

Esempi di proteine: Mioglobina ed Emoglobina

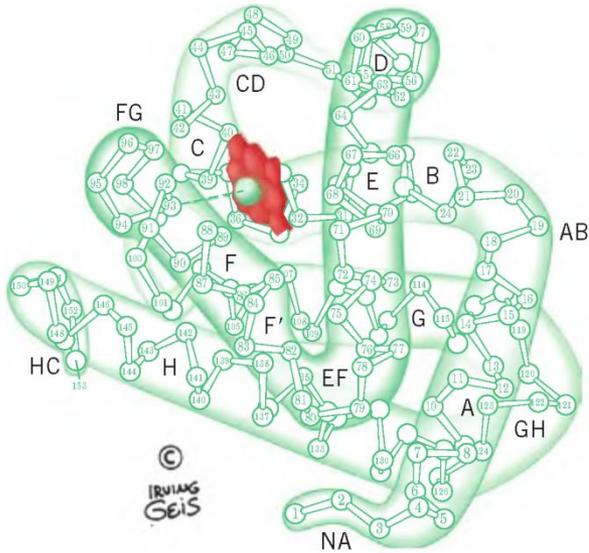
- Mioglobina: caratteristiche generali, funzione
- Il gruppo eme
- Emoglobina: caratteristiche generali, funzione
- Legame dell'ossigeno all'emoglobina, cooperatività
- Emoglobina modello di proteina allosterica
- Mutazioni dell'emoglobina

Francesca Anna Scaramuzzo, PhD

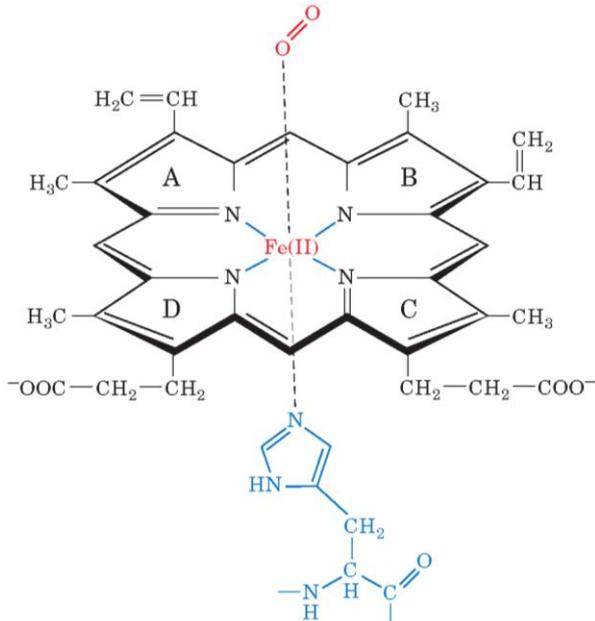
Dipartimento di Scienze di Base e Applicate per l'Ingegneria - Centro di Nanotecnologie Applicate all'Ingegneria

francesca.scaramuzzo@uniroma1.it

Mioglobina: Caratteristiche Generali

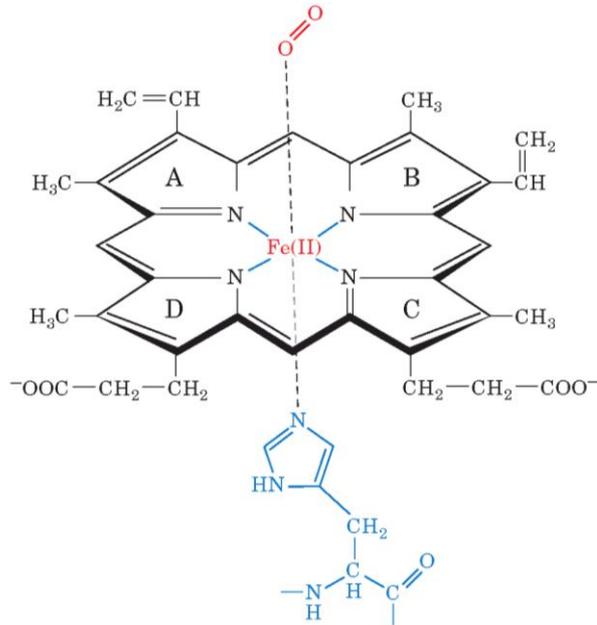


- Proteina globulare intracellulare del muscolo dei vertebrati
- Facilita il trasporto dell'ossigeno nel muscolo
- 153 residui amminoacidici
- 8 segmenti α -elica (A-H)
- 1 gruppo prostetico **eme**

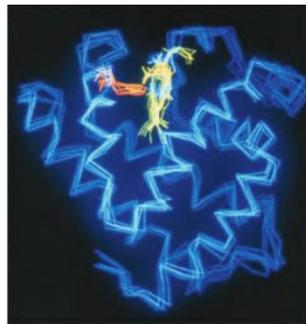
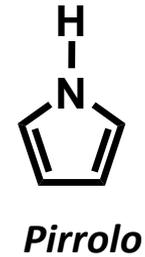
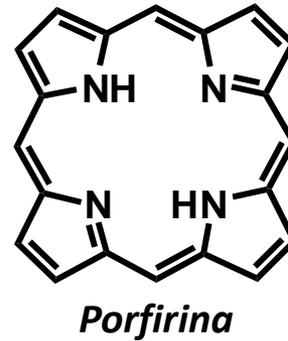


Gruppo prostetico: molecola organica legata in maniera permanente alla proteina (legami covalenti o legami idrogeno o interazioni idrofobiche)

Il gruppo prostetico eme



- Sistema ad anello eterociclico derivato della porfirina
- Contiene 4 anelli pirrolici tenuti insieme da ponti metinici

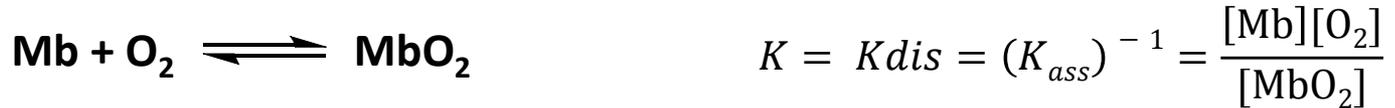


- Si trova in una tasca idrofobica tra le eliche E ed F
- Ha interazioni idrofobiche con Val E11 e Phe CD1
- Fe(II) coordina i 4 N porfirinici, N di HisF8 e O₂
- O₂ forma legame idrogeno con His E7
- Lega anche CO, NO, H₂S
- Se Fe(II) si ossida a Fe(III) si forma **metamioglobina**
- La parte proteica evita ossidazione di Fe (II) Fe(III)

Mioglobina: Funzione

Facilita il trasporto dell'ossigeno nel muscolo

- O_2 è scarsamente solubile nelle soluzioni acquose ($\approx 10^{-4}$ M)
- La mioglobina (Mb) aumenta la solubilità dell'ossigeno nel muscolo (serbatoio molecolare)



Saturazione frazionale Y_{O_2} : frazione dei siti di legame realmente occupata da O_2

$$Y_{O_2} = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}] + [\text{MbO}_2]} = \frac{[\text{O}_2]}{K + [\text{O}_2]} = \frac{pO_2}{K + pO_2}$$

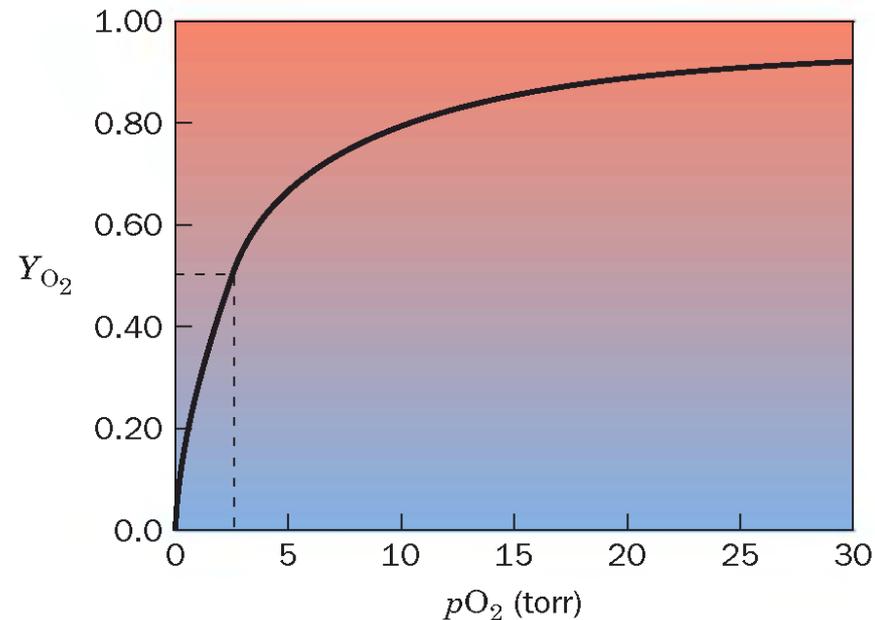
pO_2 = pressione parziale O_2 (tensione di ossigeno)

Per $pO_2 = K$, $Y_{O_2} = 0.5$ (mioglobina saturata per metà)

K è il valore di pO_2 a cui $Y_{O_2} = 0.5$ (K come p_{50})

p_{50} mioglobina = 2.8 torr

Mioglobina *saturata* con O_2 : alti valori di pO_2 , tutti i siti di legame occupati

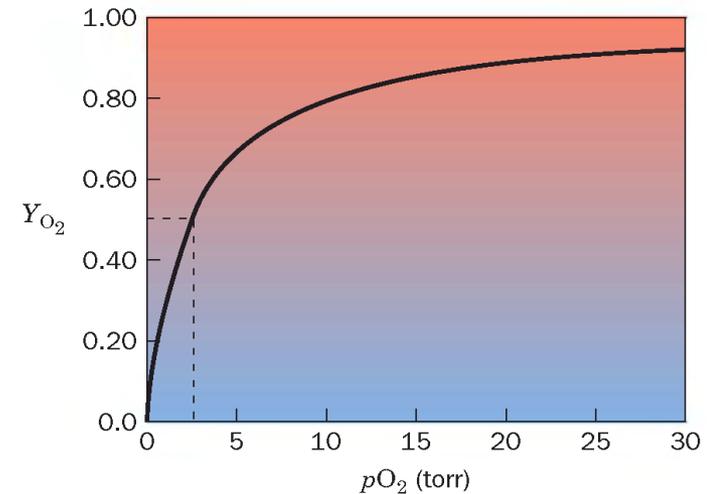


Altri fenomeni biochimici con lo stesso andamento

Saturazione frazionale Y_{O_2} vs pressione parziale pO_2

$$Y_{O_2} = \frac{[MbO_2]}{[Mb] + [MbO_2]} = \frac{[O_2]}{K + [O_2]} = \frac{pO_2}{K + pO_2}$$

$$y = \frac{x}{K + x} \quad \text{iperbole rettangolare}$$



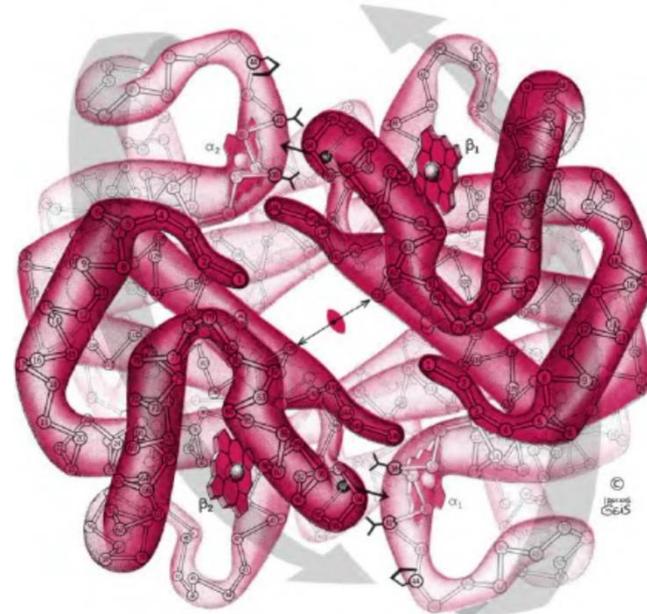
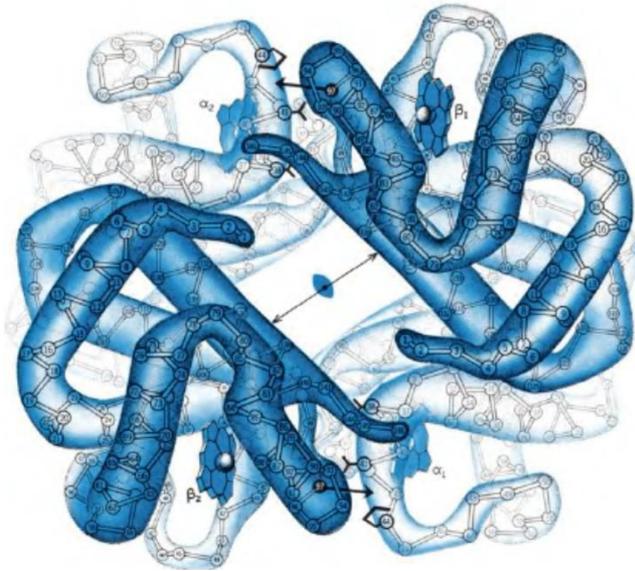
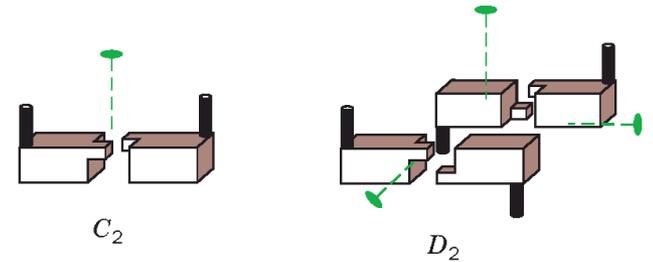
- Legame O_2 a mioglobina
- Legame ormone a recettore su superficie cellulare
- Legame substrato a sito attivo enzima

- Proteine con un solo sito di legame per ligando
- Proteine con più siti di legame per un ligando, se le interazioni dei vari siti sono indipendenti

- La pendenza dell'iperbole aumenta al diminuire di K

Emoglobina: Caratteristiche Generali

- Proteina globulare intracellulare
- Facilita il trasporto dell'ossigeno ai tessuti
- Efficienza e specificità simili a quelle enzimatiche (enzima onorario)
- Nei mammiferi, ha struttura quaternaria $\alpha_2\beta_2$ e dimensioni 64 x 55 x 50 Å
- Somiglianza struttura primaria (18%) e terziaria delle subunità con mioglobina
- Simmetria C_2 e pseudosimmetria D_2
- $\alpha_1 - \beta_1$ interagiscono tramite 35 residui
- $\alpha_1 - \beta_2$ interagiscono tramite 19 residui
- Nella deossi-emoglobina, un canale di 20 Å separa α_1 da α_2 e β_1 da β_2
- L'ossigenazione fa ruotare $\alpha\beta$ di 15°, avvicinando le subunità β e restringendo il canale



Il legame dell'ossigeno all'emoglobina

Facilita il trasporto dell'ossigeno ai tessuti

p_{50} emoglobina = 26 torr

Legame dell'O₂ all'emoglobina descritto da **curva sigmoide**

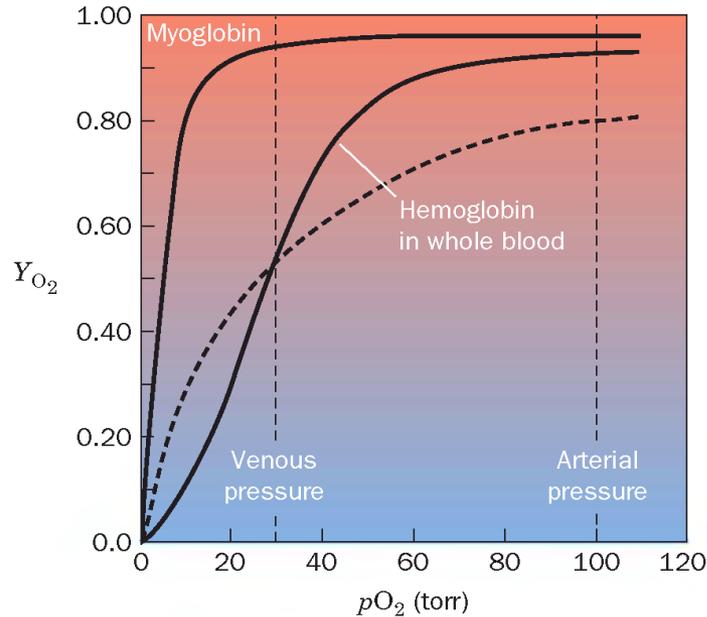
L'andamento sigmoideale è indicativo della presenza di interazioni cooperative tra i siti di legame



$$Y_{\text{O}_2} = \frac{(p\text{O}_2)^n}{(p_{50})^n + (p\text{O}_2)^n}$$

Equazione di Hill

descrive il grado di saturazione dell'emoglobina in funzione di $p\text{O}_2$



- La cooperatività infinita è fisicamente impossibile
- n = parametro non integrale correlato al grado di cooperatività tra le subunità
- Equazione di Hill equazione empirica basata sull'andamento della curva
- n aumenta con il grado di cooperatività; fornisce una caratterizzazione della reazione di legame di un ligando

$$\left\{ \begin{array}{l} n = 1 \text{ reazione non cooperativa} \\ n > 1 \text{ cooperatività positiva} \\ n < 1 \text{ cooperatività negativa} \end{array} \right.$$

Il legame dell'ossigeno all'emoglobina

$$Y_{O_2} = \frac{(pO_2)^n}{(p_{50})^n + (pO_2)^n}$$

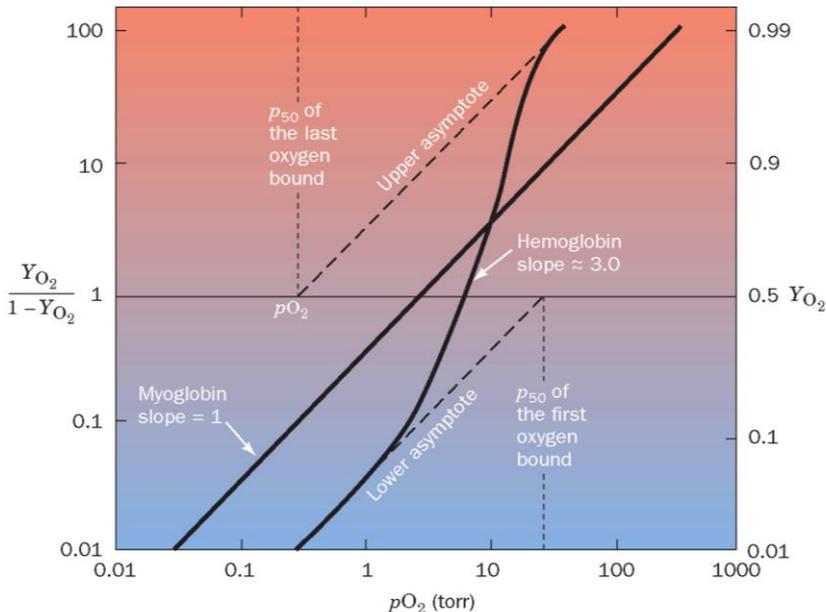
Equazione di Hill

descrive il grado di saturazione dell'emoglobina in funzione di pO_2

Riarrangiando l'Equazione di Hill si ha:

$$\frac{Y_{O_2}}{1 - Y_{O_2}} = \frac{(pO_2)^n}{(p_{50})^n} \quad \longrightarrow \quad \log\left(\frac{Y_{O_2}}{1 - Y_{O_2}}\right) = n \log pO_2 - n \log p_{50}$$

Grafico di Hill



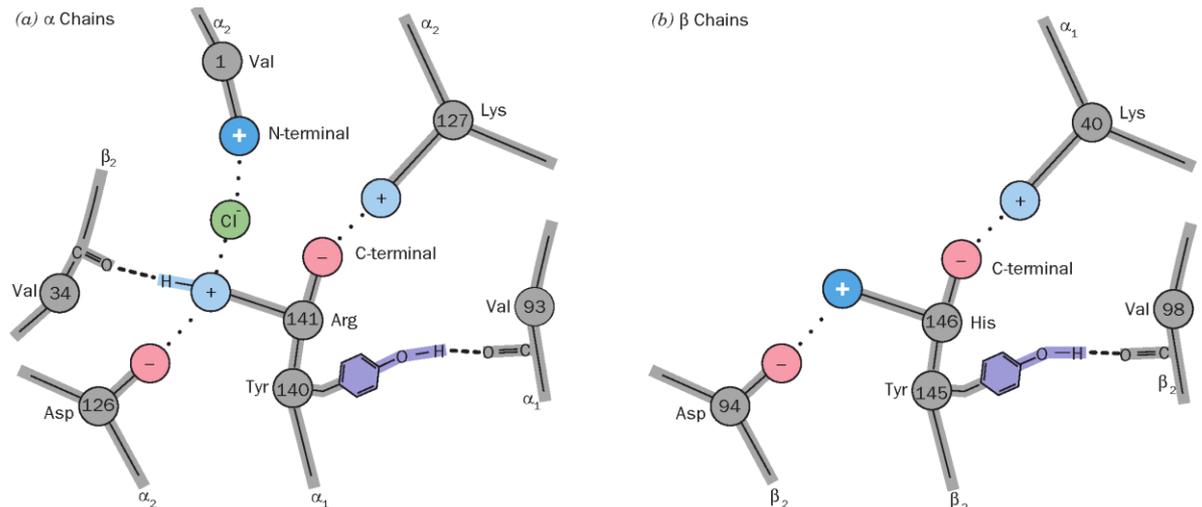
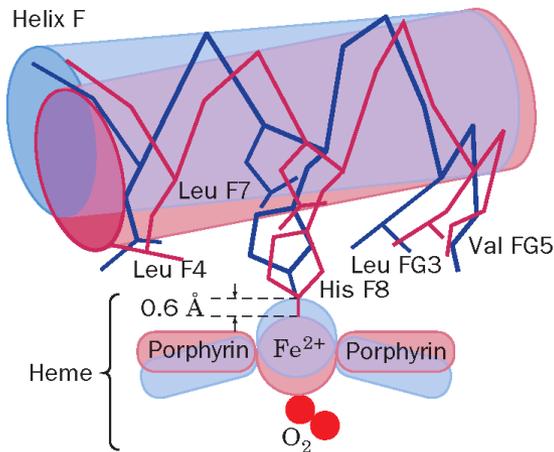
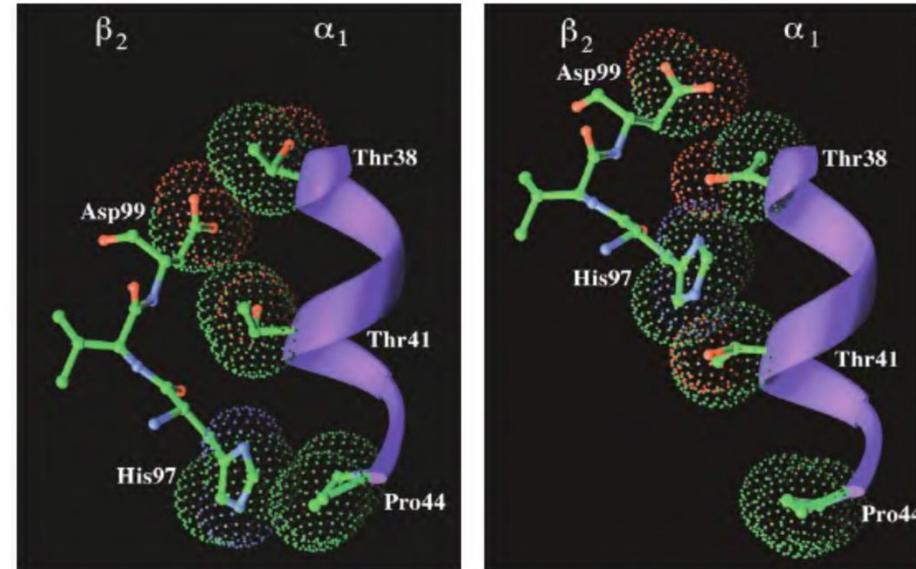
- Per mioglobina, la pendenza è data da $n = 1$
- Per emoglobina
- Andamento lineare per $0.1 < Y_{O_2} < 0.9$
- Pendenza massima per $pO_2 = p_{50}$ $[Y_{O_2} / (1 - Y_{O_2})] = 1$ è la costante di Hill
- Per emoglobina di uomo adulto, costante di Hill $\approx 2.8 / 3$
- Per $Y_{O_2} \approx 0$, andamento lineare con pendenza 1 (asintoto inferiore)
- Per $Y_{O_2} \approx 1$, andamento lineare con pendenza 1 (asintoto superiore)
- Estrapolando l'asintoto inferiore, $p_{50} \approx 30$ torr
- Estrapolando l'asintoto superiore, $p_{50} \approx 0.3$ torr

Cooperatività del legame dell'ossigeno all'emoglobina

Effetto del legame di O₂ a un gruppo eme sull'affinità di un altro gruppo eme della stessa molecola

Meccanismo di Perutz

- Stato T (deossiemoglobina) e stato R (ossiemoglobina)
- Nello stato T, Fe(II) è 0.6 Å fuori dal piano dell'eme
- Nello stato R, Fe(II) si sposta al centro del piano dell'eme
- L'ossigenazione determina lo spostamento dell'Elica F di 1 Å
- Riarrangiamento delle subunità
- Nel passaggio da T a R si perdono interazioni elettrostatiche

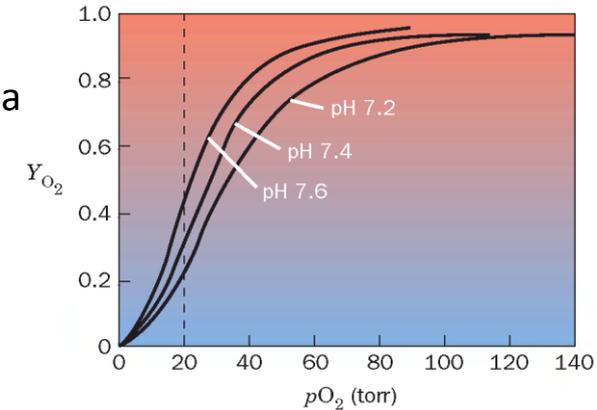


Cooperatività del legame dell'ossigeno all'emoglobina

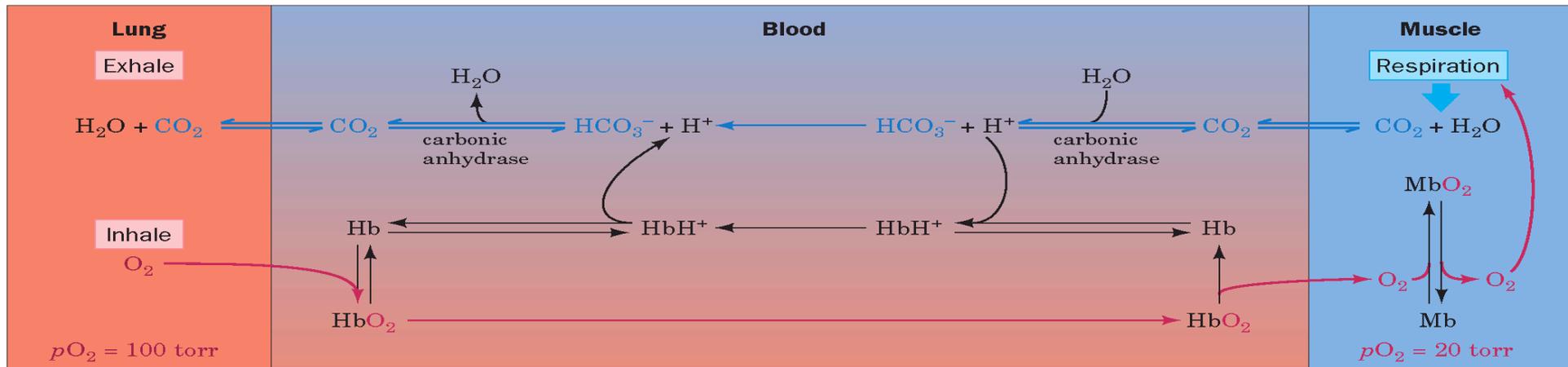
Effetto del legame di O₂ a un gruppo eme sull'affinità di un altro gruppo eme della stessa molecola

Trasporto dell'anidride carbonica ed effetto Bohr

- Modificazione conformazionale emoglobina legata cambia pK di molti aa
- L'emoglobina legata rilascia 0.6 protoni per ogni O₂ che lega
- Un aumento del pH stimola l'emoglobina a legare più O₂ (**effetto Bohr**)
- L'effetto Bohr influenza il trasporto dell' O₂ e della CO₂



- Negli eritrociti l'anidrasi carbonica accelera questa reazione e l'anidride carbonica viene trasportata essenzialmente come bicarbonato
- Nei capillari pO₂ è bassa e gli H⁺ sono legati dall'emoglobina; si formano coppie ioniche tipiche dello stato T, si facilita il trasporto di CO₂ e si promuove la produzione di bicarbonato
- Nei polmoni pO₂ è alta, si rompono le coppie ioniche e l'emoglobina passa dallo stato T a R; si rilasciano H⁺ che si legano al bicarbonato facilitando la produzione di CO₂

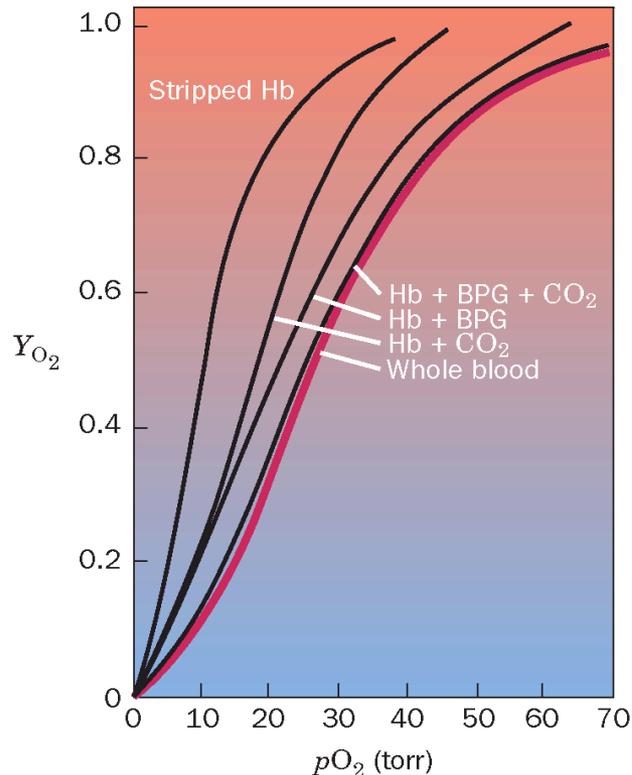
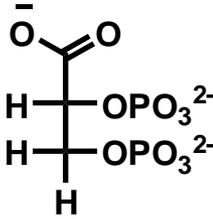


Cooperatività del legame dell'ossigeno all'emoglobina

Effetto del legame di O₂ a un gruppo eme sull'affinità di un altro gruppo eme della stessa molecola

Legame del bisfosfoglicerato alla deossiemoglobina

- L'emoglobina purificata ha più affinità per O₂ del sangue intero
- Il D-2,3-bisfosfoglicerato (BPG) modifica il legame dell'ossigeno all'emoglobina
- D-2,3-bisfosfoglicerato si lega saldamente alla deossiemoglobina e debolmente all'ossiemoglobina
- D-2,3-bisfosfoglicerato favorisce la conformazione deossigenata e quindi abbassa la sua affinità per l'ossigeno



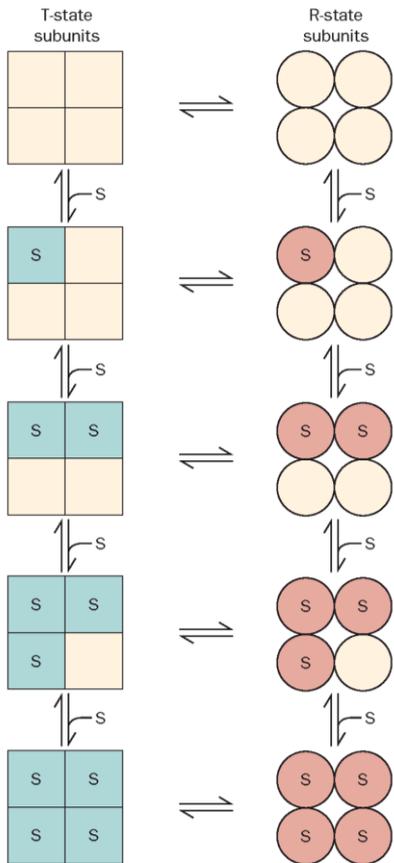
- Passando nei capillari, l'emoglobina perde il 40% dell'ossigeno legato
- A bassa pO₂ l'emoglobina ha più affinità per l'ossigeno, quindi tenderebbe a cederne poco
- La presenza di BPG favorisce la liberazione dell'ossigeno legato
- BPG si lega nella cavità centrale della deossiemoglobina
- Nello stato R la cavità centrale si stringe e BPG viene espulso
- Nello stato R i gruppi amminici N-terminali delle subunità β si allontanano e questi non possono formare legami idrogeno con BPG

L'emoglobina modello di proteina allosterica

Effetti allosterici: il legame di un ligando a un sito modifica le proprietà di legame di altri siti per un altro ligando

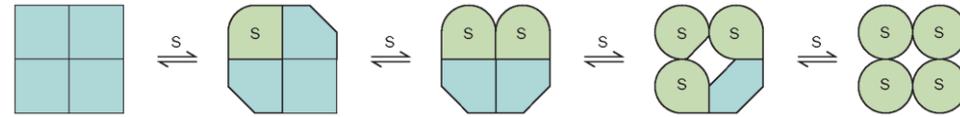
Gli effetti allosterici richiedono interazioni tra le subunità di una proteina oligomerica

Modello simmetrico dell'allosterismo



- Oligomero con subunità distribuite in modo simmetrico
- Ogni subunità può essere in conformazione T o R, in equilibrio tra loro
- Il ligando può legarsi alle subunità in qualsiasi conformazione
- La modificazione conformazionale altera l'affinità per il ligando
- La simmetria viene conservata durante la transizione conformazionale (punto debole della teoria)
- Il modello spiega solo la cooperatività positiva

Modello sequenziale dell'allosterismo



- Il legame del ligando induce una modificazione conformazionale della subunità a cui è legato
- La transizione di una subunità influenza le subunità vicine
- Le modificazioni conformazionali avvengono una dopo l'altra
- L'affinità di una subunità per un ligando varia con la sua conformazione
- Il modello spiega sia la cooperatività positiva che quella negativa

DOMANDA: Sotto quali aspetti il legame dell'ossigeno all'emoglobina è riconducibile al modello simmetrico e sotto quali aspetti è riconducibile al modello sequenziale?

Mutazioni dell'emoglobina

- Esistono 500 varianti di emoglobine
- Il 95% delle mutazioni dipende dalla sostituzione di un solo residuo amminoacidico
- Il 5% della popolazione mondiale presenta una variante dell'emoglobina

Name ^a	Mutation	Effect
Hammersmith	Phe CD1(42) β \rightarrow Ser	Weakens heme binding
Bristol	Val E11(67) β \rightarrow Asp	Weakens heme binding
Bibba	Leu H19(136) α \rightarrow Pro	Disrupts the H helix
Savannah	Gly B6(24) β \rightarrow Val	Disrupts the B-E helix interface
Philly	Tyr C1(35) β \rightarrow Phe	Disrupts hydrogen bonding at the α_1 - β_1 interface
Boston	His E7(58) α \rightarrow Tyr	Promotes methemoglobin formation
Milwaukee	Val E11(67) β \rightarrow Glu	Promotes methemoglobin formation
Iwate	His F8(87) α \rightarrow Tyr	Promotes methemoglobin formation
Yakima	Asp G1(99) β \rightarrow His	Disrupts a hydrogen bond that stabilizes the T conformation
Kansas	Asn G4(102) β \rightarrow Thr	Disrupts a hydrogen bond that stabilizes the R conformation

^aHemoglobin variants are usually named after the place where they were discovered (e.g., hemoglobin Boston).

Emoglobine con basse costanti di Hill
Cianosi

Emoglobine con alta affinità per l'ossigeno
Elevato numero di eritrociti
Policitemia

Mutazioni dell'emoglobina

L'anemia a cellule falciformi

- In emoglobina S si ha Val invece di Glu in sesta posizione di ciascuna catena β
 - Si manifesta negli individui omozigoti
 - La deossi-emoglobina S forma filamenti insolubili che deformano gli eritrociti
 - Gli eritrociti falciformi sono rigidi (passano difficilmente attraverso i capillari) e fragili (anemia emolitica)
 - La Val mutante permette contatti intermolecolari tra le subunità β della deossi-emoglobina con formazione di polimeri
 - Nella ossi-emoglobina, il riarrangiamento della struttura impedisce la polimerizzazione
 - Gli eterozigoti sono più resistenti alla malaria
-
- Le regioni dell'Africa equatoriale dove è più diffusa la malaria coincidono con quelle in cui è prevalente il gene per l'emoglobina S
 - Il parassita abbassa il pH di 0.4; per effetto Bohr si favorisce la deossi-emoglobina
 - Le fibrille sono distrutte dalla milza o possono distruggere meccanicamente il parassita

