

Proteine globulari:

Mioglobina ed Emoglobina

Proteine trasportatrici di ossigeno

Mioglobina

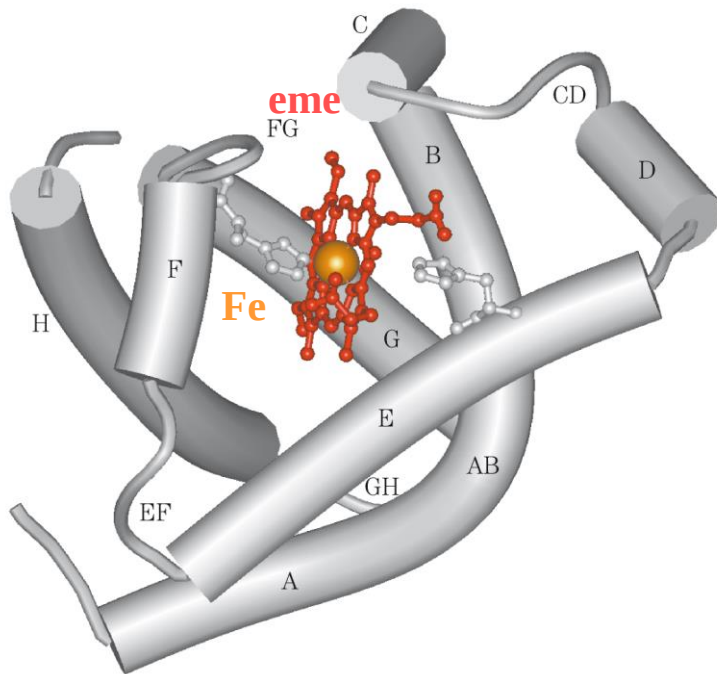
Piccola proteina intracellulare **trasportatrice di ossigeno**

Presente nel **tessuto muscolare** di quasi tutti i mammiferi (**serbatoio di O₂**)

Singolo peptide di **153 aa**

Peso Molecolare **16700 Da**

8 segmenti in **α -elica** (indicate con le lettere da **A** ad **H**) che si organizzano formando una **proteina globulare**. I ripiegamenti che collegano i tratti a struttura alfa sono indicati con le lettere dei segmenti che interconnettono: **AB, CD, EF...**



L'ossigeno si lega al **Fe(II)** che è incorporato nel **gruppo prostetico** legato alla proteina chiamato **eme**.

Il gruppo eme è alloggiato in una **tasca idrofobica** tra le eliche **E** ed **F**

Il gruppo prostetico eme

Il **gruppo eme** è un anello eterociclico contiene **4 gruppi pirrolici**

È legato **1 atomo** di **ferro** nello stato di ossidazione **ferroso** (Fe^{2+}).

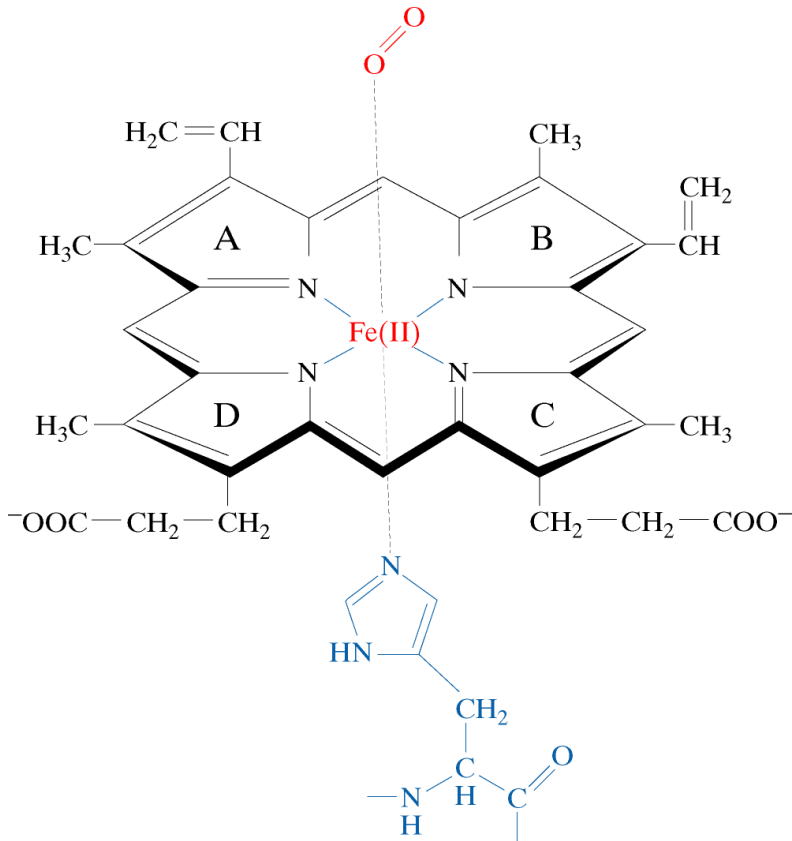
L'atomo di Ferro ha **6 legami di coordinazione** di cui 4 con i **4** atomi di **N** che fanno parte dell'anello porfirinico.

Gli altri **2 legami** sono perpendicolari all'anello porfirinico:

1 legame di coordinazione è impegnato con un atomo di **N** di un residuo di Istidina (**His F8**).

Il sesto ligando del Fe(II) è l'ossigeno molecolare (O_2).

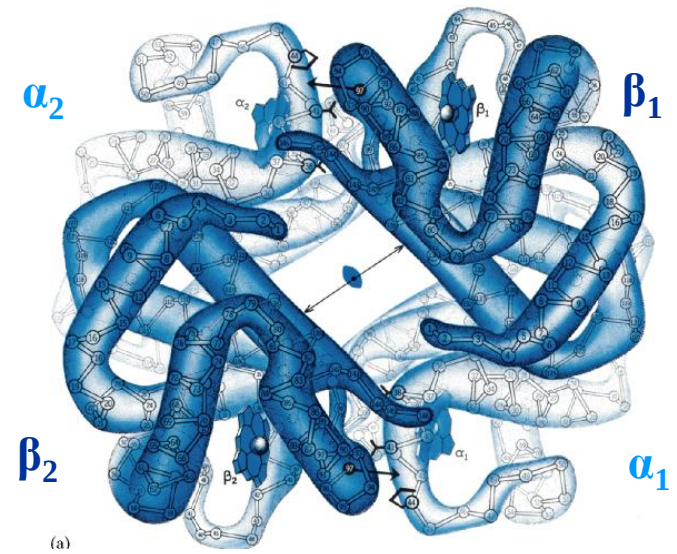
Il **Fe(III)** non è in grado di **legare l'ossigeno**



O_2 si lega **reversibilmente** al **Fe(II)**

CO, NO e **H_2S** si legano con un'affinità superiore $\Rightarrow$ **Effetto tossico**

Emoglobina



Proteina trasportatrice di ossigeno **nel sangue**

E' presente nei **globuli rossi** a cui conferisce il loro caratteristico **colore**

Fornisce ossigeno ai tessuti

Si **lega reversibilmente** a O_2 e CO_2

Nel **sangue arterioso** (dai polmoni ai tessuti) è satura di ossigeno per il **96%**

Nel **sangue venoso** (dai tessuti ai polmoni) è satura di ossigeno per il **64%**

Proteina **tetrameric** $\alpha_2\beta_2$ con due catene **α (141 aa)** e due catene **β (146 aa)**

All' **interfaccia** tra le subunità si instaurano **interazioni deboli**

4 gruppi prostetici **eme**

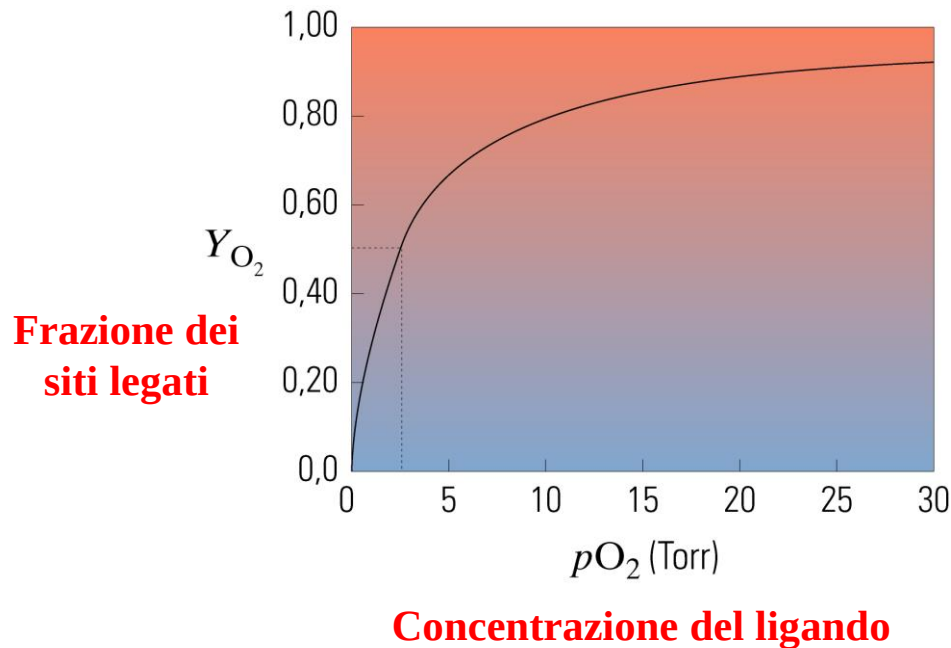
IL legame dell' **ossigeno altera** l'intera **struttura del tetramero**

Legame dell'ossigeno

La **funzione** della mioglobina e dell'emoglobina dipende dalla capacità delle proteine di **legare reversibilmente l'ossigeno**.

La frazione dei siti occupati (**Y_{O_2}**) è proporzionale alla concentrazione di ossigeno misurata come pressione parziale (**pO_2**)

Curva di legame dell'ossigeno alla mioglobina

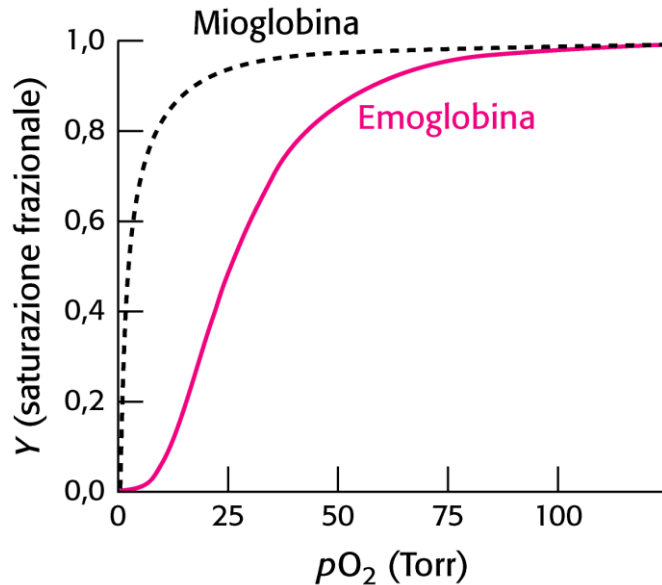


Iperbole rettangolare

E' relativamente **insensibile** a **piccole variazioni** della concentrazione di **ossigeno** disciolto e quindi funziona bene come **serbatoio di immagazzinamento** di **ossigeno** nei **tessuti**.

alti livelli di saturazione raggiunti già a basse concentrazioni di O_2

Curva di legame dell'ossigeno all'emoglobina



Andamento sigmoide tipico
dei **fenomeni cooperativi**

L'emoglobina con la sua **struttura tetrameric**a si **adatta** meglio alla funzione di **trasportatore** di ossigeno nel **sangue**.

Le interazioni tra le subunità possono generare **risposte sensibili** anche a **variazioni molto piccole** della concentrazione di **ligando**.

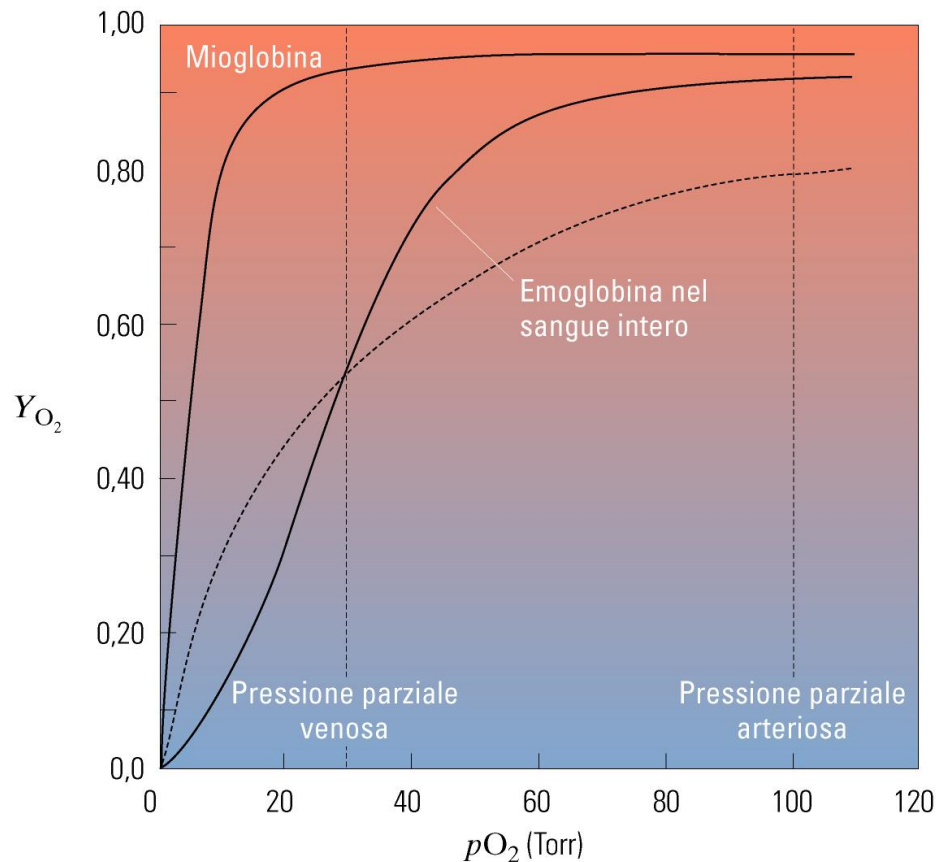
Le **interazioni tra le subunità** dell'emoglobina determinano **variazioni dell'affinità** della proteina per l'ossigeno.

La **modulazione** del legame consente **risposte efficaci** alla **domanda di ossigeno**.

Curve di legame dell'ossigeno all'emoglobina e alla mioglobina

Confronto

Le differenti curve di legame riflettono le differenti funzioni delle due proteine



La **curva tratteggiata** è una curva di legame dell'ossigeno all'emoglobina **teorica** con **andamento iperbolico**

Aspetti strutturali: lo stato R e T all'emoglobina

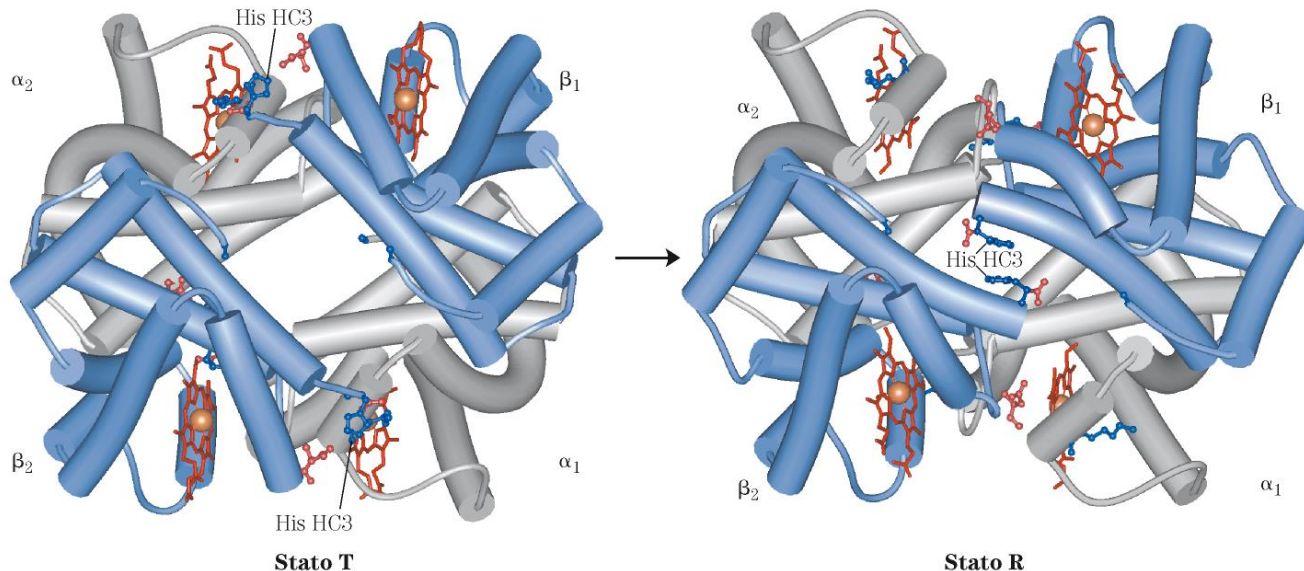
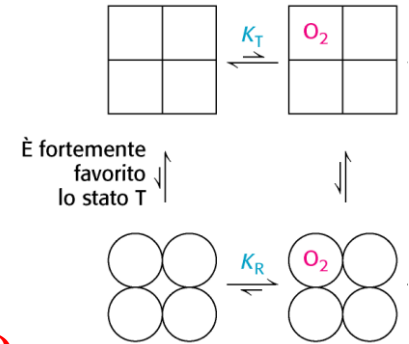
La cristallografia a Raggi X ha evidenziato due **differenti conformazioni** dell'emoglobina: lo stato **R (rilassato)** e lo stato **T (teso)**

L'ossigeno si **lega ad entrambe** le forme

L'ossigeno ha una **maggiore affinità** per lo stato **R**

In assenza di ossigeno lo stato **T** è prevalente (**deossiemoglobina**)

Il legame di ossigeno ad una subunità della forma T innesca una **variazione conformazionale** che converte le subunità allo stato **R (ossiemoglobina)**

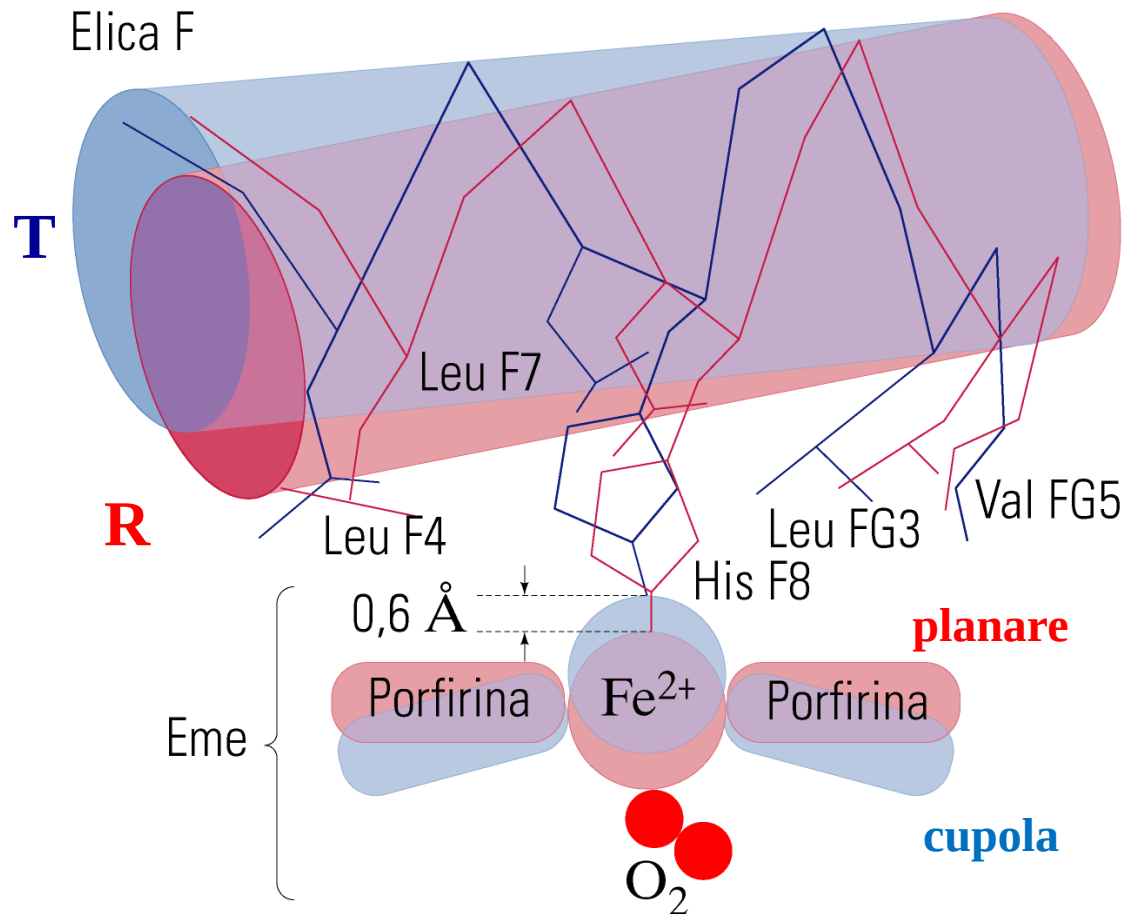


Meccanismo di Perutz

Propose che la conversione $T \Rightarrow R$ fosse innescata da cambiamenti della posizione di residui amminioacidici che circondano l'eme

Lo stato **T** (la conformazione della **deossiemoglobina**)

Lo stato **R** (la conformazione della **ossiemoglobina**)



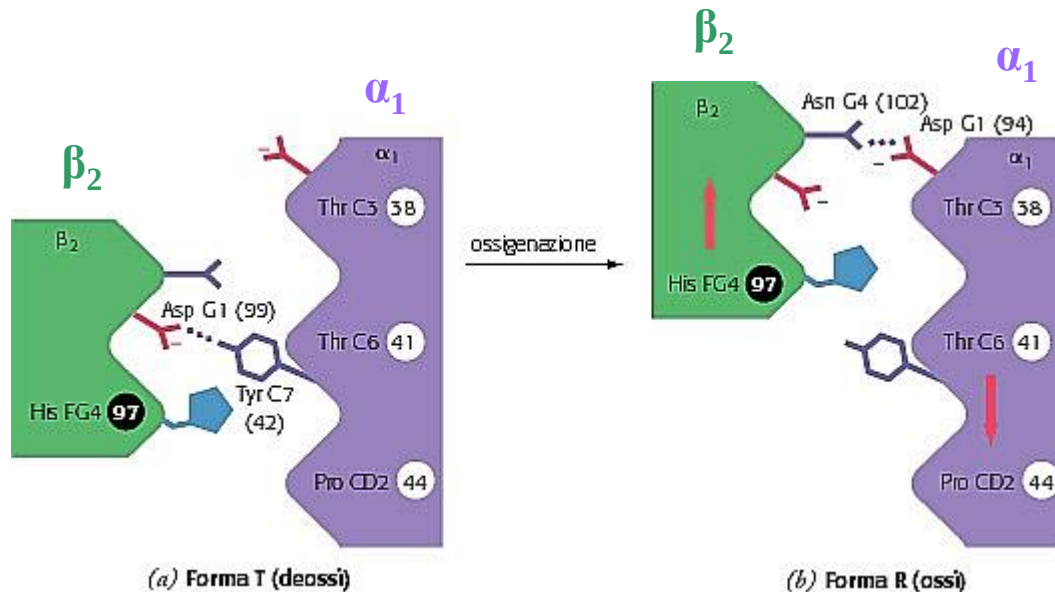
Movimenti dell'**eme** e dell'**elica F** durante la transizione $T \Rightarrow R$

Nella forma **T** la porfirina ha una forma a **cupola**

Nella forma **R** la porfirina ha una forma **planare**

Movimenti all'interfaccia α_1 - β_2 durante la transizione $T \Rightarrow R$

Bassa affinità
per l'ossigeno



Alta affinità
per l'ossigeno

Le **subunità** sono così saldamente accoppiate che una **modificazione** della **struttura terziaria** in una **subunità** non può avvenire senza che ne risenta anche la **struttura quaternaria** dell'**intera proteina tetramERICA**.

L'emoglobina è una proteina allosterica

La **prima molecola** di ossigeno si **lega debolmente** alla deossiemoglobina **(T)**.

Si verifica una **modifica conformazionale** che si **trasmette** alla altre subunità adiacenti rendendo più **facile il legame** delle **altre molecole** di **ossigeno**.

Il legame della **prima molecola** di ossigeno sarà più **debole** mentre le **successive** si legheranno **più facilmente**.

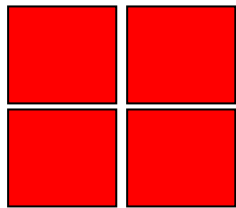
Proteine allosteriche

Il termine allosteria deriva dal greco **allos**, cioè "altro", e **stereos**, "struttura, solido", in riferimento alla separazione del sito allosterico di una proteina dal suo sito attivo.

La regolazione allosterica è la regolazione di un **enzima** o di una **proteina** mediata da una molecola detta **effettore**, che svolge tale funzione **legandosi** presso il **sito allosterico**, che può coincidere o no con il sito attivo.

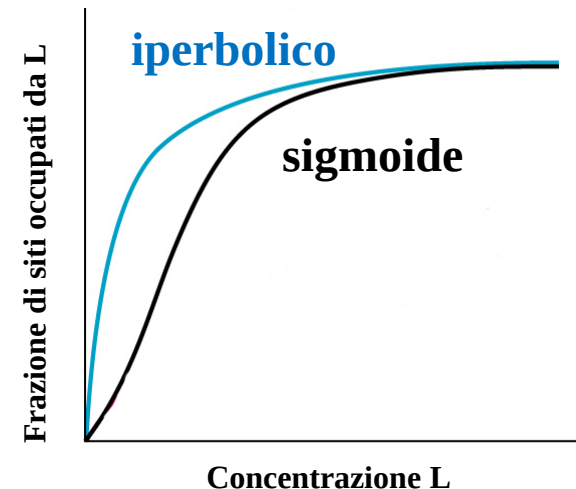
Comportamento di proteine **multisubunità**

Richiede in genere **interazioni tra le subunità** di una proteina oligomerica.

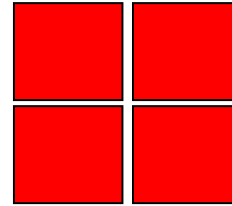


L (ligando)

La **curva di legame** di un ligando ad una proteina allosterica **non** segue un andamento **iperbolico** ma **sigmoideale**



Interazioni allosteriche



L (ligando)

il legame di un ligando a un sito modifica le proprietà di legame di altri siti per un altro ligando.

Cooperatività positiva: il legame di un ligando a uno dei siti determina un aumento dell'affinità degli altri siti sulla stessa molecola.

Cooperatività negativa: il legame di un ligando a uno dei siti determina una diminuzione dell'affinità degli altri siti sulla stessa molecola.

Allosteria omotropica e eterotropica

Se l'**effettore** di una proteina è **diverso** dal suo **ligando** si parla di **allosteria eterotropica**, quando **coincide** si parla di **allosteria omotropica**.

Un modulatore **allosterico omotropico** è tipicamente un **attivatore**, un modulatore **allosterico eterotropico** può essere un **attivatore** o un **inibitore**.

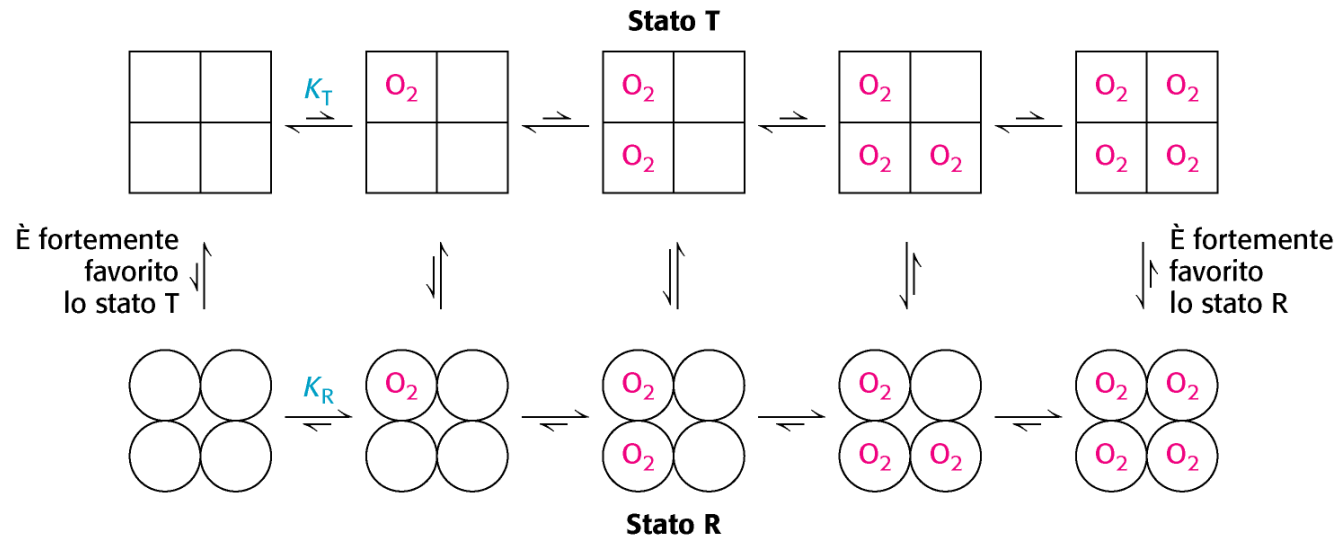
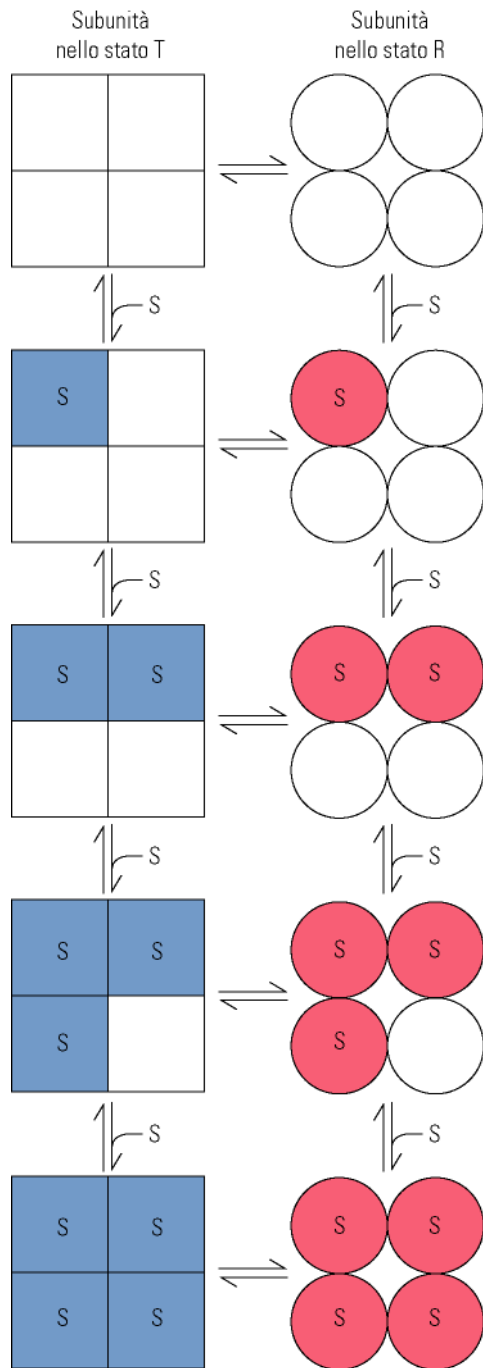
Modello simmetrico o concertato (Monod, Wyman, Changeux)

I due stati conformazionali, **T** e **R**, sono in **equilibrio** tra loro.

T e R legano entrambe il ligando ma con **affinità diversa** (diverse **K di equilibrio**: K_T e K_R).

Le subunità subiscono **modificazioni conformazionali concertate**.

Non ci sono oligomeri che abbiano nello stesso tempo subunità nello stato T e nello stato R

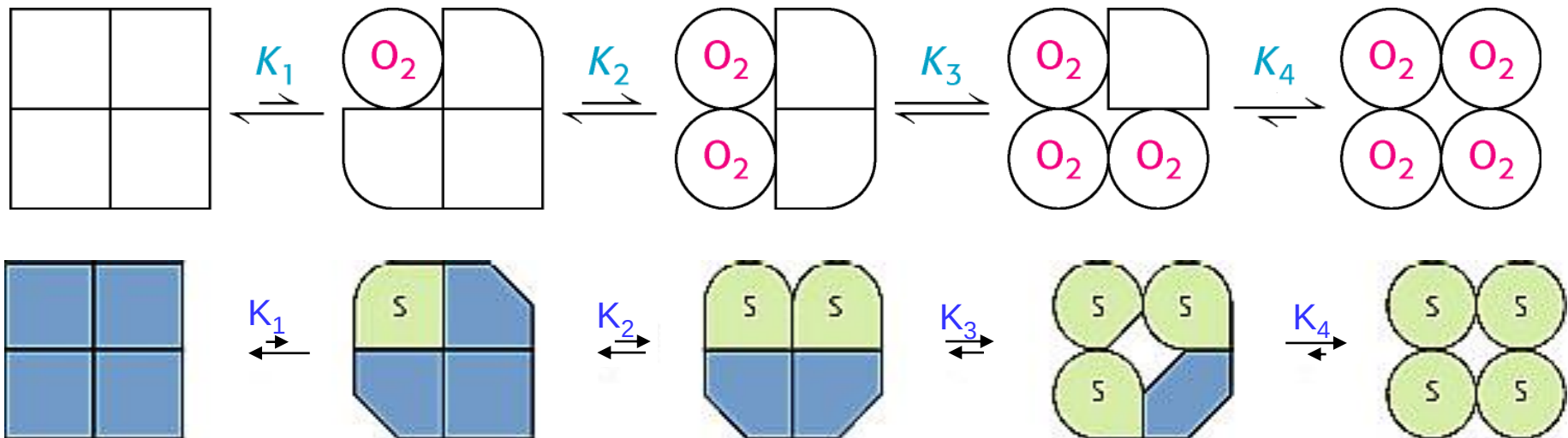


Modello sequenziale (Koshland)

Il legame del ligando induce una modificazione conformazionale nella subunità a cui è legato il ligando.

Le interazioni cooperative nascono dall'influenza che questa transizione su una subunità ha sulle altre subunità vicine.

Le **modificazioni conformazionali** avvengono **una dopo l'altra** mano a mano che vengono occupati sempre più siti per il ligando.



Effetto Bohr

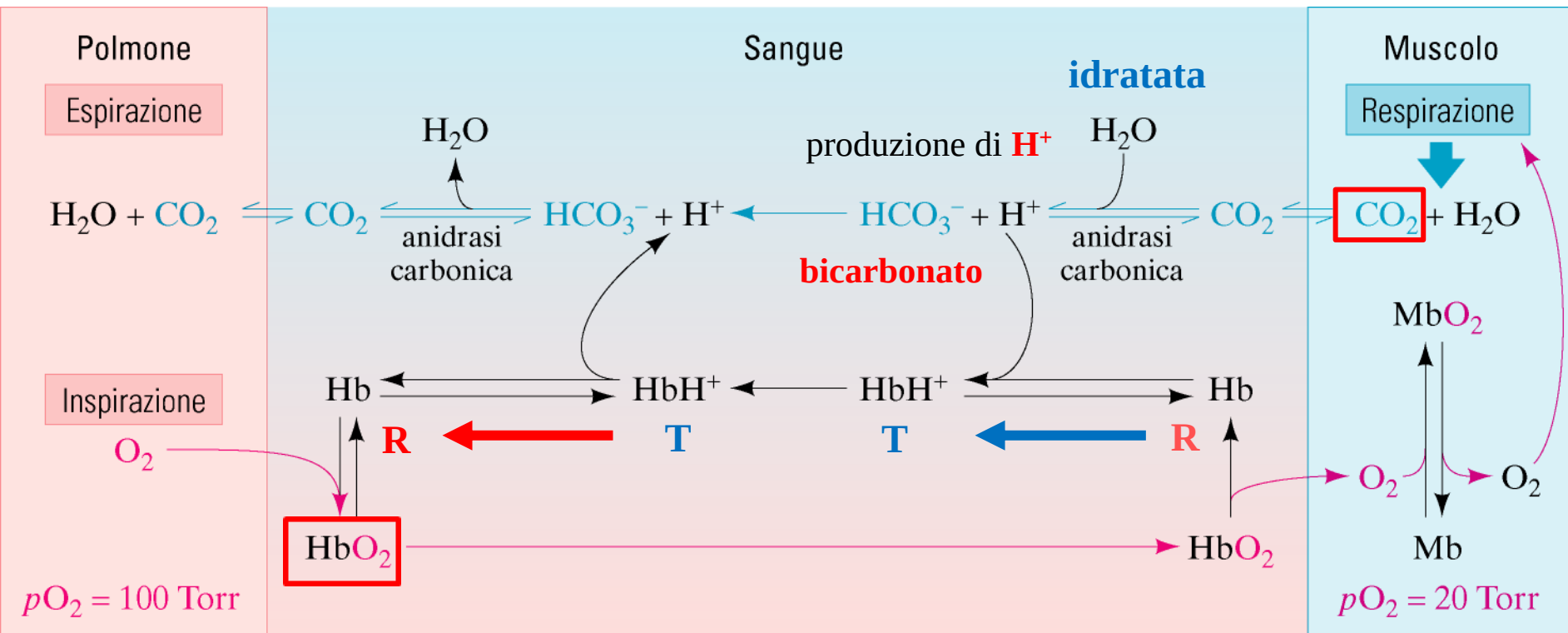
L'emoglobina trasporta H^+ e CO_2 dai tessuti ai polmoni

La CO_2 prodotta dalla respirazione cellulare nel muscolo entra nei globuli rossi e viene idratata a **bicarbonato** HCO_3^- per azione dell'enzima **anidrasi carbonica** con produzione di H^+ che si legano a residui amminoisidici della forma **R** inducendo una **riduzione dell'affinità** per l'**ossigeno** e **convertendo** l'emoglobina nella **forma T**.

Nei tessuti metabolicamente attivi: **diminuzione** del **pH** e aumento di CO_2

O_2 e H^+ si legano all'emoglobina con **affinità opposte**

CO_2 può formare **bollicine** *se non viene convertito in bicarbonato*



L' **effetto Bohr** ha lo **scopo** di regolare il rilascio di O_2 nei vari **tessuti** in base all'attività metabolica dei tessuti stessi

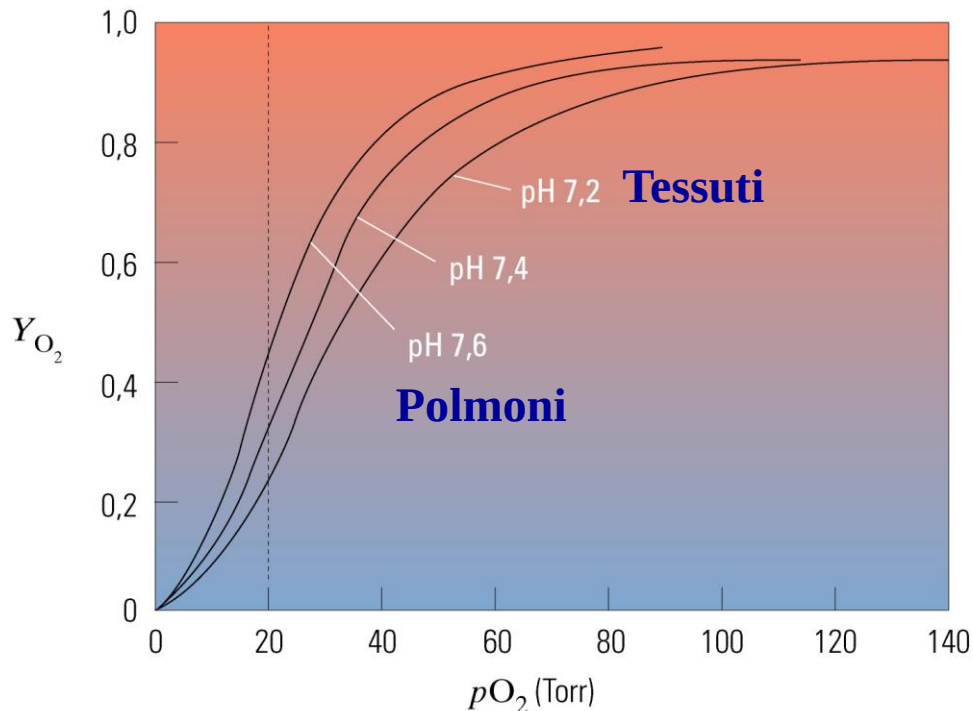
L'affinità dell'ossigeno per l'emoglobina aumenta con l'aumentare del pH

Polmoni:

la concentrazione di O_2 è **elevata** e l'emoglobina **rilascia H^+** e **lega O_2**

Tessuti periferici:

la concentrazione di O_2 è **bassa** e l'emoglobina **rilascia O_2** e **lega H^+**



diminuzione del pH

- Gli ioni **H^+** si legano all' Hb e hanno l'effetto di **diminuire l'affinità dell' Hb per l' O_2**



- Quindi anche una **riduzione del pH** causa un **maggiore rilascio di O_2** nei tessuti metabolicamente attivi

Il 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) è un regolatore allosterico eterotropico dell'emoglobina

BPG è presente in **concentrazioni elevate** negli **eritrociti**

BPG **riduce l'affinità** dell'emoglobina per **O₂**

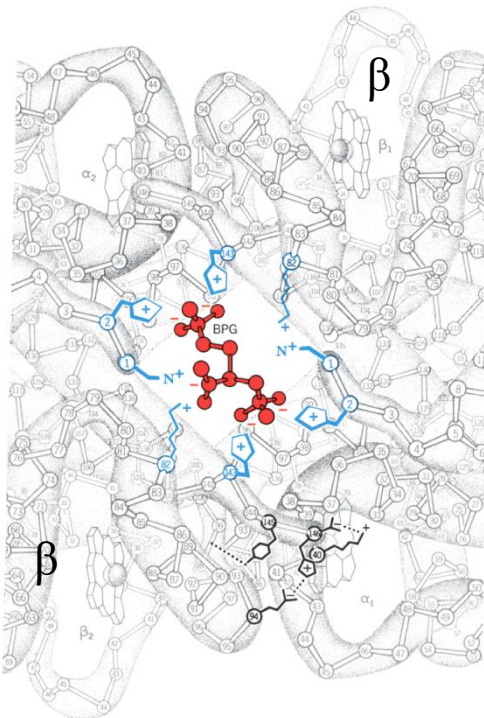
1 molecola di BPG si lega alla **forma T** nella **cavità** tra le due subunità **β**

Ruolo fisiologico

BPG svolge un ruolo fisiologico **nell'adattamento alla bassa pO₂**

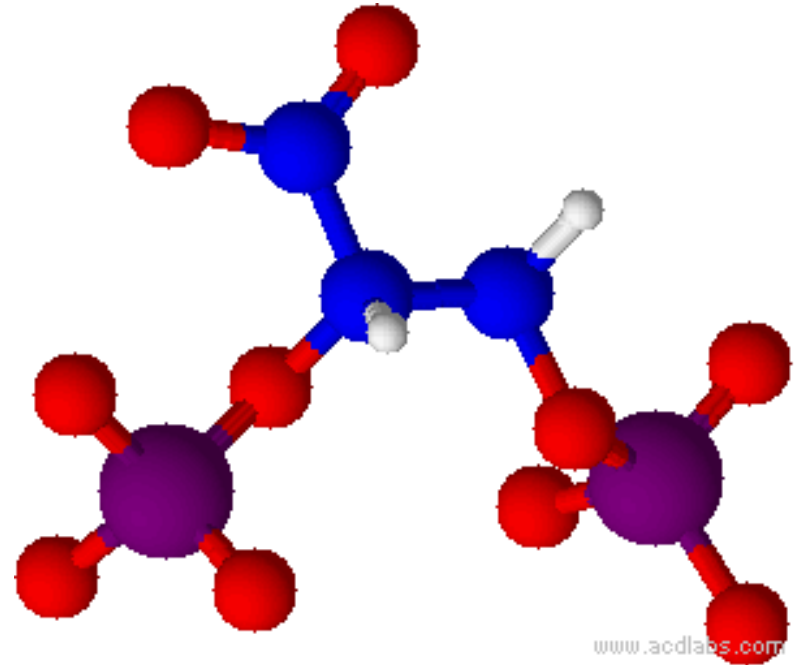
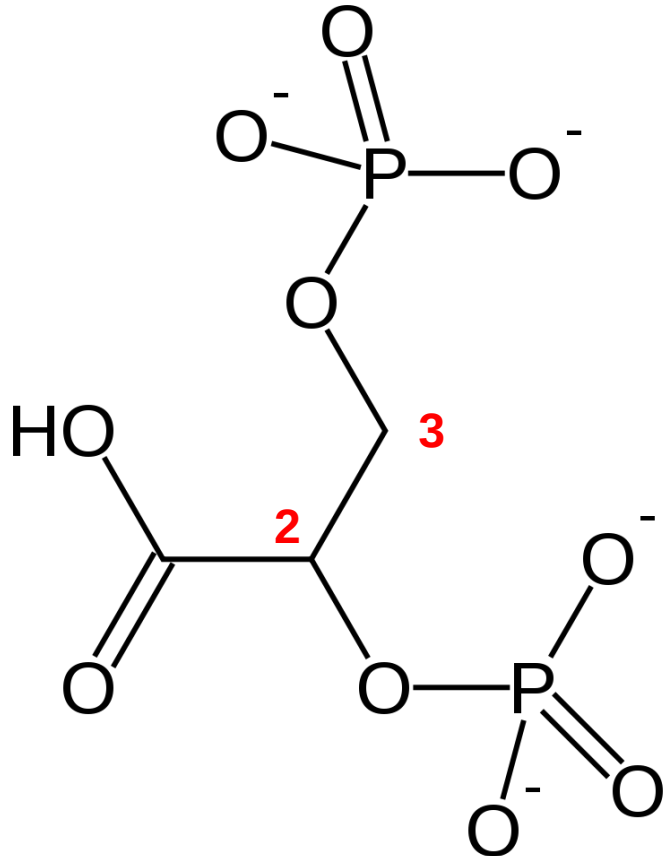
In **alta quota** la **pO₂** è **bassa** ed il **trasferimento** di **O₂** ai **tessuti** si **riduce**

Poche **ore dopo aumenta** la concentrazione di **BPG** nel sangue provocando una **diminuzione dell'affinità** dell'emoglobina per **O₂** **aumentando** il **rilascio** di **O₂** nei **tessuti**



2,3-bisfosfoglicerato (BPG)

Si lega ad una **cavità idrofila (Lys e His)**



Il 2,3 bisfosfoglicerato (2,3 DPG) è un composto derivato da un prodotto intermedio della glicolisi

Anemia a cellule falciformi

Emoglobine anormali

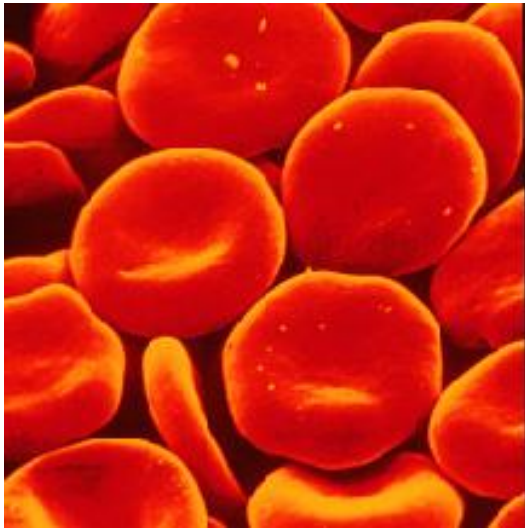
Emoglobina S

Sono note circa **500 varianti** di emoglobina umana generalmente differenti per **un singolo residuo amminoacidico**

L'emoglobina S deossigenata precipita e forma **polimeri** che si aggregano in **fibre** tubulari causando la deformazione in **falce**

L'emoglobina normale (A) rimane invece **solubile**

Eritrociti umani normali



Eritrociti umani falciformi



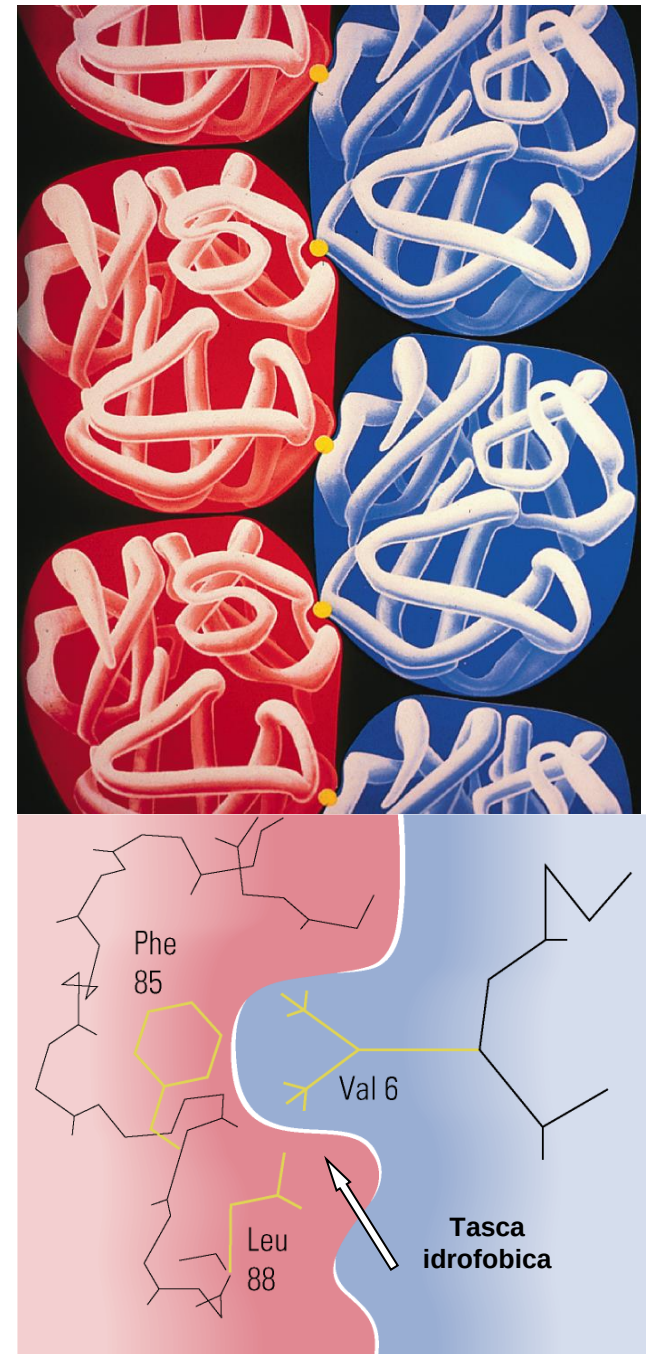
Formazione di fibre di deossiemoglobina S

Singola mutazione nelle catene β
Glu6 $\longrightarrow$ **Val6**

Struttura della fibra di deossiemoglobina S

Disposizione delle molecole di deossiemoglobina S nella fibra. Sono mostrate solo tre subunità di ogni molecola.

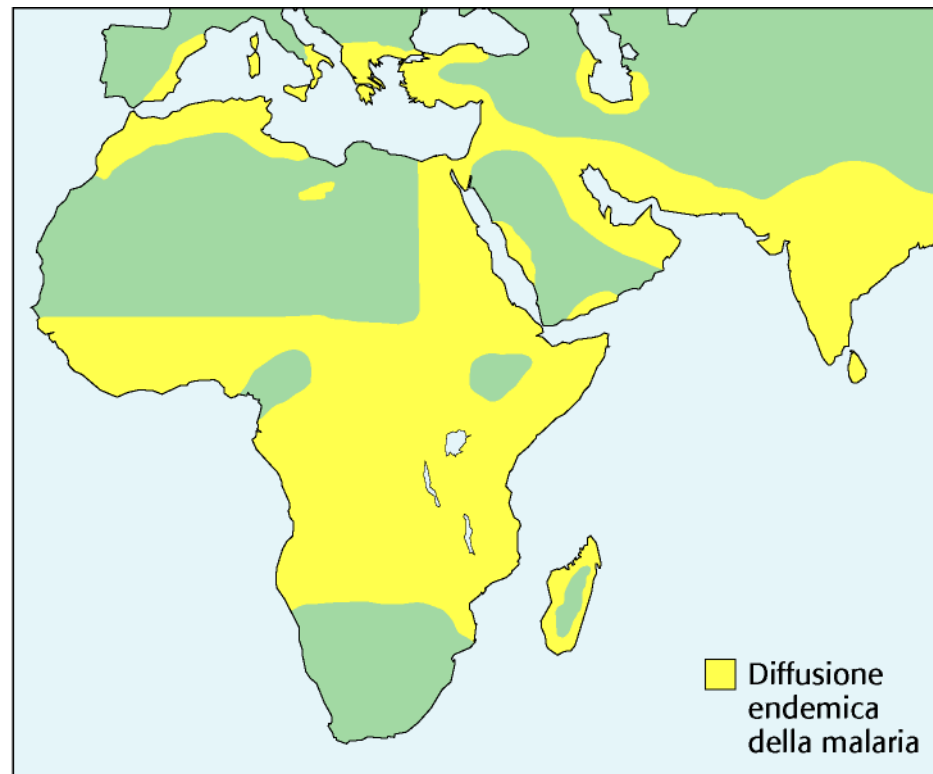
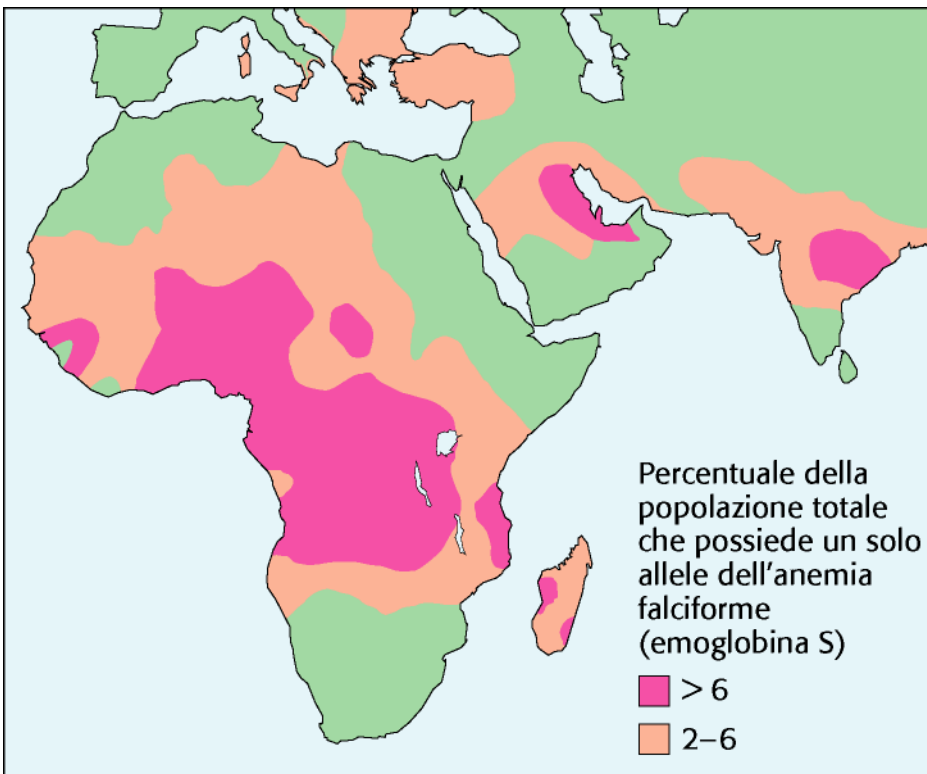
La catena laterale della **Val 6** mutante nella catena β di una molecola di deossiemoglobina S, si lega ad una **tasca idrofobica** sulla **subunità β** di una molecola di deossiemoglobina S vicina



Anemia falciforme e malaria

La popolazione **eterozigote** per il gene dell'anemia falciforme presenta un vantaggio nei paesi in cui è diffusa la malaria.

Gli **omozigoti muoiono** in età infantile



1A3N

DEOXY HUMAN HEMOGLOBIN

[RCSB PDB - 1A3N: DEOXY HUMAN HEMOGLOBIN](#)

6BB5

Human Oxy-Hemoglobin

[RCSB PDB - 6BB5: Human Oxy-Hemoglobin](#)

1B86

HUMAN DEOXYHAEMOGLOBIN-2,3-DIPHOSPHOGLYCERATE COMPLEX

[RCSB PDB - 1B86: HUMAN DEOXYHAEMOGLOBIN-2,3-DIPHOSPHOGLYCERATE COMPLEX](#)

1IGT

STRUCTURE OF IMMUNOGLOBULIN

[RCSB PDB - 1IGT: STRUCTURE OF IMMUNOGLOBULIN](#)

1M4L

STRUCTURE OF NATIVE CARBOXYPEPTIDASE A AT 1.25 RESOLUTION

[RCSB PDB - 1M4L: STRUCTURE OF NATIVE CARBOXYPEPTIDASE A AT 1.25 RESOLUTION](#)