemoglobina normal, hemoglobina de un individuo anémico con el 50% de su hemoglobina funcional y hemoglobina de un individuo con el 50% de sus subunidades de hemoglobina acomplejadas con CO. Se indica la pO<sub>2</sub> en pulmones y tejidos humanos.

nas de minutos si se administra oxígeno al 100% a una presión de 3 atm (303 kPa). De este modo, resulta crítico el tratamiento a cargo de un equipo médico competente y bien equipado.

Está altamente recomendada la instalación de detectores de monóxido de carbono en las casas. Se trata de una medida simple y barata que puede evitar una posible tragedia. Al terminar de recopilar los datos para este recuadro, adquirimos inmediatamente detectores de CO nuevos para nuestras casas.

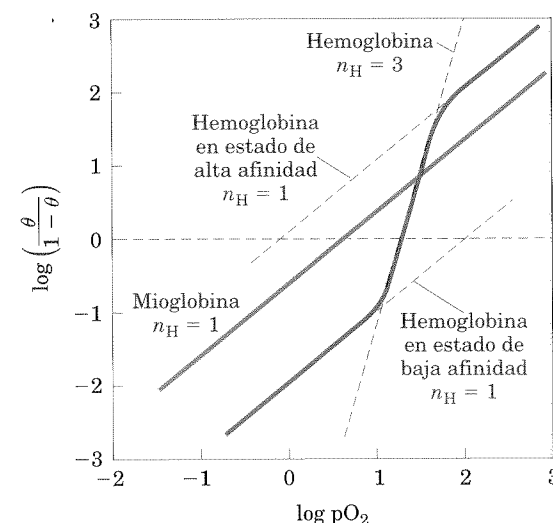
do. Ésta es la situación que se observa en la hemoglobina, en la que la unión de una molécula de ligando facilita la unión de las otras. El límite superior teórico para  $n_H$  se alcanza cuando  $n_H = n$ . En este caso la unión sería completamente cooperativa: todos los sitios de fijación en una proteína unirían el ligando simultáneamente, y no habría moléculas de proteína parcialmente saturadas de ligando en ningún caso. Este límite nunca se alcanza en la práctica, y el valor medido de  $n_H$  es siempre menor que el número de sitios de fijación de ligando de la proteína.

Un  $n_H$  menor que 1 indica cooperatividad negativa, la unión de una molécula de ligando *dificulta* la unión de otras. Hay pocos casos bien documentados de cooperatividad negativa.

Para adaptar la ecuación de Hill a la unión de oxígeno por parte de la hemoglobina debemos sustituir de nuevo  $[L]$  por  $pO_2$  y  $K_d$  por  $P_{50}^n$ :

$$\log \left( \frac{\theta}{1-\theta} \right) = n \log pO_2 - n \log P_{50} \quad (5-17)$$

Las representaciones de Hill para la mioglobina y la hemoglobina se presentan en la **Figura 5-14**.

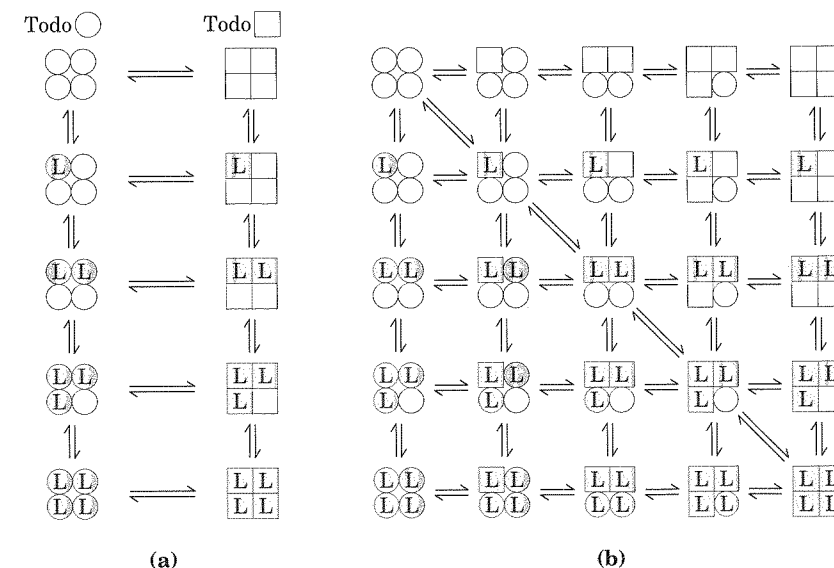


**FIGURA 5-14** Gráficas de Hill para la unión del oxígeno a la mioglobina y a la hemoglobina. Cuando  $n_H = 1$  no existe cooperatividad evidente. El máximo grado de cooperatividad observado para la hemoglobina corresponde aproximadamente a  $n_H = 3$ . Obsérvese que, mientras esto indica un alto nivel de cooperatividad,  $n_H$  es menor que  $n$ , siendo  $n$  el número de sitios de fijación de O<sub>2</sub> de la hemoglobina. Esto es lo normal para una proteína que presenta unión alostérica.

### Existen dos modelos que explican los mecanismos de la unión cooperativa

Los bioquímicos tienen hoy una gran cantidad de información sobre los estados T y R de la hemoglobina, pero queda mucho por aprender sobre cómo se produce la transición T → R. Existen dos modelos para la unión cooperativa de ligandos a las proteínas con múltiples sitios de fijación que han influenciado en gran medida las ideas que se tienen sobre este problema.

El primer modelo fue el propuesto por Jacques Monod, Jeffries Wyman y Jean-Pierre Changeux en 1965, es el llamado **modelo MWC** o **modelo concertado** (Fig. 5-15a). En el modelo concertado se considera que las subunidades de una proteína con unión cooperativa son funcionalmente idénticas, que cada subunidad puede existir en (como mínimo) dos conforma-



**FIGURA 5-15** Dos modelos generales para la interconversión de las formas inactiva y activa de proteínas durante la unión cooperativa a ligando. A pesar de que los modelos pueden aplicarse a cualquier proteína (incluyendo cualquier enzima, Capítulo 6) que presente unión cooperativa, se muestran cuatro subunidades debido a que el modelo fue propuesto originalmente para la hemoglobina. (a) En el modelo concertado o de todo o nada (modelo MWC) se postula que todas las subunidades están en la misma conformación, ya sea como  $\bigcirc$  (baja afinidad o inactiva) o como  $\square$  (alta afinidad o activa). Dependiendo del equilibrio,  $K_1$ , entre las formas  $\bigcirc$  y  $\square$ , la unión de una o más moléculas de ligando (L) desplazará el equilibrio hacia la forma  $\square$ . Las subunidades con un L unido están sombreadas. (b) En el modelo secuencial cada subunidad individual puede estar en la forma  $\bigcirc$  o en la forma  $\square$ , siendo posible un gran número de conformaciones.

ciones, y que todas las subunidades sufren la transición de una conformación a otra de manera simultánea. En este modelo ninguna proteína tiene subunidades con conformaciones diferentes. Las dos conformaciones están en equilibrio. El ligando puede unirse a cualquiera de ellas aunque con diferente afinidad. La unión sucesiva de moléculas de ligando a la conformación de baja afinidad (la cual sería más estable en ausencia de ligando) hace más probable la transición a la conformación de alta afinidad.

En el segundo modelo, el **modelo secuencial** (Fig. 5-15b) propuesto en 1966 por Daniel Koshland y colaboradores, la unión del ligando puede inducir un cambio de conformación en una subunidad individual. Un cambio de conformación en una subunidad provoca un cambio similar en la subunidad adyacente, así como hace más probable la unión de una segunda molécula de ligando. Hay más estados intermedios potenciales en este modelo que en el modelo concertado. Los dos modelos no son mutuamente excluyentes: el modelo concertado puede verse como un caso límite de "todo o nada" del modelo secuencial. En el Capítulo 6 utilizaremos estos modelos para la discusión sobre los enzimas alostéricos.

### La hemoglobina también transporta H<sup>+</sup> y CO<sub>2</sub>

Además de transportar prácticamente todo el oxígeno necesario para las células de los pulmones a los tejidos, la hemoglobina transporta dos productos finales de la respiración celular (H<sup>+</sup> y CO<sub>2</sub>) de los tejidos a los pulmones y los riñones, donde son excretados. El CO<sub>2</sub> producido por la oxidación de combustibles orgánicos en la mitocondria, se hidrata para formar bicarbonato:



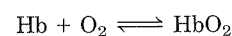
Esta reacción está catalizada por la **carbónico anhidrasa**, un enzima especialmente abundante en los eritrocitos. El dióxido de carbono no es demasiado soluble en solución acuosa, y, de no ser convertido en bicarbonato, se formarían burbujas de CO<sub>2</sub> en los tejidos y en la sangre. Tal como puede verse en la reacción catalizada por la carbónico anhidrasa, la hidratación del CO<sub>2</sub>



provoca un aumento de la concentración de  $H^+$  (un descenso del pH) en los tejidos. La unión de oxígeno a la hemoglobina se ve muy afectada por el pH y la concentración de  $CO_2$ , por lo que la interconversión de  $CO_2$  y bicarbonato es de gran importancia para la regulación de la unión de oxígeno y su liberación en la sangre.

La hemoglobina transporta alrededor del 40% del total de  $H^+$  y del 15% al 20% del  $CO_2$  formado en los tejidos hacia los pulmones y los riñones. (El resto de  $H^+$  es absorbido por el tampón bicarbonato del plasma; el resto del  $CO_2$  se transporta en forma de  $HCO_3^-$  y  $CO_2$  disueltos.) La unión del  $H^+$  y  $CO_2$  está inversamente relacionada con la unión de oxígeno. Con un pH relativamente bajo y altas concentraciones de  $CO_2$  en los tejidos periféricos, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno disminuye a medida que se unen  $H^+$  y  $CO_2$ , y se libera oxígeno a los tejidos. Por el contrario, a medida que se excreta  $CO_2$  en los capilares pulmonares y aumenta consecuentemente el pH de la sangre, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno aumenta y la proteína une más  $O_2$  para su transporte a los tejidos periféricos. Este efecto del pH y de la concentración de  $CO_2$  sobre la unión y liberación de oxígeno por la hemoglobina es el llamado **efecto Bohr**, en honor de Christian Bohr, el fisiólogo danés (y padre del físico Niels Bohr) que lo descubrió en 1904.

El equilibrio de unión de la hemoglobina y una molécula de oxígeno puede describirse por la reacción

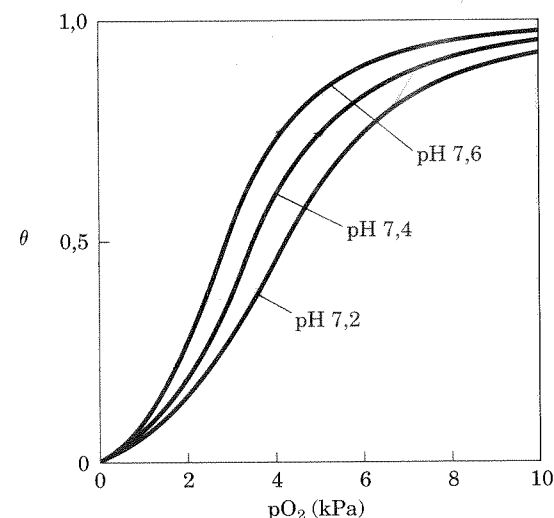


que no es una expresión completa. Para tener en cuenta el efecto de la concentración de  $H^+$  sobre este equilibrio de unión, debemos reescribir la reacción como



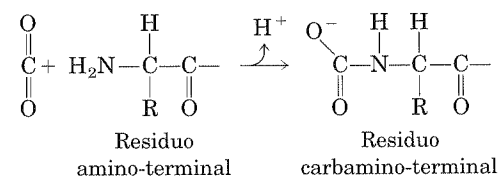
donde  $HHb^+$  designa una forma protonada de la hemoglobina. Esta ecuación nos dice que la curva de saturación de  $O_2$  de la hemoglobina está influenciada por la concentración de  $H^+$  (Fig. 5-16). Tanto el  $O_2$  como el  $H^+$  se unen a la hemoglobina, aunque con afinidades inversas. Cuando la concentración de oxígeno es alta, como ocurre en los pulmones, la hemoglobina une  $O_2$  y libera protones. Cuando la concentración de oxígeno es baja, situación que se da en los tejidos periféricos, se une  $H^+$  y se libera  $O_2$ .

El oxígeno y el  $H^+$  no se unen a los mismos sitios de la hemoglobina. El oxígeno se une a los átomos de hierro de los hemo, mientras que el  $H^+$  se puede unir a diversos residuos de aminoácido de la proteína. La  $His^{146}$  (His HC3) de las subunidades  $\beta$  realiza un aporte fundamental al efecto Bohr. Este residuo forma, al protonarse, uno de los pares iónicos (con el  $Asp^{94}$ ,  $Asp^{FG1}$ ) que ayudan a estabilizar la desoxihemoglobina en el estado T (Fig. 5-9). El par iónico estabiliza la forma protonada de la His HC3, dándole a este residuo un  $pK_a$  anormalmente alto en el estado T. El  $pK_a$  cae a su valor normal de 6,0 en el estado R debido a que el par iónico no puede formarse, y este residuo está en su mayor parte desprotonado en la oxihemoglobina a pH 7,6, el pH de la sangre en los pulmones. A medida que aumenta la concentración de  $H^+$ , se produce la protonación de la His HC3, lo que favorece la transición al estado T provocando la liberación de oxígeno. Un efecto similar se produce con la protonación de los residuos amino terminales de las subunidades  $\alpha$ , de otros residuos His y quizás de otros grupos.



**FIGURA 5-16 Efecto del pH sobre la unión de oxígeno por la hemoglobina.** El pH de la sangre en los pulmones es 7,6 y en los tejidos 7,2. Las medidas experimentales sobre la unión de oxígeno por la hemoglobina se suelen tomar a pH 7,4.

Así vemos que las cuatro cadenas polipeptídicas de la hemoglobina se comunican unas con otras no sólo por la unión de  $O_2$  a sus grupos hemo sino también por la unión de  $H^+$  a residuos aminoácidos específicos. Y aún hay otros elementos que añadir al entramado. La hemoglobina también une  $CO_2$ , y de modo también inversamente proporcional a la unión de oxígeno. El dióxido de carbono se une en forma de grupo carbamato al grupo  $\alpha$ -amino del extremo amino terminal de cada cadena de globina, formando carbaminohemoglobina:



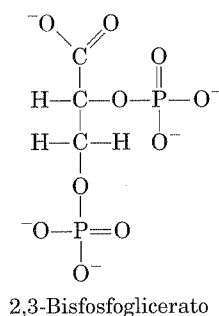
Esta reacción produce  $H^+$  y contribuye al efecto Bohr. Los carbamatos unidos también forman puentes salinos adicionales (no mostrados en la Figura 5-9) que ayudan a estabilizar el estado T y favorecen la liberación de oxígeno.

Cuando la concentración de dióxido de carbono es alta, tal como ocurre en los tejidos periféricos, se une algo de  $CO_2$  a la hemoglobina y la afinidad por el  $O_2$  disminuye, haciendo que éste se libere. A su vez, cuando la hemoglobina llega a los pulmones, la alta concentración de oxígeno favorece la unión de  $O_2$  y la liberación de  $CO_2$ . Es la capacidad de comunicar información de unión a ligando de una subunidad polipeptídica a las otras lo que convierte a la hemoglobina en una molécula tan perfectamente adaptada a la integración del transporte de  $O_2$ ,  $CO_2$  y  $H^+$  por parte de los eritrocitos.

### La unión de oxígeno a la hemoglobina está regulada por el 2,3-bisfosfoglicerato

La interacción del **2,3-bisfosfoglicerato (BPG)** con las moléculas de hemoglobina perfecciona aún más la función de la he-

moglobina y proporciona un ejemplo de modulación alostérica heterotrópica.

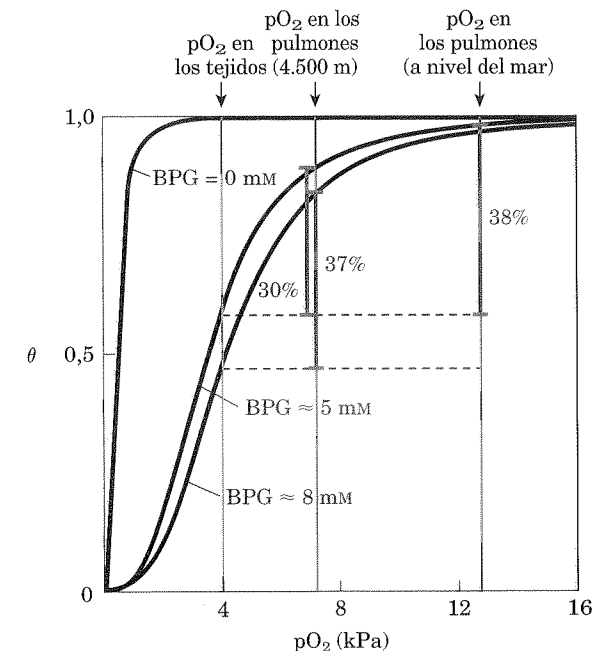


El BPG está presente en concentraciones relativamente altas en los eritrocitos. Cuando se aísla la hemoglobina contiene una cantidad significativa de BPG unido, cuya eliminación completa resulta difícil. De hecho, las curvas de unión a  $O_2$  para la hemoglobina que hemos examinado hasta ahora se habían obtenido en presencia de BPG unido. Se sabe que el 2,3-bisfosfoglicerato reduce de manera considerable la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, hay una relación inversa entre la unión de  $O_2$  y la unión de BPG. Por tanto podemos describir otro proceso de unión para la hemoglobina:



El BPG se une a un sitio alejado del sitio de fijación para el  $O_2$  y regula la afinidad de unión de la hemoglobina para el  $O_2$  en relación a la  $pO_2$  en los pulmones. El BPG juega un papel importante en las adaptaciones fisiológicas a la menor  $pO_2$  disponible a grandes alturas. Para un humano sano que se pasee a nivel del mar, la unión de oxígeno a la hemoglobina está regulada de manera que la cantidad de  $O_2$  liberada a los tejidos equivale aproximadamente al 40 % del máximo que podría ser transportado por la sangre (Fig. 5-17). Imaginemos que la misma persona se traslada rápidamente a un lugar montañoso a 4.500 m de altitud, en donde la  $pO_2$  es considerablemente menor. La liberación de  $O_2$  a los tejidos se ve ahora reducida. Sin embargo, después de unas pocas horas de permanencia a gran altitud, la concentración de BPG de la sangre empieza a aumentar, conduciendo a una disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Este ajuste del nivel de BPG tiene un efecto pequeño sobre la unión de  $O_2$  en los pulmones pero afecta de manera importante a la liberación de  $O_2$  en los tejidos. Por ello, la liberación de oxígeno en los tejidos vuelve a ser de casi el 40 % del que puede ser transportado por la sangre. La situación se invierte cuando la persona vuelve al nivel del mar. La concentración de BPG en los eritrocitos también aumenta en las personas que sufren **hipoxia**, una disminución en la oxigenación en los tejidos periféricos debida a un mal funcionamiento de los pulmones o del sistema circulatorio.

El BPG se une a la hemoglobina en la cavidad existente entre las subunidades  $\beta$  en el estado T (Fig. 5-18). Esta cavidad está recubierta por residuos aminoácidos cargados positivamente que interaccionan con los grupos cargados negativamente del BPG. A diferencia del  $O_2$ , sólo se une una molécula de BPG a cada tetrámero de hemoglobina. El BPG disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno al estabilizar el estado T. La transición al estado R provoca un estrechamiento de la bolsa



**FIGURA 5-17 Efecto del BPG sobre la unión de oxígeno a la hemoglobina.**

La concentración de BPG en la sangre humana normal es aproximadamente 5 mM cuando se está a nivel del mar y alrededor de 8 mM a grandes altitudes. Observe 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 unión cooperativa de  $O_2$  disminuye sólo 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 cercana al 38% del máximo que puede ser transportado por la sangre. A grandes altitudes la liberación de  $O_2$  disminuye aproximadamente una cuarta parte, alcanzando como máximo el 30%. Sin embargo, 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 37% del oxígeno transportado.

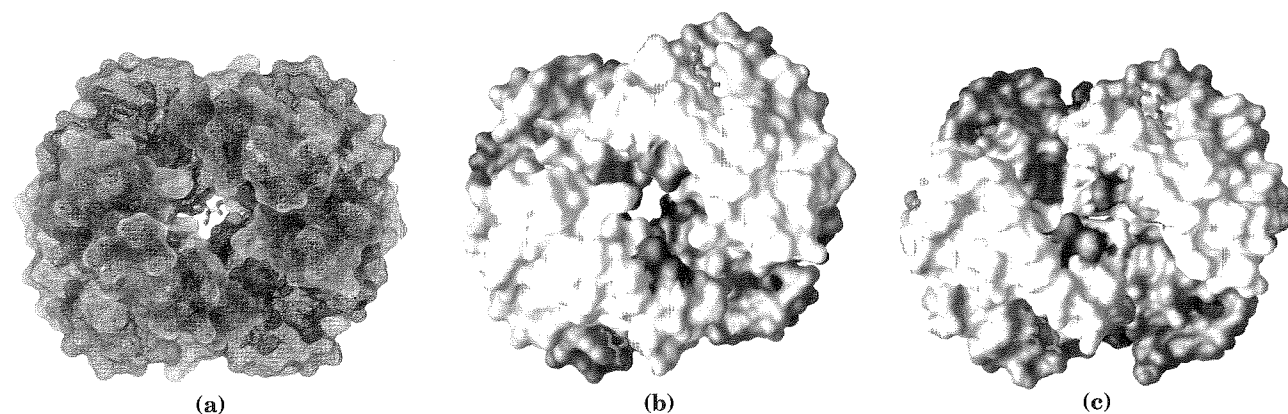
de unión a BPG, impidiendo la unión del BPG. En ausencia de BPG, la hemoglobina pasa más fácilmente al estado R.

La regulación de la unión de oxígeno a la hemoglobina por el BPG juega un papel importante en el desarrollo fetal. La hemoglobina fetal debe tener una mayor afinidad por el  $O_2$  que la hemoglobina materna debido a que el feto debe extraer el oxígeno de la sangre de su madre. El feto sintetiza subunidades  $\gamma$  en lugar de las  $\beta$ , formándose la hemoglobina  $\alpha_2\gamma_2$ . Este tetrámero tiene una afinidad por el BPG mucho menor que la de la hemoglobina adulta normal, y por lo tanto una mayor afinidad por el oxígeno. **Proteínas de unión a oxígeno – La hemoglobina puede estar regulada alostéricamente**

### La anemia falciforme es una enfermedad molecular de la hemoglobina

La enfermedad humana hereditaria llamada anemia falciforme demuestra de manera indiscutible la gran importancia de la secuencia de aminoácidos para determinar las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas globulares y por lo tanto sus funciones biológicas. Se conocen





**FIGURA 5-18 Unión del BPG a la desoxihemoglobina.** (a) La unión del BPG estabiliza el estado T de la desoxihemoglobina (PDB ID 1HGA), representada aquí por una imagen de superficie de malla. (b) Las cargas negativas del BPG interactúan con varios grupos cargados positivamente (mostrados en azul) que

más de 500 variantes genéticas de la hemoglobina en la población humana; con pocas excepciones, se trata de variantes muy raras. La mayoría de estas variantes se deben a diferencias en un único residuo aminoácido. Los efectos sobre la estructura y la función de la hemoglobina suelen ser muy pequeños, aunque a veces pueden llegar a ser extraordinarios. Cada variante de hemoglobina es el producto de una alteración genética. A cada variante de un gen se le llama alelo. Debido a que los humanos poseen en general dos copias de cada gen, un individuo puede tener dos copias de un alelo (siendo entonces homocigoto para ese gen) o una copia de cada uno de los dos alelos diferentes (heterocigoto).

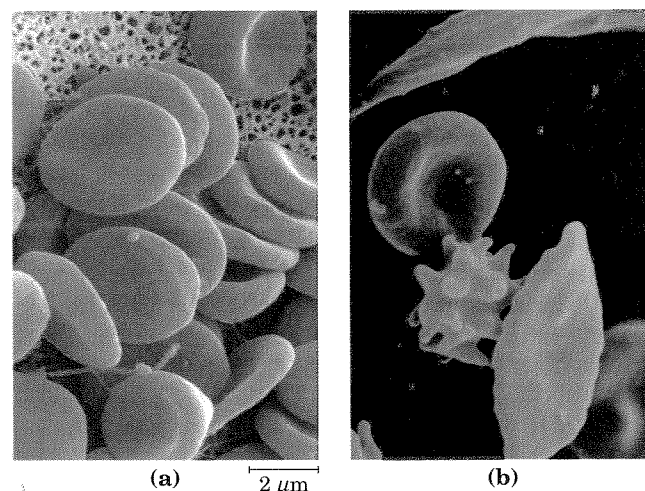
La anemia falciforme se da en individuos que han heredado el alelo de esta enfermedad de ambos progenitores. Los eritrocitos de estos individuos son anormales y menos numerosos. Además de un número inusualmente elevado de células inmaduras, la sangre contiene muchos eritrocitos alargados, delgados y en forma de media luna que asemejan la hoja de una hoz (**Fig. 5-19**). Cuando se desoxigena la hemoglobina de las células falciformes (llamada hemoglobina S), ésta pasa a ser insoluble y forma polímeros que se agregan en fibras tubulares (**Fig. 5-20**). La hemoglobina normal (hemoglobina A) sigue siendo soluble cuando se desoxigena. Las fibras insolubles de la hemoglobina S desoxigenada son las responsables de la deformación en forma de hoz de los eritrocitos y la proporción de células falciformes aumenta en gran medida cuando se desoxigena la sangre.

Las propiedades alteradas de la hemoglobina S son el resultado de la sustitución de un único aminoácido, una Val en lugar de un residuo Glu en la posición 6 de las dos cadenas  $\beta$ . El grupo R de la valina no posee carga eléctrica, mientras que el glutamato tiene una carga negativa a pH 7,4. Por lo tanto la hemoglobina S tiene dos cargas negativas menos que la hemoglobina A, una por cada una de las cadenas  $\beta$ . La sustitución de Glu por Val crea un punto de contacto hidrofóbico "adhesivo" en la posición 6 de la cadena  $\beta$ , que se sitúa en la superficie exterior de la molécula. Estos puntos adhesivos hacen que las moléculas de desoxihemoglobina S se asocien anormalmente entre ellas, formando los largos agregados fibrosos característicos de esta enfermedad. ■ **Proteínas de unión a oxígeno – Defectos en la Hb dan lugar a graves enfermedades genéticas**

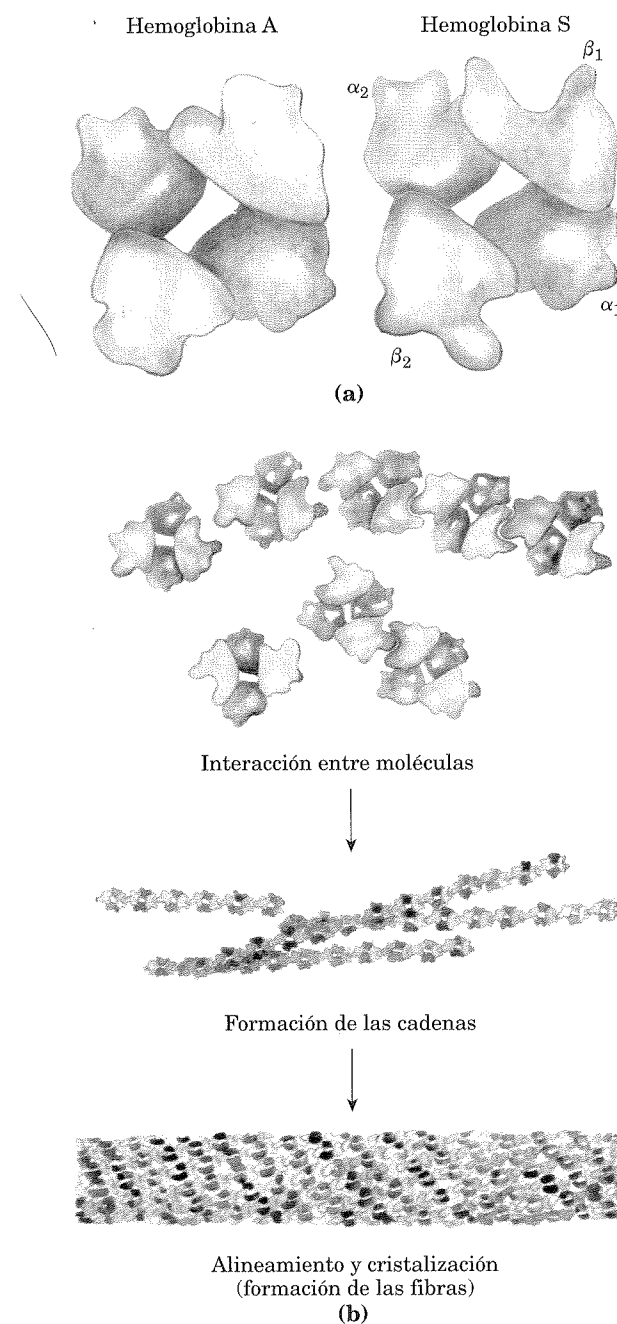
rodean a la bolsa entre las subunidades  $\beta$  en el estado T. (c) La bolsa de unión para el BPG desaparece con la oxigenación, produciéndose la transición al estado R (PDB ID 1BBB). (Compare (b) y (c) con la Fig. 5-10.)

Como ya hemos visto, la anemia falciforme se presenta en individuos homocigotos en el alelo falciforme del gen codificante de la subunidad  $\beta$  de la hemoglobina. Los individuos que reciben el alelo falciforme de uno solo de sus progenitores y que por tanto son heterocigotos, sufren una enfermedad más leve llamada rasgo de la anemia falciforme; en estos casos sólo un 1% de sus eritrocitos son falciformes en estado de desoxigenación. Estos individuos pueden tener una vida completamente normal si evitan el ejercicio vigoroso u otros esfuerzos.

La anemia falciforme es una enfermedad dolorosa y que puede ser mortal. Las personas con anemia falciforme sufren crisis recurrentes provocadas por el ejercicio físico. Se sienten débiles, tienen vértigo y les falta el aire, además de sufrir un aumento del pulso y soplos cardíacos. El contenido en hemoglobina de su sangre es sólo la mitad del normal, de 15 a 16 g/100mL, debido a que los eritrocitos falciformes son muy frágiles y se rompen con facilidad, lo que provoca una anemia ("falta de sangre"). Una consecuencia aún más grave es que los capilares quedan bloqueados por los eritrocitos alargados y con formas anormales, provocando un intenso dolor e interfiriendo con las



**FIGURA 5-19 Comparación de eritrocitos cóncavos normales y uniformes (a) con los eritrocitos de formas diversas presentes en la anemia falciforme (b).** Estos últimos pueden ser normales, falciformes o estrellados.



**FIGURA 5-20 Hemoglobina normal y hemoglobina de la anemia falciforme.** (a) Como resultado de un único cambio de aminoácido en las cadenas  $\beta$  se producen diferencias sutiles de conformación entre la hemoglobina A y la hemoglobina S. (b) A consecuencia de este cambio la desoxihemoglobina S presenta un parche hidrofóbico en su superficie, que provoca la agregación de las moléculas en cadenas que se alinean en forma de fibras insolubles.

funciones normales de los órganos, siendo ésta una de las causas principales que provocan la muerte temprana de mucha gente que padece esta enfermedad.

Las personas con anemia falciforme suelen morir en su infancia si no reciben tratamiento médico. Sin embargo, el alelo de la anemia falciforme es sorprendentemente común en algunas partes de África. La investigación sobre la persistencia de un alelo con efectos negativos tan evidentes en los individuos homocigotos, llevó al descubrimiento de que este alelo aporta una pequeña pero importante resistencia a formas letales de la mala-

ria en individuos heterocigotos. La selección natural ha dado como resultado una población de alelos en la que se compensan los efectos negativos del estado homocigoto con la resistencia a la malaria que aporta el estado heterocigoto ■

## RESUMEN 5.1 Unión reversible de una proteína a un ligando: proteínas de unión a oxígeno

- La función proteica suele implicar interacciones con otras moléculas. Una molécula que se une a una proteína se denomina ligando y el sitio al que se une sitio de fijación de ligando. Las proteínas pueden experimentar cambios conformacionales cuando se une un ligando en un proceso que se llama encaje inducido. En una proteína con múltiples subunidades la unión de un ligando a una subunidad puede afectar la unión del ligando a otras subunidades. La unión de ligandos puede estar regulada.
- La mioglobina contiene un grupo prostético hemo que une oxígeno. El hemo consiste en un único átomo de  $\text{Fe}^{2+}$  coordinado en un anillo de porfirina. El oxígeno se une reversiblemente a la mioglobina, en un proceso que se puede describir mediante una constante de asociación  $K_a$  o una constante de disociación  $K_d$ . Para una proteína monomérica como la mioglobina, la fracción de sitios de fijación ocupados por ligandos es una función hiperbólica de la concentración de ligando.
- La hemoglobina adulta normal tiene cuatro subunidades que contienen grupos hemo, dos  $\alpha$  y dos  $\beta$ , similares entre ellas y con la mioglobina. La hemoglobina existe en dos estados estructurales interconvertibles, T y R. El estado T es el más estable en ausencia de oxígeno. La unión de oxígeno promueve la transición hacia el estado R.
- La unión de oxígeno a la hemoglobina es alostérica y cooperativa. Al unirse  $\text{O}_2$  a un sitio de fijación, la hemoglobina experimenta cambios conformacionales que afectan a los otros sitios de fijación, lo que es un ejemplo de comportamiento alostérico. Los cambios conformacionales entre los estados T y R, mediados por interacciones subunidad-subunidad, producen una unión cooperativa; este comportamiento se describe mediante una curva sigmoidea y se analiza mediante la representación de Hill.
- Se han propuesto dos modelos para explicar la unión cooperativa de ligandos a proteínas con múltiples subunidades: el modelo concertado y el modelo secuencial.
- La hemoglobina también se une a  $\text{H}^+$  y  $\text{CO}_2$ , lo que resulta en la formación de pares iónicos que estabilizan el estado T y hacen disminuir la afinidad de la hemoglobina por el  $\text{O}_2$  (efecto Bohr). La unión del oxígeno a la hemoglobina está también modulada por el 2,3-bisfosfoglicerato, que se une y estabiliza el estado T.
- La anemia falciforme es una enfermedad genética causada por la sustitución de un único aminoácido ( $\text{Glu}^6$  por  $\text{Val}^6$ )

en cada una de las cadenas  $\beta$  de la hemoglobina. El cambio genera la aparición de una zona hidrofóbica en la superficie de la hemoglobina que hace que las moléculas se agreguen en haces de fibras. En condiciones de homocigosis, esta enfermedad presenta graves complicaciones.

## 5.2 Interacciones complementarias entre proteínas y ligandos: el sistema inmune y las inmunoglobulinas

Hemos visto como las conformaciones de las proteínas de unión a oxígeno afectan a y son afectadas por la unión de pequeños ligandos ( $O_2$  o  $CO_2$ ) al grupo hemo. Pero la mayoría de las interacciones proteína-ligando no implican un grupo prostético. En vez de esto, el sitio de fijación de ligando suele ser como el de la hemoglobina para el BPG: una hendidura en la proteína recubierta de residuos aminoácidos dispuestos de tal manera que hacen que la interacción sea altamente específica.

Una discriminación efectiva para los ligandos es la norma para los sitios de fijación, incluso cuando los ligandos tienen diferencias estructurales muy pequeñas.

Todos los vertebrados poseen un sistema inmune capaz de distinguir las moléculas “propias” de las “ajenas” y destruir a continuación las consideradas ajenas. De esta manera, el sistema inmune elimina virus, bacterias y otros patógenos, así como moléculas que puedan representar una amenaza para el organismo. Fisiológicamente, la respuesta del sistema inmune es un entramado complejo de interacciones entre muchas clases de proteínas, moléculas y tipos celulares. Cuando se trata de proteínas individuales, el sistema inmune demuestra como un sistema bioquímico específico y extremadamente sensible puede basarse en la unión reversible entre ligandos y proteínas.

### En la respuesta inmune interviene un conjunto de células y proteínas especializadas

La acción inmune es llevada a cabo por una amplia gama de **leucocitos** (glóbulos blancos de la sangre) que incluyen a los **macrófagos** y **linfocitos**, originados todos a partir de células madre no diferenciadas de la médula ósea. Los leucocitos pueden abandonar el torrente sanguíneo y recorrer los tejidos. Cada una de las células sintetiza una o más proteínas capaces de reconocer y unirse a moléculas que podrían ser señal de una infección.

La respuesta inmune es el resultado de la acción de dos sistemas complementarios, el sistema inmune humoral y el celular. El **sistema inmune humoral** (del latín *humor*, “fluido”) está dirigido contra infecciones bacterianas y virus extracelulares (los que se encuentran en los fluidos corporales), pero también puede responder a proteínas externas individuales. El **sistema inmune celular** destruye las células propias infectadas por virus, y también parásitos y tejidos ajenos.

La base proteica de la respuesta inmune humoral está formada por unas proteínas solubles llamadas **anticuerpos** o **inmunoglobulinas**, normalmente abreviadas como **Ig**. Las inmunoglobulinas se unen a las bacterias, a los virus o a moléculas grandes identificadas como ajenas, marcándolas para su destrucción. Las inmunoglobulinas constituyen hasta un 20% de las proteínas sanguíneas y son producidas por los **linfocitos**

**B** o **células B**, llamadas así debido a que completan su desarrollo en la médula ósea (en inglés bone marrow).

Los agentes que conforman la base de la respuesta inmune celular son una clase de **linfocitos T** o **células T** (llamadas así porque las últimas fases de su desarrollo tienen lugar en el timo) llamadas **células T citotóxicas** (**células T<sub>C</sub>**, también llamadas células T asesinas). El reconocimiento de las células infectadas o de los parásitos implica unas proteínas llamadas **receptores de las células T** que se encuentran en la superficie de las células T<sub>C</sub>. Los receptores son proteínas que habitualmente se disponen en la superficie exterior de las células y se extienden a través de la membrana plasmática; reconocen y unen ligandos extracelulares, desencadenando una serie de cambios en el interior de la célula.

Además de las células T citotóxicas también encontramos las **células T helper** (**células T<sub>H</sub>**, **células cooperantes** o **auxiliares**), cuya función es producir unas proteínas señalizadoras solubles llamadas citoquinas, entre las que se cuentan las interleuquinas. Las células T<sub>H</sub> interaccionan con los macrófagos. Las células T<sub>H</sub> participan sólo de manera indirecta en la destrucción de células infectadas y patógenos, estimulando la proliferación selectiva de las células T<sub>C</sub> y B que pueden unirse a un antígeno particular. Este proceso, llamado **selección clonal**, aumenta el número de células del sistema inmunitario capaces de responder a un patógeno concreto. La importancia de las células T<sub>H</sub> se aprecia claramente en el caso de la epidemia causada por el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), el virus causante del sida (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Las células T<sub>H</sub> son la diana primaria de la infección por VIH. La eliminación de estas células incapacita progresivamente a la totalidad del sistema inmune. En la tabla 5-2 se resumen las funciones de los diversos leucocitos del sistema inmune.

Cada proteína de reconocimiento del sistema inmune, ya sea un receptor de células T o un anticuerpo producido por una célula B, se une de manera específica a alguna estructura química concreta, distinguiéndola prácticamente de cualquier otra.

TABLA 5-2

### Algunos tipos de leucocitos asociados con el sistema inmune

Tipo celular	Función
<b>Macrófagos</b>	Ingestión de grandes partículas y células por fagocitosis
<b>Linfocitos B</b> (células B)	Producción y secreción de anticuerpos
<b>Linfocitos T</b> (células T)	
Células citotóxicas (T <sub>C</sub> ) (asesinas)	Interaccionan con células infectadas a través de receptores superficie de las células T
Células T auxiliares ( <i>helper</i> ) (T <sub>H</sub> )	Interaccionan con macrófagos y secretan citoquinas (interleuquinas) que estimulan la proliferación de las células T <sub>C</sub> y T <sub>H</sub> , B.

El ser humano es capaz de producir unos  $10^8$  anticuerpos diferentes con especificidad de unión propia. Dada esta extraordinaria diversidad, es altamente probable que cualquier estructura química de la superficie de un virus o de una célula invasora pueda ser reconocida y unirse a uno o más anticuerpos. La diversidad de los anticuerpos se deriva de la reorganización al azar de una serie de segmentos de los genes de las inmunoglobulinas mediante mecanismos de recombinación genética que se describirán en el Capítulo 25 (véase la Fig. 25-26).

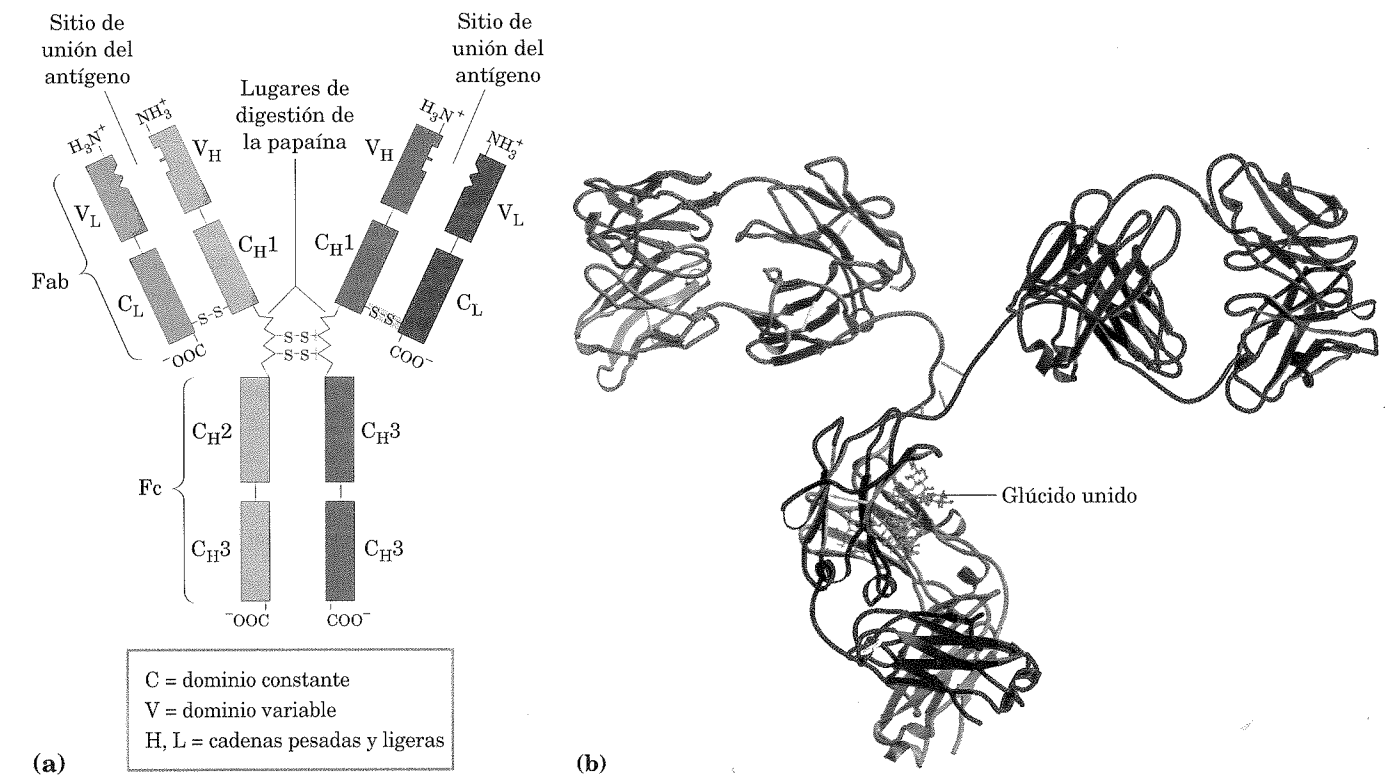
Se utiliza un léxico especializado para describir las interacciones, exclusivas del sistema inmune, que se establecen entre anticuerpos o receptores de las células T y las moléculas a las que se unen. Se conoce como **antígeno** cualquier molécula o patógeno capaz de generar una respuesta inmune. Un antígeno puede ser un virus, una pared bacteriana, una proteína individual u otras macromoléculas. A un antígeno complejo se le pueden unir una serie de anticuerpos diferentes. Un anticuerpo o un receptor de las células T concreto se unirá solamente a una estructura molecular determinada dentro del antígeno denominada **determinante antigénico** o **epitopo**.

Responder a moléculas pequeñas que son intermediarios comunes y productos del metabolismo celular no sería productivo para el sistema inmune. Las moléculas con una  $M_r < 5.000$  generalmente no actúan como antígenos. No obstante, cuando estas moléculas pequeñas se unen covalentemente a grandes proteínas en el laboratorio, pueden usarse para originar una respuesta inmune. Estas moléculas pequeñas se denominan **hap-**

**tenos**. Los anticuerpos producidos como respuesta a los haptenos unidos a proteínas se unirán entonces a las mismas moléculas pequeñas en su forma libre. Este tipo de anticuerpos se emplea algunas veces en el desarrollo de pruebas analíticas que describimos más adelante en este capítulo o también como anticuerpos catalíticos (véase el Recuadro 6-3). A continuación veremos una descripción más detallada de los anticuerpos y de sus propiedades de unión.

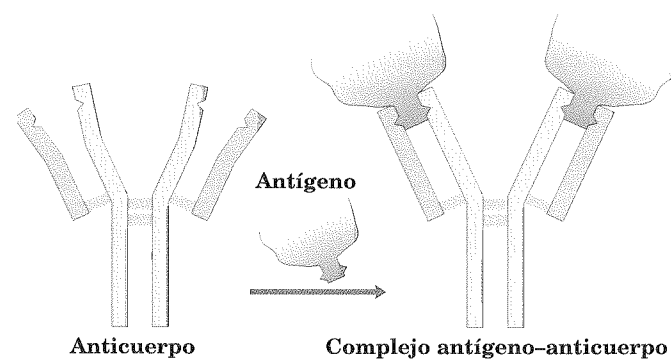
### Los anticuerpos poseen dos lugares idénticos de unión a antígeno

Las **inmunoglobulinas G (IgG)** son la principal clase de moléculas de anticuerpo y unas de las proteínas más abundantes en el suero sanguíneo. Las IgG tienen cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas largas, llamadas cadenas pesadas, y dos cadenas ligeras, unidas por enlaces no covalentes y puentes disulfuro formando un complejo de  $M_r$  150.000. Las cadenas pesadas de una molécula de IgG interaccionan en un extremo y se abren para interaccionar separadamente con las cadenas ligeras, formando una molécula en forma de Y (**Fig. 5-21**). En las “bisagras” que separan la base de la IgG de sus ramas, la inmunoglobulina puede ser cortada por proteasas. La rotura con la proteasa papaína libera el fragmento basal, llamado **Fc** debido a que suele cristalizar fácilmente, y las dos ramas, conocidas como **Fab**, los fragmentos de unión a antígeno (“antigen-binding”). Cada rama tiene un único sitio de fijación de antígeno.

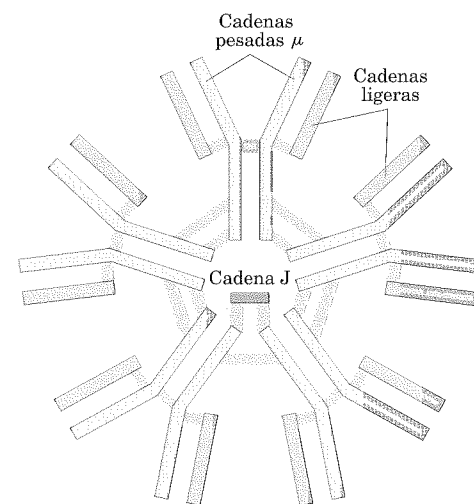


**FIGURA 5-21 Inmunoglobulina G.** (a) Un par de cadenas pesadas se combina con otro de cadenas ligeras para formar una molécula con forma de Y. Se crean dos sitios de fijación de antígeno por la combinación de los dominios variables de una cadena ligera ( $V_L$ ) y de una pesada ( $V_H$ ). La digestión con papaína separa las porciones Fab y Fc de la proteína por la región bisagra. La porción Fc de la molécula contiene también glúcido unido (se muestra en (b)). (b) Modelo de

cintas de la primera molécula de IgG completamente cristalizada y analizada estructuralmente (PDB ID 1IGT). A pesar de que la molécula contiene dos cadenas pesadas idénticas (en dos tonos de azul) y dos cadenas ligeras idénticas (en dos tonos de rojo), cristaliza según la conformación asimétrica mostrada. La flexibilidad conformacional puede ser importante para la función de las inmunoglobulinas.



**FIGURA 5-22 Unión de la IgG a un antígeno.** Para generar un ajuste óptimo con el antígeno, los sitios de unión de la IgG suelen experimentar ligeros cambios de conformación. Un ajuste inducido de este tipo es típico de diversas interacciones entre proteína y ligando.



**FIGURA 5-23 Pentámero IgM de unidades de inmunoglobulina.** El pentámero está entrelazado con enlaces disulfuro (en amarillo). La cadena J es un polipéptido de  $M_r$  20.000 encontrado tanto en la IgA como en la IgM.

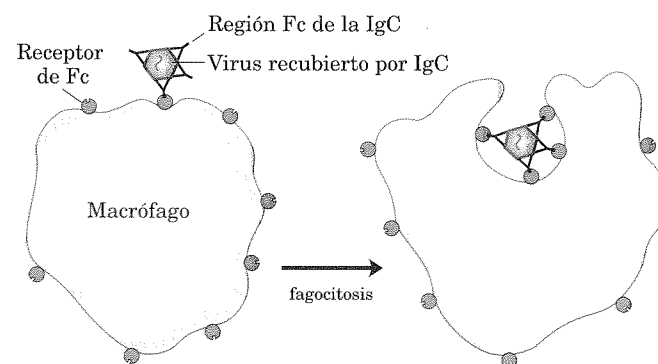
La estructura básica de las inmunoglobulinas fue establecida por Gerald Edelman y Rodney Porter. Cada cadena está compuesta por dominios identificables: algunos son constantes en secuencia y estructura de una IgG a otra, otros son variables. Los dominios constantes tienen una estructura característica conocida como **plegamiento tipo inmunoglobulina**, un motivo estructural muy conservado en todas las proteínas de la clase  $\beta$  (Capítulo 4). Hay tres de estos dominios constantes en cada cadena pesada y uno en cada cadena ligera. Las cadenas pesada y ligera poseen además un dominio variable cada una, en el cual se encuentra la mayor parte de la variabilidad en la secuencia de aminoácidos. Los dominios variables se asocian para crear el sitio de fijación del antígeno (Fig. 5-21, Fig. 5-22).

En muchos vertebrados las IgG son solamente una de las cinco clases de inmunoglobulinas. Cada clase tiene un tipo característico de cadena pesada, llamadas  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , que corresponden a las IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Hay dos tipos de cadena ligera,  $\kappa$  y  $\lambda$ , que están presentes en todas las clases de inmunoglobulinas. Las estructuras globales de las IgD y las IgE son similares a la de las IgG. Las IgM pueden presentarse en forma monomérica, unidas a membrana, o en forma de pentámero entrecruzado de la estructura básica cuando son secretadas (Fig. 5-23). Las IgA se encuentran principalmente en secreciones como la saliva, las lágrimas y la leche, pudiendo encontrarse como monómeros, dímeros o trímeros. Las IgM son los primeros anticuerpos producidos por los linfocitos B y el principal anticuerpo en los primeros estadios de la respuesta inmune primaria. Algunas células B empiezan también pronto a producir IgD (con el mismo sitio de fijación de antígeno que la IgM producida por la misma célula) pero la función específica de las IgD no está bien definida.

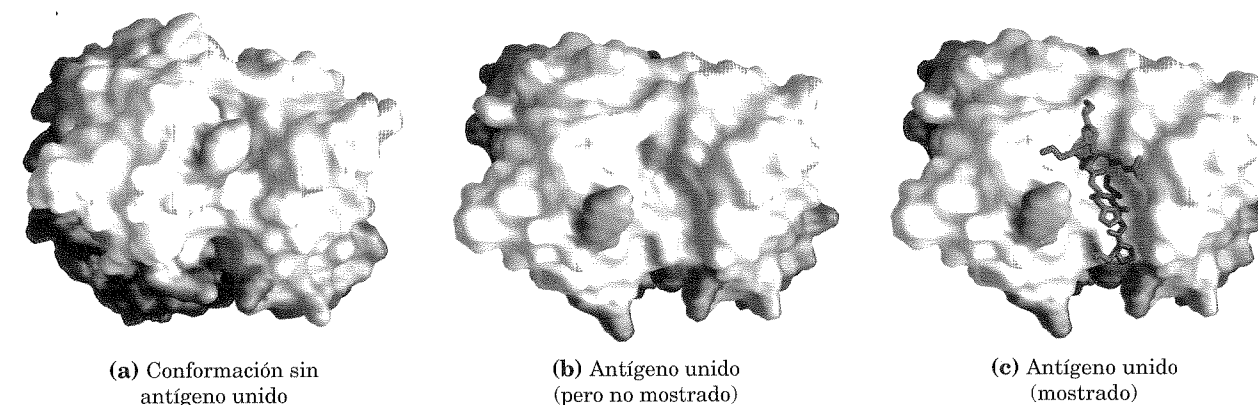
La IgG descrita anteriormente es el principal anticuerpo en la respuesta inmune secundaria, la respuesta iniciada por una clase de células B denominadas células B de memoria. Como parte de la inmunidad del organismo frente a antígenos ya conocidos, la IgG es la inmunoglobulina más abundante en la sangre. Cuando la IgG se une a una bacteria invasora o a un virus, activa ciertos leucocitos, como los macrófagos, para que engullan y destruyan al invasor, y también activa otros componentes de la respuesta inmune. Unos receptores de la superficie celular de los macrófagos reconocen y unen la región Fc de las

IgG. Cuando estos receptores de Fc se unen a un complejo antígeno-patógeno el macrófago lo rodea y lo incorpora por fagocitosis (Fig. 5-24).

La IgE juega un papel muy importante en la respuesta alérgica, interaccionando con los basófilos (leucocitos fagocíticos) en la sangre y con las células secretoras de histamina llamadas mastocitos que están ampliamente distribuidas por los tejidos. Esta inmunoglobulina se une por su región Fc a receptores Fc específicos de los basófilos o de los mastocitos. De esta manera, la IgE actúa como una especie de receptor del antígeno. La unión del antígeno induce la secreción por parte de las células de histamina y otras aminas biológicamente activas que provocan dilatación y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Se cree que estos efectos sobre los vasos sanguíneos sirven para facilitar el desplazamiento de las células y proteínas del sistema inmune hacia los lugares de inflamación. También provocan los síntomas normalmente asociados con las alergias. El polen y otros alérgenos son reconocidos como extraños, desencadenando una respuesta del sistema inmune que normalmente se reserva para los patógenos. ■



**FIGURA 5-24 Fagocitosis por un macrófago de un virus unido a anticuerpo.** Las regiones Fc de los anticuerpos unidas a los virus se unen a receptores de Fc situados en la superficie del macrófago, haciendo que el macrófago fagocite al virus y lo destruya.



**FIGURA 5-25 Encaje inducido en la unión de un antígeno a la IgG.** La molécula, mostrada en un contorno de superficie, es el fragmento Fab de una IgG. El antígeno es un péptido pequeño derivado del VIH. Hay dos residuos de la cadena pesada (en azul) y uno de la ligera (en rosa) que están coloreados para proporcionar puntos visuales de referencia. (a) Vista del fragmento Fab en ausencia de antígeno visto en dirección hacia el sitio de fijación del antígeno

(PDB ID 1GGC). (b) La misma perspectiva, pero aquí el fragmento Fab está en la conformación de "unión" (PDB ID 1GGI); el antígeno no está representado para permitir una visión sin impedimentos del sitio de fijación alterado. Observe que la cavidad de unión se ha agrandado y varios grupos han cambiado de posición. (c) La misma perspectiva que en (b), pero con el antígeno representado en el sitio de fijación como una estructura roja de varillas.

### Los anticuerpos se unen fuertemente y de manera específica al antígeno

La especificidad de unión de un anticuerpo viene determinada por la composición de aminoácidos de los dominios variables de sus cadenas pesada y ligera. Muchos residuos de estos dominios son variables, aunque no en la misma medida. Algunos, principalmente aquellos que recubren el sitio de fijación del antígeno, son hipervariables (especialmente proclives a la variación). La especificidad se debe a la complementariedad química entre el antígeno y su sitio de fijación específico, en términos de forma y localización de grupos cargados, no polares y formadores de puentes de hidrógeno. Por ejemplo, un sitio de fijación con un grupo cargado negativamente puede unir un antígeno con carga positiva en la posición complementaria. En muchos casos, la complementariedad se consigue de modo interactivo gracias a que las estructuras del antígeno y del sitio de fijación se influyen mutuamente durante la aproximación del ligando. A continuación, cambios conformacionales en el anticuerpo y/o en el antígeno permiten una completa interacción entre grupos complementarios. Éste es un ejemplo de encaje inducido. El complejo de un péptido derivado del VIH (un antígeno modelo) y una molécula Fab mostrada en la Figura 5-25 ilustra algunas de estas propiedades. En este caso los cambios en la estructura observados al unirse el antígeno son particularmente llamativos.

Una interacción antígeno-anticuerpo típica es bastante fuerte, caracterizándose por valores de  $K_d$  tan bajos como  $10^{-10}$  M (recuérdese que una  $K_d$  más baja corresponde a una interacción de unión más fuerte; véase la Tabla 5-1). La  $K_d$  refleja la energía derivada de las diversas interacciones iónicas, de enlace de hidrógeno, hidrofóbicas y de van der Waals que estabilizan la unión. La energía de unión necesaria para generar una  $K_d$  de  $10^{-10}$  M es de unos 65 kJ/mol.

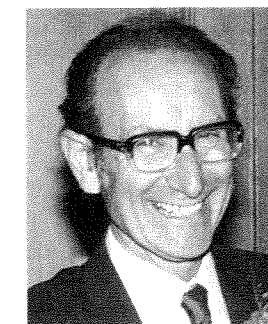
### Las interacciones antígeno-anticuerpo son la base de diversos procesos analíticos importantes

La extraordinaria afinidad y especificidad de unión de los anticuerpos los convierten en valiosos reactivos para análisis. Se

emplean dos tipos de anticuerpos: los policlones y los monoclonales. Los **anticuerpos policlones** son los producidos por diferentes poblaciones de linfocitos B en respuesta a un antígeno, como podría ser el caso de una proteína inyectada a un animal. Las células de la población de linfocitos B producen anticuerpos que unen específicamente diferentes epitopos dentro del antígeno. Por lo tanto, una preparación policlonal contiene una mezcla de anticuerpos que reconocen diferentes partes de una proteína. Los **anticuerpos monoclonales** se sintetizan por una población de células B idénticas (un **clon**) crecidas in cultivo celular. Estos anticuerpos son homogéneos, todos reconocen el mismo epitopo. Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales fueron desarrolladas por George Köhler y Cesar Milstein.



Georges Köhler, 1946–1995



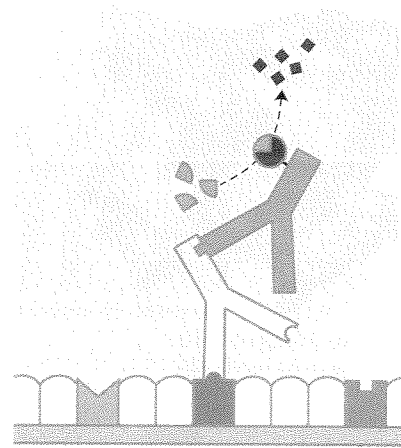
Cesar Milstein, 1927–2002

La especificidad de los anticuerpos tiene utilidades prácticas. Un anticuerpo seleccionado puede unirse covalentemente a una resina y utilizarse en una columna de cromatografía del tipo que se muestra en la Figura 3-17c. Cuando se añade una mezcla de proteínas a la columna, el anticuerpo unirá específicamente su proteína diana y la retendrá en la columna mientras que las otras proteínas escapan de ellas. La proteína diana puede entonces ser eluida de la resina utilizando una solución salina o algún otro agente. Ésta es una herramienta muy poderosa para la purificación de proteínas.

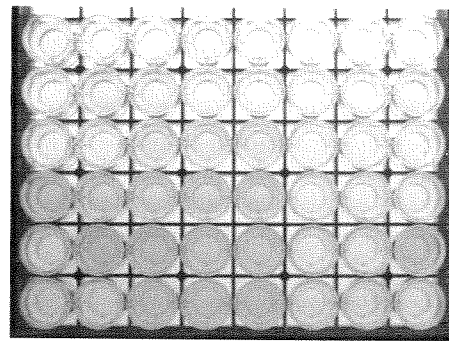
En otra técnica analítica muy versátil, un anticuerpo puede marcarse radiativamente o con algún otro reactivo que lo haga



- ① Recubrimiento de la superficie con la muestra (antígenos).
- ② Bloqueo de los lugares no ocupados con proteína no específica.
- ③ Incubación con el anticuerpo primario frente al antígeno específico.
- ④ Incubación con el complejo anticuerpo secundario-enzima que se une al anticuerpo primario.
- ⑤ Adición del sustrato.
- ⑥ Formación de producto coloreado que indica la presencia del antígeno específico.

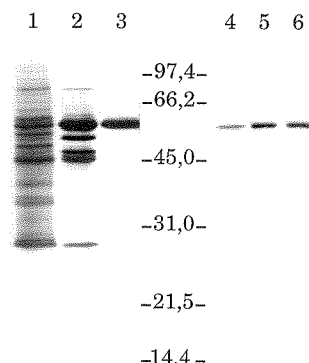


(a)



Ensayo de ELISA

(b)



Gel de SDS

Inmunotransferencia (c)

fácil de detectar. Cuando el anticuerpo se une a la proteína diana, la marca revela la presencia de la proteína en una solución o su localización en un gel o incluso en una célula viva. En la **Figura 5-26** se ilustran algunas variantes de este procedimiento.

Un **ELISA** (enzyme-linked immunosorbent assay: análisis del inmunoabsorbente unido a enzima) permite un rastreo rápido y una cuantificación de la presencia de un antígeno en una muestra (Fig. 5-26b). Las proteínas de una muestra se adsorben sobre una superficie inerte, normalmente una placa de poliestireno de 96 pocillos. La superficie se lava con una disolución de una proteína no específica y barata (normalmente caseína de leche descremada en polvo) para bloquear los sitios no ocupados evitando que otras proteínas se unan a ellos en los pasos siguientes. A continuación la superficie se trata con una solución que contenga el anticuerpo primario, un anticuerpo contra la proteína de interés. Se lava el anticuerpo no unido y la superficie se trata con una disolución que contiene un anticuerpo secundario —anticuerpo contra el anticuerpo primario—, conjugado a un enzima que cataliza una reacción que da lugar a la formación de un producto coloreado. Después de la eliminación del anticuerpo secundario no unido se añade el sustrato del enzima conjugado. La formación de producto (medida colorimétricamente) es proporcional a la concentración de la proteína de interés en la muestra.

En un **ensayo de inmunotransferencia** o **immunoblot** (Fig. 5-26c), las proteínas que se han separado mediante electroforesis en gel se transfieren electroforéticamente a una membrana

de nitrocelulosa. La membrana se bloquea (de la misma manera que se hace en un ELISA) y a continuación se trata sucesivamente con el anticuerpo primario, el anticuerpo secundario conjugado con el enzima y el sustrato. Se forma un precipitado coloreado únicamente sobre la banda que contiene la proteína de interés. La inmunotransferencia permite la detección de componentes minoritarios de una muestra y proporciona una aproximación de su masa molecular. **Inmunotransferencia**

Encontraremos otros aspectos de los anticuerpos en capítulos posteriores. Son extremadamente importantes en medicina y nos pueden enseñar muchas cosas sobre la estructura de las proteínas y la acción de los genes.

## RESUMEN 5.2 Interacciones complementarias entre proteínas y ligandos: el sistema inmune y las inmunoglobulinas

- La respuesta inmune está mediada por interacciones entre un conjunto de leucocitos especializados y sus proteínas asociadas. Los linfocitos T producen receptores de células T. Los linfocitos B producen inmunoglobulinas. Mediante un proceso denominado selección clonal, las células T auxiliares (*helper*) inducen la proliferación de células B y de células T

**FIGURA 5-26 Técnicas con anticuerpos.** La reacción específica de un anticuerpo con su antígeno es la base de diversas técnicas que identifican y cuantifican proteínas específicas en muestras complejas. (a) Representación esquemática del método general. (b) Un ELISA para comprobar la presencia de anticuerpos frente al virus herpes simplex (VHS) en muestras de sangre. Los pocillos se recubrieron con un antígeno VHS al cual se le unirán los anticuerpos contra el VHS. El segundo anticuerpo es una anti IgG humana unida a la peroxidasa de rábano. Al terminar los pasos mostrados en (a), las muestras de sangre con mayor cantidad de anticuerpos frente al VHS dan un color amarillo más intenso. (c) Una inmunotransferencia. Los carriles del 1 al 3 pertenecen a un gel de SDS; muestras pertenecientes a pasos consecutivos de la purificación de una proteína quinasa han sido resueltas electroforéticamente y teñidas con azul de Coomassie. Los carriles del 4 al 6 presentan las mismas muestras después de haber sido transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa, tras separación en un gel de SDS. A continuación, la membrana se “analizó” con un anticuerpo frente a la proteína quinasa. Los números entre el gel y la inmunotransferencia indican el  $M_r$  (en millares).

citotóxicas que producen inmunoglobulinas o de receptores de células T que se unen a un antígeno específico.

- El ser humano posee cinco clases de inmunoglobulinas, con diferentes funciones biológicas para cada una de ellas. La clase más abundante es la de las IgG, proteínas en forma de Y con dos cadenas pesadas y dos ligeras. Los dominios cercanos a los extremos superiores de la Y son hipervariables dentro de la amplia población de las IgG y forman dos sitios de fijación de antígeno.
- Una inmunoglobulina determinada se une generalmente a una única parte, denominada epitopo, de un antígeno más grande. La unión suele implicar un cambio conformacional de la IgG a través de un encaje inducido con el antígeno.

## 5.3 Interacciones proteicas moduladas por energía química: actina, miosina y motores moleculares

Los organismos se mueven. Las células se mueven. Los orgánulos y las macromoléculas dentro de las células se mueven. La mayoría de estos movimientos se originan a partir de la actividad de unos fascinantes motores moleculares basados en proteínas. Grandes agregados de proteínas motoras experimentan cambios conformacionales cíclicos que se acumulan en fuerzas direccionales unificadas, para lo que utilizan energía química, normalmente derivada del ATP. La fuerza resultante puede ser pequeña, como la responsable de la separación de los cromosomas en la división celular, o inmensa, como la que eleva en el aire a un tigre de un cuarto de tonelada de peso.

Tal como se puede suponer, las interacciones complementarias entre las proteínas motoras son de los más diversos tipos: iónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals en los sitios de unión de las proteínas. Sin embargo, en las proteínas motoras estas interacciones alcanzan niveles extraordinariamente altos de organización espacial y temporal.

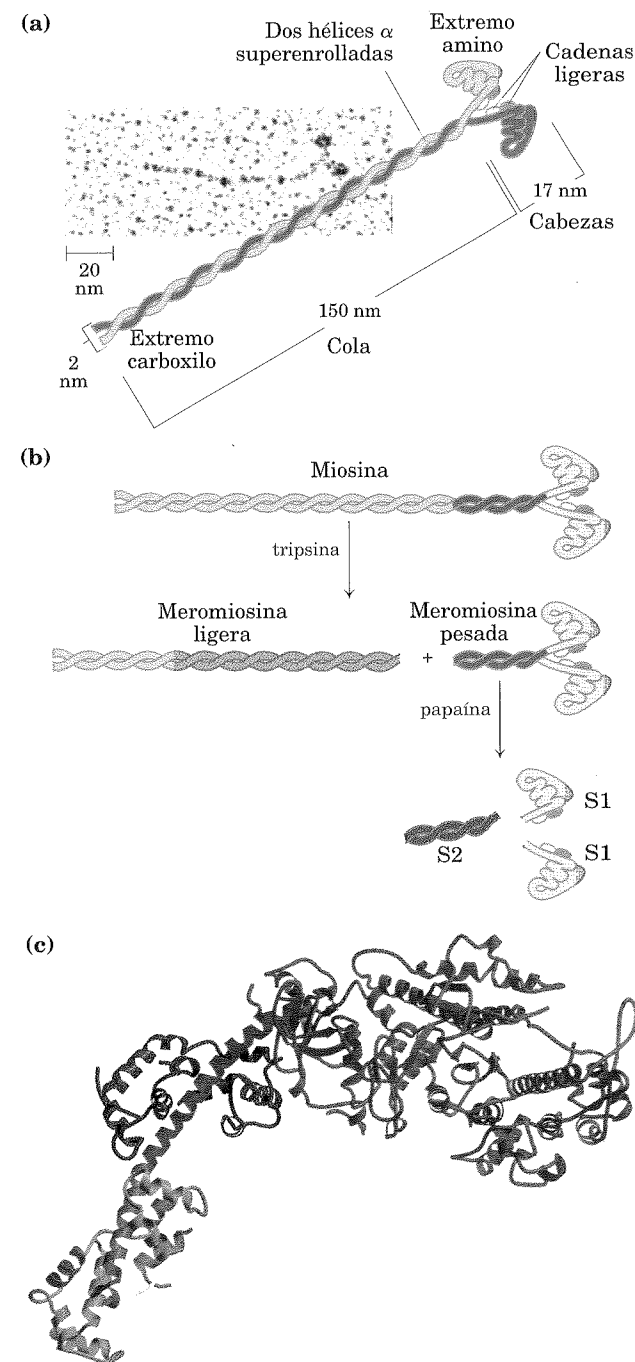
Las proteínas motoras son la base de la contracción muscular, la migración de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos, la rotación de los flagelos bacterianos y el movimiento de algunas proteínas a lo largo del DNA. Las proteínas llamadas quinesinas y dineínas se mueven a lo largo de los microtúbulos en las células, transportando orgánulos o reorganizando los cromosomas durante la división celular. Es una interacción de la dineína con los microtúbulos la que origina el movimiento de los flagelos y los cilios de los eucariotas. El movimiento flagelar de las bacterias implica un complicado motor de rotación situado en la base del flagelo (véase la Fig. 19-39). Las helicasas, las polimerasas y otras proteínas se mueven a lo largo del DNA al tiempo que llevan a cabo sus funciones metabólicas sobre el DNA (Capítulo 25). Aquí nos centraremos en el bien estudiado ejemplo de las proteínas contráctiles del músculo esquelético de los vertebrados, utilizándolo como paradigma de la forma en que las proteínas transforman energía química en movimiento.

### Las principales proteínas del músculo son la actina y la miosina

La fuerza para la contracción muscular se genera por la interacción de dos proteínas, la miosina y la actina. Estas proteínas es-

tán dispuestas en filamentos que llevan a cabo interacciones transitorias y se deslizan unos sobre otros para realizar la contracción. En conjunto la actina y la miosina conforman el 80% de la masa proteica muscular.

La **miosina** ( $M_r$  540.000) tiene seis subunidades: dos cadenas pesadas (cada una con  $M_r$  220.000) y cuatro cadenas ligeras



**FIGURA 5-27 Miosina.** (a) La miosina tiene dos cadenas pesadas (coloreadas en dos tonos rosa), en las que el extremo carboxilo forma un superenrollamiento extendido (cola) y el extremo amino terminal tiene unos dominios globulares (cabezas). Con cada cabeza de miosina hay dos cadenas ligeras asociadas (en azul). (b) La digestión con tripsina y papaína separa las cabezas de miosina (fragmentos S1) de las colas. (c) Representación de cintas del fragmento S1 de la miosina (a partir de coordenadas cedidas por Ivan Rayment). La cadena pesada se muestra en gris, las dos cadenas ligeras se muestran en dos tonos de azul.

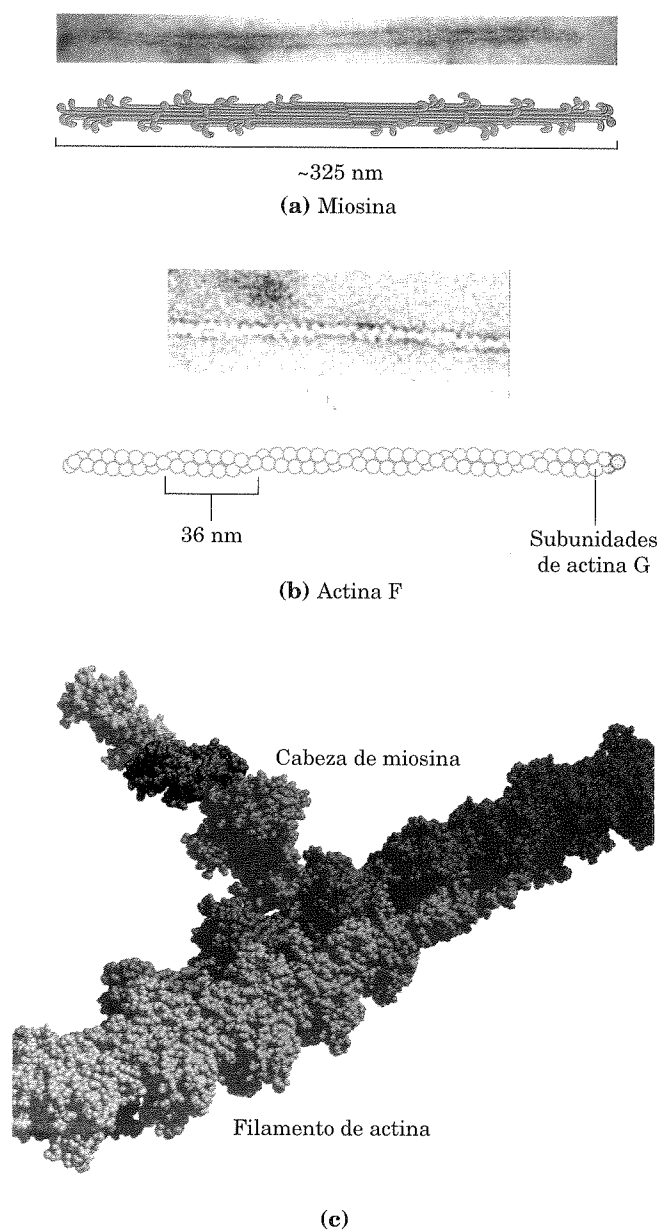
(cada una con  $M_r$  20.000). Las cadenas pesadas constituyen la mayor parte de la estructura. Se encuentran dispuestas como hélices  $\alpha$  extendidas en su extremo carboxilo terminal, dispuestas unas sobre las otras con un superenrollamiento levógiro formando una fibra del tipo de la  $\alpha$ -queratina (Fig. 5-27a). En su extremo amino terminal cada cadena pesada tiene un gran dominio globular donde se encuentra el sitio de hidrólisis del ATP. Las cadenas ligeras están asociadas con los dominios globulares. Tras un breve tratamiento de la miosina con tripsina, la mayor parte de la cola fibrosa se libera por proteólisis, dividiendo a la proteína en dos componentes llamados meromiosina ligera y pesada (Fig. 5-27b). El dominio globular, llamado subfragmento 1 o S1 de la miosina, o simplemente “cabeza” de la miosina, se puede liberar de la meromiosina pesada por tratamiento con papaína. El fragmento S1 es el dominio motor que permite la contracción muscular. Los fragmentos S1 pueden cristalizarse y su estructura global se muestra tal como fue determinada por Ivan Rayment y Hazel Holden en la Figura 5-27c.

En las células musculares, las moléculas de miosina se agregan para formar las estructuras llamadas **filamentos gruesos** (Fig. 5-28a). Estas estructuras en forma de varilla actúan como núcleo de la unidad contráctil. Varios centenares de moléculas de miosina se disponen en un filamento grueso con sus colas fibrosas asociadas para formar una larga estructura bipolar. Los dominios globulares se proyectan a partir de los dos extremos de esta estructura a modo de grupos dispuestos con regularidad.

La segunda de las proteínas principales del músculo, la **actina**, abunda en prácticamente todas las células eucariotas. En el músculo, las moléculas de actina monomérica llamada actina G (actina globular:  $M_r$  42.000), se asocian para formar largos polímeros llamados actina F (actina filamentosa). Los **filamentos delgados** (Fig. 5-28b) están formados por actina F junto con las proteínas troponina y tropomiosina (que se describen más adelante). La parte filamentosa de los filamentos delgados se asocia al añadirse sucesivas moléculas de actina monomérica a un extremo. Además, cada monómero une ATP y a continuación lo hidroliza a ADP, de manera que todas las moléculas de actina del filamento están acomplejadas con ADP. Esta hidrólisis de ATP por la actina se produce sólo en el ensamblaje de los filamentos; no contribuye directamente a la energía gastada en la contracción muscular. Cada monómero de actina del filamento delgado puede unirse fuertemente y de manera específica a una cabeza de miosina (Fig. 5-28c).

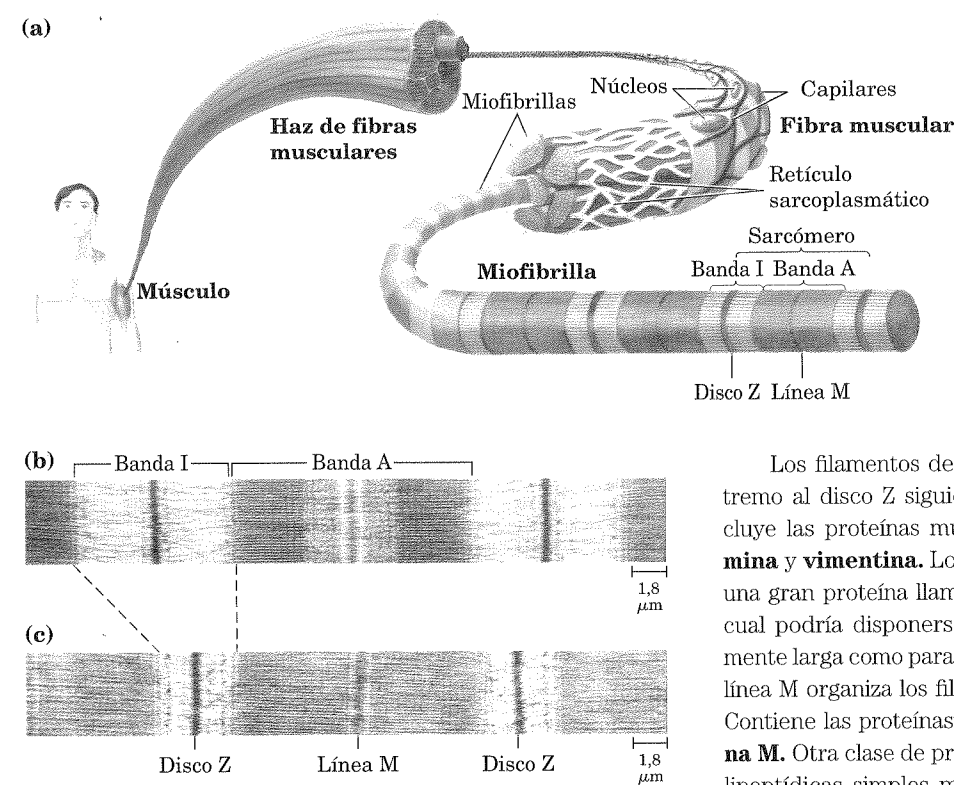
### Otras proteínas adicionales organizan los filamentos delgado y grueso en estructuras ordenadas

El músculo esquelético consiste en haces paralelos de **fibras musculares**, siendo cada fibra una única célula multinucleada de gran tamaño, de 20 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, formada a partir de la fusión de muchas células y con una longitud en ocasiones igual a la del propio músculo. Cada fibra contiene a su vez unas 1.000 **miofibrillas**, de unos 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, estando formada cada una por un gran número de filamentos delgados y gruesos acomplejados con otras proteínas y dispuestos de manera regular (Fig. 5-29). Un sistema de vesículas membranosas planas llamado **retículo sarcoplasmático** rodea cada miofibrilla. Al examinarse al microscopio electrónico, las fibras



**FIGURA 5-28 Principales componentes del músculo.** (a) Los agregados de miosina forman una estructura bipolar conocida como filamento grueso. (b) La actina F resulta del ensamblaje filamentoso de los monómeros de actina G, que polimerizan en parejas adquiriendo el aspecto de dos filamentos que se enrollan en espiral uno sobre otro con una orientación dextrógiro. (c) Modelo espacial de esferas de un filamento de actina (diferentes tonos de rojo) con una cabeza de miosina (en gris y dos tonos de azul) unida a un monómero de actina dentro del filamento (a partir de coordenadas cedidas por Ivan Rayment).

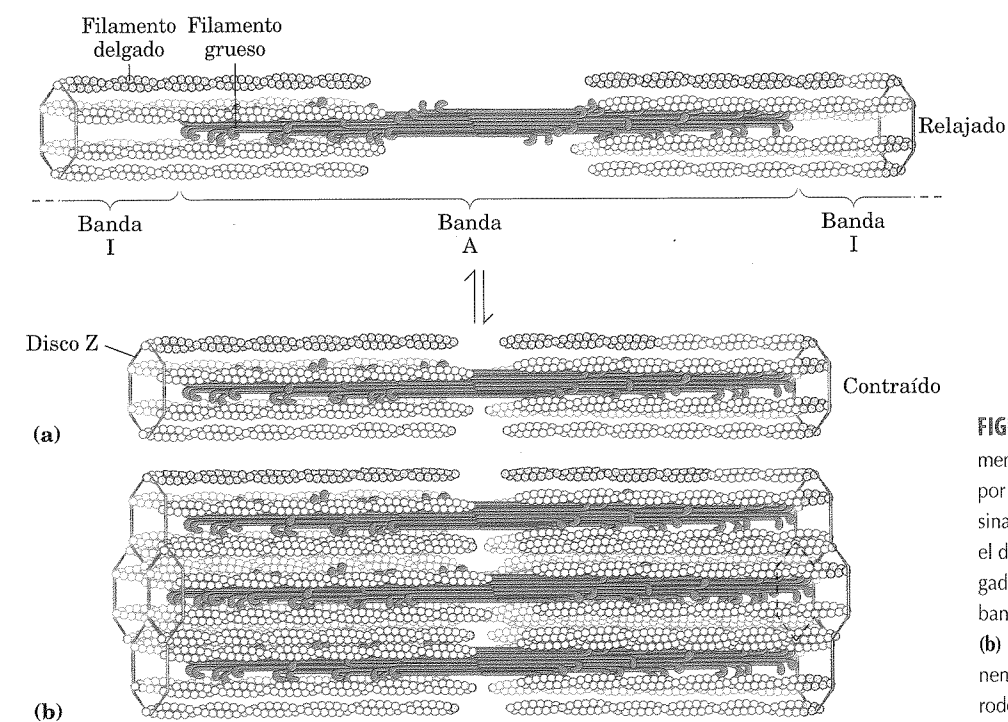
musculares muestran regiones alternas de alta y baja densidad electrónica, llamadas **bandas A e I** (Fig. 5-29b, c). Las bandas A e I se deben a la disposición de los filamentos gruesos y delgados, los cuales están alineados y se solapan parcialmente. La banda I es la región del haz cuyo corte sagital sólo contendría filamentos delgados. La banda A, más oscura, es igual de larga que los filamentos gruesos e incluye la región de solapamiento entre filamentos gruesos y delgados paralelos. En la bisección de la banda I hay una fina estructura llamada **disco Z**, perpendicular a los filamentos delgados y que actúa como un ancla a la cual se unen estos filamentos. La banda A también posee una



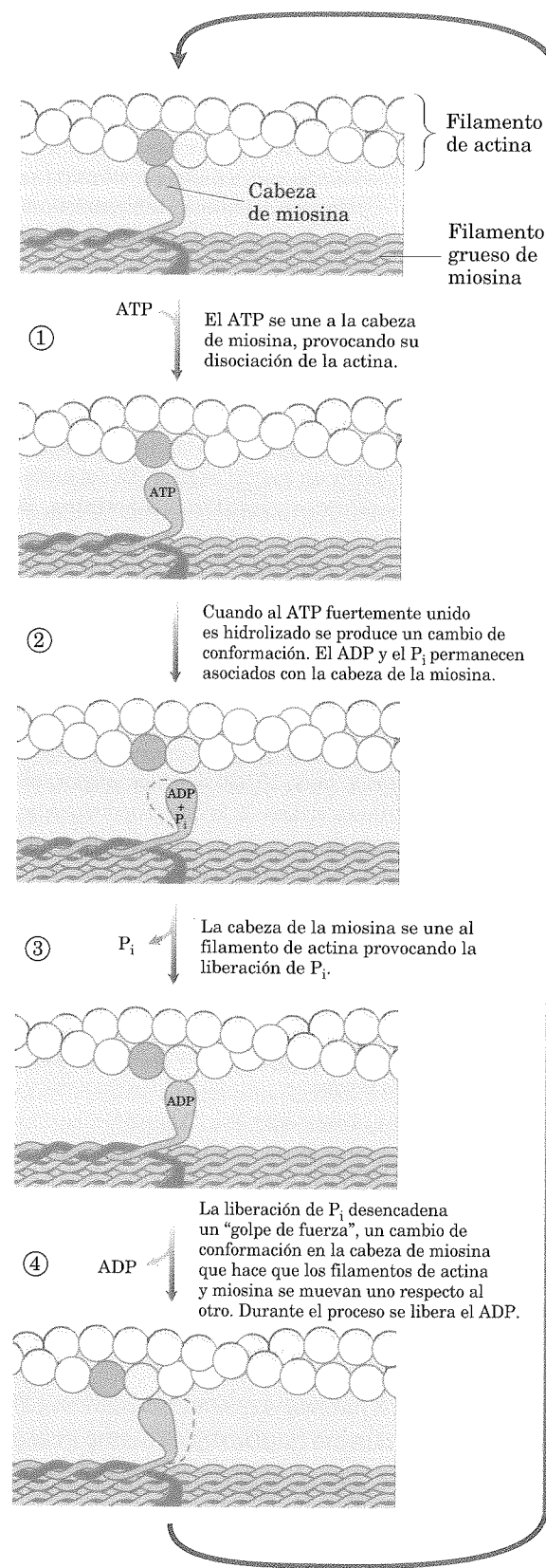
**FIGURA 5-29 Músculo esquelético.** (a) Las fibras musculares están formadas por células multinucleadas alargadas que se originan por la fusión de muchas células precursoras. Dentro de las fibras hay muchas miofibrillas (aquí se muestran sólo seis), rodeadas por el retículo sarcoplasmático membranoso. La organización de los filamentos gruesos y delgados dentro de la miofibrilla le confiere una apariencia estriada. Cuando el músculo se contrae las bandas I se estrechan y los discos Z se acercan entre ellos, como se observa en las micrografías electrónicas del músculo relajado (b) y contraído (c).

Los filamentos delgados de actina están unidos en un extremo al disco Z siguiendo un patrón regular. El conjunto incluye las proteínas musculares minoritarias  **$\alpha$ -actinina, desmina y vimentina**. Los filamentos delgados también contienen una gran proteína llamada **nebulina** (~7.000 aminoácidos), la cual podría disponerse en forma de una hélice  $\alpha$  suficientemente larga como para abarcar toda la longitud del filamento. La línea M organiza los filamentos gruesos de una manera similar. Contiene las proteínas **paramiosina, proteína C y la proteína M**. Otra clase de proteínas llamadas **titinas**, las cadenas polipeptídicas simples más largas que se conocen (la titina del músculo cardíaco humano tiene 26.926 residuos aminoácidos), unen los filamentos gruesos al disco Z, lo que proporciona un nivel adicional de organización a la estructura global. Se cree que tanto la nebulina como la titina actúan como “pautas moleculares”, regulando la longitud de los filamentos gruesos y delgados respectivamente. La titina se extiende del disco Z a la línea M, regulando la longitud del sarcómero y evitando una hiperextensión del músculo. En los vertebrados la longitud característica de un sarcómero varía de un tejido muscular a otro, un fenómeno atribuible en gran medida a la presencia de diferentes variantes de titina en los tejidos.

estructura similar en su bisectriz, la **línea M** o disco M, que es una región de alta densidad electrónica en el centro de los filamentos gruesos. El conjunto de la unidad contráctil, los haces de filamentos gruesos solapados en cada uno de sus extremos con haces de filamentos delgados, se denomina **sarcómero**. La disposición de los haces yuxtapuestos permite que los filamentos gruesos y delgados se deslicen unos sobre otros (mediante un mecanismo que discutiremos más adelante), provocando un acortamiento progresivo de cada sarcómero (Fig. 5-30).



**FIGURA 5-30 Contracción muscular.** Los filamentos gruesos son estructuras bipolares creadas por la asociación de muchas moléculas de miosina. (a) La contracción muscular se produce por el deslizamiento de los filamentos gruesos y delgados entre ellos de manera que los discos Z de bandas I vecinas se aproximan unos a los otros. (b) Los filamentos gruesos y delgados se disponen de manera que cada filamento grueso está rodeado por seis filamentos delgados.



**FIGURA 5-31 Mecanismo molecular de la contracción muscular.** Una serie de cambios de conformación en la cabeza de miosina, acoplados al ciclo hidrolítico del ATP, hacen que la miosina se separe de una subunidad de actina y se asocie a otra más alejada del filamento de actina. De esta manera las cabezas de miosina se deslizan a lo largo de los filamentos delgados, arrastrando a los filamentos gruesos dentro del entramado de filamentos delgados (véase la Fig. 5-30).

### Los filamentos gruesos de miosina se deslizan a lo largo de los filamentos delgados de actina

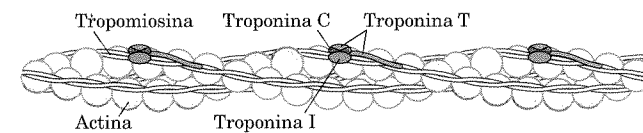
La interacción entre la actina y la miosina, igual que cualquier otra entre proteínas y ligandos, está basada en enlaces débiles. Cuando el ATP no está unido a la miosina, una cara de la cabeza de ésta se une fuertemente a la actina (**Fig. 5-31**). Cuando el ATP se une a la miosina y es hidrolizado a ADP y fosfato, se producen una serie de cambios de conformación coordinados mediante los cuales la miosina libera la subunidad F de la actina y se une a otra subunidad en una posición más lejana en el filamento delgado.

El ciclo consta de cuatro pasos principales (**Fig. 5-31**). En el paso **1**, el ATP se une a la miosina produciendo un cambio conformacional que consiste en la apertura de una hendidura en la miosina, a consecuencia del cual se deshace la interacción actina-miosina, liberándose la actina. A continuación el ATP se hidroliza en el paso **2**, provocando un cambio conformacional en la proteína, que pasa a un estado de "alta energía" que hace que la cabeza de miosina se mueva y cambie su orientación con respecto al filamento delgado de actina. La miosina se une, entonces, débilmente a una subunidad de actina F más cercana al disco Z que la que acaba de liberar. En el paso **3** se produce otro cambio conformacional cuando el fosfato, producto de la hidrólisis del ATP, es liberado de la miosina. Este cambio consiste en el cierre de la hendidura de la miosina, fortaleciendo la unión actina-miosina. Inmediatamente a continuación se produce el paso final **4**, un "golpe de energía" en el que la conformación de la cabeza de miosina vuelve a su estado de reposo original, con un cambio en su orientación relativa con respecto a la actina unida que hace que la cola de la miosina se aproxime al disco Z. A continuación se libera ADP para completar el ciclo. Cada ciclo genera entre 3 y 4 pN (piconewtons) de fuerza y mueve el filamento grueso de 5 a 10 nm con respecto al filamento delgado.

Debido al gran número de cabezas de miosina presentes en un filamento grueso, en cualquier momento habrá algunas de ellas (probablemente entre el 1% y el 3%) unidas a filamentos delgados. Esto evita que los filamentos gruesos puedan deslizarse hacia atrás cuando una cabeza individual de miosina libera la subunidad de actina a la que estaba unida. Así el filamento grueso se desliza activamente hacia adelante sobre los delgados adyacentes. Este proceso, coordinado entre los muchos sarcómeros de una fibra muscular, genera la contracción muscular.

La interacción entre la actina y la miosina debe ser regulada de manera que la contracción muscular se produzca sólo como respuesta a las señales adecuadas con origen en el sistema nervioso. De esta regulación se encarga un complejo formado por dos proteínas, la **tropomiosina** y la **troponina** (**Fig. 5-32**). La tropomiosina se une al filamento delgado, bloqueando los sitios de fijación para los grupos de las cabezas de miosina. La troponina es una proteína que une  $Ca^{2+}$ . El impulso nervioso provoca la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico. El  $Ca^{2+}$  liberado se une a la troponina (otra interacción proteína-ligando) y provoca de este modo un cambio conformacional en los complejos de tropomiosina-troponina, exponiendo los sitios de fijación para miosina de los filamentos delgados. A continuación se produce la contracción.

El músculo esquelético en funcionamiento requiere dos tipos de funciones moleculares que son comunes entre las proteínas: unión y catálisis. La interacción entre la actina y la miosina,



**FIGURA 5-32 Regulación de la contracción muscular por la tropomiosina y la troponina.** La tropomiosina y la troponina están unidas a la actina F en los filamentos delgados. En el músculo relajado, estas proteínas están dispuestas alrededor de los filamentos de actina y bloquean los sitios de unión para la miosina. La tropomiosina es una superhélice de dos cadenas de hélice  $\alpha$ , la misma estructura que la de la  $\alpha$ -queratina (véase la Fig. 4-10). Forma polímeros cabeza-cola que se doblan alrededor de las dos cadenas de actina. La troponina se une al complejo actina-tropomiosina a intervalos regulares de 38,5 nm. La troponina está formada por tres subunidades diferentes: I, C y T. La troponina I impide la unión de la cabeza de miosina a la actina; la troponina C tiene un sitio de unión de  $Ca^{2+}$  y la troponina T une el complejo entero de troponina a la tropomiosina. Cuando el músculo recibe una señal nerviosa para iniciar la contracción, se libera  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (véase la Fig. 5-29a) y se une a la troponina C. Produce un cambio de conformación en la troponina C que altera las posiciones de la troponina I y de la tropomiosina de manera que se libera la inhibición por la troponina I y se permite la contracción muscular.

una interacción de tipo proteína-ligando igual que la que se da entre las inmunoglobulinas y los antígenos, es reversible y no modifica a las moléculas que participan en ella. Sin embargo el ATP se hidroliza a ADP y  $P_i$  cuando se une a la miosina. La miosina no es sólo una proteína de unión a actina es también una ATPasa, un enzima. La función de los enzimas como catalizadores de transformaciones químicas es el tema del próximo capítulo.

### RESUMEN 5.3 Interacciones proteicas moduladas por energía química: actina, miosina y motores moleculares

- Las interacciones proteína-ligando adquieren un grado especial de organización espacial y temporal en las proteínas motoras. La contracción muscular es el resultado de un conjunto de interacciones entre miosina y actina, acopladas a la hidrólisis del ATP a cargo de la miosina.
- La miosina consiste en dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras que forman un dominio enrollado superhelicoidal (cola) y un dominio globular (cabeza). Las moléculas de miosina se organizan en filamentos gruesos que se deslizan sobre filamentos delgados compuestos principalmente por actina. La hidrólisis de ATP en la miosina se acopla a una serie de cambios conformacionales en la cabeza de la miosina que conducen a la disociación de la miosina de una subunidad de actina F y su posterior reasociación con otra subunidad, en una posición más lejana en el filamento delgado. De este modo, la miosina de desliza a lo largo de los filamentos de actina.
- La contracción muscular es estimulada por la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico. El  $Ca^{2+}$  se une a la proteína troponina, provocando un cambio conformacional en un complejo troponina-tropomiosina que da lugar al inicio del ciclo de interacciones actina-miosina.

### Palabras clave

Todos los términos en **negrita** están definidos en el glosario.

<b>ligando</b>	153	<b>linfocitos B</b>	
<b>sitio de fijación</b>	153	o <b>células B</b>	170
<b>encaje inducido</b>	153	<b>linfocitos T</b>	
<b>hemo</b>	154	o <b>células T</b>	170
<b>porfirina</b>	154	<b>antígeno</b>	171
globinas	155	<b>epitopo</b>	171
expresión de equilibrio	155	<b>hapteno</b>	171
constante de asociación,		plegamiento tipo	
$K_a$	156	inmunoglobulina	172
<b>constante de disociación,</b>		<b>anticuerpos</b>	
$K_d$	156	<b>policlonales</b>	173
<b>proteína alostérica</b>	162	<b>anticuerpos</b>	
ecuación de Hill	164	<b>monoclonales</b>	173
efecto Bohr	166	ELISA	174
<b>linfocitos</b>	170	<b>miosina</b>	175
<b>anticuerpo</b>	170	<b>actina</b>	176
<b>inmunoglobulina</b>	170	<b>sarcómero</b>	177

### Bibliografía

#### Proteínas de unión a oxígeno

- Ackers, G.K. & Hazzard, J.H.** (1993) Transduction of binding energy into hemoglobin cooperativity. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 385-390.
- Changeux, J.P. & Edelstein, S.J.** (2005) Allosteric mechanisms of signal transduction *Science* **308**, 1424-1428.
- Koshland, D.E., Jr., Nemethy, G., & Filmer, D.** (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* **6**, 365-385.
- La publicación en la cual se propuso el modelo secuencial.
- Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J.-P.** (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**, 88-118.
- El modelo concertado fue propuesto por primera vez en esta publicación de referencia.
- Olson, J.S. & Phillips, G.N., Jr.** (1996) Kinetic pathways and barriers for ligand binding to myoglobin. *J. Biol. Chem.* **271**, 17,593-17,596.
- Perutz, M.F.** (1989) Myoglobin and haemoglobin: role of distal residues in reactions with haem ligands. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 42-44.
- Perutz, M.F., Wilkinson, A.J., Paoli, M., & Dodson, G.G.** (1998) The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 1-34.
- Squires, J.E.** (2002) Artificial blood. *Science* **295**, 1002-1005.
- Una buena descripción del imponente reto tecnológico que significa el intento de mimetizar la altamente sofisticada función de la sangre en el transporte de oxígeno.
- #### Proteínas del sistema inmune
- Cooper, M.D. & Alder, M.N.** (2006) The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124**, 815-822.
- Un ensayo interesante que describe los orígenes del sistema inmune humano
- Davies, D.R. & Chacko, S.** (1993) Antibody structure. *Acc. Chem. Res.* **26**, 421-427.
- Davies, D.R., Padlan, E.A., & Sheriff, S.** (1990) Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 439-473.
- Kindt, T.J., Osborne, B.A., & Goldsby, R.A.** (2007) *Kuby Immunology*, 6th edn, W. H. Freeman and Company, New York.



**Ploegh, H.L.** (1998) Viral strategies of immune evasion. *Science* **280**, 248–253.

**Thomsen, A.R., Nansen, A., & Christensen, J.P.** (1998) Virus-induced T cell activation and the inflammatory response. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **231**, 99–123.

**Yewdell, J.W. & Haeryfar, S.M.M.** (2005) Understanding presentation of viral antigens to CD8(+) T cells in vivo: the key to rational vaccine design. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 651–682.

### Motores moleculares

**Finer, J.T., Simmons, R.M., & Spudich, J.A.** (1994) Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature* **368**, 113–119.

La tecnología moderna revela las fuerzas que afectan a las proteínas motores individuales.

**Geeves, M.A. & Holmes, K.C.** (1999) Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 687–728.

**Huxley, H.E.** (1998) Getting to grips with contraction: the interplay of structure and biochemistry. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 84–87.

Una interesante perspectiva histórica sobre el esclarecimiento del mecanismo de la contracción muscular.

**Labeit, S. & Kolmerer, B.** (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* **270**, 293–296.

Una descripción de algunas de las mayores proteínas conocidas.

**Molloy, J.E. & Veigel, C.** (2003) Myosin motors walk the walk. *Science* **300**, 2045–2046.

**Rayment, I.** (1996) The structural basis of the myosin ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 15,850–15,853.

La contracción muscular desde una perspectiva estructural.

**Rayment, I. & Holden, H.M.** (1994) The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 129–134.

**Spudich, J.A.** (1994) How molecular motors work. *Nature* **372**, 515–518.

**Vale, R.D.** (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467–480.

## Problemas

**1. Relación entre las constantes de afinidad y de disociación** La proteína A tiene un sitio de fijación para el ligando X con una  $K_d$  de  $10^{-6}$  M. La proteína B tiene un sitio de fijación para el ligando X con una  $K_d$  de  $10^{-9}$  M. ¿Qué proteína tiene mayor afinidad para el ligando X? Explique el razonamiento. Convierta la  $K_d$  en  $K_a$  para ambas proteínas.

**2. Cooperatividad negativa** ¿Cuál de las siguientes situaciones daría lugar a una curva de Hill con  $n_H < 1,0$ ? Explique su razonamiento en cada caso.

(a) La proteína tiene múltiples subunidades, cada una con un único sitio de fijación de ligando. La unión del ligando a un sitio disminuye la afinidad de unión de los otros sitios de fijación de ligando.

(b) La proteína es un único polipéptido con dos sitios de fijación de ligando, cada uno de ellos con una afinidad diferente para el ligando.

(c) La proteína es un único polipéptido con un único sitio de fijación de ligando. Una vez purificado, el preparado proteico es heterogéneo y contiene algunas moléculas de proteína que están parcialmente desnaturalizadas, por lo que poseen una menor afinidad de unión para el ligando.

**3. Afinidad por el oxígeno en la hemoglobina** ¿Cuál es el efecto de los siguientes cambios sobre la afinidad de la hemoglobina por el  $O_2$ ? (a) Un descenso del pH del plasma sanguíneo de 7,4 a 7,2. (b) Un descenso de la presión parcial de  $CO_2$  en los pulmones de 6 kPa (aguantando la respiración) a 2 kPa (normal). (c) Un aumento del nivel de BPG de 5 mM (alti-

tud normal) a 8 mM (grandes altitudes). (d) Un incremento en  $CO$  desde 1,0 partes por millón (ppm) en una atmósfera interior normal hasta 30 ppm en una casa en la que el horno de gas funciona mal o tiene pérdidas.

**4. Unión reversible de ligandos** La proteína calcineurina se une a la proteína calmodulina con una velocidad de asociación de  $8,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y una constante de disociación global,  $K_d$ , de 10 nM. Calcule la velocidad de disociación,  $k_d$ , y exprese la en las unidades adecuadas.

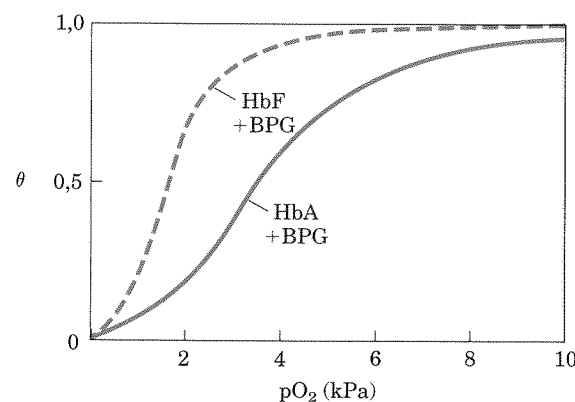
**5. Cooperatividad en la hemoglobina** En circunstancias adecuadas, la hemoglobina se disocia en sus cuatro subunidades. La subunidad  $\alpha$  aislada une oxígeno, pero la curva de saturación de  $O_2$  es hiperbólica en lugar de sigmoidea. Además, la unión de oxígeno a la subunidad  $\alpha$  aislada no se ve afectada por la presencia de  $H^+$ ,  $CO_2$  o BPG. ¿Qué indican estas observaciones sobre el origen de la cooperatividad en la hemoglobina?

**6. Comparación de las hemoglobinas fetal y materna** Los estudios sobre transporte de oxígeno en mamíferos en estado de gestación han demostrado que las curvas de saturación por  $O_2$  de las sangres materna y fetal son claramente diferentes cuando se miden en las mismas condiciones. Los eritrocitos fetales contienen una variante estructural de la hemoglobina, la HbF, que consiste en dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ), mientras que los eritrocitos maternos contienen la HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ).

(a) ¿Cuál de las dos hemoglobinas tiene una mayor afinidad por el oxígeno en condiciones fisiológicas, la HbA o la HbF? Explíquelo.

(b) ¿Cuál es el significado fisiológico de la diferente afinidad por el oxígeno?

(c) Cuando se retira todo el BPG presente en muestras de HbA y HbF las curvas de saturación de  $O_2$  (y como consecuencia las afinidades por el  $O_2$ ) se desplazan hacia la izquierda. No obstante, en esta situación la HbA tiene una mayor afinidad por el oxígeno que la HbF. Cuando se reintroduce el BPG las curvas de saturación de  $O_2$  vuelven a la normalidad, tal como se muestra en el gráfico. ¿Cuál es el efecto del BPG sobre la afinidad por el  $O_2$  de la hemoglobina? ¿Cómo puede utilizarse esta información para explicar las diferentes afinidades por el  $O_2$  de las hemoglobinas fetal y materna?



**7. Variantes de la hemoglobina** En la naturaleza se presentan casi 500 variantes de la hemoglobina. La mayoría son el resultado de un único cambio de aminoácido en una cadena polipeptídica de globina. Algunas variantes provocan enfermedades aunque no todas tienen efectos negativos. A continuación se presenta una breve muestra:

HbS (Hb de la célula falciforme): sustitución de un Glu por una Val en la superficie

Hb Cowtown: eliminación de un par iónico implicado en la estabilización del estado T

Hb Memphis: sustitución de un residuo polar no cargado por otro de tamaño similar en la superficie

Hb Bibba: sustitución de una Leu por una Pro implicada en una hélice  $\alpha$

Hb Milwaukee: sustitución de una Val por un Glu

Hb Providence: sustitución de una Lys por una Asn que se proyecta normalmente hacia la cavidad central del tetrámero

Hb Philly: sustitución de una Tyr por una Phe, que rompe el enlace de hidrógeno en la interfase  $\alpha_1\beta_1$

Explique su elección para cada una de las siguientes situaciones:

(a) La variante de Hb que tendrá *menor* probabilidad de provocar síntomas patológicos.

(b) La variante o variantes que tengan más probabilidad de mostrar valores de pI diferentes a los de la HbA al analizarlas en un gel de enfoque isoeléctrico.

(c) La variante o variantes que tengan más posibilidades de mostrar una disminución en la unión de BPG y un aumento de la afinidad global de la hemoglobina por el oxígeno.

**8. Unión de oxígeno y estructura de la hemoglobina** Se utiliza la ingeniería genética para modificar la interfase entre subunidades de hemoglobina. Las variantes resultantes se presentan en disolución principalmente como dímeros  $\alpha\beta$  (tetrámeros  $\alpha_2\beta_2$  hay pocos, o ninguno). Estas variantes, ¿unirán oxígeno más débilmente o más fuertemente? Explique su respuesta.

**9. Unión reversible (aunque fuerte) a un anticuerpo** Un anticuerpo se une a un antígeno con una  $K_d$  de  $5 \times 10^{-8}$  M. ¿A qué concentración de antígeno  $\theta$  será igual a: (a) 0,2, (b) 0,5, (c) 0,6, (d) 0,8?

**10. Uso de anticuerpos para demostrar las relaciones entre estructura y función en las proteínas** Un anticuerpo monoclonal se une a la actina G pero no a la actina F. ¿Qué nos dice esto sobre el epitopo reconocido por el anticuerpo?

**11. El sistema inmune y las vacunas** El organismo huésped necesita tiempo, a menudo días, para presentar una respuesta inmune frente a un nuevo antígeno, pero las células de memoria permiten una respuesta rápida frente a los patógenos a los que se ha tenido una exposición previa. A menudo, una vacuna que protege frente a una determinada infección vírica suele consistir en un virus muerto o inactivado o en proteínas aisladas a partir de una proteína de la envuelta vírica. Normalmente la vacuna no provoca infección ni enfermedad cuando se inyecta en un paciente humano, aunque “enseña” al sistema inmune cómo son esas partículas víricas, estimulando la producción de células de memoria. Cuando hay una infección posterior, estas células pueden unirse al virus y desencadenar una rápida respuesta inmune. Algunos patógenos, incluido el VIH, han desarrollado mecanismos para eludir la acción del sistema inmune, haciendo que sea muy difícil el desarrollo de vacunas efectivas. ¿Qué estrategia podría utilizar un patógeno para eludir al sistema inmune? Suponga que el huésped dispone de anticuerpos, receptores T o ambos, capaces de unirse a cualquier estructura que pueda aparecer en la superficie de un patógeno y que, una vez unidos, el patógeno es destruido.

**12. El modo en que nos quedamos “tiesos”** Cuando un vertebrado superior se muere, sus músculos quedan rígidos al ser privados de ATP, un estado llamado *rigor mortis*. Explique la base molecular de este fenómeno.

**13. Los sarcómeros desde otro punto de vista** La simetría de los filamentos gruesos y delgados dentro de un sarcómero es

tal que cada filamento grueso suele estar rodeado por seis filamentos delgados dispuestos en forma hexagonal. Dibuje una sección sagital (corte transversal) de una miofibrilla: (a) en la línea M, (b) a través de la banda I, (c) a través de la región densa de la banda A, (d) a través de la región menos densa de la banda A, adyacente a la línea M (véase la Fig. 5–29b, c).

## Bioquímica en Internet

**14. Lisozima y anticuerpos** Para poder apreciar completamente cómo funcionan las proteínas en una célula es muy útil tener una visión tridimensional de cómo interactúan las proteínas con otros componentes celulares. Afortunadamente esto es posible utilizando las bases de datos de proteínas que se encuentran en la Web y programas de visualización molecular tridimensional. Algunos visualizadores requieren la descarga de un programa o de un conector (plug-in); algunos de ellos pueden dar problemas cuando se usan con ciertos sistemas operativos o navegadores; algunos requieren el uso de un código de órdenes definidas y otros ofrecen interfaces de uso más sencillo. Sugierimos que visite la dirección [www.umass.edu/microbio/rasmol](http://www.umass.edu/microbio/rasmol) y lea la información sobre RasMol, Protein Explorer y Jmol First Glance. Escoja el visualizador de mayor compatibilidad con su sistema operativo, navegador y nivel de experiencia. A continuación descargue e instale los programas o conectores que necesite.

En este ejercicio examinará las interacciones entre el enzima lisozima (Capítulo 4) y el fragmento Fab del anticuerpo antilisoizima. Utilice el identificador del PDB 1FDL para explorar la estructura del complejo entre el fragmento Fab de IgG1 y la lisozima (complejo antígeno-anticuerpo). Para responder a las siguientes preguntas, use la información de la página de Resumen de la Estructura del Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) y visualice la estructura utilizando RasMol, Protein Explorer o Jmol First Glance.

(a) ¿Qué cadenas del modelo tridimensional corresponden al fragmento de anticuerpo y cuales al antígeno (lisozima)?

(b) ¿Qué tipo de estructura secundaria predomina en este fragmento Fab?

(c) ¿Cuántos residuos aminoácidos hay en las cadenas pesadas y ligeras del fragmento Fab y en la lisozima? Estime el porcentaje de la molécula de lisozima que interacciona con el sitio de fijación de antígeno del fragmento de anticuerpo.

(d) Identifique los residuos aminoácido específicos de la lisozima y de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de Fab que están situados en la interfase antígeno-anticuerpo. ¿Son estos residuos contiguos en la secuencia primaria de la cadena polipeptídica?

**15. Explorando las interacciones reversibles de proteínas y ligandos con gráficos animados** Utilice los gráficos animados para las ecuaciones 5–8, 5–11, 5–14 y 5–16 para trabajar con los ejercicios siguientes.

(a) Unión reversible de un ligando a una proteína simple, sin cooperatividad. Para la ecuación 5–8, genere una gráfica de  $\theta$  frente a  $[L]$  (ejes horizontal y vertical, respectivamente). Examine las gráficas generadas cuando  $K_d$  se ajusta a 5, 10, 20 y 100  $\mu\text{M}$ . Una mayor afinidad de la proteína por el ligando significa mayor fijación a concentraciones menores de ligando. Suponga que cuatro proteínas diferentes presentan estos cuatro valores diferentes de  $K_d$  para el ligando L. ¿Qué proteína tendría mayor afinidad por L?

Examine la gráfica generada cuando  $K_d = 10 \mu\text{M}$ . ¿Cuál es el incremento de  $\theta$  cuando  $[L]$  aumenta desde 0,2 a 0,4  $\mu\text{M}$ ? ¿Cuál es el incremento de  $\theta$  cuando  $[L]$  aumenta desde 40 a 80  $\mu\text{M}$ ?

Puede realizar el mismo ejercicio para la Ecuación 5–11. Convierta  $[L]$  a  $pO_2$  y  $K_d$  a  $P_{50}$ . Examine las curvas generadas

cuando  $P_{50}$  se ajusta a 0,5, 1, 2 y 10 kPa. Para la curva generada a  $P_{50} = 1$  kPa, ¿cuál es la variación de  $\theta$  cuando la  $pO_2$  aumenta desde 0,02 a 0,04 kPa? ¿Y desde 4 a 8 kPa?

(b) Unión cooperativa de un ligando a una proteína múltiples subunidades. Utilizando la ecuación 5-14, genere una curva de fijación de una proteína y un ligando con una  $K_d = 10 \mu M$  y  $n = 3$ . Observe el matiz en la definición de  $K_d$  en la Ecuación 5-16. En la misma gráfica, añada una curva para una proteína con  $K_d = 20 \mu M$  y  $n = 3$ . Observe ahora cómo cambian ambas curvas cuando se pasa a  $n = 4$ . Genere las representaciones de Hill (Ec. 5-16) para cada uno de estos casos. Para valores de  $K_d = 10 \mu M$  y  $n = 3$ , ¿Cuál es el valor de  $\theta$  cuando  $[L] = 20 \mu M$ ?

(c) Siga explorando estas ecuaciones mediante la variación de los parámetros utilizados hasta ahora.

## Problemas de análisis de datos

**16. Función proteica** Durante la década de 1980, la resolución a la que se conocían las estructuras de actina y miosina era tan baja como la de la Figura 5-28a, b. A pesar de que se sabía que la parte S1 de la miosina se unía a actina e hidrolizaba ATP, existía mucha discusión acerca de donde se generaba la fuerza de contracción en la molécula de miosina. En aquel momento se propusieron dos modelos alternativos para explicar el mecanismo de generación de fuerza en la miosina.

Según el modelo de la “bisagra”, S1 se unía a actina, pero la fuerza de arrastre se generaba por contracción de la “región bisagra” en la cola de la miosina. La región bisagra está en la parte de meromiosina pesada de la molécula de miosina, cerca de donde la tripsina libera por digestión la meromiosina ligera (véase la Fig. 5-27b). Éste es aproximadamente el punto llamado “Dos hélices  $\alpha$  superenrolladas” de la Figura 5-27a. Según el modelo “S1”, la fuerza de arrastre se generaba en la misma “cabeza” S1 y la cola servía tan solo para fines de soporte estructural.

Se llevaron a cabo muchos experimentos sin que dieran lugar a conclusiones claras. En 1987, James Spudich y colaboradores en la Universidad de Stanford publicaron un estudio que, sin ser concluyente, daba un gran paso en la resolución de esta controversia.

Las técnicas de DNA recombinante no estaban entonces lo suficientemente desarrolladas para poder estudiar este tema in vivo, por lo que Spudich y colaboradores usaron un interesante ensayo de motilidad in vitro. El alga *Nitella* tiene células extremadamente largas, a menudo de varios centímetros de longitud y de aproximadamente 1 mm de diámetro. En estas células hay fibras de actina que se distribuyen según su eje longitudinal y las células se pueden abrir longitudinalmente y exponer sus fibras de actina. Spudich y su grupo habían observado que cuentas de plástico recubiertas de miosina podían “caminar” a lo largo de estas fibras en presencia de ATP, del mismo modo que la miosina hacía en la contracción muscular.

Para llevar a cabo estos experimentos usaron un método mejor definido para unir la miosina a las cuentas. Las “cuentas” eran aglomerados de células bacterianas muertas (*Staphylococcus aureus*). Estas células tienen una proteína en su superficie que se une a la región Fc de moléculas de anticuerpo (Fig. 5-21a). Los anticuerpos, por su parte, se unen a varios lugares (desconocidos) de la cola de la molécula de miosina. Cuando se preparan complejos cuenta-anticuerpo-miosina con moléculas intactas de miosina, se mueven a lo largo de las fibras de actina de *Nitella* en presencia de ATP.

(a) Dibuje un diagrama que muestre el aspecto que podría tener un complejo cuenta-anticuerpo-miosina a nivel molecular.

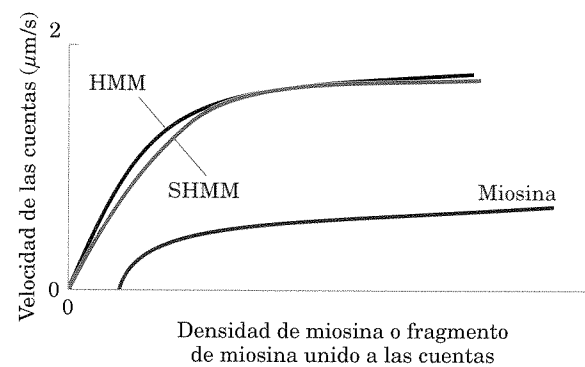
(b) ¿Por qué era necesario ATP para que las cuentas se movieran a lo largo de las fibras de actina?

(c) Spudich y colaboradores usaron anticuerpos que se unían a la cola de la miosina. ¿Por qué habría fallado este experimento si hubieran utilizado un anticuerpo que se uniera a la parte S1 que es la que normalmente se une a actina? ¿Por qué habría fallado este experimento si hubieran utilizado un anticuerpo que se uniera a actina?

Para concentrarse en la parte de la molécula de miosina responsable de la producción de fuerza, Spudich y colaboradores usaron tripsina para producir dos moléculas de miosina parciales (véase la Fig. 5-27): (1) meromiosina pesada (HMM), generada mediante una breve digestión de miosina con tripsina; HMM contiene la parte S1 y la parte de la cola que incluye la bisagra, y (2) meromiosina pesada corta (SHMM), generada por una digestión más larga de HMM con tripsina; SHMM contiene S1 y una parte más corta de la cola que no incluye la bisagra. Una digestión breve de miosina con tripsina produce HMM y meromiosina ligera (Fig. 5-27) por rotura de un único enlace peptídico específico en la molécula de miosina.

(d) ¿Cuál es la razón de que la tripsina pueda atacar este enlace antes que a todos los demás de la miosina?

Spudich y colaboradores prepararon complejos de cuenta-anticuerpo-miosina con cantidades variables de miosina, HMM y SHMM y midieron sus velocidades sobre las fibras de actina de *Nitella* en presencia de ATP. En el gráfico siguiente se representan sus resultados.



(e) ¿Qué modelo (“S1” o “bisagra”) es consistente con estos resultados? Explique su razonamiento.

(f) Proponga una explicación plausible para el hecho de que la velocidad de las cuentas aumente con el aumento de la densidad de la miosina.

(g) Proponga una explicación plausible para el hecho de que la velocidad de las cuentas llegue a una meseta a altas densidades de miosina.

La digestión más larga con tripsina necesaria para producir SHMM tenía un efecto secundario: otra rotura específica de la cadena polipeptídica de la miosina además de la que se producía en la cola. El segundo lugar de corte estaba en la cabeza S1.

(h) En base a esta información, ¿por qué resulta sorprendente que SHMM sea todavía capaz de mover las cuentas a lo largo de las fibras de actina?

(i) Se vio que la estructura de la cabeza S1 permanecía intacta en SHMM. Proponga una explicación plausible para el hecho de que la proteína esté todavía intacta y sea funcional a pesar de que se haya roto la cadena polipeptídica y ya no sea continua.

## Referencias

Hynes, T.R., Block, S.M., White, B.T., & Spudich, J.A. (1987) Movement of myosin fragments in vitro: domains involved in force production. *Cell* 48, 953-963.