**PROTEINE RESPIRATORIE:**

**emoglobina e mioglobina**

Premesse: similmente a quanto accade per gli enzimi, il ligando è una molecola che si lega reversibilmente ad una porzione di una proteina, cioè il sito di legame. Quando la proteina lega il suo ligando si forma un complesso proteina-ligando, in seguito a una modificazione conformazionale (adattamento indotto).

Nell’interazione tra ligando e proteina valgono gli stessi ragionamenti fatti per l’interazione enzima proteina: L+P ⬄ LP

In questa reazione possiamo identificare delle costanti di velocità:

K1=costante di velocità di formazione/associazione di LP

K2=costante di velocità di dissociazione di LP a formare L + P K1 K2

Identifichiamo anche una costante di equilibrio data dal rapporto tra le due costanti di velocità:

Keq= K1 / K2 = [LP]/[L][P] = Ka = 1/Kd

TRASPORTO DI OSSIGENO:

Come possono le proteine respiratorie trasportare l’ossigeno dato che:

* L’ossigeno è poco solubile in acqua
* Le proteine respiratorie che trasportano O2 (mioglobina ed emoglobina) non hanno catene laterali amminoacidi adatte a legare reversibilmente O2

L’utilizzo di metalli di transizione (Fe, Cu) liberi non risolve il problema: rende facile il legame, ma porta alla formazione specie reattive dell’O2 (ROS). Allora la natura ha utilizzato il Fe 2+, bloccato all’interno di una struttura, la **protoporfirina IX**, creando il gruppo **eme**. In questo modo si limita la reattività del ferro e si rende possibile il legame reversibile dell’ossigeno, senza generare i ROS.

Immagine che contiene testo

Descrizione generata automaticamente

EME:

È un anello costituito da una cavità interna con quattro residui di azoto, alcuni protonati e altri no; è proprio qui che si lega il ferro, che froma quattro legami di coordinazione con l’eme, legami che si trovano sullo stesso piano. Però il ferro per essere stabile deve formare sei legami di coordinazione. Nell’eme libero gli altri due legami di coordinazione sono occupati da molecole di H2O, che si legano al ferro e lo stabilizzano.

**MIOGLOBINA**

Immagine che contiene schizzo, disegno, Line art, illustrazione

Descrizione generata automaticamenteProteina globulare che prende l’ossigeno dal circolo sanguigno e lo rende disponibile a livello del muscolo. Monomero. Ha una struttura formata da 8 α-eliche e 152 amminoacidi (proteina di medie dimensioni) e tale catena è legata non covalentemente ad un gruppo eme. Inoltre, tale struttura, non presenta ponti disolfuro ed è stabilizzata da interazioni idrofobiche tra residui apolari. La mioglobina presenta, infine, sulla propria superficie residui polari che la rendono solubile in acqua pur essendo essa impermeabile. Tale impermeabilità interna è dovuta alla presenza interna di residui apolari e risulta di grande importanza per evitare che alcune molecole d’acqua del solvente entrino nella mioglobina e vadano ad occupare il legame di coordinazione del ferro, rendendo impossibile un legame reversibile con l’ossigeno (si può quindi affermare che l’eme sia inserito all’interno di una tasca idrofobica).

**Immagine che contiene accessorio, interruttore, collana, chiave

Descrizione generata automaticamenteLEGAME EME - PROTEINA:**

Come visibile nella figura a sinistra il ferro possiede due legami di coordinazione perpendicolari al piano dell’anello porfirinico e uno di questi legami è impegnato con un residuo di istidina detta prossimale che si trova sull’elica F (la sesta α-elica, la quale si trova in una posizione prossima al C-terminale). Dall’altro lato, quello superiore, abbiamo dei residui idrofobici che contornano l’eme e un altro residuo di istidina detta distale che è localizzata sull’elica E. Essa non interagisce direttamente con lo ione ferro ma ha il compito di interagire con l’ossigeno nel momento in cui quest’ultimo si va a legare all’interno dell’ultimo sito di coordinazione rimasto del ferro. Dunque, l’istidina prossimale interagisce direttamente con il ferro, mentre quella distale stabilizza il legame. Infine, gli altri quattro legami di coordinazione del ferro giacciono sul piano della porfirina, impegnati con i quattro atomi d’azoto dell’anello.

Immagine che contiene design, tipografia

Descrizione generata automaticamente con attendibilità mediaAltra considerazione di grande importanza è che nel momento in cui l’eme non lega l’ossigeno, l’atomo di ferro viene leggermente “tirato” verso l’istidina prossimale e si trova così non in asse. Quando invece è presente il legame con l’ossigeno si ha un cambiamento di conformazione e il ferro viene ritirato giù in maniera tale che sia perfettamente in asse con il piano formato dagli atomi di azoto dell’anello del gruppo eme. Tutto ciò provoca uno spostamento dell’elica 7 (ciò è da tenere ben a mente per capire cosa accade invece nell’emoglobina).

Immagine che contiene diagramma, linea, design

Descrizione generata automaticamenteAltra informazione da ricordare è quella secondo cui l’ossigeno, nel momento in cui si lega al gruppo eme all’interno della proteina, va a legarsi con un angolo distorto in quanto quest’ultima rappresenta la situazione di legame ottimale. Il monossido di carbonio, invece, tenta di legarsi in maniera perfettamente parallela, ma ciò risulta impossibile a causa della tasca della proteina che ostacola tale situazione. Ciò risulta essere molto vantaggioso poiché riduce l’affinità della mioglobina e dell’emoglobina per il monossido di carbonio (tuttavia non evita l’intossicazione da monossido di carbonio, ma rende la situazione un minimo più controllabile).

**AFFINITÀ DELL’OSSIGENO PER LA MIOGLOBINA:**

Immagine che contiene linea, Rettangolo

Descrizione generata automaticamenteDall’immagine a lato si può osservare la cinetica con cui la mioglobina lega l’ossigeno. Tale profilo è simile a quella di una cinetica enzimatica poiché alcune proteine, come appunto la mioglobina, legano il loro ligando seguendo proprio tale cinetica. L’unica differenza è che sull’asse Y è rappresentata la frazione di legame, la quale ci indica quanti siti di legame della nostra proteina sono occupati dal ligando. Tale profilo cambia in relazione alla disponibilità del ligando che nel nostro caso è l’ossigeno. Possiamo quindi affermare che la mioglobina ha una curva di dissociazione che risulta iperbolica: ad una bassa percentuale di ossigeno (nei tessuti) la nostra mioglobina è tutta completamente saturata. Infatti, la funzione della mioglobina è di passare l’ossigeno dall’emoglobina al citocromo c ossidasi. Dunque, l’ossigeno possiede un’affinità maggiore per la mioglobina rispetto che per l’emoglobina.

**EMOGLOBINA**

È presente all’interno degli eritrociti e, a differenza della mioglobina, non è un monomero ma un tetramero ed è formato da quattro catene di globina ciascuna delle quali lega un gruppo eme. È un eterotetramero (tetramero formato da subunità differenti) composto da due dimeri di subunità uguali. Esistono diversi tipi di eterotetrameri di mioglobina, tra cui il più comune è il tetramero ααββ (detto HbA1 ed è il 97% delle Hb), poi si ha l’ααδδ detta HbA2 e infine si hanno le emoglobine rispettivamente fetale ed embrionale che sono ααγγ e ααεε. La funzione dell’emoglobina è quella di legare l’ossigeno nei polmoni e di trasportarlo ai tessuti e la sua concentrazione nel sangue è di circa 12-17 mg ogni 100 mL di sangue.

Immagine che contiene disegno, clipart, schizzo, Line art

Descrizione generata automaticamenteLa struttura dell’emoglobina è molto simile a quella della mioglobina poiché, pur non avendo la stessa sequenza primaria di quest’ultima, le singole catene che compongono l’emoglobina hanno un folding molto simile a quello della mioglobina.

Ogni subunità dell’emoglobina è formata da 8 α-eliche e la caratteristica che la differenzia dalla mioglobina è quella di avere residui superficiali in grado di formare legami a idrogeno e interazioni polari tra le varie subunità del tetramero. Infine, bisogna ricordare che le interazioni più forti all’interno dell’emoglobina si vanno a formare tra subunità tra loro differenti, ovvero tra una subunità α e una β.

Immagine che contiene testo, linea, diagramma, Diagramma

Descrizione generata automaticamenteOra mettiamo a confronto il profilo iperbolico della mioglobina con quello dell’emoglobina. Bisogna ricordare, innanzitutto, che l’emoglobina è in grado di legare quattro atomi di ossigeno e che si tratta, inoltre, di una proteina allosterica. Infatti, nel momento in cui il primo ligando si andrà a legare al sito attivo, in seguito a quello spostamento di rientro del ferro precedentemente descritto, si avrà un effetto allosterico nei confronti degli altri monomeri della proteina respiratoria. Dunque, l’emoglobina presenta un profilo di saturazione sigmoidale che si osserva in tutte le proteine in grado di legare più ligandi. Tale profilo è sigmoidale e non iperbolico poiché il legame tra la prima molecola di ossigeno e il primo sito di legame dell’emoglobina genera un cambiamento conformazionale che varia l’affinità degli altri siti di legame dell’emoglobina per l’ossigeno stesso. Tale aspetto è fondamentale in quanto permette all’emoglobina di reagire in maniera molto più efficace e sensibile ai cambiamenti di concentrazione del ligando. La figura geometrica della sigmoide è data, inoltre, dalla miscela di due profili: uno stato a bassa affinità e uno ad alta affinità per l’ossigeno (infatti l’emoglobina passa da uno stato ad alta affinità per l’ossigeno a uno a bassa affinità).

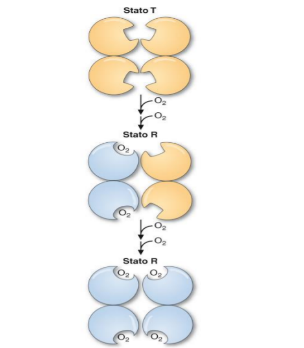
**Immagine che contiene disegno, schizzo, clipart, cartone animato

Descrizione generata automaticamenteCambiamento strutturale dell’emoglobina quando si passa da uno stato a bassa affinità per l’ossigeno a una ad alta affinità:**

La struttura, in seguito al legame con l’ossigeno, passa da uno stato definito **T** (teso) a uno definito **R** (rilassato). La differenza macroscopica che si può notare nella figura a fianco è che la tasca centrale tra le quattro subunità si va a stringere e che i residui di istidina vengono puntati verso l’interno, mentre le tasche che contengono i gruppi eme vanno ad ampliarsi favorendo così l’ingresso dell’ossigeno.

Immagine che contiene testo, schermata, design, illustrazione

Descrizione generata automaticamente**Driver della conversione da stato T a stato R:**

È garantito, come abbiamo visto per la mioglobina, dal passaggio dell’atomo di ferro da una posizione più esterna al piano dell’anello protoporfirinico a una posizione in cui l’atomo di ferro è inserito sull’asse di tale anello. Tale cambiamento trascina con sé la proteina e si ripercuote dunque su tutte le subunità. Ad esempio, prendendo l’emoglobina più comune (HbA1), nel momento in cui un ossigeno si va a legare alla subunità α la conformazione della subunità β con cui ha più stretto contatto cambia e tale subunità β potrà così legarsi più facilmente ad una molecola di ossigeno. Dunque, il passaggio da stato R a stato T non è un passaggio immediato, ma è un processo a due step, come visibile nell’immagine a destra (infatti la prima molecola di ossigeno non favorisce il legame degli altri 3 ossigeni alle altre 3 subunità dell’emoglobina, ma favorisce solamente il legame del secondo ossigeno all’interno del dimero di cui fa parte la prima subunità).

**EMOGLOBINA VS MIOGLOBINA: diversa interazione con l’ossigeno**

Immagine che contiene testo, diagramma, linea, schermata

Descrizione generata automaticamenteL’emoglobina è molto efficace nel legare l’ossigeno, infatti, a livello della pressione parziale nei polmoni essa è tutta saturata, ma è anche in gran parte saturata a livello dei tessuti. Ciò fa capire perché l’emoglobina debba avere un profilo cinetico differente da quello della mioglobina: in caso contrario legherebbe molto bene l’ossigeno ma non sarebbe in grado di rilasciarlo ai tessuti. Viceversa, se noi avessimo un’emoglobina efficiente nel rilasciare l’ossigeno a livello della pressione dei tessuti, questa proteina sarebbe totalmente inefficiente nel saturarsi completamente a livello dei polmoni. Dunque, l’emoglobina deve essere efficiente sia nel legare l’ossigeno sia nel rilasciarlo ed è per questo che possiede un profilo cinetico di legame sigmoidale.

Nel grafico alla destra si osserva come a livello dei polmoni l’emoglobina risulti completamente saturata, mentre a pressioni parziali a livello dei tessuti come essa vada a cedere il 50% dell’ossigeno alla mioglobina.

**FATTORI CHE INFLUENZANO L’AFFINITA’ DELL’EMOGLOBINA PER L’OSSIGENO:**

* **Immagine che contiene testo, linea, diagramma, schermata

  Descrizione generata automaticamentepH e pCO2:**

quando aumenta la pCO2 a livello dei tessuti diminuisce l’affinità dell’emoglobina per l’ossigeno. Ciò accade perché la CO2 si combina con l’acqua, forma H2CO3 che tende a dissociare e a formare + che va ad abbassare il pH. Questo è di grande importanza in quanto l’emoglobina è in grado di variare la propria capacità di rilasciare ossigeno anche a seconda dell’attività metabolica del tessuto. Infatti, più un tessuto è attivo più si abbassa il pH e più l’emoglobina è efficiente nel rilasciare l’ossigeno. Nell’immagine a fianco sono rappresentati tre profili di dissociazione dell’emoglobina a differenti pH.

* **Temperatura:**

man mano che aumenta la temperatura diminuisce l’affinità dell’emoglobina per l’ossigeno. Non a caso a livello dei vasi polmonari la temperatura è minore e quindi l’emoglobina ha una maggiore affinità per l’ossigeno rispetto al livello tissutale dove la temperatura è infatti maggiore.

* **2,3-bisfosfoglicerato (BFG):**

è una molecola che si lega alle catene β della deossiemoglobina disponendosi nella cavità interna della struttura quaternaria, stabilizzandone la conformazione e creando, dunque, una minor affinità per l’ossigeno. Nei tessuti (bassa pO2) la cessione di O2 consente il legame con il BFG, mentre nei polmoni avviene l’evento contrario.

Il grafico a fianco presenta due profili di rilascio dell’emoglobina e sono indicate delle pressioni parziali di ossigeno a livello dei tessuti e poi a livello dei polmoni nel caso in cui ci troviamo a livello Immagine che contiene testo, linea, diagramma, Diagramma

Descrizione generata automaticamentedel mare o a 4500 metri. Il profilo azzurro rappresenta la situazione normale (con concentrazione di BFG pari a 5 mM) e, se lo si osserva, si può notare che nel passaggio dalla pressione parziale dell’ossigeno nei polmoni a livello del mare alla pressione parziale dell’ossigeno nei tessuti a livello del mare l’emoglobina rilascia il 38% dell’ossigeno. Mentre, se aumentiamo l’altitudine del luogo in cui ci troviamo e la concentrazione di BFG rimane sempre di 5mM, noi non siamo in grado di rilasciare tutto il 38% dell’ossigeno ma ne si rilascia solo il 30% (si ha così una minore disponibilità di ossigeno). Per evitare ciò, all’aumentare dell’altitudine, la concentrazione di BFG va ad aumentare (fino ad 8mM) in modo tale da cambiare la pendenza della curva di dissociazione dell’emoglobina. Ciò permette all’emoglobina di legare circa l’80% dell’ossigeno e di aumentare, inoltre, la quantità di ossigeno rilasciata dall’emoglobina stessa.

Altra informazione da ricordare è quella secondo cui essendo le emoglobine embrionali e fetali prive delle catene β ed essendo che il BFG si lega proprio a tali catene β, allora queste due emoglobine non risentono dell’influenza del BFG (avranno quindi maggiore affinità per l’ossigeno rispetto all’emoglobina degli adulti).

* **CO2:**

viene trasportata nel torrente circolatorio in maniera libera e solo una piccola parte di essa va a legarsi sulle lisine dell’emoglobine, formando la carbamminoemoglobina e abbassando così l’affinità dell’emoglobina per l’ossigeno.

Immagine che contiene testo, rosa, design

Descrizione generata automaticamente**ANEMIA FALCIFORME (DREPANOCITOSI)**

Immagine che contiene testo, schermata, cerchio, diagramma

Descrizione generata automaticamentePatologia che provoca nei pazienti affetti la presenza di globuli rossi aventi una forma di falce. Tali eritrociti non sono ottimali per circolare in un sistema fluidico e vanno a formare aggregati che provocano regioni di ipossia. La causa di tale malattia è data da una mutazione a carico dell’emoglobina, la quale va ad esporre sulla propria superficie un residuo idrofobico, una valina. Essa va ad interagire con residui idrofobici di altri tetrameri di emoglobina, formando così delle strutture a filamento che risultano insolubili e che vanno a distorcere tutta la struttura eritrocitaria che prende così la forma di una falce.

Nell’immagine a sinistra si possono notare come le piccole differenze tra le conformazioni dell’emoglobina A e dell’emoglobina delle cellule falciformi sono dovute alla sostituzione di un singolo amminoacido nelle catene β. Per effetto di questa piccola variazione nella conformazione, la deossiemoglobina S si trova ad avere una zona idrofobica sulla superficie della molecola, che causa un’aggregazione delle molecole di emoglobina S; queste si dispongono in filamenti e formano fibre insolubili.