

# Hemoglobin i alosterija

---

Ramić, Laura

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:010876>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni prijediplomski studij kemije

Laura Ramić

Hemoglobin i alosterija

Završni rad

Osijek, rujan 2023. godine

## SAŽETAK

Hemoglobin je kompleksni protein prisutan u crvenim krvnim stanicama i igra ključnu ulogu u transportu kisika i ugljikovog dioksida u organizmu. Sastoji se od četiri podjedinice (dvije alfa i dvije beta podjedinice -  $\alpha_2\beta_2$ ), pri čemu svaka podjedinica sadrži mjesto za vezanje kisika, omogućujući učinkovit prijenos kisika iz pluća do tkiva i organa.

Alosterija, važan biokemijski koncept, opisuje promjene u strukturi proteina koje utječu na njegovu funkciju. Kod hemoglobina, alosteričke promjene mijenjaju sposobnost hemoglobina za vezivanje i otpuštanje kisika. To znači da hemoglobin može prilagoditi svoju aktivnost ovisno o uvjetima u okolišu, kao što su pH i koncentracija  $\text{CO}_2$ .

Jedan od najpoznatijih primjera alosterije u hemoglobinu je Bohr efekt, gdje promjene u pH-vrijednosti okoline utječu na afinitet hemoglobina za kisik. Ovaj mehanizam omogućava hemoglobinu da isporučuje kisik gdje je najpotrebniji u tijelu. Osim toga, hemoglobin može biti moduliran egzogenim faktorima poput organskih fosfata i 2,3-bisfosfoglicerata (BPG).

**KLJUČNE RIJEČI:** hemoglobin, alosterija, vezanje kisika

## ABSTRACT

Hemoglobin is a complex protein present in red blood cells and plays a key role in the transportation of oxygen and carbon dioxide in the body. It consists of four subunits (two alpha and two beta subunits -  $\alpha_2\beta_2$ ), with each subunit containing a binding site for oxygen, enabling efficient transfer of oxygen from the lungs to the tissues and organs.

Allosterism, an important biochemical concept, describes changes in the protein's structure that affect its function. In the case of hemoglobin, allosteric changes alter its ability to bind and release oxygen. This means that hemoglobin can adjust its activity depending on environmental conditions, such as pH and CO<sub>2</sub> concentration.

One of the most well-known examples of allosterism in hemoglobin is the Bohr effect, where changes in the pH of the environment influence hemoglobin's affinity for oxygen. This mechanism allows hemoglobin to deliver oxygen where it is most needed in the body. Additionally, hemoglobin can be modulated by exogenous factors such as organic phosphates and 2,3-bisphosphoglycerate (BPG).

**KEY WORDS:** hemoglobin, allostery, oxygen binding

## Sadržaj

1. UVOD .....	5
2. HEMOGLOBIN .....	2
2.1. Građa hemoglobina .....	2
2.1.1. Strukturni oblici hemoglobina.....	4
2.1.2. Glavne konformacije hemoglobina .....	4
2.2. Funkcija hemoglobina .....	5
3. ALOSTERIJA .....	9
3.1. Hillova jednačba.....	10
3.2. Model Manod – Wyman – Changeux.....	11
3.3. Model Koschland – Némethy – Filmer .....	11
4. ALOSTERIJA KOD HEMOGLOBINA .....	13
4.1. Alosterički modulatori .....	15
4.1.1. Endogeni modulatori .....	16
4.1.2. Egzogeni modulatori .....	19
5. ZAKLJUČAK .....	21
6. LITERATURA .....	22

## 1. UVOD

Hemoglobin, složeni protein prisutan u eritrocitima (crvenim krvnim stanicama), ključan je za ispravan transport kisika i ugljikovog dioksida u organizmu. S druge strane, alosterija je fundamentalni biokemijski koncept koji opisuje promjene u strukturi proteina i njihovu sposobnost da reguliraju svoju funkciju [1].

Hemoglobin je oligomerni protein, što znači da se sastoji od više podjedinica koje zajedno tvore funkcionalni protein. U slučaju hemoglobina, on se sastoji od četiri podjedinice, dvije alfa i dvije beta podjedinice ( $\alpha_2\beta_2$ ). Svaka od ovih podjedinica sadrži posebno mjesto za vezanje kisika, što omogućava hemoglobinu da djeluje kao izvanredno učinkovit transporter kisika [1].

Alosterija je ključna za razumijevanje načina na koji hemoglobin regulira vezanje i otpuštanje kisika. Ovaj koncept se odnosi na promjene u konformaciji (trodimenzionalnoj strukturi) proteina kao odgovor na specifične signale ili promjene u okolini. U slučaju hemoglobina, alosteričke promjene u njegovoj strukturi mijenjaju afinitet (sposobnost) hemoglobina za vezivanje kisika. To znači da hemoglobin može postati bolji ili lošiji u hvatanju i otpuštanju kisika ovisno o uvjetima u okolišu [1].

Jedan od najpoznatijih primjera alosterije u hemoglobinu je Bohr efekt. Kada se pH okoline smanji (tj. postane kiselij), hemoglobin se više otvara, što olakšava otpuštanje kisika u tkivima gdje je koncentracija ugljikovog dioksida veća. Ova promjena u afinitetu za kisik omogućava hemoglobinu da prilagodi svoju funkciju prema potrebama organizma i osigura adekvatan prijenos kisika do stanica [1].

U ovom završnom radu, detaljno ćemo istražiti strukturu hemoglobina, mehanizme alosteričke regulacije, te kako alosterija utječe na funkciju ovog ključnog proteina.

## 2. HEMOGLOBIN

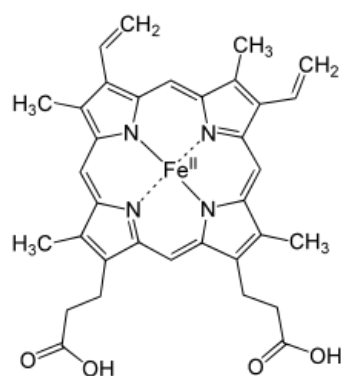
### 2.1. Građa hemoglobina

Hemoglobin, kompleksni protein prisutan u crvenim krvnim stanicama, obavlja ključnu ulogu u transportu kisika iz pluća do tkiva i organa te povratka ugljikovog dioksida natrag prema plućima kako bi se izdahnuo. Hemoglobin omogućuje crvenim krvnim stanicama da izvršavaju svoju vitalnu funkciju u održavanju opskrbe tijela kisikom i uklanjanju ugljikovog dioksida. Zbog svoje složene strukture i sastava, hemoglobin je iznimno učinkovit u prijenosu kisika i ugljikovog dioksida kroz krvotok, što omogućava ispravno funkcioniranje metaboličkih procesa i osigurava tijelu dovoljno kisika [1].

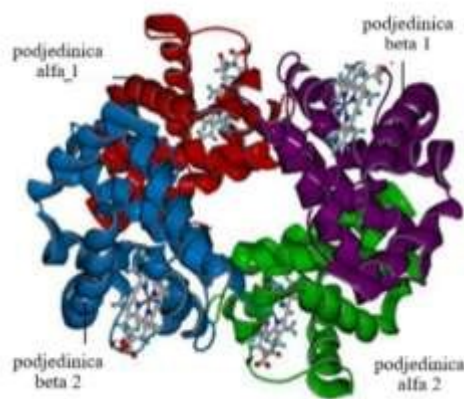
Hemoglobin (Hb) je molekula čija je molekulska masa 64500 g/mol, a koncentracija mu u eritrocitima iznosi 0,005 mol/L. Prosječna udaljenost molekularnih komponenti u hemoglobinu varira s obzirom na konformaciju hemoglobina i na uvjete u kojima se nalazi, ali prosječna udaljenost od središta jedne do središta druge molekule hemoglobina iznosi 6,9 nm, a promjer pojedinačne molekule hemoglobina je otprilike 5 nm [2]. Što se tiče strukture hemoglobina, riječ je o složenom proteinu koji se sastoji od četiri polipeptidna lanca - dva  $\alpha$ -lanca i dva  $\beta$ -lanca koji su povezani kemijskim vezama. Ova četiri lanca organizirana su u karakterističnu kvaternu strukturu. Svaki od tih polipeptidnih lanaca sadrži jednu prostetičku skupinu hema koja sadrži željezo i protoporfirin IX. Željezni ion u hemu je vezan za aminokiselinu histidin, a porfirinski prsten unutar hem grupe je usidren u svoj džep zahvaljujući prisustvu fenilalanina u polipeptidnom lancu. Polipeptidni lanci hemoglobina kod odraslih osoba dolaze u dvije varijante, alfa i beta lanci, koji su slične duljine; 141 (za alfa lanac) i 146 (za beta lanac) aminokiselinskih ostataka, ali se razlikuju u sekvenci aminokiselina. Alfa lanci su identični u svim ljudskim oblicima hemoglobina, bilo da se radi o embrionalnom ili odraslom hemoglobinu [3].

Organska komponenta protoporfirin sastoji se od pirolnih prstenova koji su vezani metilenskim mostovima, dok su na tetrapirolni prsten dodane četiri metilne skupine; dvije vinilne i dva propionatna bočna ogranka [4]. Atom željeza koji se pri normalnim uvjetima nalazi u oksidacijskom stanju  $Fe^{2+}$ , nalazi se u središtu protoporfirina i vezan je s četiri pirolna dušikova atoma. Osim te četiri veze, željezov ion može ostvariti još dvije dodatne veze koje se nalaze svaka s jedne strane ravnine hema [4]. To omogućuje željezu da veže kisik ili druge plinove kovaletnom vezom kako bi se ispunila oktaedarska koordinacija šest liganda. [5]. Na slici 1 nalazi se prikaz kemijske formule hema, a na slici 2. nalazi se strukturni prikaz molekule hemoglobina.

hemoglobina, koji se u najvećem omjeru nalazi u čovjekovom tijelu naziva se HbA. [6]. Važno je spomenuti da se u šupljini između alfa i beta podjedinica HbA nalazi vezana molekula 2,3-bisfosfoglicerata koja stabilizira strukturu i smanjuje afinitet hemoglobina za kisik [7]. Osim HbA oblika, za čovjeka je značajan i HbA2. HbA2 se za razliku od HbA sastoji od dvije alfa i dvije delta podjedinice [8]. HbA2 čini manje od 3% ukupnog hemoglobina i nema fiziološku ulogu kod odraslih. Međutim, vrlo je važan u dijagnosticiranju beta-talasemije. Pojedinci koji imaju ovu bolest zapravo ne trebaju liječenje, ali je važno otkrivanje ovog stanja kako bi se smanjio rizik od rađanje djeteta s ozbiljnom bolešću jer ova bolest može dovesti do anemije [9].



Slika 1. Prikaz kemijske formule hema [10]



Slika 2. Prikaze strukturne formule hemoglobina [11]

Struktura hemoglobina je temeljito istraživana upotrebom rendgenske analize. Kvaterna struktura, odnosno organizacija podjedinica, razlikuje se između oksihemoglobina i deoksihemoglobina. Kod ljudskog hemoglobina, međusobna prilagodba polipeptidnih lanaca



ima ključnu ulogu jer pukotina između ta dva lanca postaje uža kada se molekule kisika vežu za atome željeza [3].

Kisik se reverzibilno veže na željezo u hemu, a ovaj proces varira ovisno o parcijalnom tlaku kisika. Krivulja zasićenosti kisikom pokazuje sigmoidalni oblik, ukazujući na postojanje kooperativne interakcije između mjesta vezanja kisika. To znači da, kako se više molekula kisika veže, olakšava se vezivanje dodatnih molekula kisika. [3].

Važno je napomenuti da osim kisika, neki drugi spojevi poput dušikovog oksida i ugljikovog monoksida također mogu vezati za željezo u hemoglobinskoj molekuli. Ugljikov monoksid se čvršće veže za željezo u usporedbi s kisikom. Nakon što se karboksihemoglobin formira, kisik ne može učinkovito istisnuti ugljikov monoksid. Ovo svojstvo leži u osnovi trovanja ugljikovim monoksidom [3].

#### 2.1.1. Strukturni oblici hemoglobina

Postoje različiti strukturni oblici hemoglobina, kao što su: HbA, HbA<sub>2</sub>, HbE, HbF, HbS, HbC. Zdravi ljudi imaju značajne razine samo HbA i HbA<sub>2</sub> oblika hemoglobina, a osim toga neki ljudi mogu imati i male količine HbF (fetalni hemoglobin). Normalne razine HbA kreću se od 95% do 98%, dok su za HbA<sub>2</sub> to vrijednosti od 2% do 3% ukupne količine hemoglobina. HbF oblik hemoglobina je glavni tip kod nerođene djece, a kod odraslih ljudi neke bolesti mogu biti povezane s visokim koncentracijama HbF-a. Normalna razina HbF kod zdravih ljudi iznosi 0,8 - 2%, dok je kod novorođenčadi taj postotak 50 - 80%, a kod djece starije od 6 mjeseci taj postotak opada značajno i iznosi 1 - 2%. HbS je oblik hemoglobina koji je povezan sa srpastom anemijom, a HbC je oblik povezan s hemolitičkom anemijom. Kod ljudi koji boluju od srpaste anemije dolazi do promjene oblika krvnih zrnaca koje onda poprimaju oblik polumjeseca ili srpa.[6] Hemoglobin oboljelih ima kao šestu aminokiselinu u beta lancu valin umjesto glutaminske kiseline, što uzrokuje smanjenje topljivosti hemoglobina pa dolazi do taloženja molekule u eritrocitima.[7] Hemoglobin E (HbE) je vrlo učestali oblik hemoglobina u azijskim zemljama. HbE je strukturna varijanta β-hemoglobina. Iako sam HbE ne uzrokuje značajne kliničke probleme, njegove interakcije s drugim talasemijama uzrokuje različite bolesti. [12].

#### 2.1.2. Glavne konformacije hemoglobina

Analiza rendgenske kristalografije otkrila je dvije glavne konformacije hemoglobina: stanje R i stanje T. Iako se kisik veže za hemoglobin u oba stanja, ima značajno veći afinitet za hemoglobin u stanju R. Vezanje kisika stabilizira R stanje. Kada je kisik eksperimentalno

uklonjen, stanje T je stabilnije i tako postaje prevladavajuća konformacija deoksihemoglobina. Oznake T i R prvobitno označavaju "napeto" i "opušteno" stanje jer je stanje T stabilizirano većim brojem ionskih parova. Vezanje kisika za podjedinicu hemoglobina u stanju T potiče promjenu konformacije u stanje R. Kada cijeli protein prolazi kroz tu tranziciju, strukture pojedinačnih podjedinica se malo mijenjaju, no parovi podjedinica klize jedan pored drugog i rotiraju, sužavajući džep između podjedinica  $\beta$ . U tom se procesu neki ionski parovi koji stabiliziraju stanje T razdvajaju, dok se neki novi formiraju [1].

Max Perutz, koji je pomoću X-zraka uspio definirati strukturu hemoglobina [13], je predložio da je tranzicija između stanja T i R potaknuta promjenama u položaju ključnih bočnih lanaca aminokiselina koje okružuju hem. U stanju T porfirin je lagano zakrivljen, što uzrokuje da se željezo henskog kompleksa nešto ističe na stranu blisku His (His F8). Vezanje kisika uzrokuje da porfirin preuzme ravnotežnu konformaciju, pomičući položaj bliske His i pripadajuće F spirale. Te promjene dovode do prilagodbi ionskih parova na sučelju  $\alpha_1\beta_2$  ( $i \alpha_2\beta_1$ ) [1].

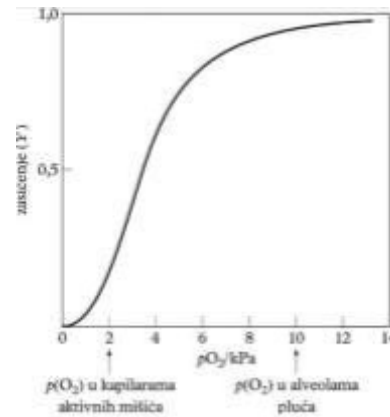
## 2.2.Funkcija hemoglobina

Glavna uloga hemoglobina u organizmu je prijenos kisika, a druge važne funkcije su: katalitička funkcija, sudjelovanje u metabolizmu dušikovog oksida, sudjelovanje u metabolizmu eritrocita, regulacija pH i održavanje redoks ravnoteže. [14]

Gotovo sav kisik koji se prenosi kroz krvotok veže se i prenosi putem hemoglobina prisutnog u eritrocitima (crvenim krvnim stanicama) [1]. U arterijskoj krvi koja prolazi iz pluća kroz srce prema perifernim tkivima, hemoglobin je zasićen kisikom oko 96%. U venskoj krvi koja se vraća prema srcu, zasićenje hemoglobina je samo oko 64%. Dakle, svakih 100 mL krvi koja prolazi kroz tkivo oslobađa oko trećinu kisika koji nosi ili 6,5 mL kisika kao plin pri atmosferskom tlaku i tjelesnoj temperaturi [1]. Dakle, hemoglobin sa svojim višestrukim podjedinicama i mjestima za vezanje kisika odgovara transportu kisika. Interakcije između podjedinica hemoglobina uzrokuju konformacijske promjene proteina koje mijenjaju afinitet proteina prema kisiku [1].

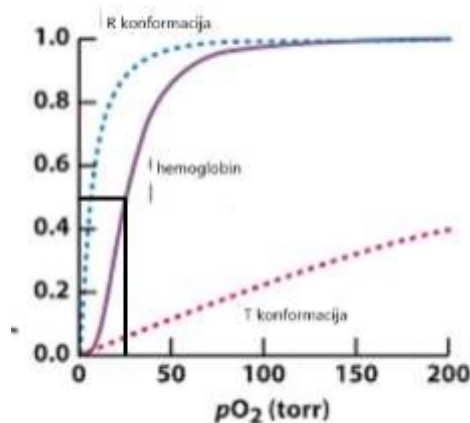
Prijenos kisika iz pluća u tkiva, tj. vezanje i otpuštanje kisika, odvija se na kooperativan način i prikazuje se krivuljom vezanja kisika na hemoglobin, koja je prikazana na slici 3. Krivulja predstavlja zasićenje hemoglobina kisikom pri različitim parcijalnim tlakovima kisika.

Afinitet hemoglobina za kisik izražava se pomoću  $p_{50}$  vrijednosti, koja predstavlja parcijalni tlak kisika pri kojem je polovina molekula hemoglobina zasićena kisikom. [5].



Slika 3. Krivulja vezanja kisika na hemoglobin [7]

Kako se veže sve više molekula kisika, hemoglobin prolazi kroz promjenu iz stanja niskog afiniteta (stanje T) u stanje visokog afiniteta (stanje R). Ovaj prijelaz rezultira oblikom krivulje vezanja kisika koji podsjeća na slovo "S" ili sigmoidnu krivulju. Jedan proteinski entitet s jednim mjestom za vezanje liganda ne može generirati sigmoidnu krivulju vezanja jer svaki ligand veže neovisno i ne utječe na vezivanje drugih liganda. No, kod hemoglobina, vezanje kisika za pojedinačne podjedinice može utjecati na afinitet kisika u susjednim podjedinicama. Prva molekula kisika koja se veže za deoksihemoglobin ima slabo vezanje jer se povezuje s podjedinicom u stanju T. No, njeno vezivanje pokreće promjene konformacije koje se prenose na okolne podjedinice, olakšavajući daljnjem kisiku da se veže. Prijelaz iz stanja T u R lakše se događa u drugoj podjedinici kada je prva podjedinica već vezala kisik. Posljednja (četvrta) molekula kisika veže se za hem u podjedinici koja je već u stanju R, pa se stoga veže s puno većim afinitetom u usporedbi s prvom molekulom [1]. Sigmoidalna krivulja kooperativnog vezanja prikazana je na slici 4.

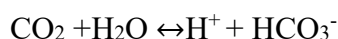


Slika 4. Sigmoidalna krivulja kooperativnog vezanja (preuzeto i prilagođeno iz [4]).

Sigmoidalna krivulja vezanja ilustrira kako hemoglobin postupno veže kisik kako koncentracija kisika raste. Na početku krivulje, zbog niske koncentracije kisika, hemoglobin je u deoksigeniranom stanju, što znači da nije vezao kisik. Kako se parcijalni tlak kisika povećava, hemoglobin počinje postupno vezati kisik, tj. raste zasićenost hemoglobina kisikom. Točka na krivulji gdje je polovina svih aktivnih vezivnih mjesta na hemoglobinu zasićena kisikom se obično nalazi u sredini krivulje i označava se kao  $p_{50}$ . Nakon dosezanja punog zasićenja kisikom (kada su sva četiri vezivna mjesta na hemoglobinu zasićena) krivulja doseže maksimum gdje daljnje povećanje koncentracije kisika ne utječe značajno na zasićenost hemoglobina [4]. Krivulja se može promatrati kao kombinacija krivulja koje bi postojale kada bi sve podjedinice molekule ostale u T stanju odnosno prešle u R stanje [4].

Drugi ligandi kao što su nitritni ion, dušikov ion, ugljikov monoksid, cijanid, sumporov monoksid i sulfid mogu se vezati na hem i djelovati kao kompetitivni inhibitori i tako utjecati na vezanje kisika. Neki od ovih liganda mogu se vezati s većim afinitetom od kisika i tako nastaju spojevi koji su vrlo toksični za zdravlje. Npr., afinitet vezanja hemoglobina za ugljikov monoksid je 240 puta veći od kisika, pa koncentracija 0,1% ugljikovog monoksida u zraku može dovesti do nesvjestice i smrti čovjeka [5].

Hemoglobin osim što prenosi kisik iz pluća u tkiva, prenosi i vodikove ione i ugljikov dioksid iz tkiva u pluća i bubrege. Ugljikov dioksid reagira s vodom i nastaju sljedeći produkti:



Da bi došlo do transporta ugljikovog dioksida iz tkiva, potrebno je prevesti ugljikov dioksid u bikarbonat, zato jer ugljikov dioksid nije dobro topljiv u vodenoj otopini, a u plinovitom stanju bi se ponovno stvorio u tkivima i krvi [1]. Veći dio bikarbonata se iz crvenih krvnih stanica

transportira se posredovanjem specifičnih membranskih prenositelja koji izmjenjuju bikarbonat s jedne i kloridne ione s druge strane membrane. Hidratacija ugljikovog dioksida, koju ubrzava ugljična anhidraza, rezultira povećanjem koncentracije vodikovog iona (dakle, smanjenjem pH) u tkivima. Ovo prevođenje ugljikovog dioksida vrlo je važno za regulaciju vezanja kisika i otpuštanje u krvi. Hemoglobin transportira otprilike 40% ukupnih vodikovih iona i 15-20% ukupnog ugljikovog dioksida koji se formira u tkivima do pluća ili do bubrega. Vezanje vodikovih iona i ugljikovog dioksida je povezano s vezanjem kisika; pri niskom pH i visokim koncentracijama ugljikovog dioksida, afinitet hemoglobina za kisik opada kako se vežu vodikovi ioni i  $\text{CO}_2$ . Ovaj efekt naziva se Bohrov efekt [1].

### 3. ALOSTERIJA

Alosterija je pojam koji se odnosi na procese pri kojima vezanje na jednom mjestu biološke makromolekule utječe na aktivnosti vezanja na drugom posebnom funkcionalnom mjestu, omogućujući regulaciju odgovarajuće funkcije. Alosterija ima ključnu ulogu u mnogim biološkim procesima kao što su: prijenos signala, regulacija transkripcije i metabolizma. Iako je alosterija vrlo važna, detaljno razumijevanje mehanizama ovog svojstva nije potpuno istraženo, a važnu ulogu u razumijevanju imaju računalni pristupi [15].

Povijest alosterije datira još od 1904. godine kada je Christian Bohr opisao odnos vezanja ugljikovog dioksida i kisika na hemoglobin i nazvao ga Bohrov efekt. Najčešće se alosterija proučava kristalografijom X-zrakama. Ta metoda omogućuje informacije o strukturama molekula prije i nakon promjena nastalih uslijed vezanja liganda ili odvijanja reakcije. Razumijevanje alosterije vrlo je važno za razumijevanje bioloških sustava u različitim stanjima bolesti[16].

Postoje različiti tipovi alosterije – homotropna i heterotropna alosterija. Homotropna alosterija je kada alosterički regulator ima strukturu sličnu strukturi supstrata. Homotropni regulatori često djeluju kao pozitivni ili negativni alosterički regulatori. Pozitivni alosterički regulatori povećavaju aktivnost proteina, dok ju negativni alosterički regulatori smanjuju. Heterotropna alosterija je kada alosterički regulator ima različitu strukturu od one kod supstrata, a mogu djelovati kao pozitivni ili negativni alosterički regulatori, ovisno o konformaciji proteina u kojoj se vežu [1].

Alosterički enzimi su skupina biokatalizatora koji posjeduju zajedničke karakteristike enzima, no, ne slijede Michaelis-Menten kinetiku.

Mioglobin i hemoglobin su proteinske molekule koje vežu kisik, ali se razlikuju u svojoj alosteriji. Mioglobin je monomerni protein koji se nalazi u mišićnim stanicama. Ima jednu hem grupu koja može vezati jednu molekulu kisika. Mioglobin pokazuje nekooperativno vezanje kisika, što znači da vezanje jedne molekule kisika ne utječe na sposobnost vezanja drugih molekula kisika. Ova razlika u alosteriji ima važne posljedice za funkciju mioglobina i hemoglobina. Mioglobin je dizajniran za skladištenje kisika u mišićnim stanicama, tako da je njegovo nekooperativno vezanje kisika važno za to da se kisik oslobodi tek kada je to potrebno. Hemoglobin je dizajniran za transport kisika od pluća do tkiva, tako da je njegovo kooperativno vezanje kisika važno za to da se kisik brzo i učinkovito dostavi tkivima [4].

### 3.1. Hillova jednađba

Kooperativno vezanje kisika na hemoglobin analizirao je Archibald Hill. Hillova jednađba koristi se za opisivanje sigmoidalnog oblika krivulje koja prikazuje zasićenost enzima vezanjem liganda ili supstrata. U reakciji gdje se protein veže s ligandom koji ima  $n$  broj veznih mjesta, Hillova jednađba je sljedeća:

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

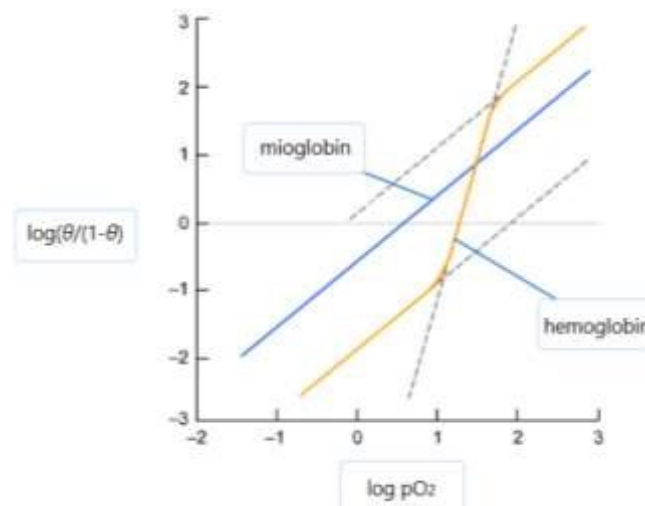
Gdje je  $\theta$  količnik svih zauzetih veznih mjesta i ukupnih veznih mjesta, a  $K_d = [L]_{0,5}^n$  [1]

Iz prikazane jednađbe dobije se graf ovisnosti  $\log\left[\frac{\theta}{1-\theta}\right]$  o  $\log [L]$  gdje je L ligand odnosno molekula kisika.

Kako bi se Hillova jednađba prilagodila za vezanje kisika na hemoglobin, potrebno je napraviti neke izmjene pa ona glasi:

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

Hillov graf za vezanje kisika za hemoglobin prikazan je na slici 5.



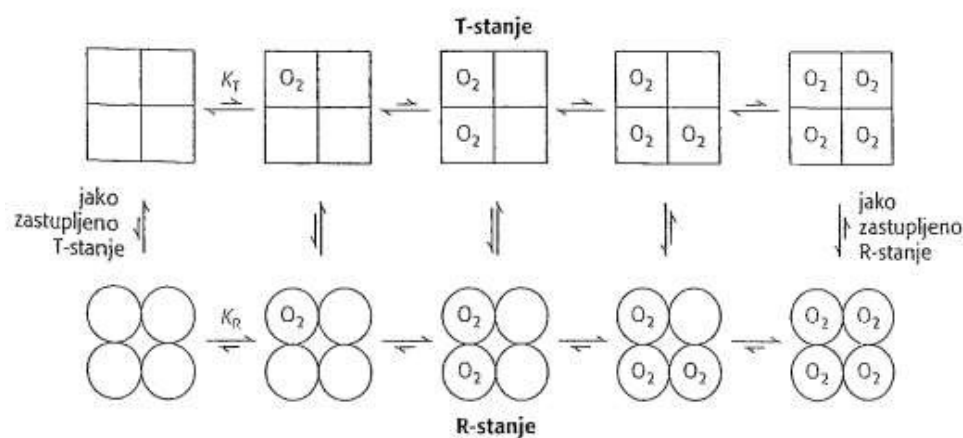
Slika 5. Prikaz Hillovog grafa za vezanje kisika za hemoglobin i mioglobin (Preuzeto i prilagođeno iz [1]).

Ovaj odnos koristi se za analizu kooperativnosti između liganda i proteina. Nagib pravca koji se dobije koristeći prikazanu jednađbu naziva se Hillov koeficijent i mjeri stupanj kooperativnosti. Ako je iznos nagiba veći od 1 on ukazuje na pozitivnu kooperativnost, kao što je slučaj kod hemoglobina gdje veza jednog liganda potiče na vezanje drugog liganda. Teoretska

maksimalna vrijednost postiže se kada je iznos nagiba grafa jednak broju aktivnih mjesta, što bi značilo da je kooperativnost potpuna, ali taj limit nikada nije dostignut [1].

### 3.2. Model Manod – Wyman – Changeux

Model Manod – Wyman – Changeux (MWC) se primjenjuje na alosteričke enzime koji sadrže dimere, a svaki od njih ima katalitička mjesta. Poznat je još i kao model simetrije. Model pretpostavlja da dvije podjedinice postoje u istom stanju, a enzim može biti prisutan ili u T ili R stanju. Ligand ili supstrat alosteričkog enzima veže se prvenstveno na R stanje pa se ravnoteža pomiče prema njemu kako se povećava koncentracija supstrata. Konformacijska promjena u jednoj podjedinici usklađena je s drugom, održavajući simetriju enzima [17].



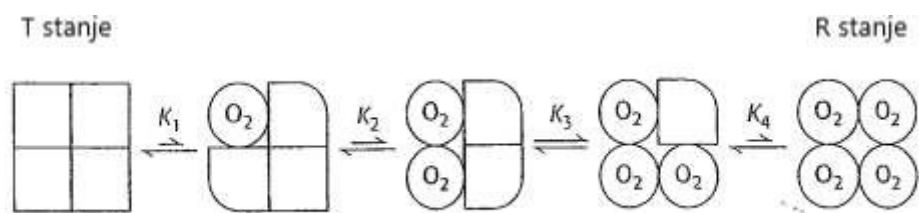
Slika 6. Slikoviti prikaz MWC modela kod vezanja kisika na hemoglobin [4]

Na slici 6. može se vidjeti prikaz MWC modela. Sve molekule u MWC modelu nalaze se ili u T ili u R stanju, a pri svakoj razini kada dolazi do vezanja kisika postoji ravnoteža između tih dviju stanja. Ravnoteža se pomiče iz stanja T u stanje R kako dolazi do zasićenja kisikom, do krajnjeg R stanja kada je molekula u potpunosti zasićena kisikom [4].

### 3.3. Model Koschland – Némethy – Filmer

Model Koschland – Némethy – Filmer (KNF) ne pretpostavlja da enzim postoji u T ili R ravnoteži, niti nalaže da podjedinice enzima moraju uvijek postojati u istom konformacijskom stanju. Kod ovog modela, vezanje liganada ili supstrata inducira konformacijsku promjenu podjedinice iz T u R stanje kako bi se prilagodilo vezanju. Ova konformacijska promjena u jednoj podjedinici mijenja njezinu interakciju sa susjednom podjedinicom, što onda utječe na afinitet te susjedne podjedinice prema ligandu [17].





Slika 7. Slikoviti prikaz KNF modela [4]

Kod KNF modela vezanje liganda mijenja konformaciju podjedinice na koju se veže, a to se može vidjeti na slikovitom prikazu KNF modela na slici 7.

Modeli MWC i KNF nisu dovoljni za opis ponašanja hemoglobina; da bi opis bio potpun potrebno je kombinirati oba. Ovi modeli su idealizirana stanja kojima se realni sustavi mogu približiti, ali ih ne mogu dostići [4].

#### 4. ALOSTERIJA KOD HEMOGLOBINA

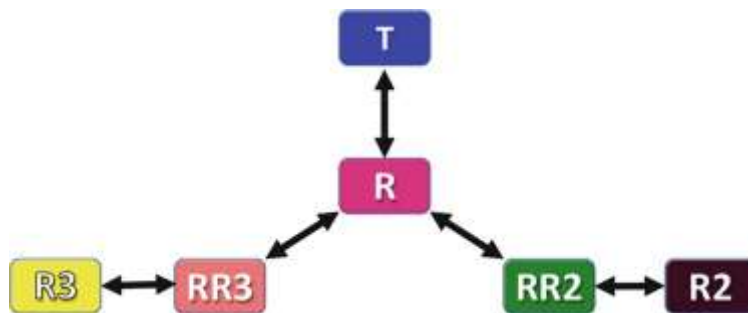
Alosterija je vrlo važna jer omogućuje hemoglobinu da bude učinkovit prijenosnik kisika, ali važna je i zbog mogućnosti iskorištavanja alosterije za razvoj lijekova za razne bolesti, primjerice alosterički modulatori mogu pojačavati ili smanjivati aktivnost proteina, a razumijevanje alosterije omogućava farmaceutskoj industriji da istražuje nove načine za razvoj lijekova i terapija.

MWC model pretpostavlja da se nakon što se ligand veže, konformacija T stanja alosteričkog proteina u potpunosti mijenja u R konformaciju stanje; dakle, nakon vezanja kisika na hemoglobin dolazi do kooperativne promjene između konformacije iz T stanja u R stanje bez međustanja između T i R. MWC/Perutzov model molekule hemoglobina temelji se na pretpostavci da sve četiri podjedinice u hemoglobinu moraju istovremeno poprimiti ili napetu (T) ili opuštenu (R) strukturu kako bi se ligandi mogli vezati. Ove dvije strukture, T i R, imaju različite afinitete prema ligandima, pri čemu se promjena događa istovremeno u svim podjedinicama. [18] Kod KNF modela pretpostavlja se da se promjene između T i R stanja događaju kao odgovor na vezanje ili otpuštanje kisika. Kada se jedna molekula kisika veže za hemoglobin, on se prebacuje iz T stanja u R stanje, što povećava njegov afinitet za kisik i olakšava daljnje vezanje dodatnih molekula kisika. Obratno, kada se kisik otpusti s hemoglobina, hemoglobin prelazi iz R stanja u T stanje, što za posljedicu ima smanjenje afiniteta za kisik [19]. Modeli se mogu objediniti, tj. poznat je stereokemijski mehanizam koji je uključuje oba spomenuta modela. Prema ovom modelu, vezanje liganada na podjedinice tetramera uzrokuje promjene konformacije koje se prenose s jedne podjedinice na drugu, što dovodi do povećanja afiniteta za ligand na drugim mjestima hema i pomicanja ravnoteže iz T stanja u R stanje. Ovaj model prikazuje hemoglobin samo kao stanje ili T ili R bez postojanja međustanja [20].

Unatoč mnogim istraživanjima i kristalnim strukturama koje su identificirane tijekom godina, tradicionalni MWC/Perutz opis alosterije hemoglobina s dvije strukture pokazuje se kao nedovoljan za potpuno razumijevanje funkcije hemoglobina [17]. Otkriveno je da opušteno stanje hemoglobina nije jedinstveno i ne svodi se samo na klasičan prijelaz iz T u R strukturu. Umjesto toga, opušteno stanje hemoglobina sastoji se od različitih potpuno ligandiranih stanja s različitim kvaternim konformacijama. Ova raznolikost opuštenih stanja ovisi o različitim strukturnim parametrima, kao što su rotacija oko osi simetrije i translacija, međudimerne interakcije, veličina vodenih šupljina i pukotina te udaljenost između hemova. [20]

Jedan od ključnih parametara za kvantificiranje ovog alosteričkog kretanja je rotacija oko osi simetrije i translacija, koju su za hemoglobin prvi put opisali Baldwin i Chothi kao približnu

rotaciju za  $14^\circ$  i približnu translaciju za  $1 \text{ \AA}$   $\alpha_1\beta_1$  dimerne podjedinice u odnosu na  $\alpha_2\beta_2$  dimer tijekom prijelaza iz T u R stanje. Ovo klizno gibanje definira "preklopno područje" i "zglobnu regiju" i igra važnu ulogu u promjeni konformacije hemoglobina tijekom prijelaza iz T u R stanje [21]. Osim toga, različite strukture opuštenih stanja hemoglobina, označene s R2, RR2, R3 i RR3, pokazuju različite rotacije i translacije  $\beta$  podjedinice te interakcije vodikovih veza među ostacima. Ove promjene u konformaciji rezultiraju različitim svojstvima središnjih vodenih šupljina i  $\alpha$ - i  $\beta$ -pukotina, kao i udaljenosti između atoma željeza u hemima. Postoje različite putanje za prijelaz iz T u R stanje, uključujući putanju prema R2 ili R3 stanju, s različitim rotacijama i translacijama. Struktura RR3 također pokazuje rotaciju distalnog  $\beta\text{His63(E7)}$  i stvaranje posebnog kanala za ligand His(E7), što ima utjecaj na stabilizaciju vezanog liganda. Osim navedenih stanja, postoje i druge varijacije opuštenih stanja hemoglobina s različitim kvaternim strukturama i konformacijama koje se nalaze između prijelaza  $R \rightarrow RR2$  i  $RR2 \rightarrow R2$  [5]. Shematski prikaz prijelaza iz T u R i druga stanja prikazan je na slici 8.



Slika 8. Shematski prikaz prijelaza iz T u R i druga stanja. [5]

No, otkriće R2 strukture u hemoglobinu tijekom ranih 1990-ih godina izazvalo je znatnu kontroverzu i raspravu o njezinoj stvarnoj fiziološkoj važnosti u usporedbi s klasičnom R strukturom. Ta kontroverza je bila predmetom istraživanja i analize tijekom niza godina kako bi se bolje razumjela priroda i uloga R2 strukture u funkciji hemoglobina [21]. Prvobitno je predloženo da je R struktura možda samo umjetna konformacija ili međuprodukt zarobljen između prijelaza iz T stanja u R2 stanje, a klasična R struktura smatrana je fiziološki

relevantnim opuštenim stanjem. Međutim, druga istraživanja sugerirala su da bi R2 struktura mogla djelovati kao posrednik između T i klasičnog R stanja. [5]

Konačno razrješenje ove kontroverze došlo je kroz kasnija istraživanja i sveobuhvatnu analizu R i R2 struktura. Prema tim analizama, R2 struktura nije međuprodukt; to je stvarno opušteno stanje hemoglobina, a klasična R struktura nije artefakt. Važan faktor koji utječe na formiranje različitih opuštenih stanja hemoglobina jest prisutnost soli i pH vrijednost okoline. Visoke koncentracije soli, zajedno s prisutnošću određenih alosteričkih efektora kao što su aromatični aldehidi, imaju ključnu ulogu u oblikovanju ovih različitih konformacija. Dinamika rotacije određenih dijelova hemoglobina, kao što je His(E7) ligandski kanal, ovisi o pH vrijednosti okoline. Razumijevanje ovih stanja važno je za funkciju hemoglobina u transportu kisika i drugim biološkim procesima. [5]

Dakle, može se zaključiti sljedeće: hemoglobin može postojati u više konformacija u T i R stanju. Ove konformacije se mogu razlikovati po relativnom položaju dimera u tetrameru, a variranjem eksperimentalnih uvjeta može se dobiti niz kristalnih struktura za hemoglobin u T i R stanju. Utvrđeno je da su strukture R i RR2 relativno slične, dok su strukture R2 i R3 značajno različite [17].

Također je otkriveno da postoje dvije glavne skupine kristalnih struktura T: one koje su nastale u visokoj koncentraciji soli i one koje su nastale u niskoj koncentraciji soli i u prisutnosti polietilen-glikola (PEG-a). Osim toga, identificirane su skupine struktura T koje su nastale u prisutnosti inozitol-heksafosfata (IHP-a), spoja koji povećava afinitet hemoglobina prema kisiku. Ove strukture su se pokazale različitima od drugih struktura T, a korištene metode u pripremi uzoraka i uzgoju kristala utječu na krajnje strukture [22].

Ove informacije sugeriraju da je struktura hemoglobina mnogo složenija nego što se prije mislilo. Hemoglobin može postojati u nizu konformacija, koje se mogu razlikovati ovisno o eksperimentalnim uvjetima. [17].

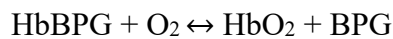
#### 4.1. Alosterički modulatori hemoglobina

Modulacija hemoglobina je proces kojim se mijenjaju svojstva hemoglobina. Ona može biti uzrokovana različitim faktorima kao što su: fizičke, biokemijske i genetske promjene. Modulacija hemoglobina može utjecati na sposobnost hemoglobina da veže kisik, transport kisika kroz tijelo i oslobađanje kisika u tkiva. Taj proces je kompleksan i igra važnu ulogu u regulaciji opskrbe tijela kisikom. Endogeni modulatori su tvari koje se prirodno proizvedu u tijelu i utječu na funkciju hemoglobina, a egzogeni su oni modulatori koji se unose u tijelo iz

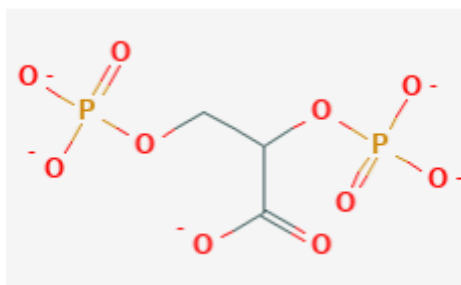
vanjskog svijeta. Također je važno spomenuti da egzogeni modulatori mogu imati slične ili nove i različite učinke na funkciju hemoglobina, ali se egzogeni modulatori mogu koristiti i za liječenje bolesti koje utječu na funkciju hemoglobina [23].

#### 4.1.1. Endogeni modulatori

2,3-bisfosfoglicerat (2,3-BPG) igra ključnu ulogu u alosteriji hemoglobina, regulirajući njegovu sposobnost vezanja kisika. 2,3-BPG smanjuje afinitet hemoglobina za kisik, omogućavajući efikasnu dostavu kisika tkivima. Proces vezanja odvija se sljedećom kemijskom reakcijom:



2,3-BPG se nalazi u relativno visokim koncentracijama u eritrocitima [1]. Kristalna struktura hemoglobina pokazuje da 2,3-BPG ima veći afinitet vezanja na deoksigenirani hemoglobin, stvarajući interakcije s određenim aminokiselinama. Ovo vezanje pomaže stabilizirati hemoglobin u njegovom napetom (T) stanju, čineći ga manje sklonim vezivanju kisika. Iako je vezanje 2,3-BPG manje snažno u opuštenom (R) stanju hemoglobina, R stanje također može vezati 2,3-BPG. Povećane razine 2,3-BPG u eritrocitima imaju ulogu u patogenezi anemije srpastih stanica, smanjujući afinitet hemoglobina takvih stanica (HbS) za kisik i potičući formiranje štetnih polimera deoksigeniranog HbS. [5]. Na slici 10. prikazana je strukturna formula molekule 2,3-BPG.

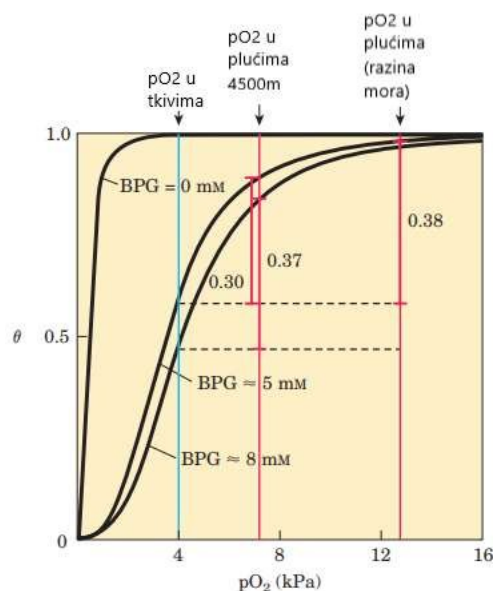


Slika 10. Strukturna formula molekule 2,3-BPG [24]

2,3- BPG se veže za mjesto udaljeno od mjesta vezanja kisika i regulira afinitet hemoglobina za kisik u odnosu na parcijalni tlak kisika u plućima. Mjesto vezanja 2,3-BPG-a na hemoglobinu je šupljina između podjedinica  $\beta$  u stanju T. Ova šupljina je obložena pozitivno nabijenim aminokiselinskim ostacima koji međusobno djeluju s negativno nabijenim grupama 2,3-BPG-

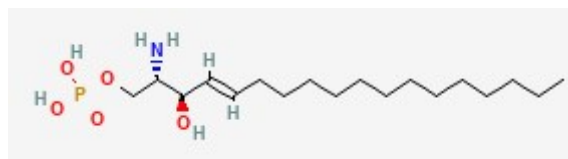
a. Za razliku od kisika, samo jedna molekula 2,3-BPG-a veže se za svaki tetramer hemoglobina. 2,3-BPG smanjuje afinitet hemoglobina za kisik stabilizirajući stanje T. Prijelaz u stanje R sužava veznu šupljinu za 2,3-BPG, što sprječava vezanje BPG-a. U odsutnosti 2,3-BPG-a, hemoglobin lakše prelazi u stanje R [1].

Osim toga, 2,3-BPG ima vrlo važnu ulogu u fiziološkoj adaptaciji na niži parcijalni tlak kisika koji je prisutan na visokim nadmorskim visinama. Za zdravu osobu koja šeće uz obalu mora, vezivanje kisika za hemoglobin regulirano je tako da količina dostavljenog kisika tkivima odgovara gotovo 40% maksimalne količine koju krv može prenositi. Međutim, ako se ta osoba nalazi na planini na nadmorskoj visini od 4500 metara, gdje je  $pO_2$  značajno niži, a količina kisika koja dolazi do tkiva smanjena nakon samo nekoliko sati na većoj nadmorskoj visini, koncentracija 2,3-BPG-a u krvi počinje rasti, što dovodi do smanjenja afiniteta hemoglobina za kisik. Ova prilagodba u razini 2,3-BPG-a ima samo malen učinak na vezanje kisika u plućima, ali značajan učinak na otpuštanje kisika u tkivima. Kao rezultat toga, dostava kisika tkivima se obnavlja na gotovo 40% onoga što krv može prenijeti. Situacija se promijeni kada osoba ponovno dođe na razinu mora. Koncentracija 2,3-BPG-a u eritrocitima također raste kod ljudi koji pate od hipoksije, smanjenog opskrbljivanja perifernih tkiva kisikom zbog nepravilnog funkcioniranja pluća ili cirkulacijskog sustava [1]. Ovaj proces prikazan je slikom 11.



Slika 11. Efekt 2,3 – BPG na vezanje kisika na hemoglobin (preuzeto i prilagođeno iz [1]).

Sfingozin-1-fosfat (S1P) je signalna molekula obogaćena u eritrocitima koja regulira različite biološke procese putem aktivacije S1P receptora na staničnoj površini i interakcije s regulatornim proteinima unutar stanica. Otkriveno je da S1P ima ulogu u patologiji anemije srpastih stanica (ASS). Otkriveno je da S1P utječe na vezanje deoksigeniranog hemoglobina na membranski protein Band 3 (cdB3) na eritrocitima, što dovodi do metaboličkog preuređenja u ASS. Kristalna struktura deoksigeniranog hemoglobina u kompleksu sa S1P pokazuje kako se S1P veže na površinu hemoglobina blizu džepa hema, što rezultira promjenama u konformaciji hemoglobina i smanjenjem afiniteta za kisik [25]. Struktura S1P molekule prikazana je na slici 12.

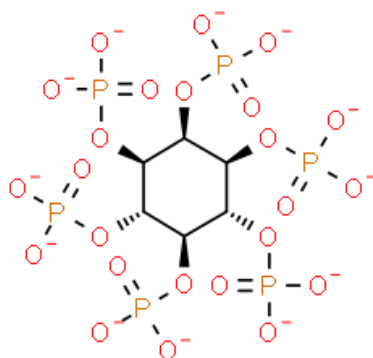


Slika 12. Struktura molekule S1P [26]

Bohrov efekt ili Bohrov učinak je, kao što je već spomenuto ranije, pojava u kojoj afinitet hemoglobina prema kisiku ovisi o pH okoline. Ovaj efekt posljedica je tercijarnih strukturnih promjena u hemoglobinu i ravnoteže između njegovih kvaternih T i R struktura. Kada je pH visok, kao što je primjerice u plućima, određeni ostaci u hemoglobinu, npr.  $\alpha$ Arg141 i  $\beta$ His146, stvaraju interakcije drugim ostacima te tako stabiliziraju T strukturu i olakšavaju oslobađanje kisika. Pri niskom pH, posebno u tkivima gdje je prisutan CO<sub>2</sub>, te interakcije se prekidaju, povećavajući pokretljivost određenih ostataka i olakšavajući prijelaz iz T u R strukturu, što rezultira povećanim afinitetom hemoglobina prema kisiku. Osim toga, drugi ostaci kao što su  $\alpha$ Val1,  $\alpha$ His122,  $\beta$ His2,  $\beta$ Lys82,  $\beta$ His143 također sudjeluju u Bohrovom efektu vezanjem protona koji su povezani s deoksigenacijom hemoglobina [27]. Kloridni ioni također pridonose Bohrovom efektu neutralizacijom pozitivnih naboja na određenim mjestima unutar hemoglobina, što stabilizira njegovu strukturu. Veći broj kloridnih iona nalazi se u centralnoj vodenoj šupljini T strukture u usporedbi s R strukturom, što dodatno stabilizira T stanje i smanjuje afinitet hemoglobina prema kisiku. Različite relaksirane strukture hemoglobina doprinose Bohrovom efektu na različite načine zbog njihovih različitih tercijarnih i kvaternih razlika.  $\beta$ His146, primjerice, ima različitu ulogu u Bohrovom efektu u R i R2 strukturama hemoglobina.[5]

#### 4.1.2. Egzogeni modulatori

Iako je 2,3-BPG prvi spoj koji je otkriven, njegovo otkriće potaknulo je proučavanje inozitol heksafosfata (IHP) i drugih sličnih molekula. IHP je molekula koja se veže na hemoglobin slično kao i 2,3-BPG, no utvrdilo se da je 1000 puta jači nego 2,3-BPG u smanjenju afiniteta hemoglobina za kisik. Također postoje spojevi kao što su propionati koji također utječu na afinitet hemoglobina za kisik stabilizirajući njegovu napetu konformaciju. [5] Strukturna formula ove molekule prikazana je na slici 13.



Slika 13. Strukturna formula IHP [28]

Propionati su klasa sintetskih spojeva koji imaju sposobnost utjecati na afinitet hemoglobina za kisik i stabilizirati njegovo T stanje. Ovi spojevi, poput bezafibrata (BZF), Efaproxial (RSR-13) i njihovih derivata, djeluju na deoksigenirani hemoglobin tako da se vežu unutar središnje vodene šupljine proteina [5]. Primjerice, RSR-13, stvara nekovalentne interakcije s različitim podjedinicama deoksigeniranog hemoglobin tetramera, čime efikasno stabilizira njegovo T stanje i smanjuje afinitet hemoglobina za kisik [29]. Važno je napomenuti da ovi spojevi djeluju drugačije od prirodnih modulatora poput 2,3-bisfosfoglicerata (2,3-BPG) ili inozitol heksafosfata (IHP), te se njihov mehanizam djelovanja bazira na njihovom vezanju za deoksigenirani hemoglobin. Osim toga, alosterički učinci ovih propionata su aditivni u odnosu na 2,3-BPG, jer imaju različita vezna mjesta na hemoglobinu. [5]. BZF veže se za središnju vodenu šupljinu ili površinu hemoglobina blizu  $\alpha$ -hema, što ometa pristup kisiku hemu u hemoglobin, što rezultira smanjenjem afiniteta hemoglobina prema kisiku. RSR-13 također stvara nekovalentne interakcije s različitim podjedinicama deoksigeniranog hemoglobin tetramera, što stabilizira T stanje hemoglobina i smanjuje njegov afinitet za kisik [29]. Ariloksialkanske kiseline imaju suprotan učinak na afinitet hemoglobina za kisik ovisno o mjestu njihove interakcije s proteinom. One koje se vežu na  $\alpha$ Trp14 hidrofobni džep



hemoglobina povećavaju njegov afinitet prema kisiku, dok one koje se vežu na središnju vodenu šupljinu hemoglobina često smanjuju afinitet hemoglobina prema kisiku. [5].

IRL-2500, sintetski peptid, također smanjuje afinitet hemoglobina za kisik. Strukturne studije su pokazale da se IRL-2500 veže na mjesto vezanja 2,3-bisfosfoglicerata (2,3-BPG) na  $\beta$ -pukotini hemoglobina i ostvaruje različite interakcije s proteinom, uključujući vodikove veze i hidrofobne interakcije, što dodatno stabilizira T stanje hemoglobina. [30].

Nekoliko sintetskih i prirodnih spojeva identificirano je kao modulatori koji kovalentno interagiraju s hemoglobinom kako bi promijenili njegovu alosteričku ravnotežu prema stanju R i povećali afinitet hemoglobina za kisik. Ovi modulatori, u većini slučajeva, djeluju tako da potiču veću sposobnost hemoglobina za vezivanje kisika. Primjeri ovih modulatora uključuju aromatske aldehide, pri čemu je vanilin jedan od najpoznatijih. [5].

Furfural i njegovi analozi, poput 5-hidroksimetil-2-furfurala (5-HMF), također su se pokazali kao spojevi koji reagiraju s hemoglobinom i povećavaju njegovu afinitet prema kisiku. 5-HMF je posebno istraživani i pokazao je značajna farmakološka poboljšanja u odnosu na vanilin, kako u *in vitro* tako i u *in vivo* ispitivanjima [31]. Važno je napomenuti da je prije istraživanja 5-HMF-a, mehanizam djelovanja aromatskih aldehida smatran drugačijim, tj. vezivanjem za deoksigenirani hemoglobin i destabilizacijom T stanja ili vezivanjem za ligandirani hemoglobin i stabilizacijom klasičnog R stanja. Međutim, otkriveno je da 5-HMF i drugi aromatski aldehidi povećavaju afinitet hemoglobina za kisik vezivanjem za R2 strukturu. Ovi spojevi stvaraju interakciju Schiffove baze s N-terminalnim  $\alpha$ Val1 dušikom hemoglobin, što ograničava prijelaz u T stanje i dodatno stabilizira R2 strukturu. [5].

GBT-440 (Vokselotor) je još jedan sintetski analog vanilina koji povećava afinitet hemoglobina prema kisiku stabilizacijom opuštenog stanja. GBT-440 se veže na N-terminalni  $\alpha$ Val1 jednog od  $\alpha$ -lanaca strukture R2, ali zbog specifične strukture, samo jedna molekula GBT-440 vezuje se po tetrameru hemoglobina [32].

Visokoučinkoviti probir malih molekula identificirao je TD-1 i TD-3, koji sadrže tiol, kao efektore hemoglobina. Ovi spojevi djeluju putem stvaranja kovalentne disulfidne veze s  $\beta$ Cys93 deoksigeniranog hemoglobina, čime povećavaju afinitet hemoglobina za kisik i stabiliziraju opušteno stanje [33].

Svi ovi različiti spojevi predstavljaju potencijalne terapije za bolesti poput sindroma srpastih stanica i mogli bi pružiti bolje opcije liječenja za te pacijente [5].

## 5. ZAKLJUČAK

Hemoglobin je ključni protein u crvenim krvnim stanicama koji ima nezamjenjivu ulogu u prijenosu kisika iz pluća do različitih tkiva i organa u tijelu. Razumijevanje regulacije aktivnosti hemoglobina od iznimne je važnosti za razumijevanje njegove funkcije te prilagodbe potrebama tijela.

Alosterija je pojava koja se odnosi na promjenu oblika ili aktivnosti proteina uzrokovane vezanjem specifičnih molekula, poznatih kao alosterički modulatori, na mjestima udaljenim od aktivnog mjesta proteina. U slučaju hemoglobina, alosterija je posebno bitna jer omogućuje njegovu prilagodbu promjenjivim uvjetima okoline i stvaranju ravnoteže između vezanja i otpuštanja kisika. Hemoglobin ima četiri mjesta za vezanje kisika i alosterički modulatori mogu utjecati na njegovu sposobnost vezivanja kisika na jednom mjestu, što zauzvrat utječe na ostala mjesta.

Alosterički modulatori mogu biti egzogeni ili endogeni. Egzogeni modulatori su tvari izvan tijela koje utječu na aktivnost hemoglobina, kao što su ioni, pH vrijednost, i molekule kao što je 2,3-BPG. Endogeni modulatori su molekule koje se prirodno nalaze u tijelu, kao što je kisik, i koje također utječu na alosteričke promjene u hemoglobinu.

Alosterija je ključna za razumijevanje regulacije hemoglobina i njegove funkcije u prijenosu kisika. Alosterički modulatori, kako egzogeni tako i endogeni, igraju vitalnu ulogu u tome kako hemoglobin reagira na promjenjive uvjete u tijelu, osiguravajući da se kisik prenosi tamo gdje je potreban. Daljnja istraživanja o alosteriji kod hemoglobina i njenom utjecaju na fiziologiju tijela mogu pružiti vrijedne uvide u razumijevanje bolesti i terapijske intervencije vezane uz ovaj sustav.

## 6. LITERATURA

- [1] D. Nelson, M. Cox , Lehninger Principles of Biochemistry, W.H. Freeman and Company, New York, 2009.
- [2] H. P. Erickson, Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological procedures online*, 11, 32–51, (2009).
- [3] A. J. Marengo-Rowe, Structure-function relations of human hemoglobins. In Baylor University Medical Center Proceedings, 19, 3, 239-245, 2006
- [4] M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry, W. H Freeman and Company, New York, 2007.
- [5] M. H. Ahmed, M. S. Ghatge, M.K. Safo, Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Sub-cellular biochemistry*, 94, 345–382., 2020.
- [6] <https://www.ucsfhealth.org/medical-tests/hemoglobin-electrophoresis#:~:text=Many%20different%20types%20of%20hemoglobin,have%20small%20amounts%20of%20HbF> Pristupljeno: rujan 2023.
- [7] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=24947> Pristupljeno: 12.9.2023. godine
- [8] <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/hemoglobin-a2>
- [9] M.S. Figueiredo, The importance of hemoglobin A2 determination, *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 37(5), 287–289., 2015.
- [10] <https://en.wikipedia.org/wiki/Hemoglobin> Pristupljeno: 23.8.2023. godine
- [11] [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hemoglobina\\_r.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hemoglobina_r.JPG) Pristupljeno: 23.8.2023. godine
- [12] S. Fucharoen, D.J. Weatherall, The hemoglobin E thalasseмии. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(8), a011734., 2012.
- [13] <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1962/perutz/facts/> Pristupljeno: 24.8.2023. godine

- [14] O.V. Kosmachevskaya, A.F. Topunov, Alternate and Additional Functions of Erythrocyte Hemoglobin. *Biochemistry. Biokhimiia*, 83(12), 1575–1593., 2018.
- [15] S.J. Wodak, E. Paci, N. V. Dokholyan, I. N. Berezovsky, A. Horovitz, J. Li, V. J. Hilser, I. Bahar, J. Karanicola, G. Stock, P. Hamm, R. H. Stote, J. Eberhardt, Y. Chebaro, A. Dejaegere, M. Cecchini, J.P. Changeux, P. G. Bolhuis, J. Vreede, P. Faccioli, ... T. McLeish, Allostery in Its Many Disguises: From Theory to Applications. *Structure*, 27(4), 566–578., 2019.
- [16] J. Liu, R. Nussinov, Allostery: An Overview of Its History, Concepts, Methods, and Applications. *PLoS computational biology*, 12., 6, 2016.
- [17] Y. Yuan, M. F. Tam, V. Simplaceanu, C. Ho, New look at hemoglobin allostery. *Chemical reviews*, 115(4), 1702–1724., 2015.
- [18] J. Monod, J. Wyman, J. P. Changeux, On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of molecular biology*, 12, 88–118., 1965.
- [19] D. E. Jr. Koshland, G. Némethy, D. Filmer, Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*, 5(1), 365–385., 1966.
- [20] M. K. Safo, O. Abdulmalik, H. R. Lin, T. Asakura, D. J. Abraham, D. J., Structures of R- and T-state hemoglobin Bassett: elucidating the structural basis for the low oxygen affinity of a mutant hemoglobin. *Acta crystallographica. Biological crystallography*, 61, 156–162., 2005.
- [21] J. Baldwin, C. Chothia, Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *Journal of molecular biology*, 129(2), 175–220., 1979.
- [22] S. Dey, P. Chakrabarti, J. Janin, J., A survey of hemoglobin quaternary structures. *Proteins*, 79(10), 2861–2870., 2011.
- [23] M. H. Ahmed, M. S. Ghatge, M. K. Safo, Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Sub-cellular biochemistry*, 94, 345–382., 2020.
- [24] [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2\\_3-Bisphosphoglycerate](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_3-Bisphosphoglycerate) Pristupljeno: 12.9.2023. godine
- [25] K. Sun, A. D'Alessandro, M. H. Ahmed, Y. Zhang, A. Song, T. P. Ko, T. Nemkov, J. A. Reisz, Z. Wu, M. Adebiyi, Z. Peng, J. Gong, H. Liu, A. Huang, Y. E. Wen, Q. A. Wen, V. Berka, M. V. Bogdanov, O. Abdulmalik, L. Han, ... Y. Xia, Structural and Functional Insight of

Sphingosine 1-Phosphate-Mediated Pathogenic Metabolic Reprogramming in Sickle Cell Disease. *Scientific reports*, 7(1), 15281., 2017.

[26] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sphingosine-1-phosphate> Pristupljeno: 11.9.2023. godine

[27] M. Berenbrink, Evolution of vertebrate haemoglobins: Histidine side chains, specific buffer value and Bohr effect. *Respiratory physiology & neurobiology*, 154(1-2), 165–184. 2011.

[28] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.18505485.html> Pristupljeno: 10.9.2023. godine

[29] G. G. Xu, T. M. Deshpande, M. S. Ghatge, A. Y. Mehta, A. S. Omar, M. H. Ahmed, J. Venitz, O. Abdulmalik, Y. Zhang, M. K. Safo, Design, Synthesis, and Investigation of Novel Nitric Oxide (NO)-Releasing Prodrugs as Drug Candidates for the Treatment of Ischemic Disorders: Insights into NO-Releasing Prodrug Biotransformation and Hemoglobin-NO Biochemistry. *Biochemistry*, 54(49), 7178–7192., 2015.

[30] S. R. Goldstein, C. Liu, M. K. Safo, A. Nakagawa, W. M. Zapol, J. D. Winkler, Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Allosteric Effectors That Enhance CO Release from Carboxyhemoglobin. *ACS medicinal chemistry letters*, 9(7), 714–718., 2018.

[31] O. Abdulmalik, M. K. Safo, Q. Chen, J. Yang, C. Brugnara, K. Ohene-Frempong, J. D. Abraham, T. Asakura, 5-hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. *British journal of haematology*, 128(4), 552–561., 2005.

[32] D. Oksenberg, K. Dufu, M. P. Patel, C. Chuang, Z. Li, Q. Xu, A. Silva-Garcia, C. Zhou, A. Hutchaleelaha, L. Patskovska, Y. Patskovsky, S. C. Almo, U. Sinha, B. W. Metcalf, D. R. Archer, GBT440 increases haemoglobin oxygen affinity, reduces sickling and prolongs RBC half-life in a murine model of sickle cell disease. *British journal of haematology*, 175(1), 141–153., 2016.

[33] A. Nakagawa, M. Ferrari, G. Schleifer, M. K. Cooper, C. Liu, B. Yu, L. Berra, E. S. Klings, R. S. Safo, Q. Chen, F. N. Musayev, M. K. Safo, O. Abdulmalik, D. B. Bloch, W. M. Zapol, A Triazole Disulfide Compound Increases the Affinity of Hemoglobin for Oxygen and Reduces the Sickling of Human Sickle Cells. *Molecular pharmaceuticals*, 15(5), 1954–1963., 2018.