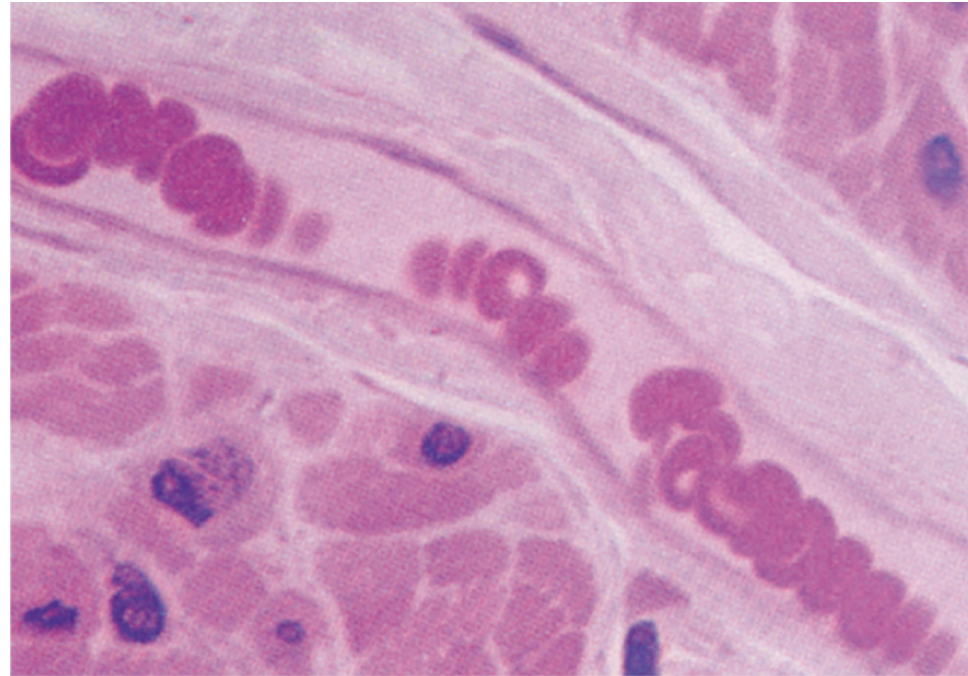
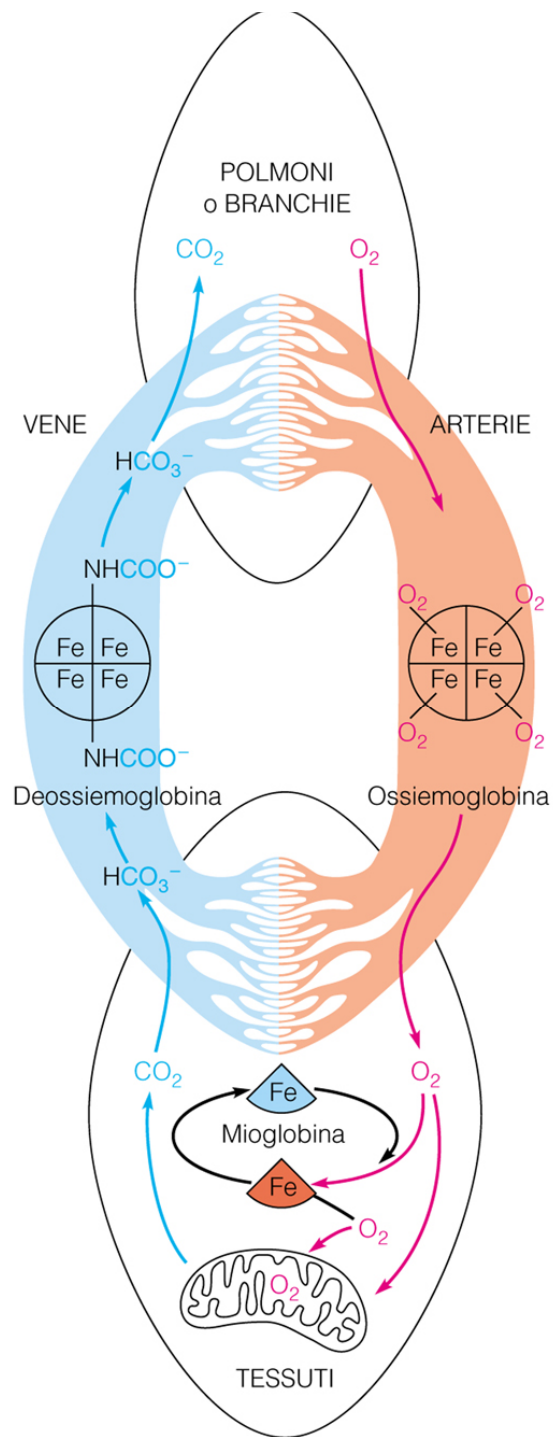


# Trasporto dell'ossigeno



**Hb: nei globuli rossi**

**Mb: nei tessuti**

# Proteine che legano l'ossigeno

**Proteine specializzate all'interazione con questo gas: essenziali per la vita degli organismi aerobi**

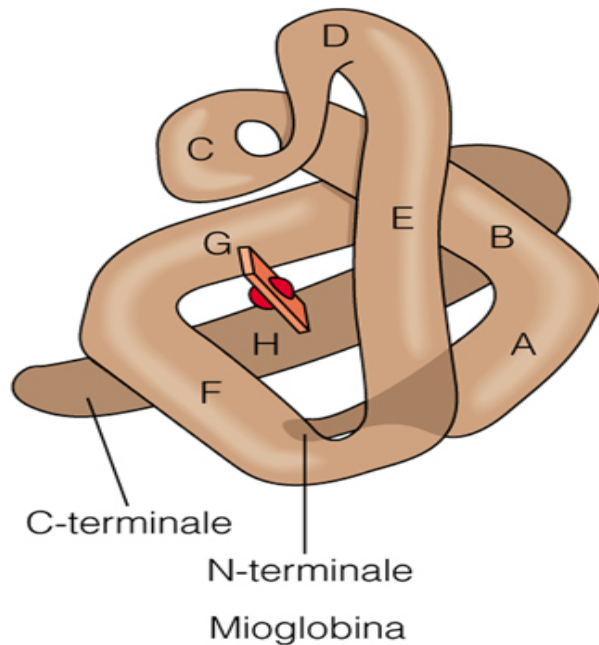
- **L'ossigeno è poco solubile nei solventi acquosi**
- **Presenta bassa velocità di diffusione nei tessuti**

**L'ossigeno si lega reversibilmente a queste proteine, ma nessuna delle catene laterali degli amminoacidi che le compongono è capace di interagire con questo gas.**

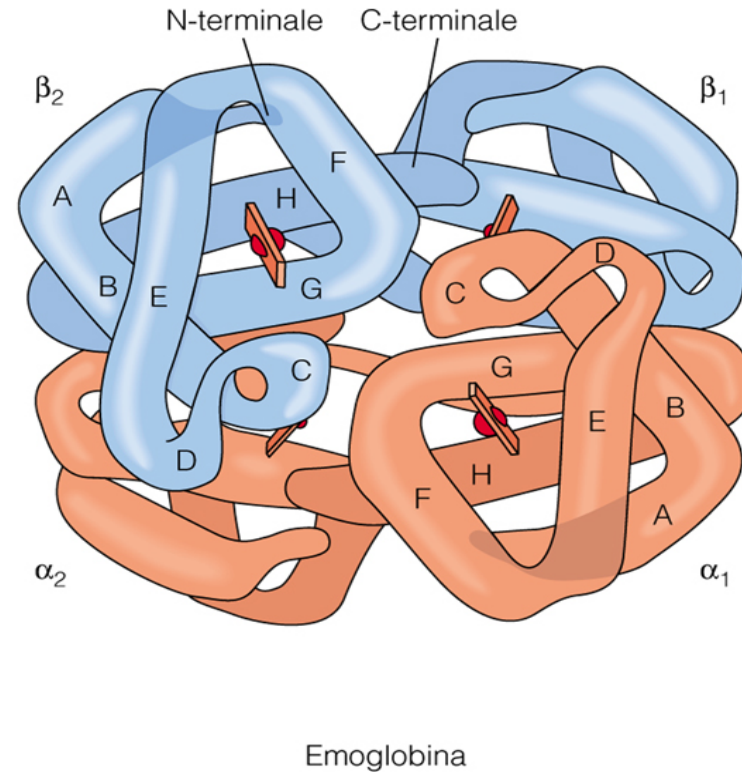
**Tale funzione viene svolta da alcuni ioni di metalli di transizione, essenzialmente ferro (rame).**

# Proteine che legano l'ossigeno

3



**Mioglobina (Mb)**  
Deposito di O<sub>2</sub> nei tessuti



**Emoglobina (Hb)**  
Trasporta O<sub>2</sub> dai polmoni ai  
tessuti periferici

# Mioglobina (Mb) ed Emoglobina (Hb)

Le proteine che legano l'ossigeno più studiate sono la **Mb** e l'**Hb**, proteine strutturalmente correlate appartenenti alla classe delle globine.

Legano l'O<sub>2</sub> in maniera reversibile.

Mb e Hb sono proteine coniugate contenti, oltre alla porzione polipeptidica, un gruppo prostetico, **EME**, localizzato in una tasca idrofobica.

**Quali sono gli atomi coinvolti nel legame con l'O<sub>2</sub> ?**

**Quale è la funzione del gruppo eme ?**

**Quale è la funzione dello ione Fe<sup>2+</sup> ?**

# **L'O<sub>2</sub> si lega allo ione Fe<sup>2+</sup> del gruppo prostetico EME**

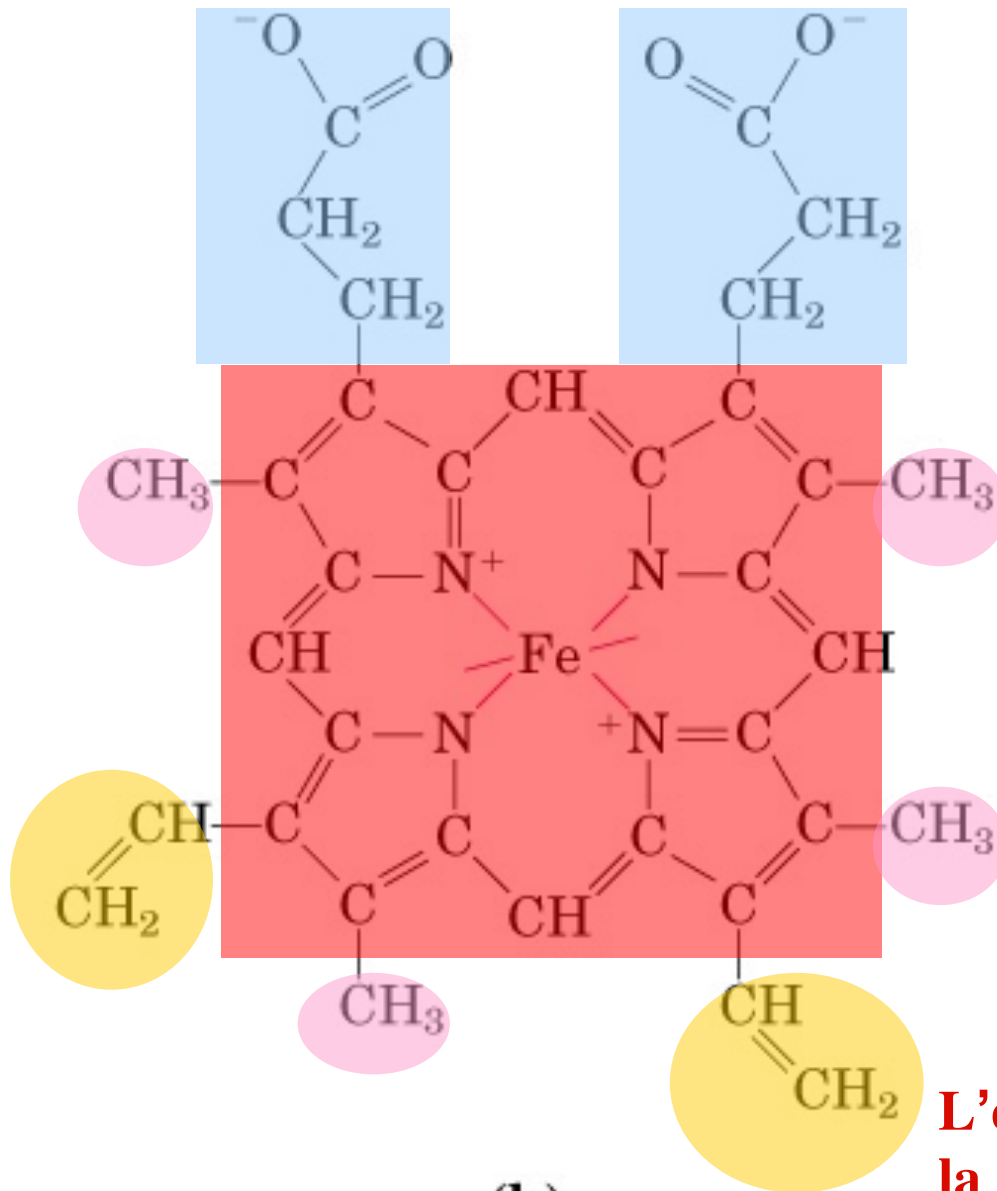
**Gli ioni ferro (Fe<sup>2+</sup>, stato ferroso) in soluzione reagirebbero velocemente con l'ossigeno portando alla formazione di Fe<sup>3+</sup>, stato ferrico, ed alcune specie molto tossiche come l'anione superossido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e i radicali ossidrilici (OH<sup>•</sup>).**



**Queste specie possono essere molto dannose per le molecole biologiche perché dotate di elevata reattività.**

**Nei sistemi biologici la reattività degli ioni ferrosi nei confronti dell'ossigeno viene ridotta dal suo legame ad un composto organico non proteico, il gruppo prostetico.**

# Struttura del gruppo EME



(b)

- tetrapirrolo ciclico legato allo ione Fe<sup>2+</sup> (4 dei 6 legami di coordinazione)

- 4 gruppi metilici

- 2 gruppi vinilici

- 2 gruppi propionato

- 1 ione ferro nello stato d'ossidazione ferroso (Fe<sup>2+</sup>) con 6 legami di coordinazione, di cui 4 sono impegnati con i 4 atomi di N dell'anello porfirinico, gli altri 2 sono perpendicolari al piano della porfirina

L'elevato numero di doppi legami coniugati e la presenza dello ione ferroso conferiscono il colore rosso alla mioglobina.



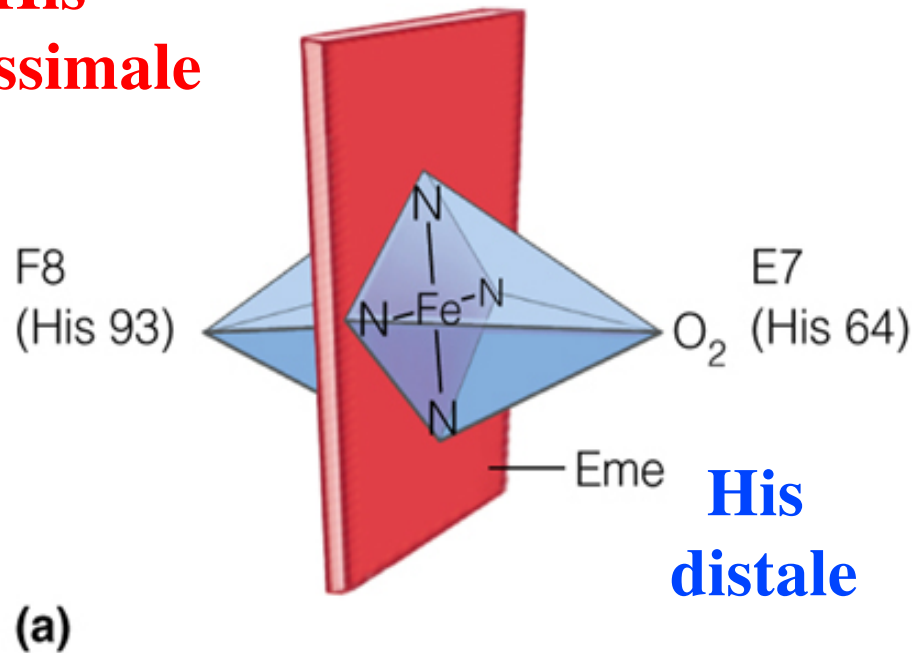
# Geometria di coordinazione del $\text{Fe}^{2+}$ nell'ossiemoglobina (OMb)

**V sito di  
coordinazione**

**His  
prossimale**

**VI sito di  
coordinazione**

**Il V sito di coordinazione dello ione Ferro è occupato dall'anello imidazolico di un residuo di His 93 (elica F8) denominata His prossimale**



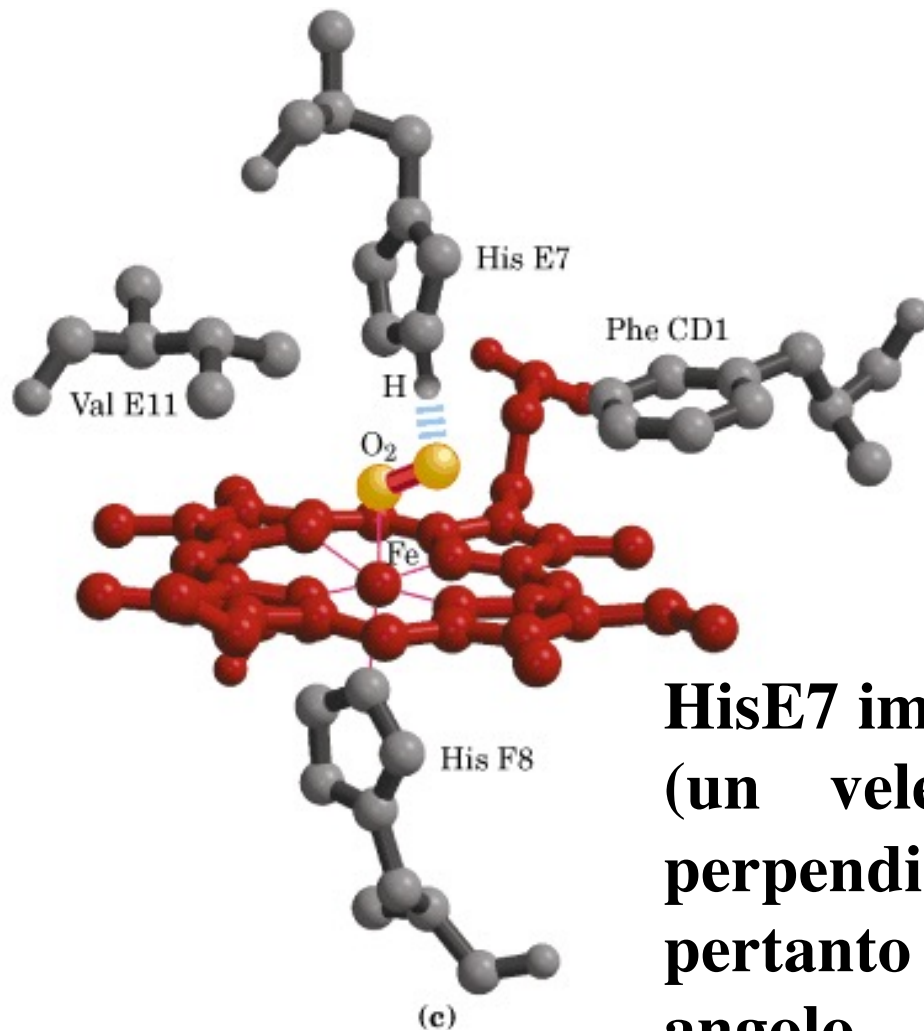
**Il VI sito di coordinazione è disponibile per il legame con l'ossigeno.**

**Nella forma non ossigenata, il VI sito è occupato da una molecola d'acqua**

**Geometria bpiramidale**



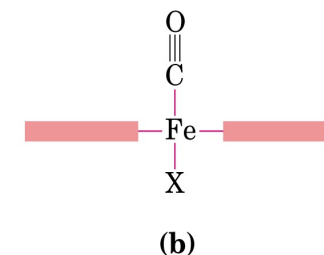
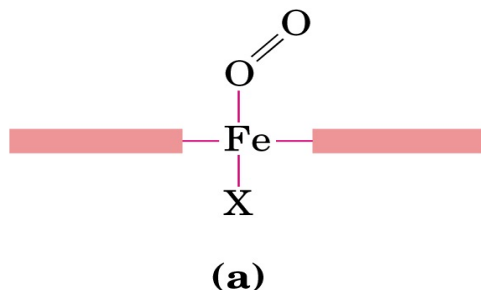
# Residui che circondano il gruppo eme



**HisE7 (istidina distale) si trova vicino all'O<sub>2</sub> e forma un legame H con l'O<sub>2</sub> legato all'EME.**

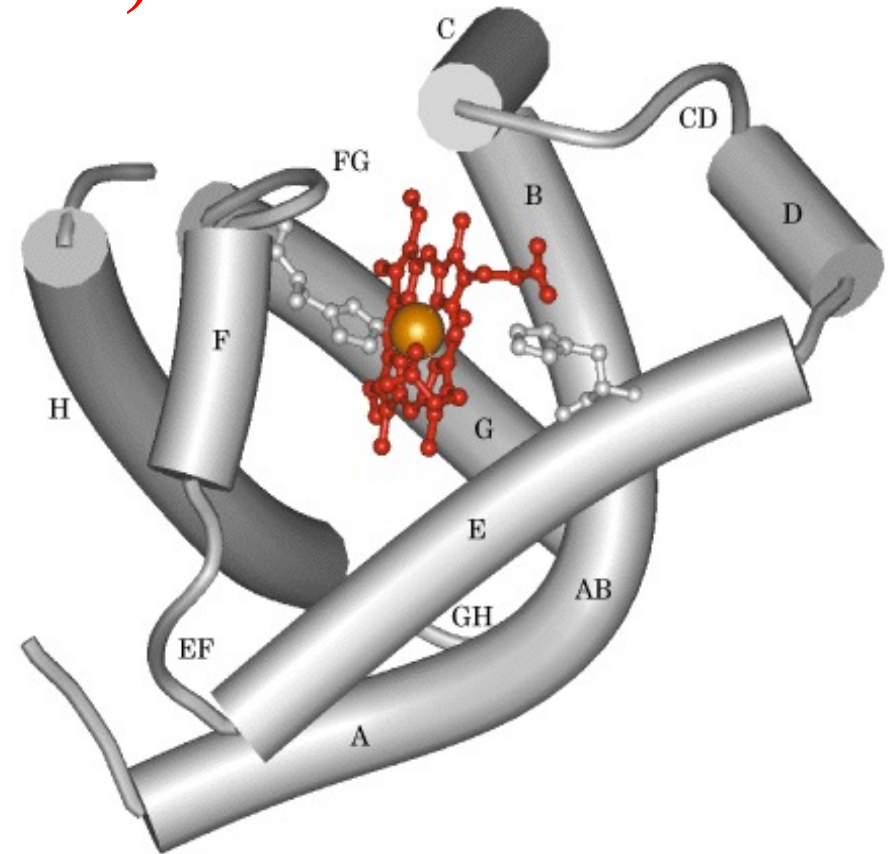
**HisE7 funziona come una porta che si apre e si chiude quando l'O<sub>2</sub> entra nella tasca idrofobica per legarsi all'EME.**

**HisE7 impedisce al monossido di carbonio (un veleno) di Fe con un legame perpendicolare al piano dell'eme, pertanto CO è forzato a formare un angolo simile a quello di O<sub>2</sub>, indebolendone il legame.**



# Mioglobina (Mb)

- **153 amminoacidi**  
(M.W. ~ 16700)
- **Struttura monomerica**
- **8 segmenti ad  $\alpha$ -elica**  
(~ 80% dei residui)
- **Gruppo EME**  
(protoporfirina IX +  $\text{Fe}^{2+}$ )

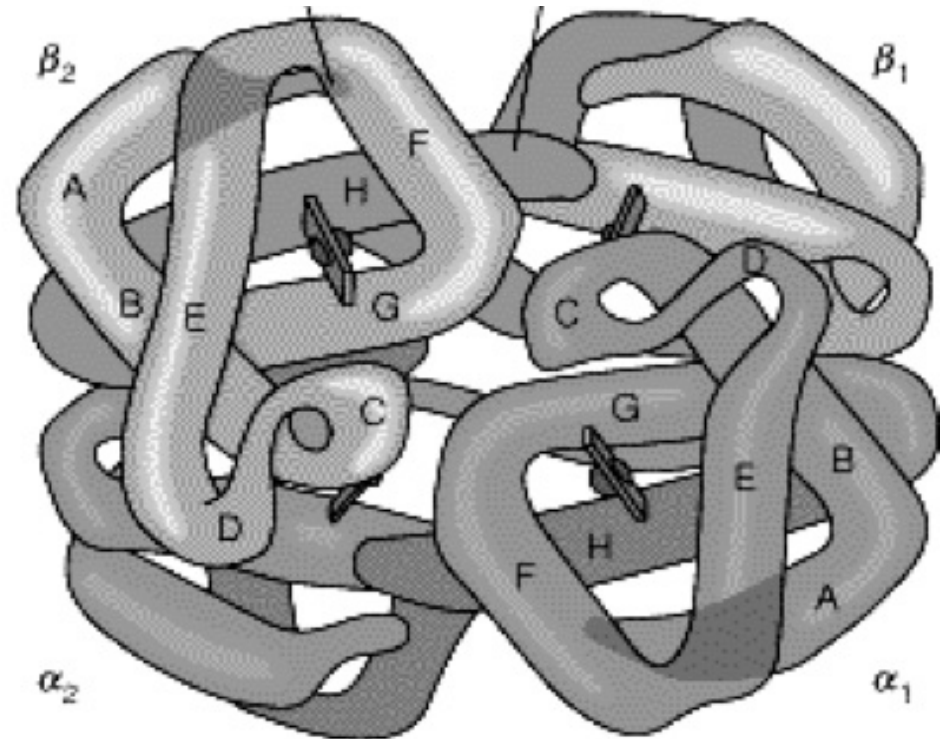


**Il gruppo EME è contenuto in una tasca idrofobica della struttura globulare.**

**La maggior parte dei residui polari si trova sulla superficie esterna della molecola, tranne due residui di istidina (distale e prossimale) coinvolte nel legame con l'ossigeno.**

# Emoglobina (Hb)

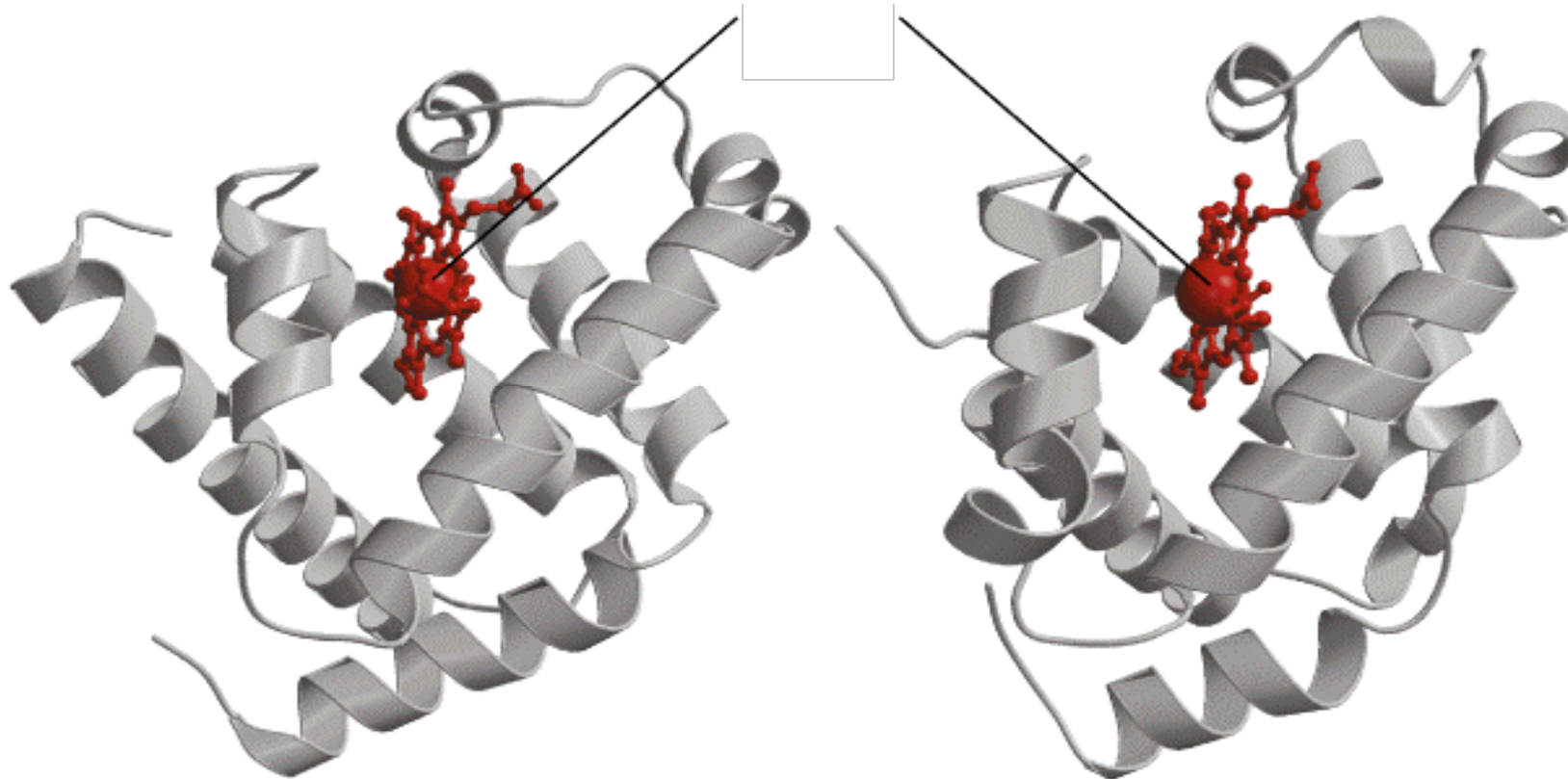
- **574 amminoacidi**  
(M.W. ~ 62000)
- **Struttura quaternaria: tetramerica** (due tipi di subunità  $\alpha$  e  $\beta$ )
- **Due dimeri  $\alpha\beta$**
- **4 gruppi EME**  
(uno per subunità)



**I gruppi EME si trovano in cavità vicine alla superficie esterna.**

**Ogni catena  $\alpha$  è in contatto con ognuna delle catene  $\beta$ , mentre esistono poche interazioni tra le catene  $\alpha$  o tra quelle  $\beta$ .**

# La struttura terziaria delle subunità dell'Hb è molto simile a quella della Mb



Mioglobina

Subunità  $\beta$  della emoglobina

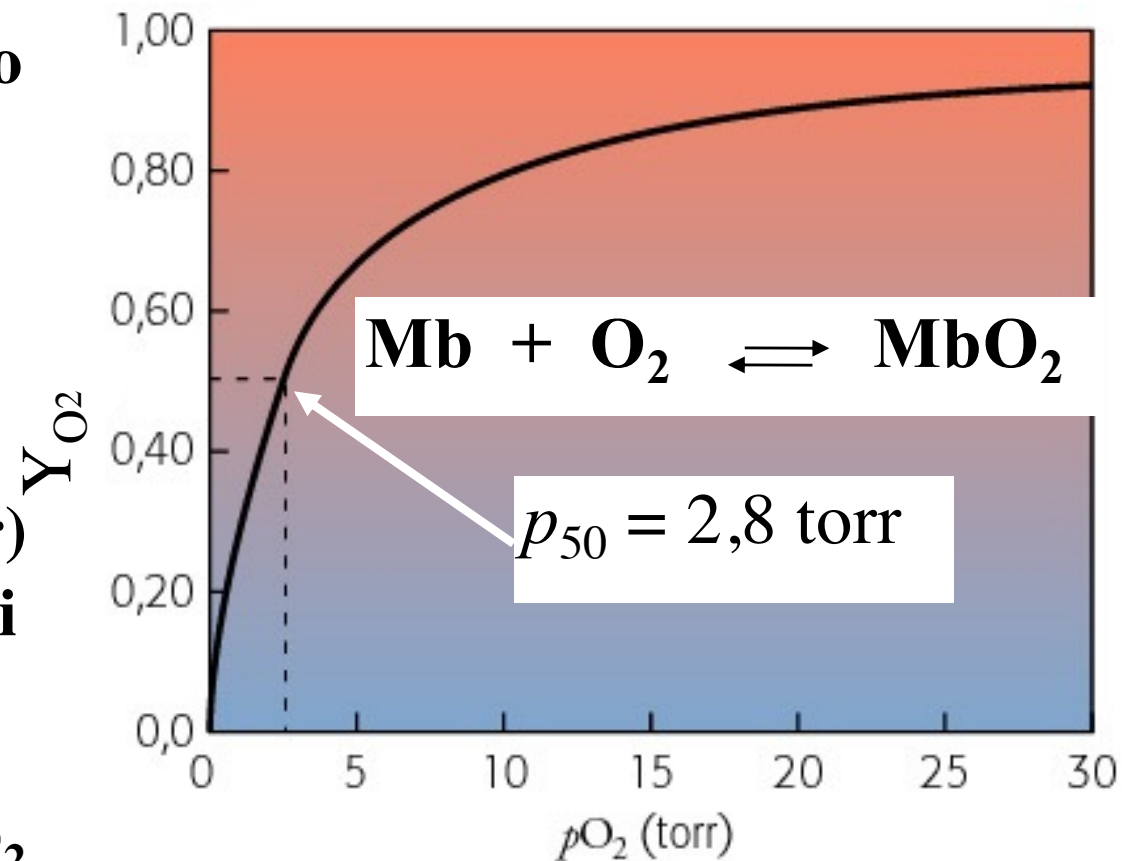
**La struttura primaria è però molto differente: solo alcune posizioni amminoacidiche sono conservate**

# Curva di saturazione della mioglobina

La quantità di ossigeno legato alla mioglobina aumenta in modo iperbolico all'aumentare della  $pO_2$ .

Pertanto, in condizioni fisiologiche ( $pO_2$  30-100 Torr) oltre il 90% delle molecole di mioglobina sono ossigenate.

Legame reversibile dell' $O_2$



## Funzioni della mioglobina

- Molecola deputata alla conservazione dell'ossigeno; lo rilascia in condizioni di scarso apporto di ossigeno ai tessuti.

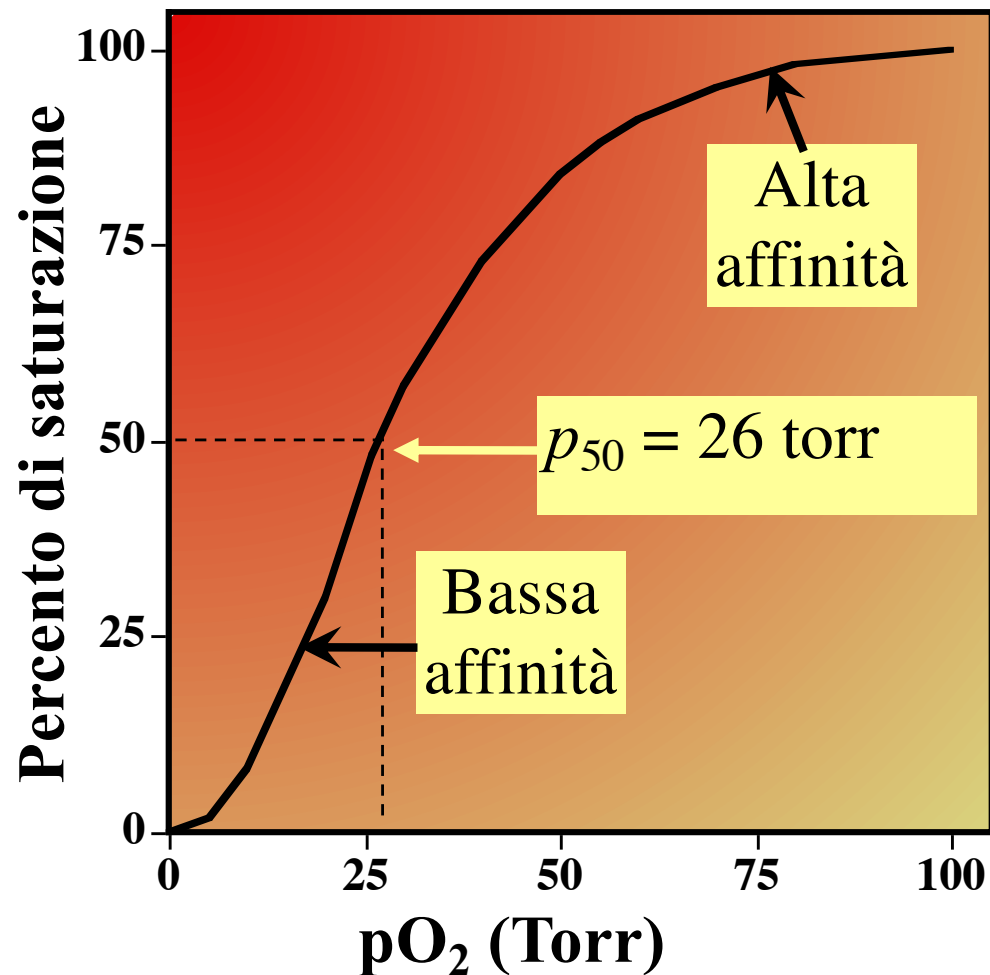
# Effetto dell'esercizio fisico sul legame dell'O<sub>2</sub>

Nel muscolo a riposo (**valori di pO<sub>2</sub> di circa 40 Torr**) la saturazione della Mb è di circa 90 % e quindi funziona da molecola di deposito d'ossigeno.

Nel muscolo sotto sforzo, (**valori di pO<sub>2</sub> molto bassi circa 20 Torr**) la saturazione della Mb è di circa 60% e quindi cede l'O<sub>2</sub> che è utilizzato nei processi ossidativi che producono energia (ATP), necessaria per la contrazione.



# Curva di saturazione dell'emoglobina



La quantità di ossigeno legato all'emoglobina aumenta all'aumentare della pO<sub>2</sub>, ma la saturazione segue un **andamento sigmoide**.

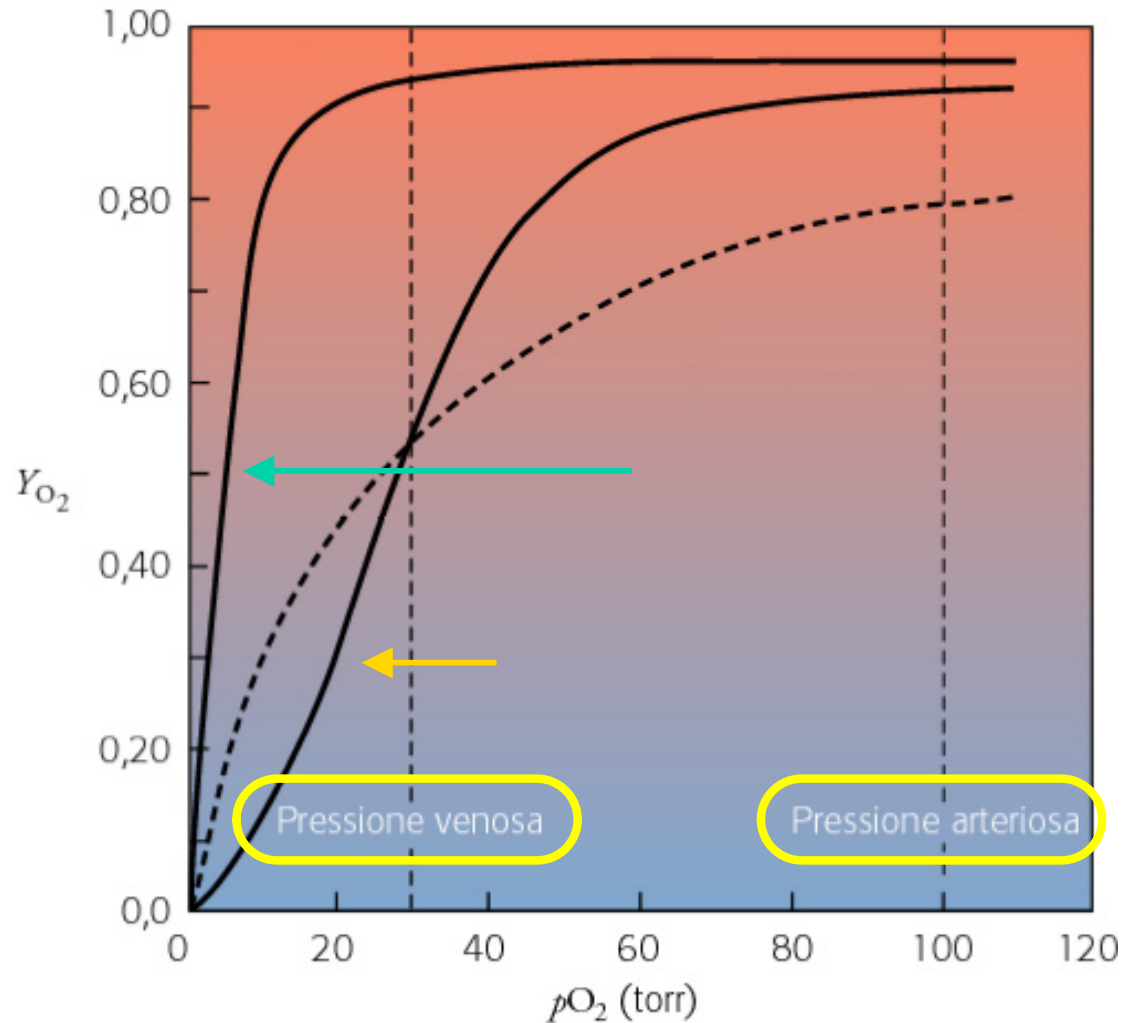
L'ossigeno viene legato con affinità sempre più alta.

*L'ossigeno viene legato alle diverse subunità in maniera cooperativa.*

Il legame dell'ossigeno all'EME di una delle subunità facilita il legame di altre molecole di ossigeno ai gruppi EME delle altre subunità.



# Confronto tra le curve di saturazione di Mb e Hb



**Alla pressione di  $O_2$  del sangue arterioso (polmoni) Mb e Hb sono quasi completamente saturate di questo gas.**

**Alla pressione di  $O_2$  del sangue venoso, la Mb è completamente saturata mentre l'Hb è saturata solo per metà.**

**Pertanto, mentre la saturazione dell'Hb è molto sensibile alla variazione di pressione parziale di  $O_2$ , la Mb è quasi sempre saturata al massimo.**

**Come si spiega il diverso andamento delle curve di saturazione della Mb e dell'Hb ?**

**L'Hb è formata da 4 subunità simili alla Mb**

**La Mb lega l'ossigeno con una curva di tipo iperbolico**

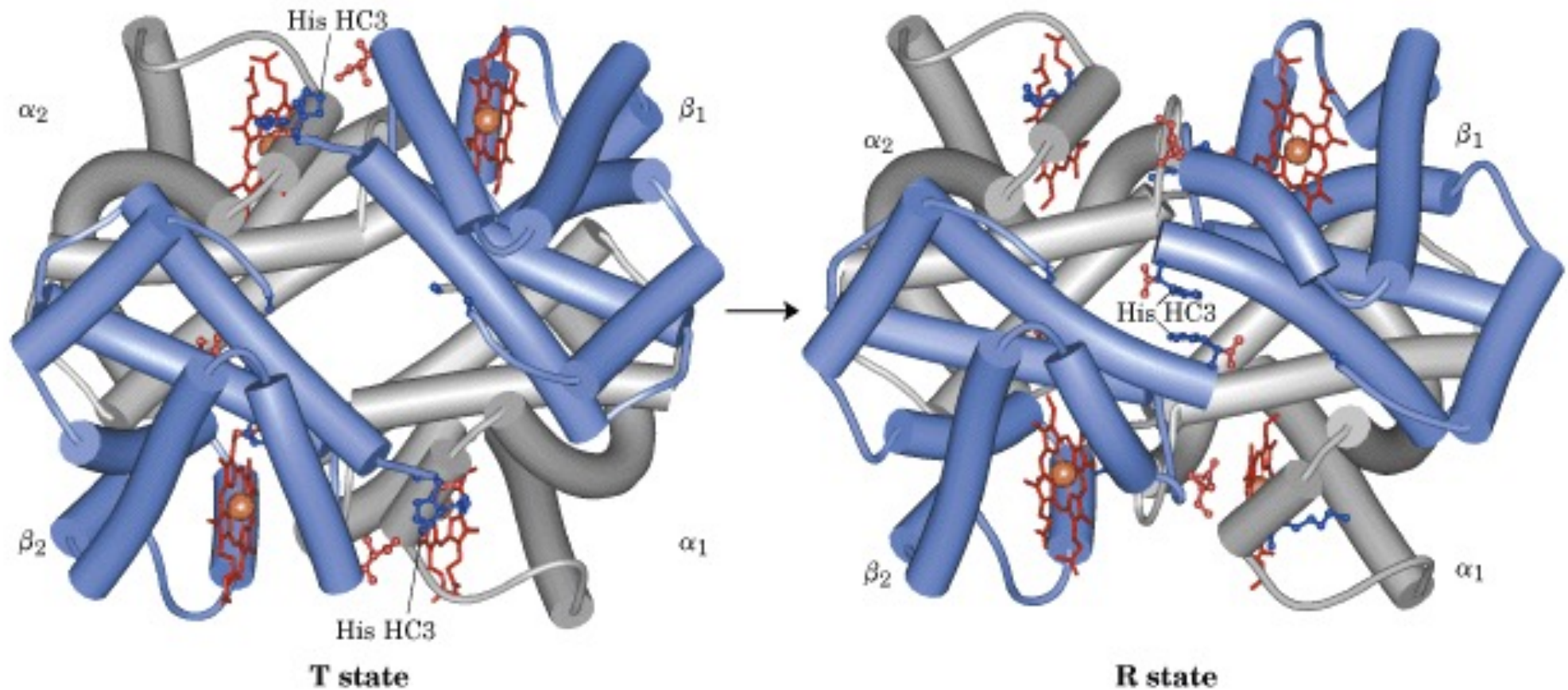
**L'Hb lega l'ossigeno con una curva di tipo sigmoide, che rappresenta un legame di tipo cooperativo**

# Due diverse conformazioni dell'Hb

Dall'analisi ai raggi X, sono state determinate 2 diverse conformazioni: lo stato T e lo stato R, con diversa affinità per O<sub>2</sub>.

Lo stato R presenta una maggiore affinità per O<sub>2</sub>.

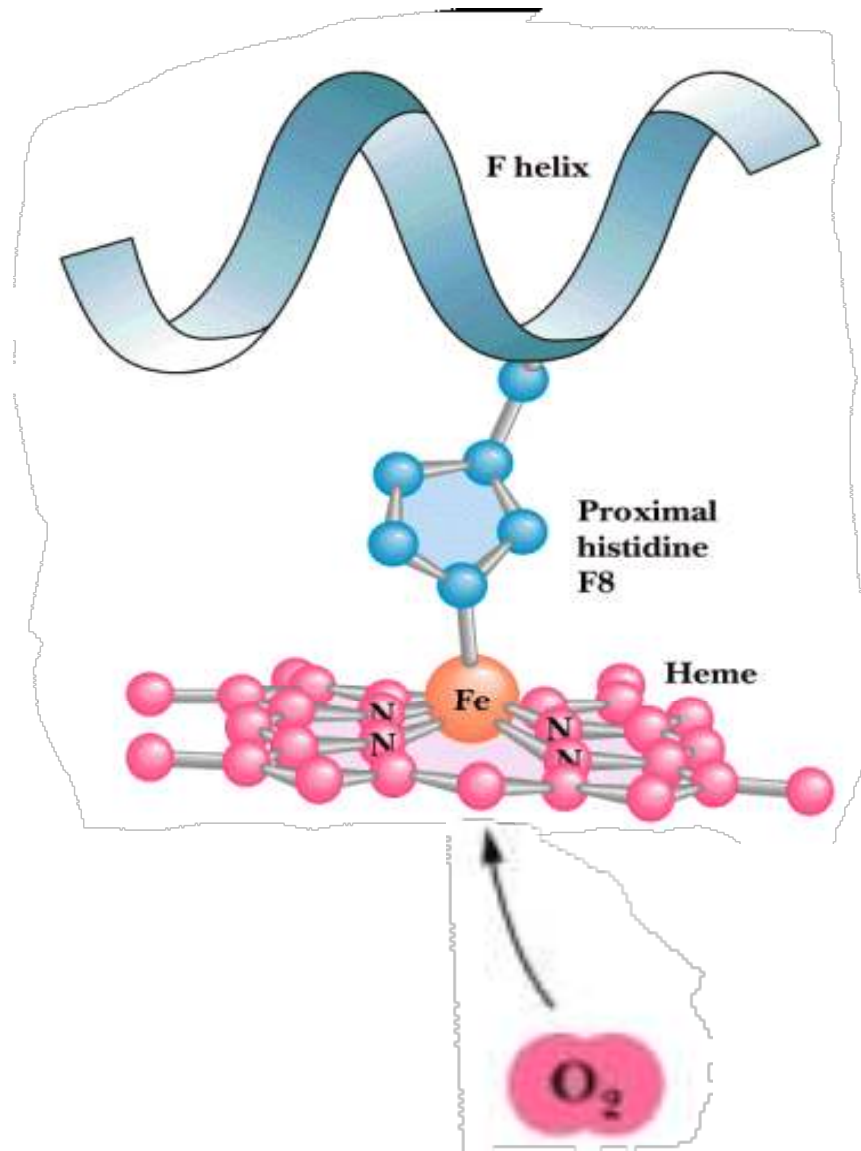
Il legame di O<sub>2</sub> allo stato T induce la transizione verso lo stato R.



**deossiemo globina**

**ossiemo globina**

## Effetti sterici causati dal legame dell'O<sub>2</sub> nell'Hb



Nella forma deossigenata dell'Hb, il Fe<sup>2+</sup> si trova al di fuori del piano dell'eme (forma a cupola).

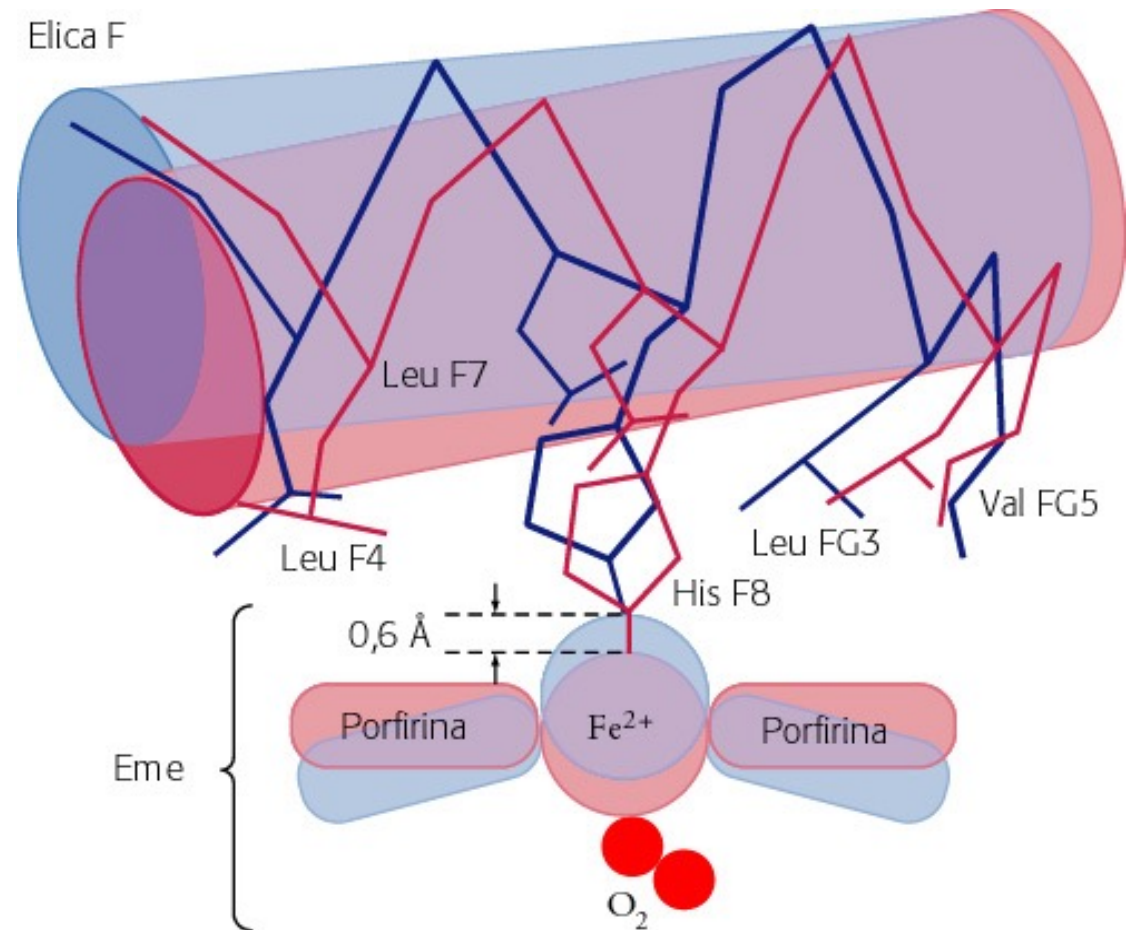
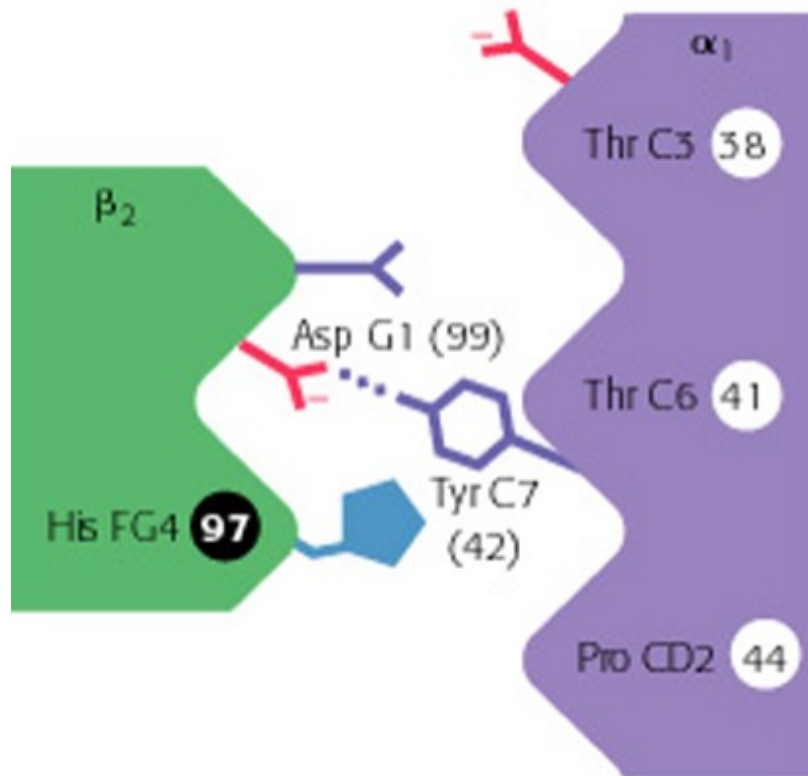
Quando l'O<sub>2</sub> si lega a Fe<sup>2+</sup>, il piano dell'eme assume una forma planare, Fe<sup>2+</sup> si sposta verso il piano dell'eme.

Ma poiché essi sono legati, si avrà un avvicinamento di HisF8 all'eme. Ciò comporta una modifica conformazionale a carico dell'elica F e quindi dell'intera proteina.



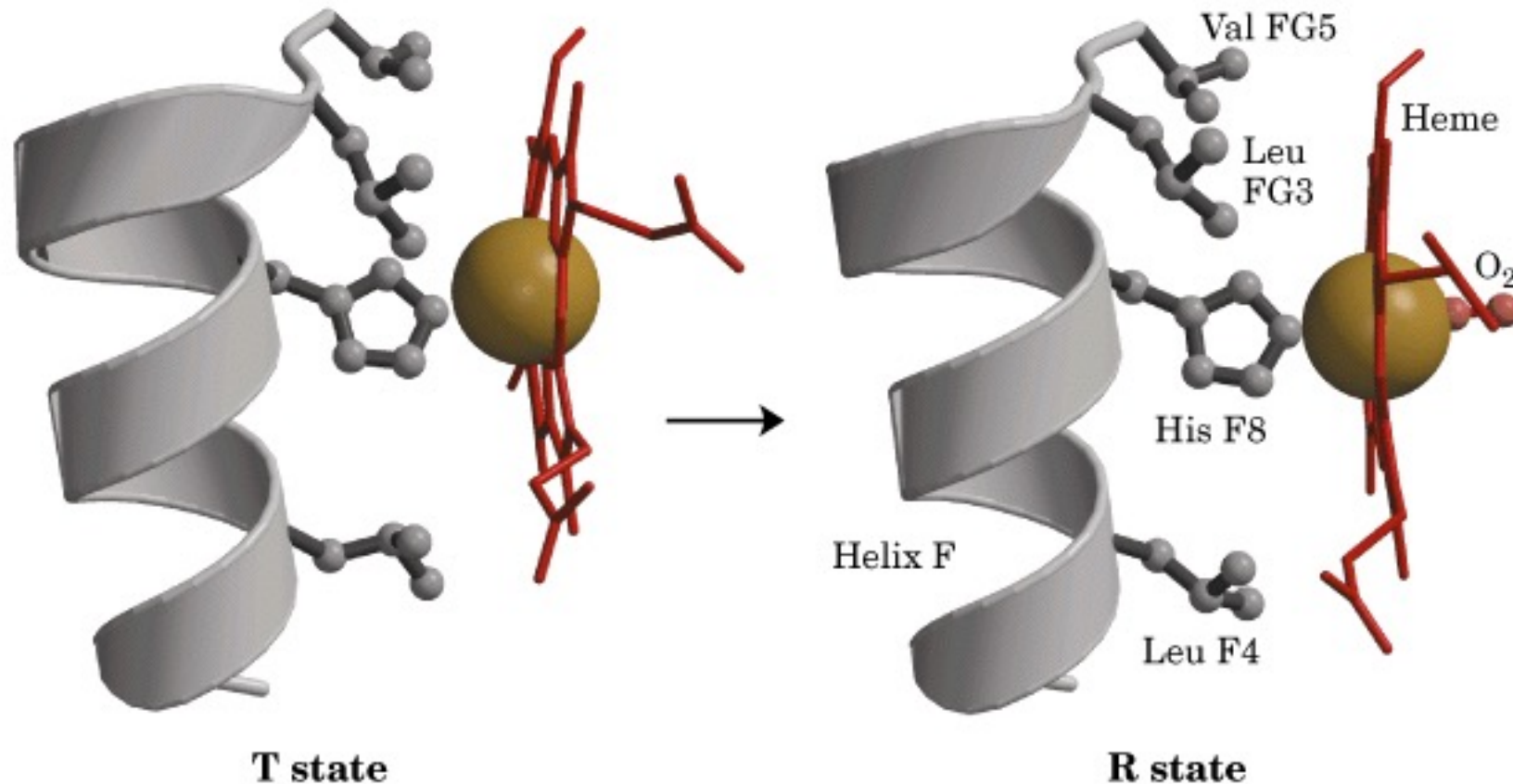
# Effetti sterici causati dal legame dell'O<sub>2</sub> nell'Hb (1)

Il legame dell'ossigeno provoca nell'Hb uno spostamento della His prossimale e quindi di tutta l' $\alpha$ -elica F



*Questa transizione provoca la rottura di alcuni ponti salini che stabilizzavano la forma deossigenata.*

# Effetti sterici causati dal legame dell'O<sub>2</sub> nell'Hb (2)

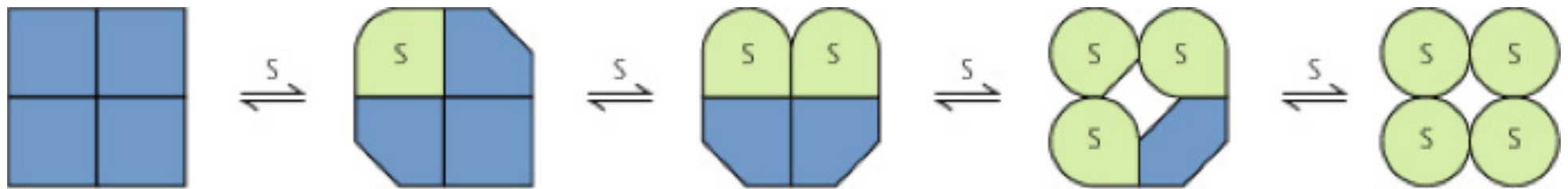


**Lo spostamento dell'elica F, conseguente al legame con l'O<sub>2</sub>, innesca la transizione dalla forma T alla forma R**

## Modello di cooperatività di legame (2)

### 2) Modello sequenziale (Koshland)

- Il legame del ligando induce una modifica conformazionale della subunità a cui si è legato
- La subunità modificata induce una modifica conformazionale sulle altre subunità più vicine
- Le modifiche conformazionali avvengono una dopo l'altra, man mano che vengono legate più molecole di ligando



Quindi, le proteine che seguono il modello sequenziale possono presentare sia cooperatività positiva (emoglobina) che negativa.



# **L'Hb è una proteina con proprietà allosteriche**

**L'Hb ha una struttura quaternaria, che consente alle 4 subunità d'influenzarsi tra loro**

**L'O<sub>2</sub> si comporta da modulatore, aumentando l'affinità di legame dell'Hb per l'O<sub>2</sub> (modulatore omotropico) che induce una cooperatività positiva.**

# Effetti di altri ligandi sul comportamento allosterico dell'Hb

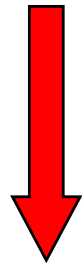
In condizioni fisiologiche il legame di O<sub>2</sub> all'emoglobina viene regolato da diversi fattori

- Gli effettori che stabilizzano la forma tesa provocano rilascio dell'ossigeno e viceversa
  - 2,3, bisfosfoglicerato (2,3-BPG)
  - Diminuzione di pH (aumento di ioni idrogeno)
  - Aumento della concentrazione di CO<sub>2</sub>

Promuovono il rilascio dell'O<sub>2</sub>:  
**Effetto Bohr**

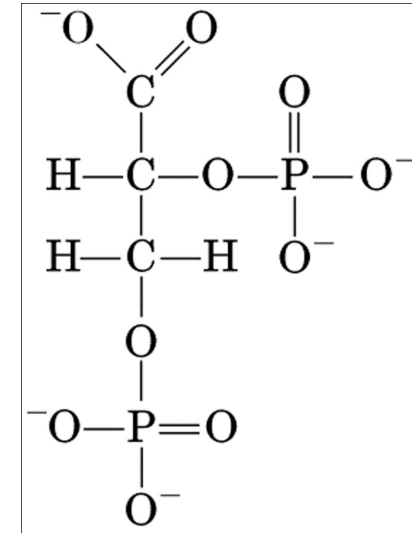
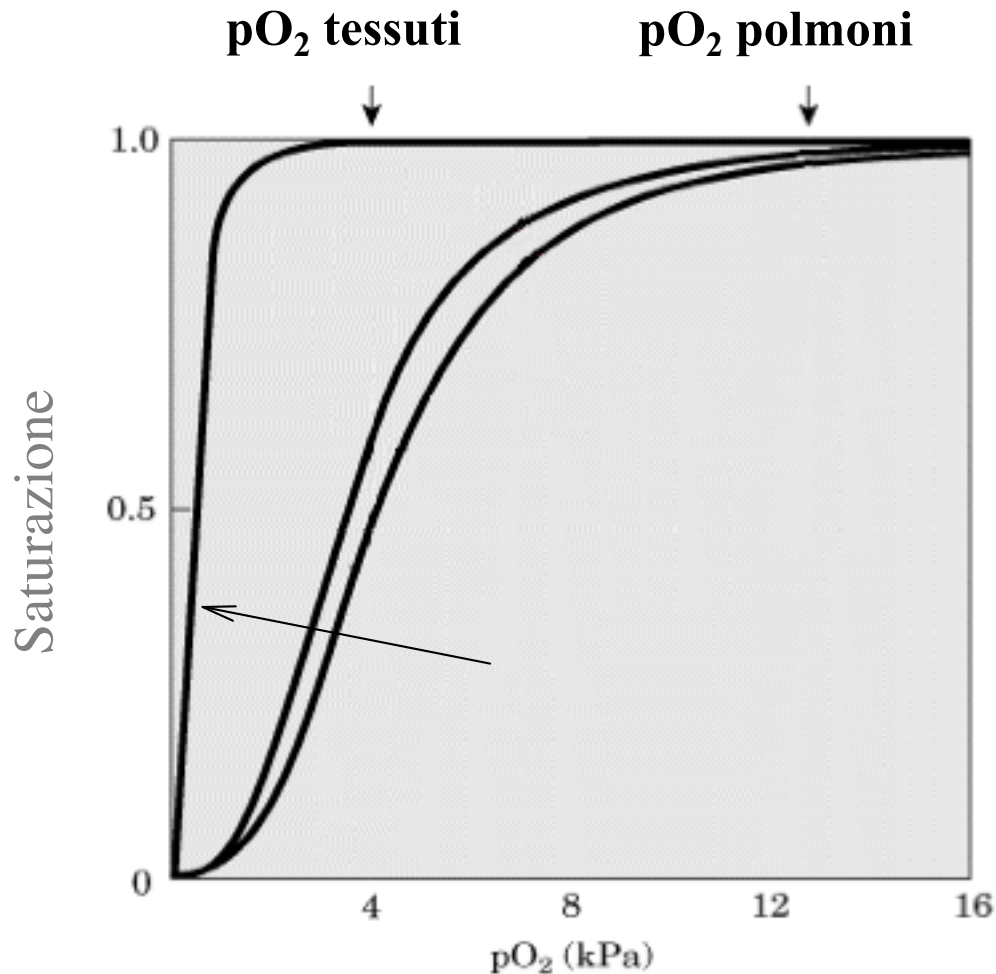
# Modulatori Allosterici

**2,3-BPG, Ioni  $H^+$  e  $CO_2$  sono modulatori negativi del legame dell' $O_2$  all'Hb**



**Favoriscono e stabilizzano la conformazione T determinando il rilascio dell' $O_2$**

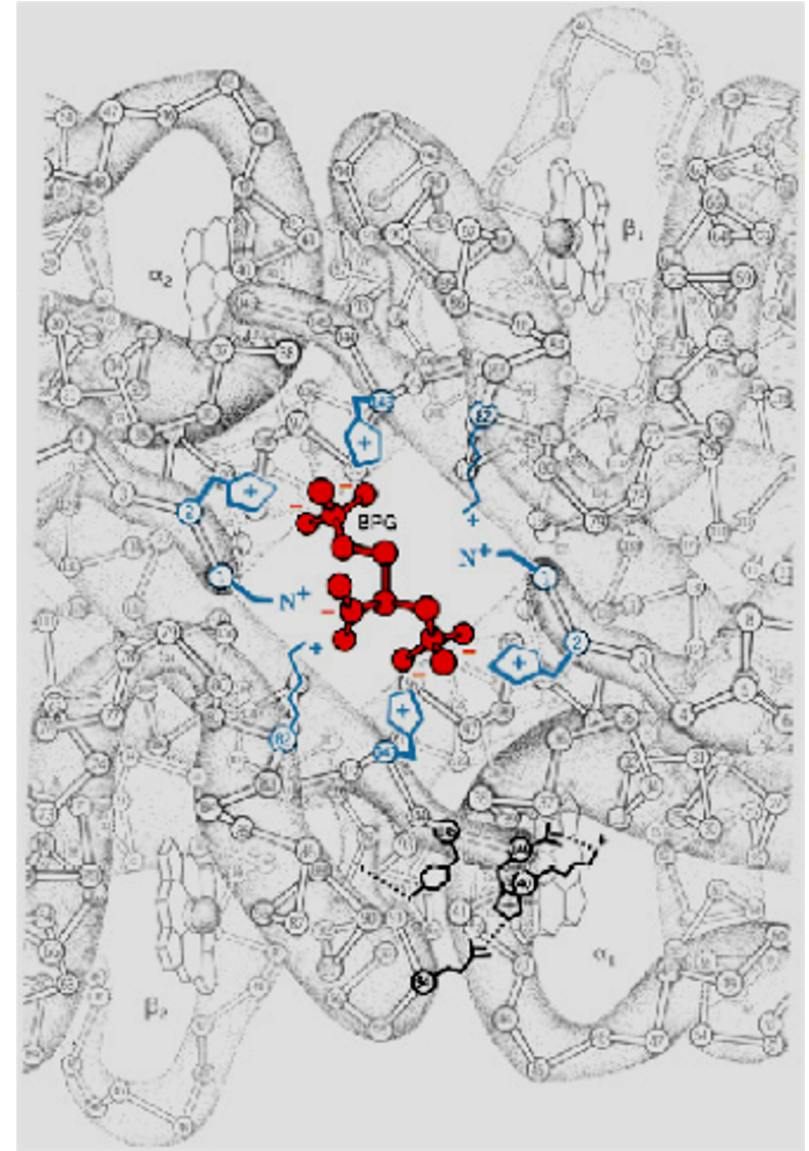
# Effetto del 2,3-BPG sul legame dell'ossigeno all'emoglobina



- In assenza di 2,3-BPG l'emoglobina presenta una curva di saturazione iperbolica
- In presenza di 2,3-BPG il legame di O<sub>2</sub> diventa cooperativo
- Nei globuli rossi è contenuta una discreta quantità di 2,3-BPG

## Il 2,3-BPG

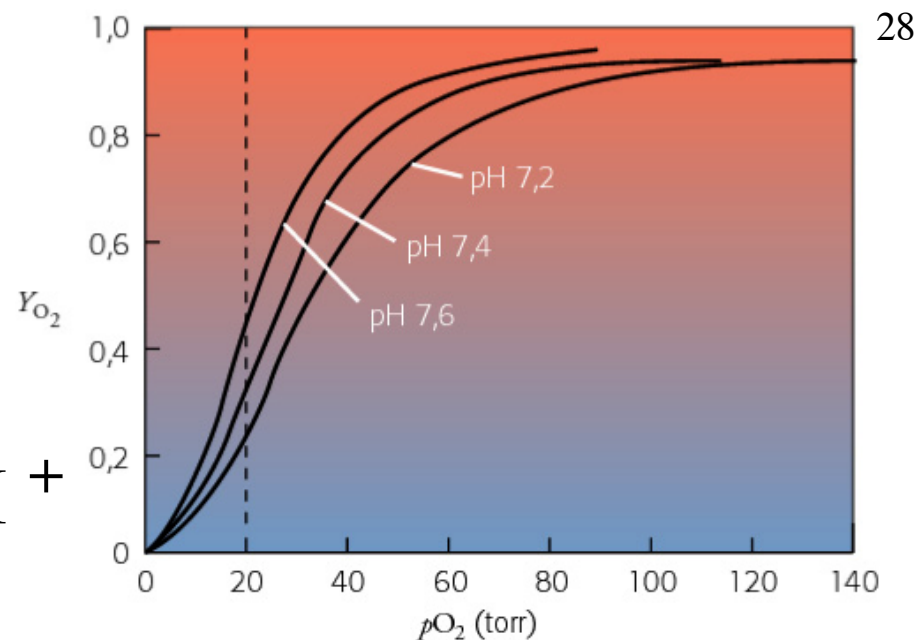
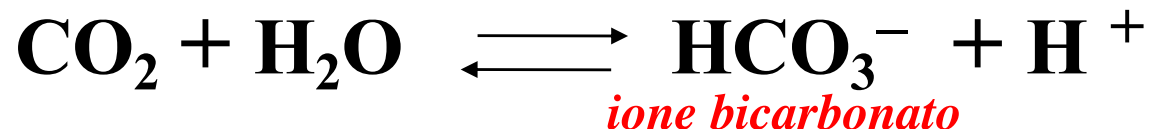
- Il 2,3-BPG è anche un intermedio di altre vie metaboliche
- Il 2,3-BPG presenta 5 cariche negative che formano 5 coppie ioniche con l'emoglobina
- Sono coinvolti residui basici (His, Lys, Arg) carichi positivamente che formano una tasca polare
- Il 2,3-BPG si lega nello spazio inter-subunità dell'Hb stabilizzando la forma T (bassa affinità)
- Nella forma R (ossigenata) non è disponibile lo spazio per accomodare il 2,3-BPG



# Effetto Bohr

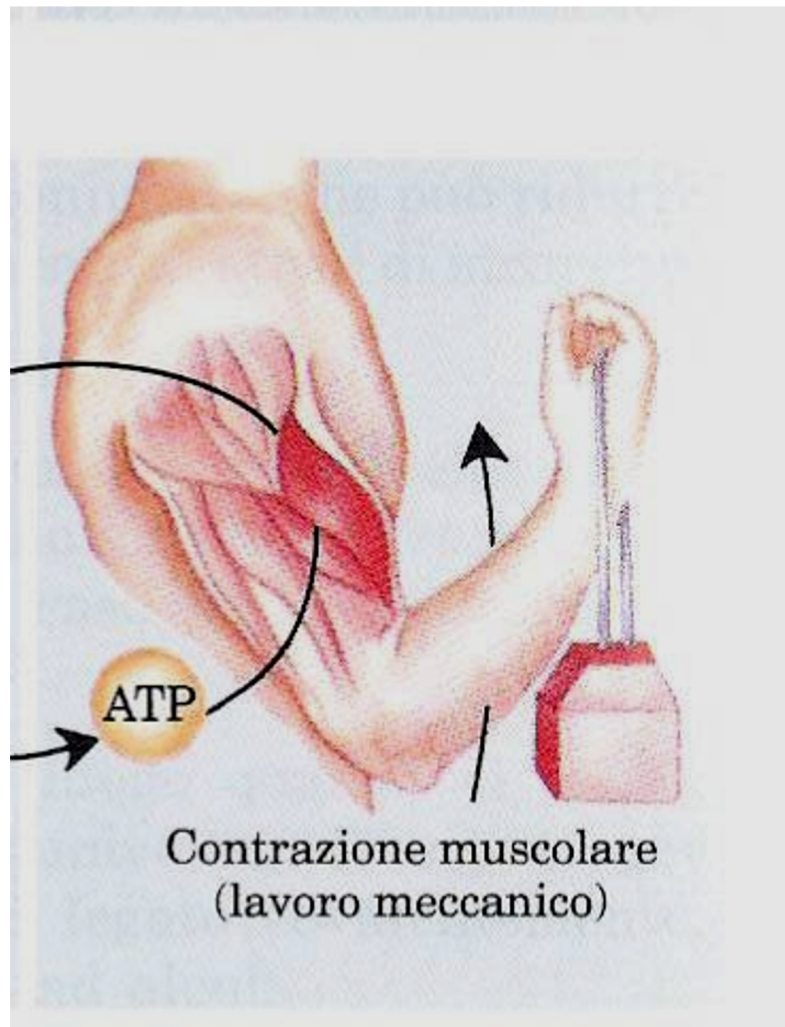
- Nei tessuti, l'aumento della  $\text{CO}_2$  porta ad una diminuzione del pH

*anidraasi carbonica*



- I protoni liberati si legano all'Hb e inoltre favoriscono la formazione di coppie ioniche (Es. His 146 — Asp 94) che stabilizzano la forma T
- Anche la  $\text{CO}_2$  si lega direttamente ai gruppi amminici N-terminali delle subunità della Hb, formando carbammati che stabilizzano la forma T
- Nel tessuto polmonare si verificano processi opposti per effetto dell'aumento del pH, anche in seguito alla espirazione della  $\text{CO}_2$

# Effetto Bohr



**Nei muscoli in attiva  
contrazione, si  
genera acido lattico  
che abbassa il pH  
promuovendo il  
rilascio di circa il  
10% in più di O<sub>2</sub> da  
parte dell'Hb**