

# PROTEINE RESPIRATORIE:

EMOGLOBINA

&

MIOGLOBINA

**Nel corso dell'evoluzione, col passaggio dalla vita anaerobia alla vita aerobia si sono progressivamente differenziati due meccanismi che sono in grado di garantire alle cellule dei tessuti un flusso di O<sub>2</sub> sufficiente e costante:**

◇ **un sistema circolatorio adeguato;**

◇ **molecole trasportatrici di O<sub>2</sub>, che permettono di superare la limitazione imposta dalla bassa solubilità dell'ossigeno in acqua.**

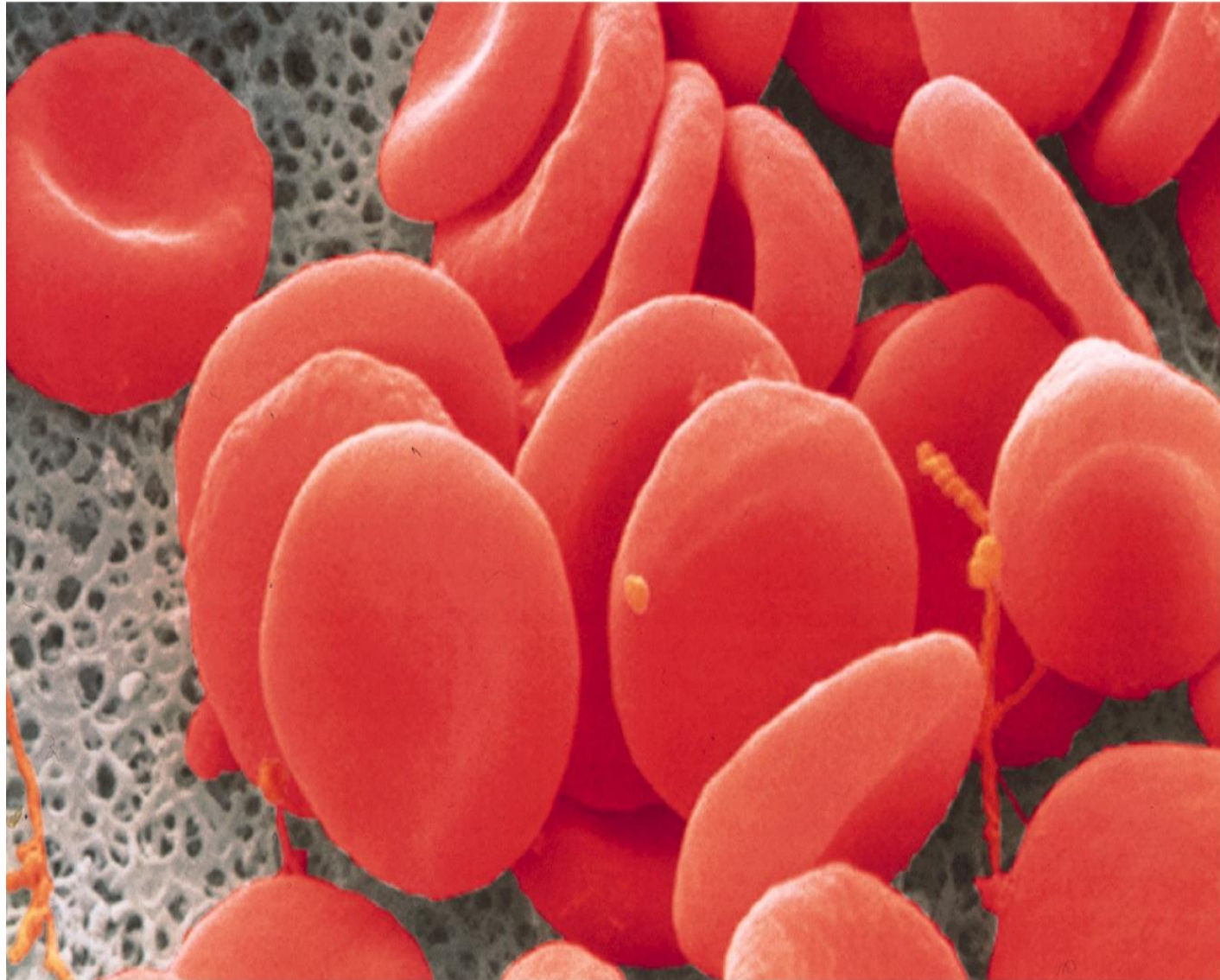
Nei vertebrati le molecole coinvolte nel rifornimento dell'ossigeno sono l'emoglobina (Hb) e la mioglobina (Mb).

si legano reversibilmente con l' $O_2$  e ne rendono possibile il trasporto dai polmoni ai tessuti e l'immagazzinamento nel muscolo.

L'Hb contenuta nei globuli rossi aumenta di 50 volte la quantità di  $O_2$  trasportata da 1 litro di sangue.

La Mb si trova nei muscoli e funziona soprattutto come deposito di  $O_2$ ; ha una grande affinità per l' $O_2$  e lo lega quando l'Hb delle emazie lo ha già ceduto e, a sua volta lo cede solo quando la pressione parziale del gas ( $pO_2$ ) scende a livelli molto bassi.

Ogni eritrocita contiene circa 300 milioni di molecole di emoglobina

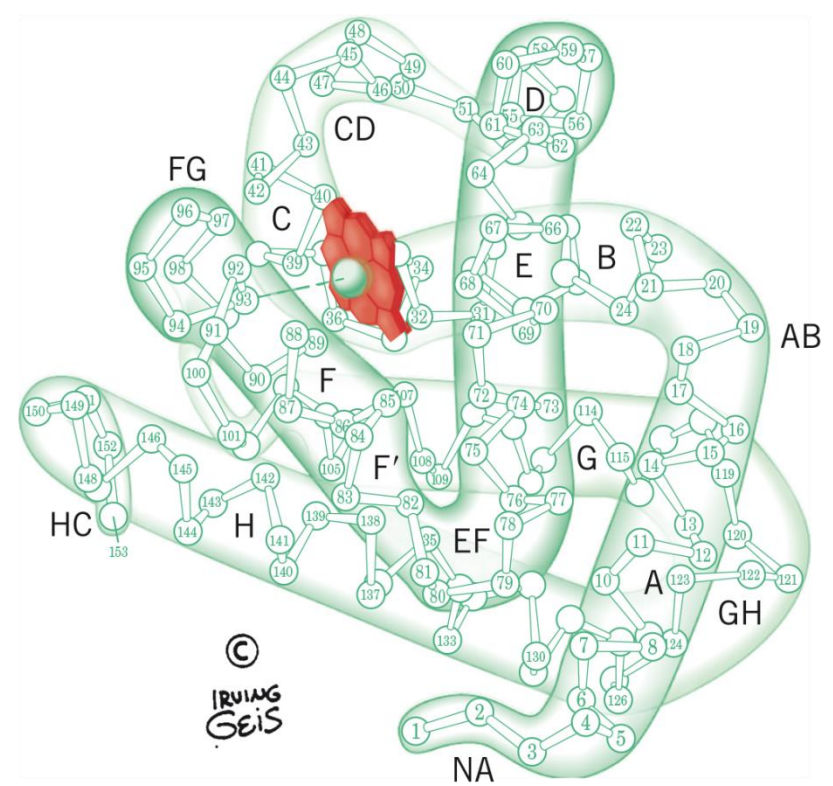


(a)

2 μm

# Mioglobina

- Proteina monomerica (153 AA.),
- Agevola la diffusione dell'O<sub>2</sub> nel muscolo
- 80% degli AA sono disposti ad  $\alpha$ -elica (8 alfa eliche identificate con le lettere A\_H)

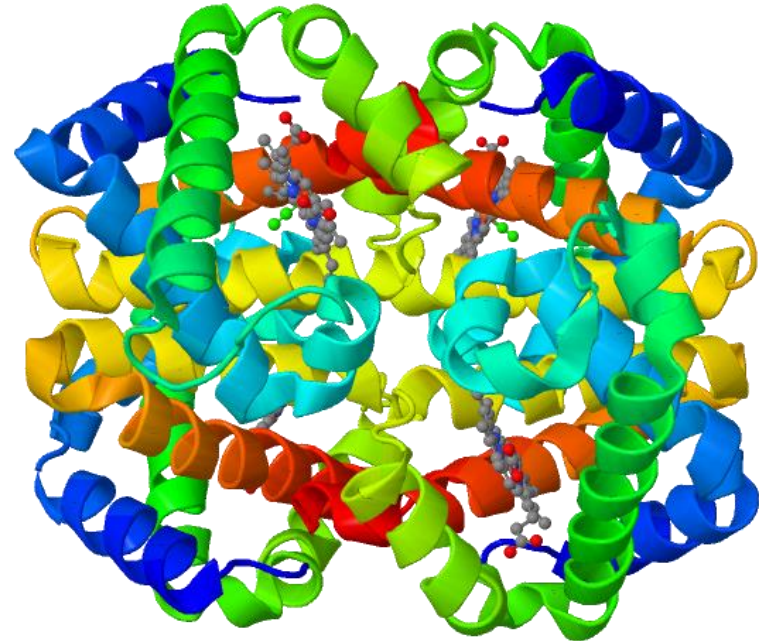
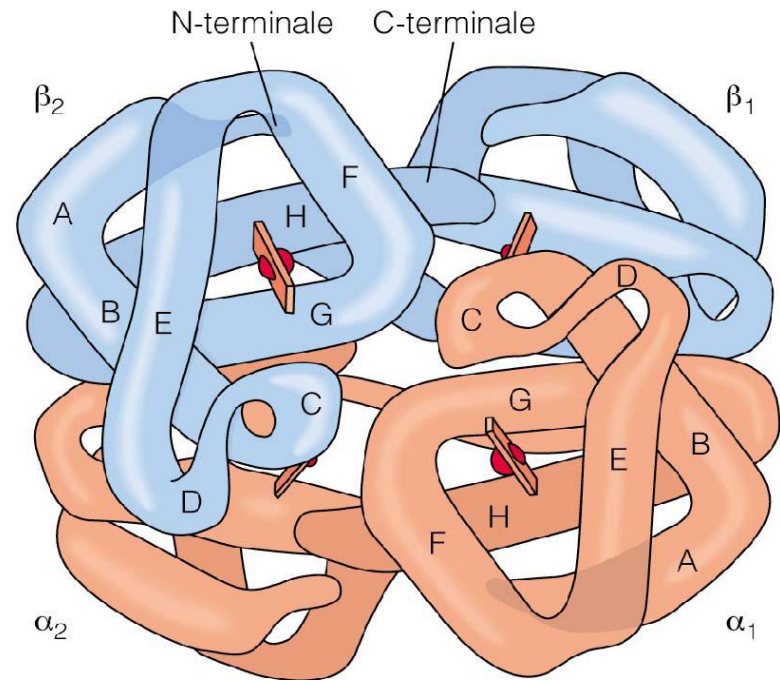


# Emoglobina

➤ Proteina tetramericata costituita da 4 diverse subunità:

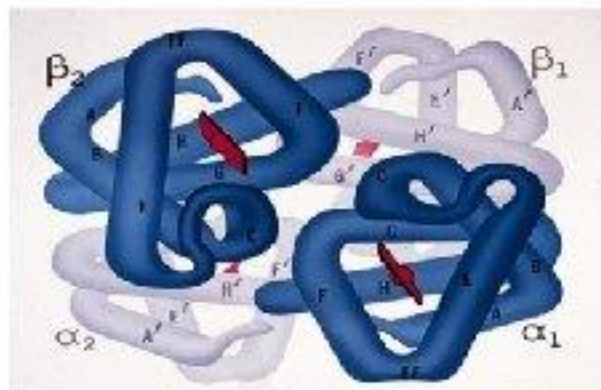
2 subunità  $\alpha$  con 7  $\alpha$  eliche  
2 subunità  $\beta$  con 8  $\alpha$  eliche

➤ Trasporto dell' $O_2$   
dai polmoni alla cellula



# Proteine – Struttura quaternaria

- Molte proteine sono costituite da una sola catena polipeptidica (proteine **monomeriche**).
- Alcune proteine sono costituite da 2 o più catene polipeptidiche (**subunità**) strutturalmente identiche o diverse (proteine **multimeriche**).
- L'associazione di queste subunità costituisce la **struttura quaternaria**.
- Le subunità sono tenute insieme da **interazioni non covalenti**.

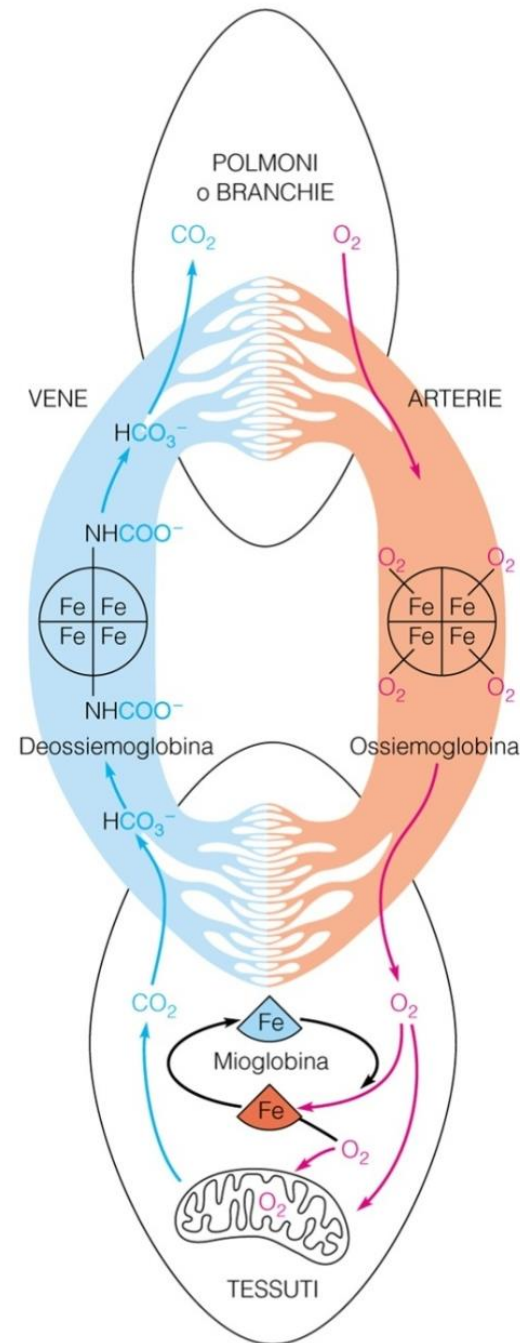


# L'emoglobina

trasporto l'O<sub>2</sub> dai polmoni ai tessuti

La **Mb** è in grado di legare l'ossigeno. Rilasciato dall'emoglobina nel circolo sanguigno ai tessuti e trasportarlo ai vari organelli cellulari che lo utilizzano (es. mitocondri)

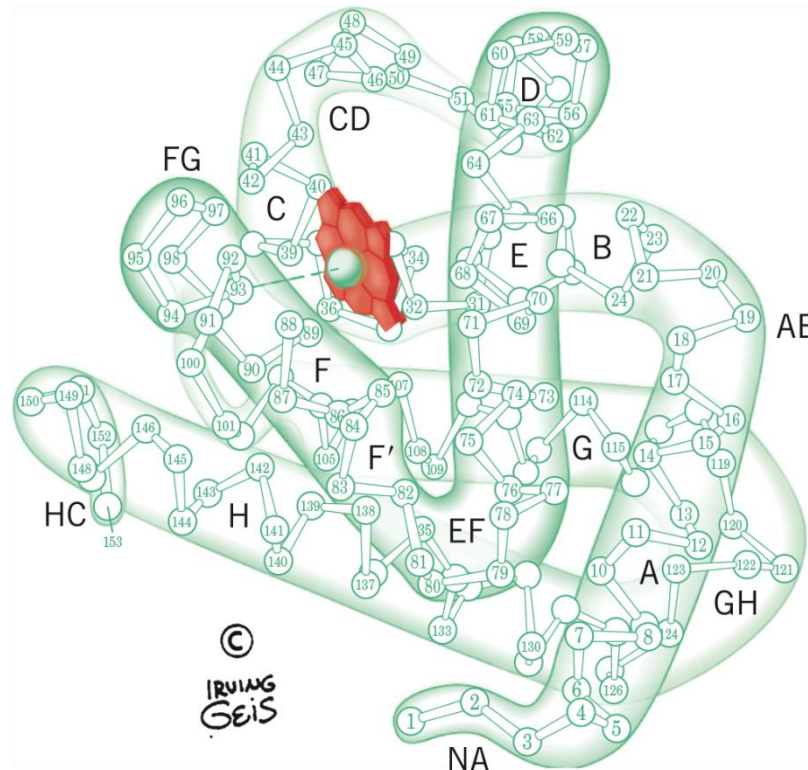
**Neuroglobina** e **citoglobina** sono presenti rispettivamente nei neuroni e in altri tessuti



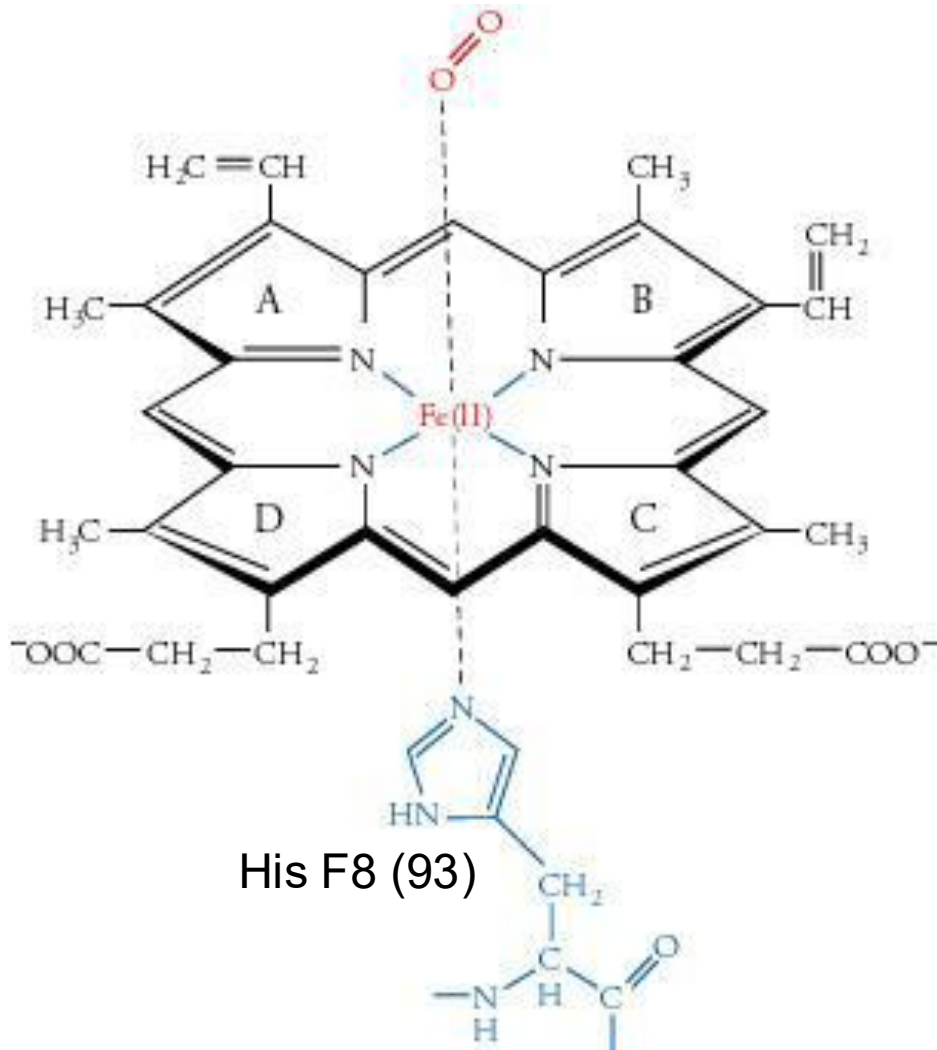
➤ Nella Mb e Hb ogni subunità ha due parti:

-proteica (globina)

-porzione non proteica (eme)



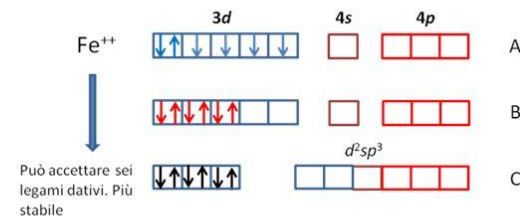
# PROTOPORFIRINA IX + $Fe^{2+}$ = EME



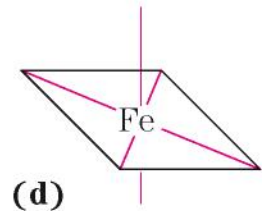
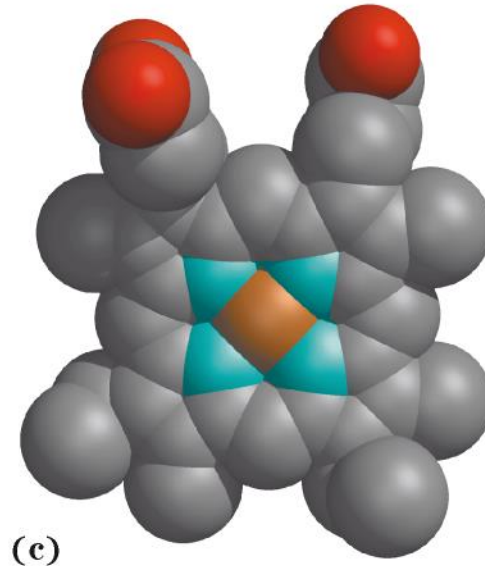
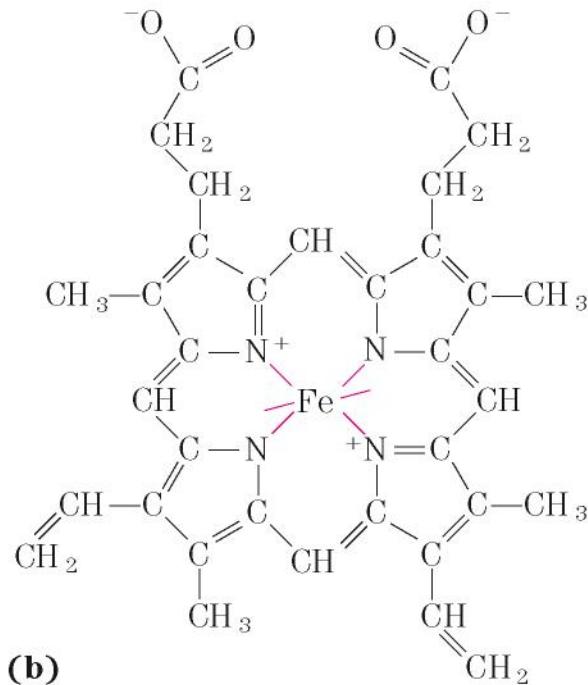
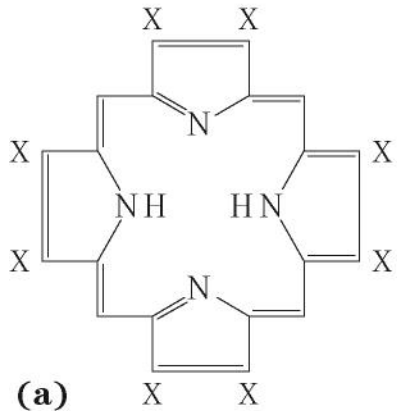
## EME:

- 4 anelli pirrolici = protoporfirina
- $Fe^{2+}$  al centro del gruppo eme (il  $Fe^{3+}$  non è in grado di legare ossigeno)

La configurazione elettronica di questo ione ha 4 orbitali  $3d$  con singoletto, mentre nel guscio più esterno l'orbitale  $4s$  e i 3 orbitali  $4p$  sono vuoti, dato che gli elettroni presenti nell'orbitale  $4s$  sono stati persi con la formazione dello ione  $Fe^{++}$

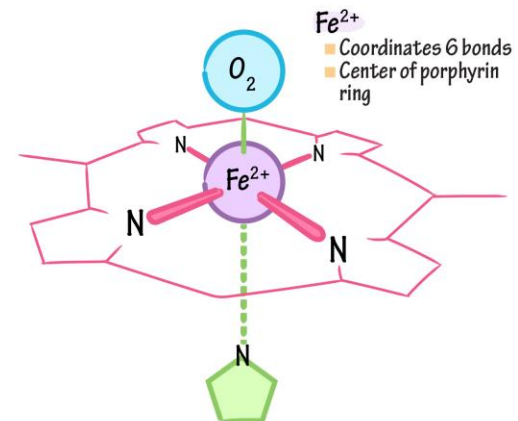


porfina

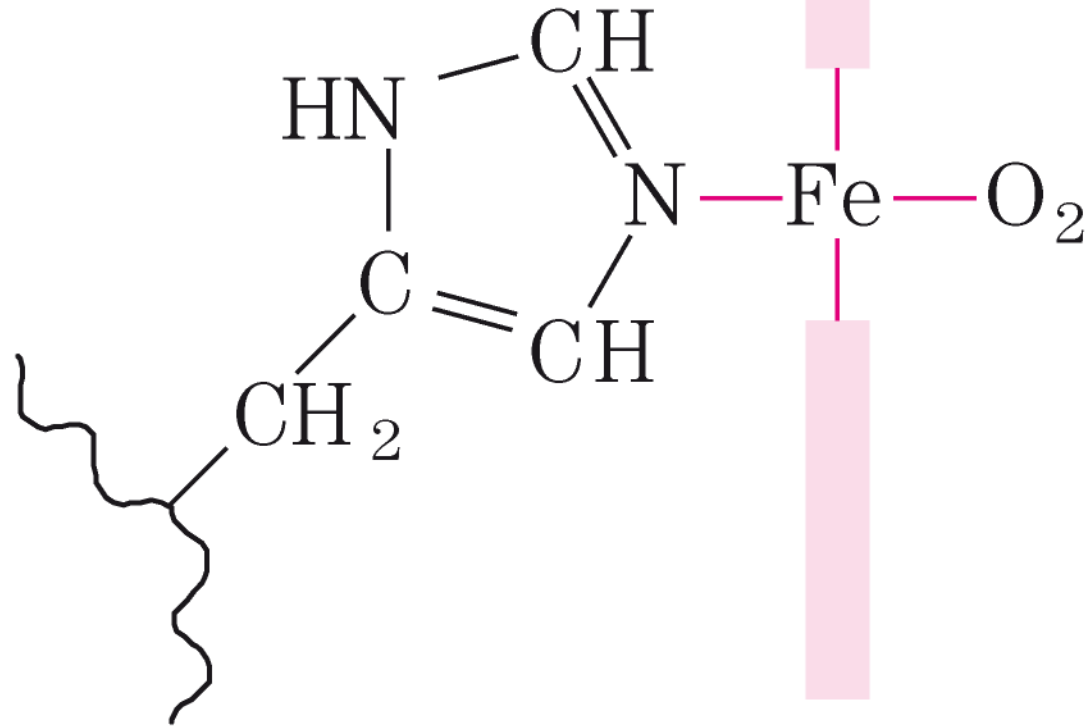


Protoporfirina IX

Heme Group

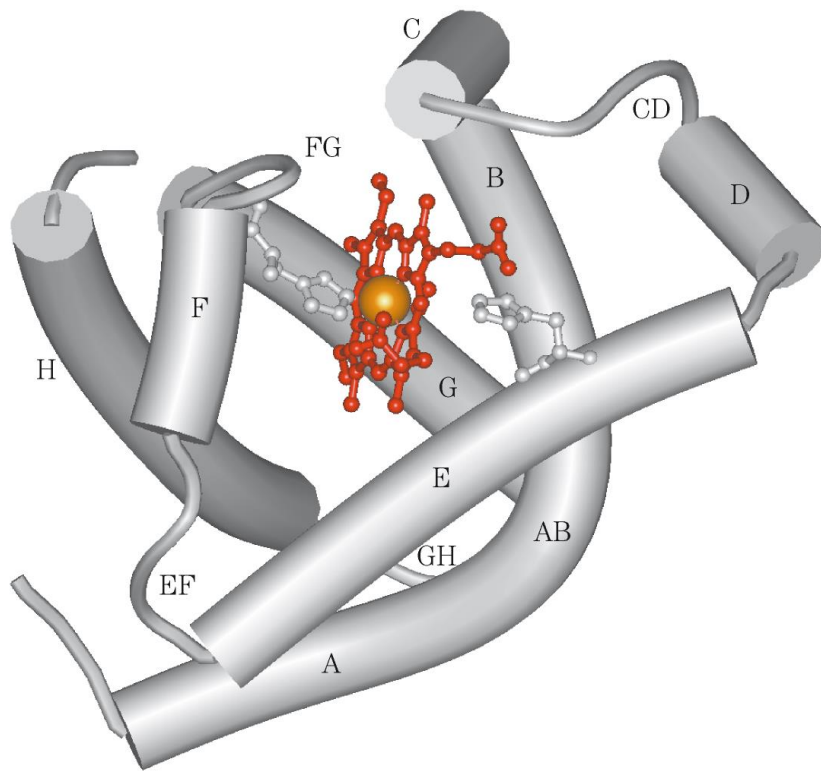


Vista di lato

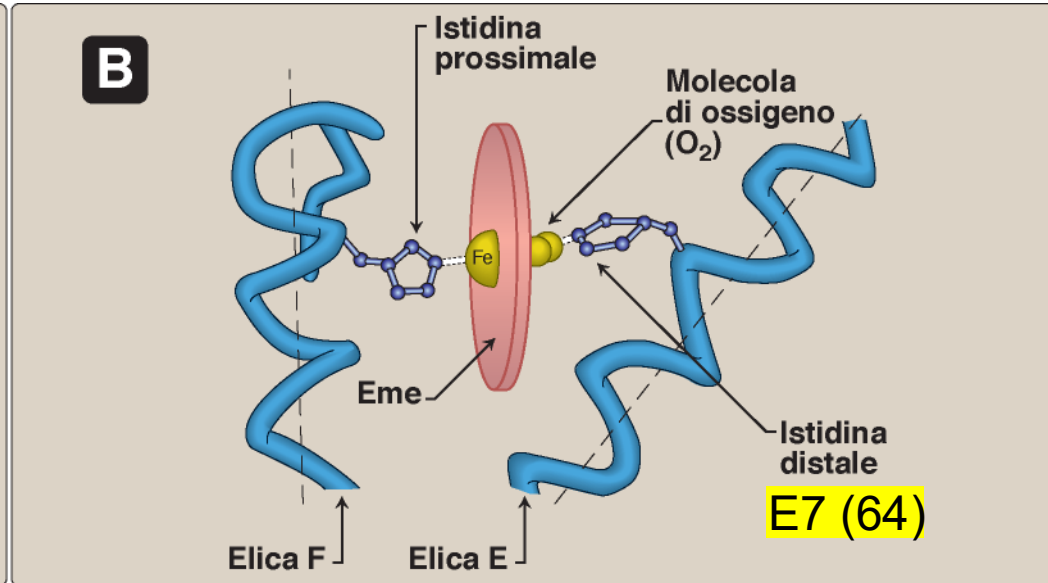
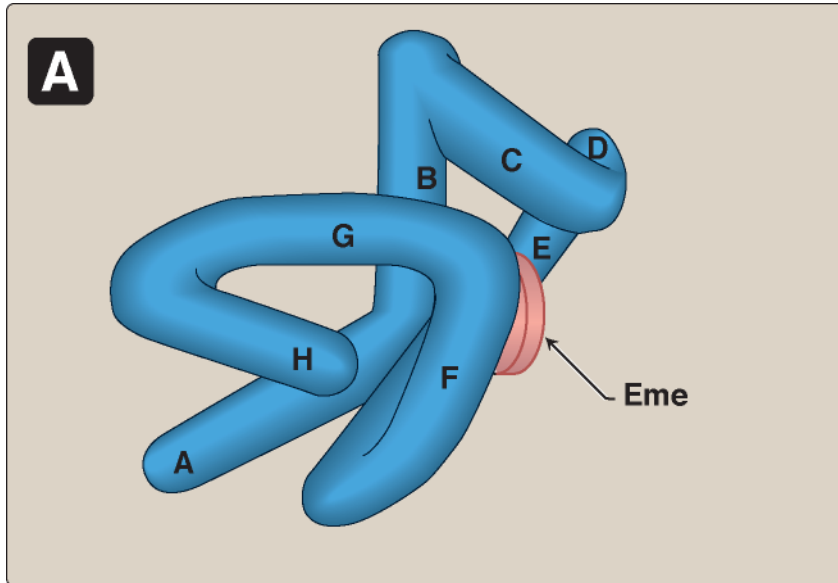


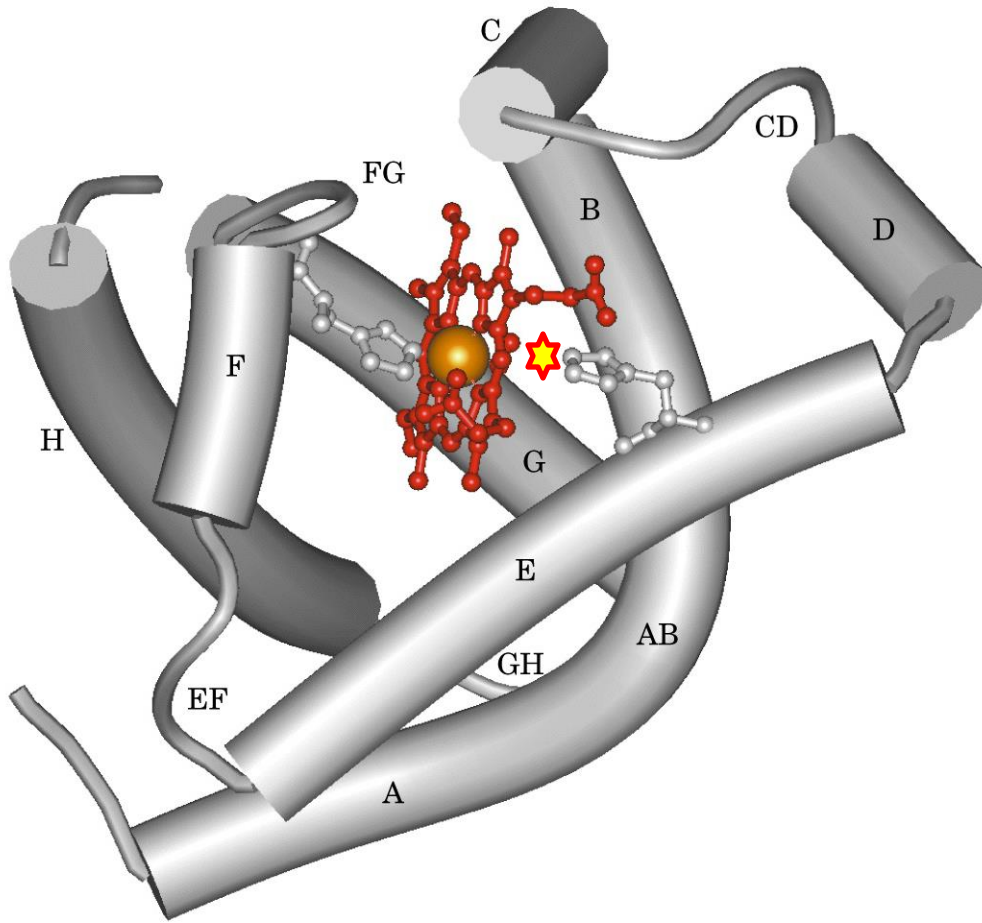
Residuo  
di istidina

Piano  
dell'anello  
porfirinico



# Gruppo EME





Il  $\text{Fe}^{2+}$  dell'eme può legare:

1. l' $\text{O}_2$  nell'**ossiemoglobina**;
2. il CO nella **carbossiemoglobina**;
3. l' $\text{H}_2\text{O}$  nella **metaemoglobina**, unico caso in cui il Fe dell'eme è trivalente ( $\text{Fe}^{3+}$ ), ma la molecola ha perso la capacità di trasportare l'ossigeno.

I derivati **carbossi-mioglobina e carbossi-emoglobina** presentano **CO** (non  $\text{CO}_2$ !!!) legato al gruppo eme.

Il legame con il CO è circa 300 volte più stabile di quello con l'O<sub>2</sub>!

Quando nell'aria è presente 0.2% di CO in 1 ora si ha perdita di coscienza e in circa 4 ore si ha morte per asfissia (circa 2/3 di

Hb

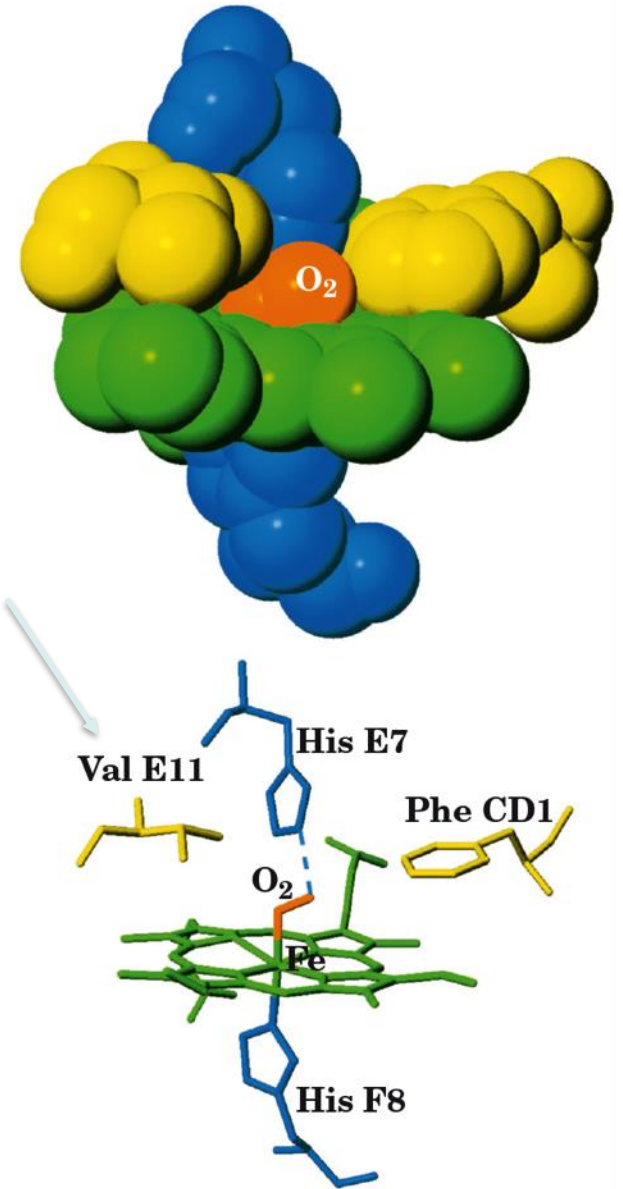


# Protezione dell'eme da parte della globina

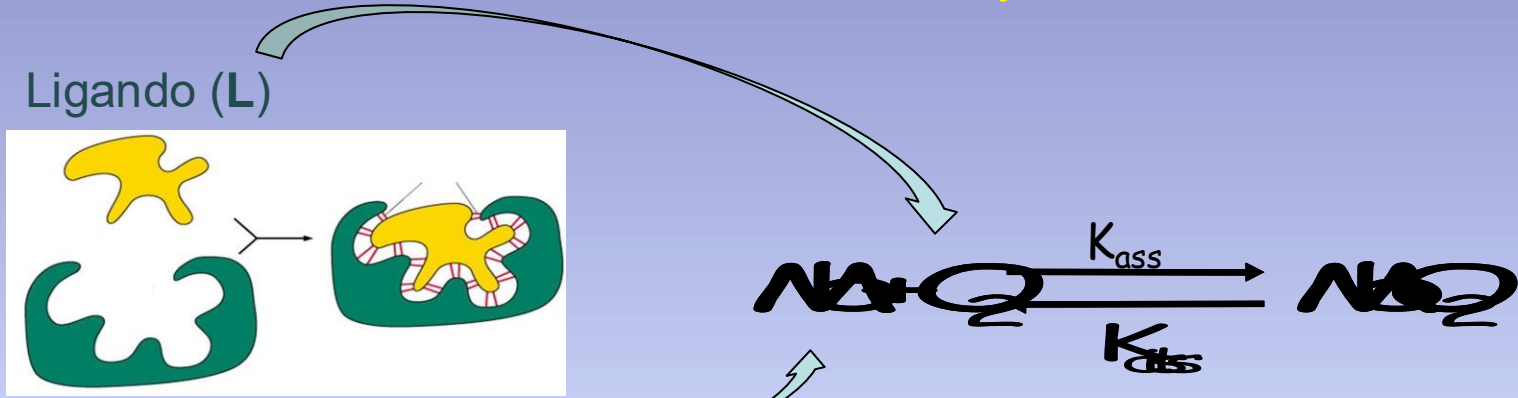
Le **globine** che circondano l'**eme** in **Mb** ed in **Hb** hanno funzioni di estrema importanza:

- impediscono al ferro dell'eme di ossidarsi da **Fe<sup>2+</sup>** ferroso a **Fe<sup>3+</sup>** ferrico;
- creano un **sito attivo idrofobico**, in cui si lega O<sub>2</sub> che è lipofilo\*;
- proteggono l'**eme** da ligandi indesiderabili (esempio CO monossido di carbonio).

\* la solubilità di O<sub>2</sub> nel plasma è molto bassa; grazie all'emoglobina nel sangue c'è una concentrazione di O<sub>2</sub> 100 volte superiore a quella del plasma.



# Legame reversibile $O_2$ -Mb è descritto dalla reazione all'equilibrio



Ligando (L)

Proteina (P)

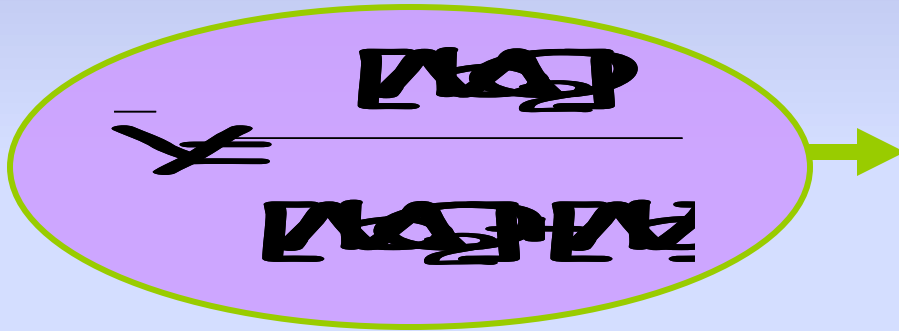
Il legame di un ligando dipende dalla sua concentrazione nell'ambiente circostante

$$K_{diss} = \frac{[M b] [O_2]}{[M b O_2]}$$

Se la  $K_{diss}$  è piccola l'affinità proteina/ligando è elevata

# Da cosa dipende la a quantita' di MIOGLOBINA ossigenata presente in una determinata condizione?

La concentrazione di proteina ossigenata (FRAZIONE legata all'ossigeno,  $MbO_2$ ) rispetto alla concentrazione totale di Mb ( $Mb + MbO_2$ ), **varia al variare della concentrazione di ossigeno (ligando) fornito alla proteina**. Questo rapporto è chiamato **FRAZIONE DI SATURAZIONE DELLA Mb** (si esprime in % o in frazione)



$Y = 1$ , Mb completamente ossigenata

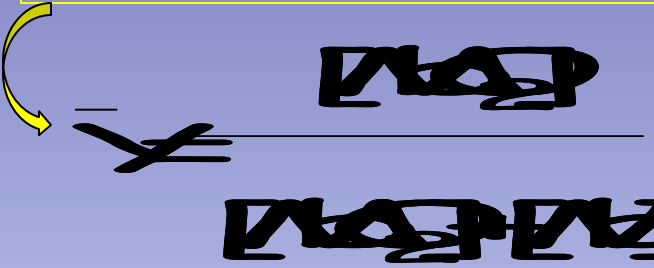
$Y = 0$ , Mb completamente deossigenata

**LA FRAZIONE DI SATURAZIONE DIPENDE DA:**

1) dalla concentrazione del ligando  $[O_2]$  che si esprime come  $pO_2$

2) dall'affinità che la proteina ha per il suo ligando, cioè dalla costante di dissociazione ( $K_{diss}$ ) del complesso  $MbO_2$

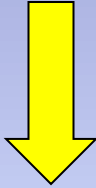
Possiamo riscrivere l'equazione in funzione della concentrazione di O<sub>2</sub> e della K<sub>diss</sub>



$$K_{diss} = \frac{[Mb] [O_2]}{[MbO_2]}$$

$$[MbO_2] = \frac{[Mb] [O_2]}{K_{diss}}$$

La [Mb] può essere raccolta al numeratore e denominatore



$$Y = \frac{\cancel{[Mb]} [O_2]}{K_{diss}} \div \left( \frac{\cancel{[Mb]} [O_2]}{K_{diss}} + \cancel{[Mb]} \right)$$

$$Y = \frac{[O_2]}{K_{diss}} \div \left( \frac{[O_2]}{K_{diss}} + 1 \right)$$

$$Y = \frac{[O_2]}{K_{diss} + [O_2]}$$

La frazione di saturazione Y, la pO<sub>2</sub>, e la K<sub>diss</sub> sono legate da una relazione matematica:

$$\bar{y} = \frac{pO_2}{K_{diss} + pO_2}$$

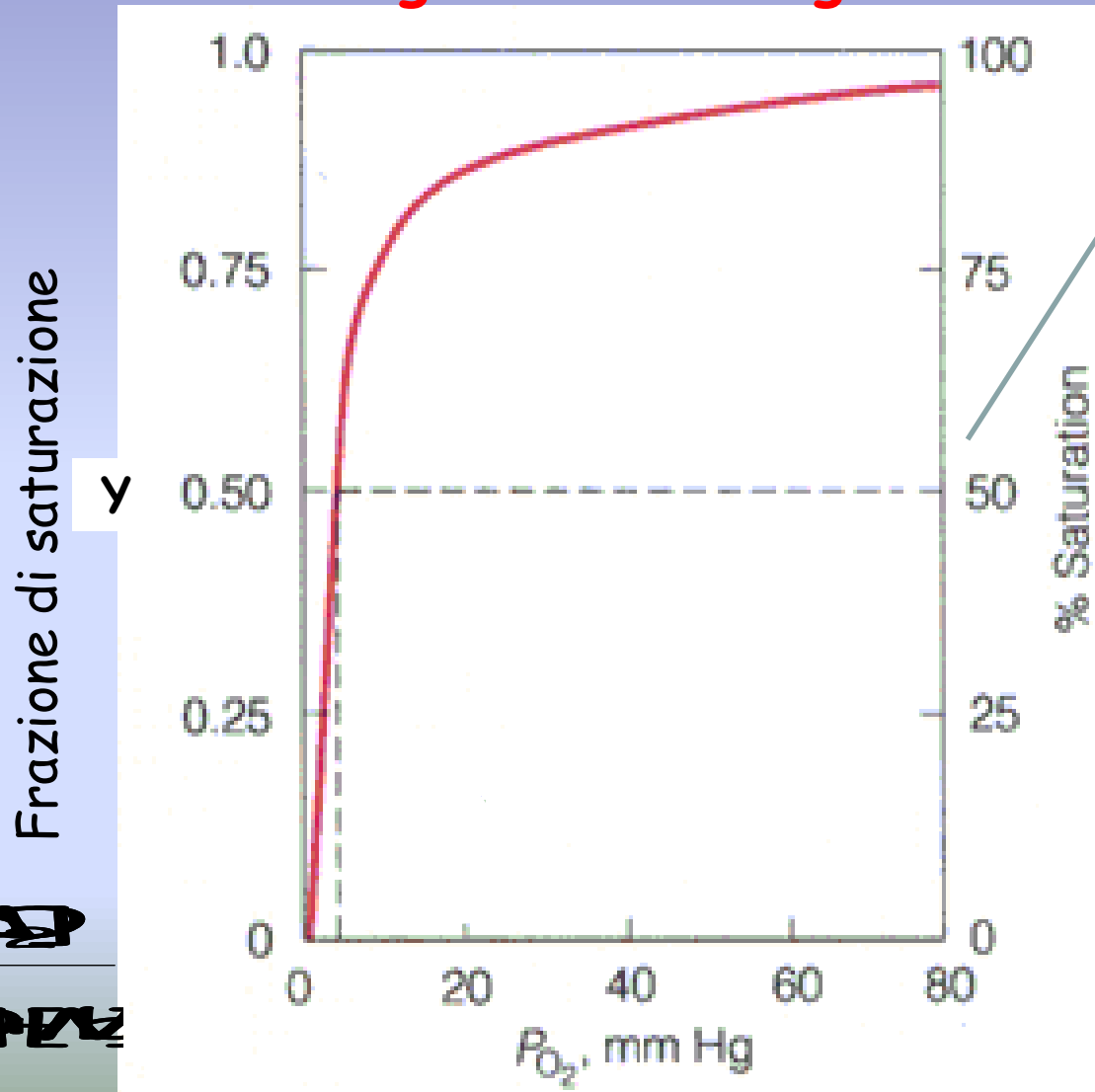
[O<sub>2</sub>] = pO<sub>2</sub> (pressione parziale di ossigeno)

Equazione che descrive una IPERBOLE RETTANGOLARE

Il grado di ossigenazione della Mb si può rappresentare graficamente con il grafico di ossigenazione: Frazione di saturazione (Y) in funzione di  $pO_2$ , la curva che si ottiene è un'iperbole

$$\bar{y} = \frac{pO_2}{K_{diss} + pO_2}$$

## CURVA di Legame dell'ossigeno alla Mb



Numero di molecole che hanno legato l'O<sub>2</sub> rispetto al totale

Una curva di legame iperbolico si ha quando i ligandi interagiscono con ciascun sito di legame in maniera indipendente

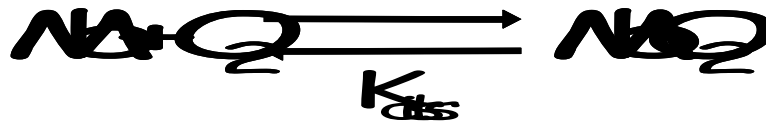
$$\bar{y} = \frac{pO_2}{K_{diss} + pO_2}$$

CASO PARTICOLARE: Quando  $\bar{y} = 0.5$  (cioè 50% della Mb è ossigenata)

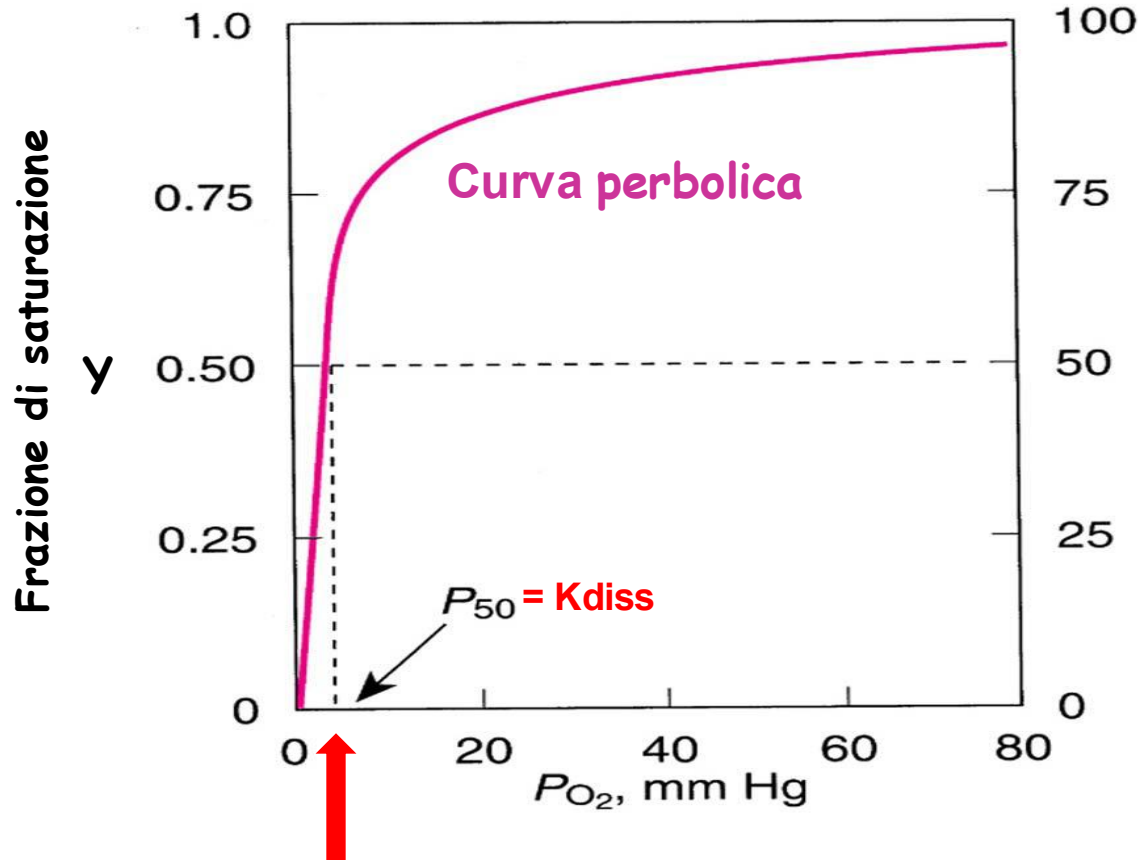
$$\begin{aligned} \rightarrow \bar{y} = \frac{1}{2} = \frac{pO_2}{K_{diss} + pO_2} &\rightarrow K_{diss} + pO_2 = 2pO_2 \rightarrow K_{diss} = 2pO_2 - pO_2 = pO_2 \\ &\downarrow \\ K_{diss} &= p50 \end{aligned}$$

la  $K_{diss}$  = quel valore di  $pO_2$  che ossigena il 50% di Mb = p50

# Legame $O_2$ -Mb



## CURVA di Legame dell'ossigeno alla Mb



$p_{50}$  della mioglobina è  $\sim 4$  mmHg,  
la sua affinità per l' $O_2$  è molto  
elevata

Numero di  
molecole che  
hanno legato l' $O_2$   
rispetto al totale

$p_{50}$  = affinità per l' $O_2$   
La pressione di  $O_2$  al quale è  
saturato il 50% delle molecole

↓

Più è piccolo il valore della  $p_{50}$   
più è piccola la  $K_{diss}$  e quindi  
maggiore l'affinità  
dell'emoproteina per l' $O_2$

La mioglobina funziona da deposito di  $O_2$  a livello muscolare. Quando il muscolo è a riposo la mioglobina rimane legata all' $O_2$ , quando il muscolo è attivo viene consumato  $O_2$  diminuisce la pressione a livello dei tessuti la mioglobina rilascia l' $O_2$

p50 della mioglobina è  $\sim 4$  mmHg, la sua affinità per l' $O_2$  è molto elevata

È una caratteristica necessaria affinché Mb sia funzionale:

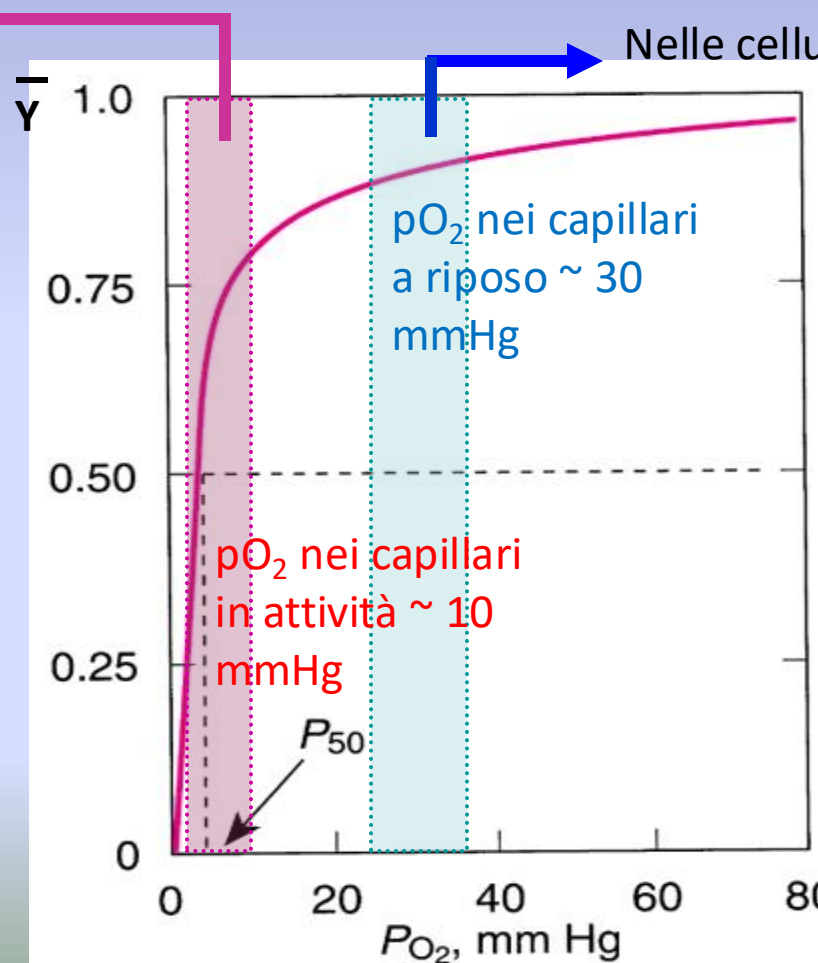
**DEVE ESTRARRE  $O_2$  DAL SANGUE E ACCUMULARLO NEL TESSUTO MUSCOLARE**

Nelle cellule muscolari metabolicamente attive:

si consuma  $O_2$ : la  $pO_2$  cellulare diminuisce

la Mb rilascia l'ossigeno che aveva legato.

Fase di deossigenazione



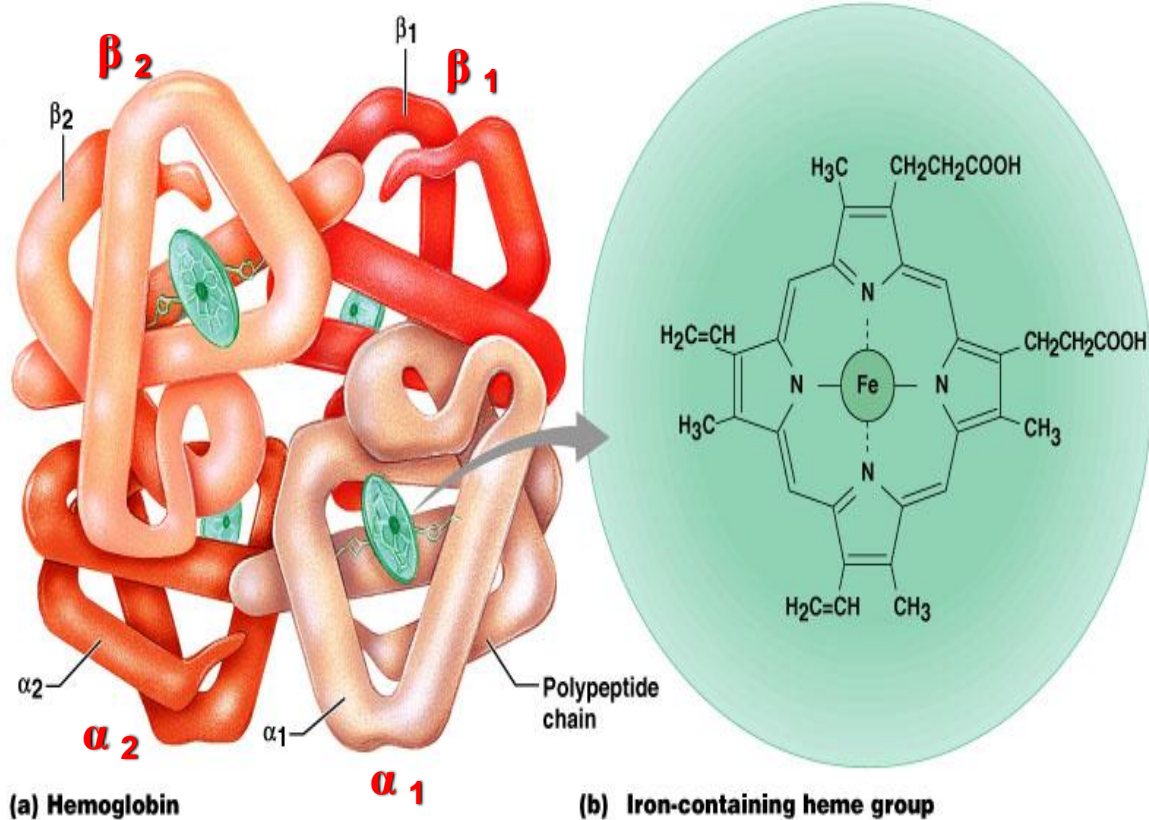
Nelle cellule muscolari a riposo:

minore consumo di  $O_2$ : la  $pO_2$  intracellulare è in equilibrio con quella del sangue capillare

Mb è quasi satura: accumula  $O_2$

Fase di ossigenazione

# EMOGLOBINA (Hb)



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

**Hb** è contenuta negli eritrociti ed è deputata al trasporto di  $\text{O}_2$  dai polmoni ai tessuti, legandosi ad esso reversibilmente. **Hb** attua anche trasporto reversibile di anidride carbonica  $\text{CO}_2$ .

**Hb** ha 4 catene polipeptidiche e 4 gruppi eme. **Hb** presenta quindi una **struttura quaternaria**.

L'**emoglobina adulta umana (HbA)** è costituita da 2 catene  $\alpha$  e 2 catene  $\beta$ , ciascuna con struttura simile a quella della mioglobina.

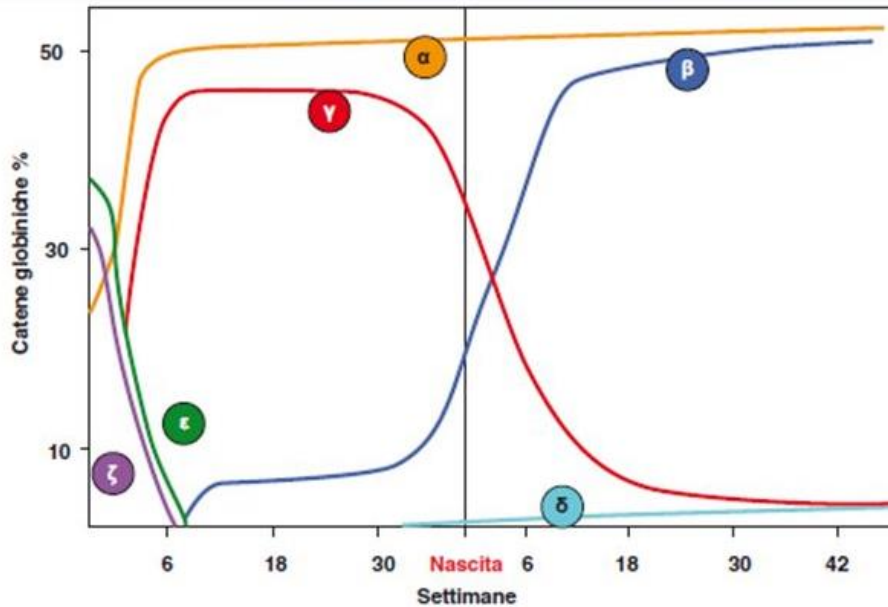
$\alpha_2 \beta_2$

L'**emoglobina fetale (HbF)** è costituita da 2 catene  $\alpha$  e 2 catene  $\gamma$ .

$\alpha_2 \gamma_2$

➔ La sostituzione delle catene  $\beta$  (Hb adulta) con catene  $\gamma$  (Hb fetale) comporta differente funzionalità.

Tipo	Composizione (catene globiniche)	Frazione dell'emoglobina totale
HbA	$\alpha_2\beta_2$	90%
HbF	$\alpha_2\gamma_2$	<2%
HbA <sub>2</sub>	$\alpha_2\delta_2$	2-5%
HbA <sub>1c</sub>	$\alpha_2\beta_2$ -glucosio	3-9%

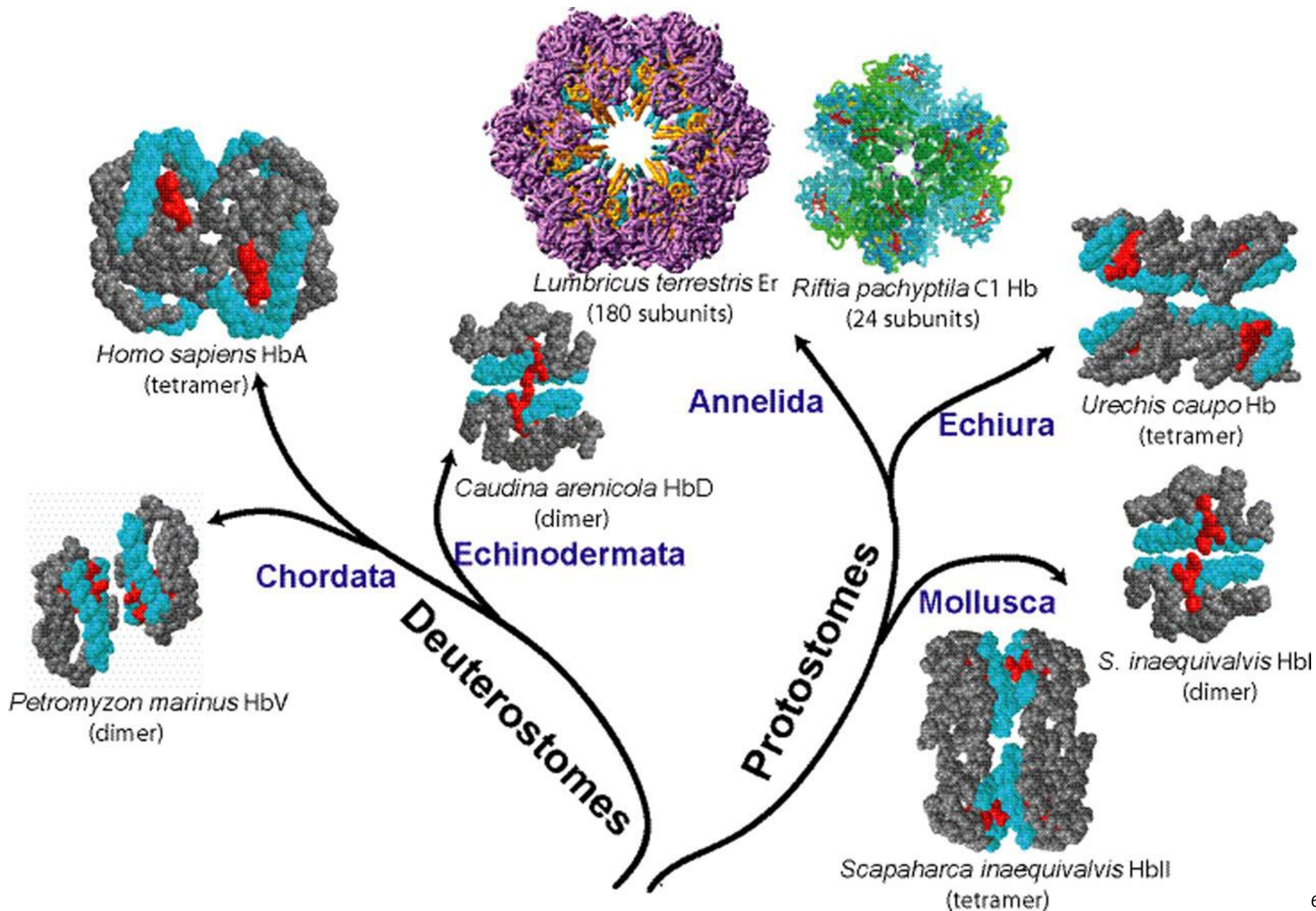


Espressione dei geni globinici durante l'ontogenesi

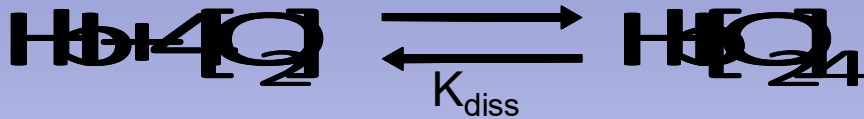
**Figura 25.35**

Entità percentuale della produzione delle diverse catene emoglobiniche nel corso della gravidanza e nel primo anno di vita.

# Diversità nelle strutture dell'EMOGLOBINE nel mondo animale



Il grado di ossigenazione della Hb ( $\bar{Y}$ ) dipende dalla  $pO_2$  e dalla  $K_{diss}$  del complesso  $Hb(O_2)_4$ .



Frazione di saturazione: % di Hb ossigenata (di siti EME occupati dall' $O_2$ ) rispetto all'Hb totale

$$\bar{Y} = \frac{[Hb(O_2)_4]}{[Hb(O_2)_4] + [Hb]}$$

$$K_{diss} = \frac{[Hb] [O_2]^4}{[Hb(O_2)_4]}$$

La Frazione di saturazione è legata alla  $pO_2$  e alla  $K_{diss}$  secondo la seguente relazione:

$$\bar{Y} = \frac{pO_2^n}{K_{diss} + pO_2^n}$$

Equazione di Hill

$$K_{diss} = p50^n$$

## Equazione di Hill

$$\bar{Y} = \frac{pO_2^n}{K_{diss} + pO_2^n}$$

$$K_{diss} = p50^n$$

$$\bar{Y} = \frac{pO_2^n}{p50^n + pO_2^n}$$

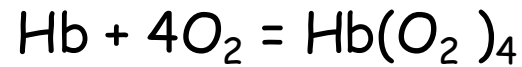
**n** è il coefficiente di Hill e può avere valori

1 (Mb)

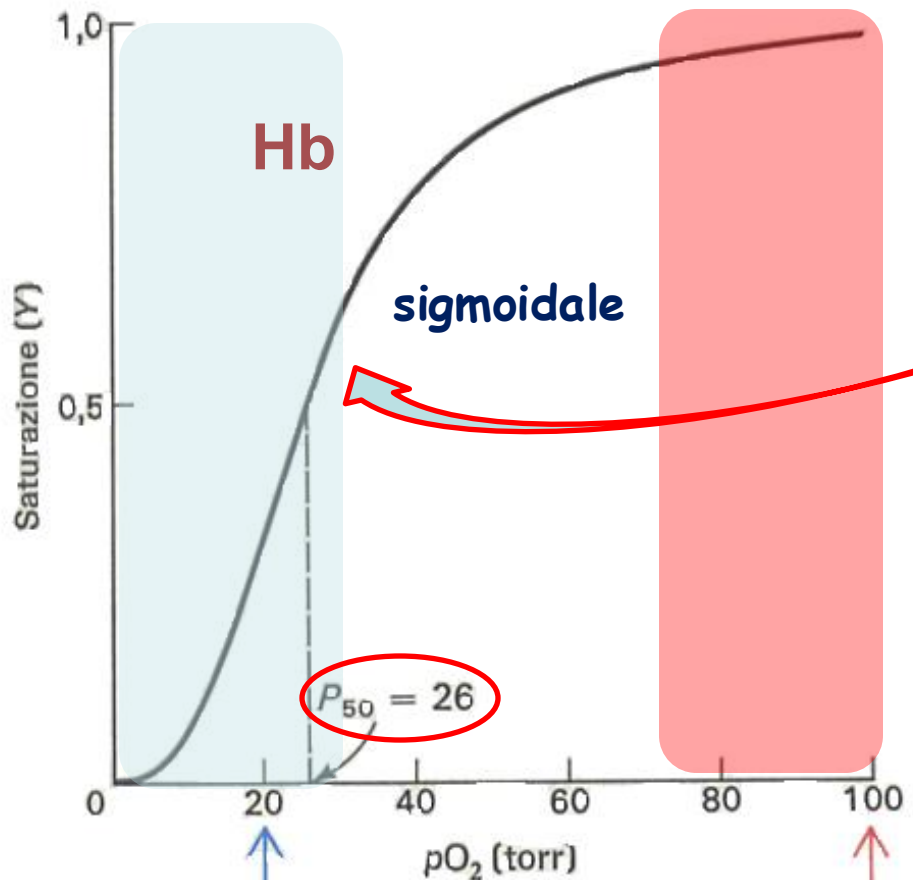
4 (Hb)

INDICA IL GRADO DI COOPERATIVITÀ TRA LE SUBUNITA'

# Curva di dissociazione dell'O<sub>2</sub> per l'emoglobina

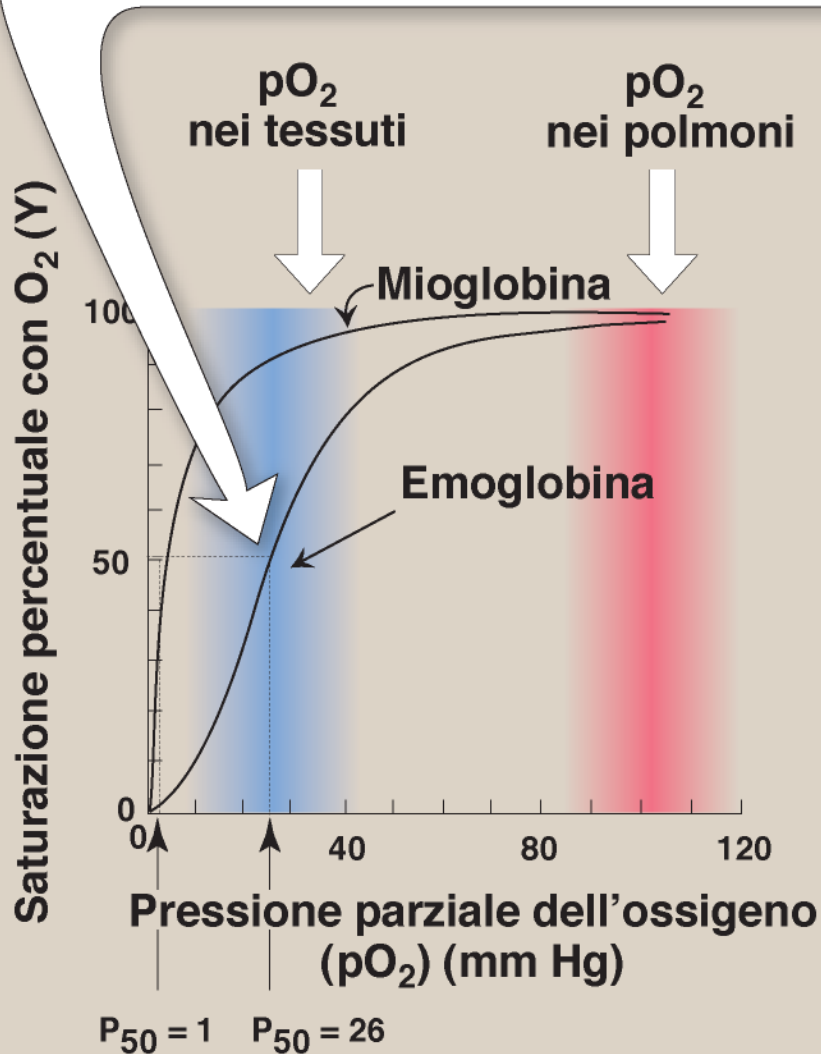


$$\bar{Y} = \frac{p\text{O}_2^n}{p50^n + p\text{O}_2^n}$$



L'emoglobina lega l'O<sub>2</sub> quando la pressione parziale del gas (pO<sub>2</sub>) è elevata (**polmoni-alta affinità**) e lo rilascia quando la pressione è bassa (**tessuti-bassa affinità**).

La parte più ripida della curva di dissociazione dell'ossigeno corrisponde alle concentrazioni di ossigeno che si verificano nei tessuti. Ciò permette la cessione dell'ossigeno in risposta a piccole variazioni della  $pO_2$ .



La mioglobina è un ottimo sistema per immagazzinare  $O_2$ :

-si lega all' $O_2$  anche a basse  $pO_2$  e lo lega strettamente.

L'emoglobina è un ottimo sistema per trasportare l' $O_2$ :

-si carica di  $O_2$  quando  $pO_2$  è alta e cede  $O_2$  quando  $pO_2$  è bassa.



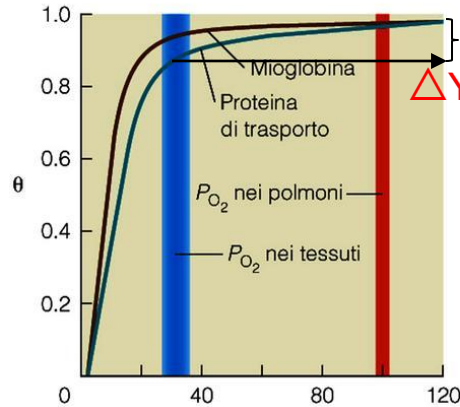
CURVA SIGMOIDALE



LEGAME COOPERATIVO

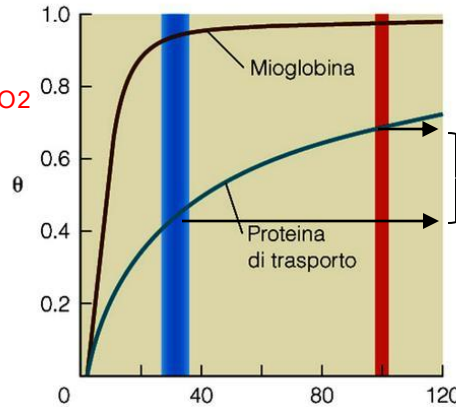
**UN TRASPORTATORE IDEALE  
DEVE ESSERE EFFICIENTE  
SIA NEL LEGAME CHE NEL RILASCIO DI OSSIGENO**

**1) Legame = efficiente  
Rilascio = inefficiente**



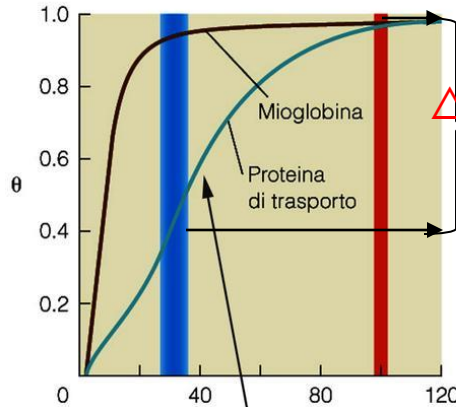
Efficace nel legare l'O<sub>2</sub>, ma inefficiente nel rilasciarlo nel muscolo = **alta affinità**

**2) Legame = inefficiente  
Rilascio = efficiente**

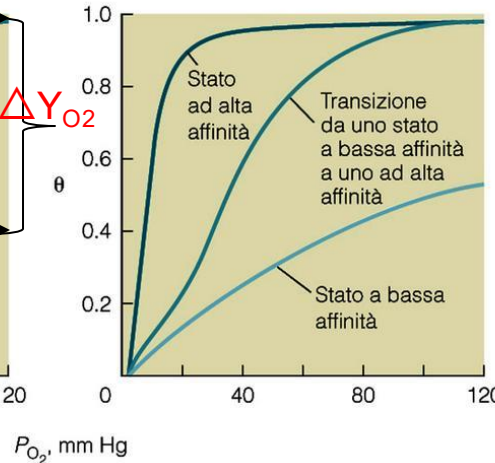


Efficace nel rilasciare l'O<sub>2</sub> nel muscolo, ma inefficiente nel legarlo nel polmone = **bassa affinità**

**Curva di dissociazione di un trasportatore ideale**

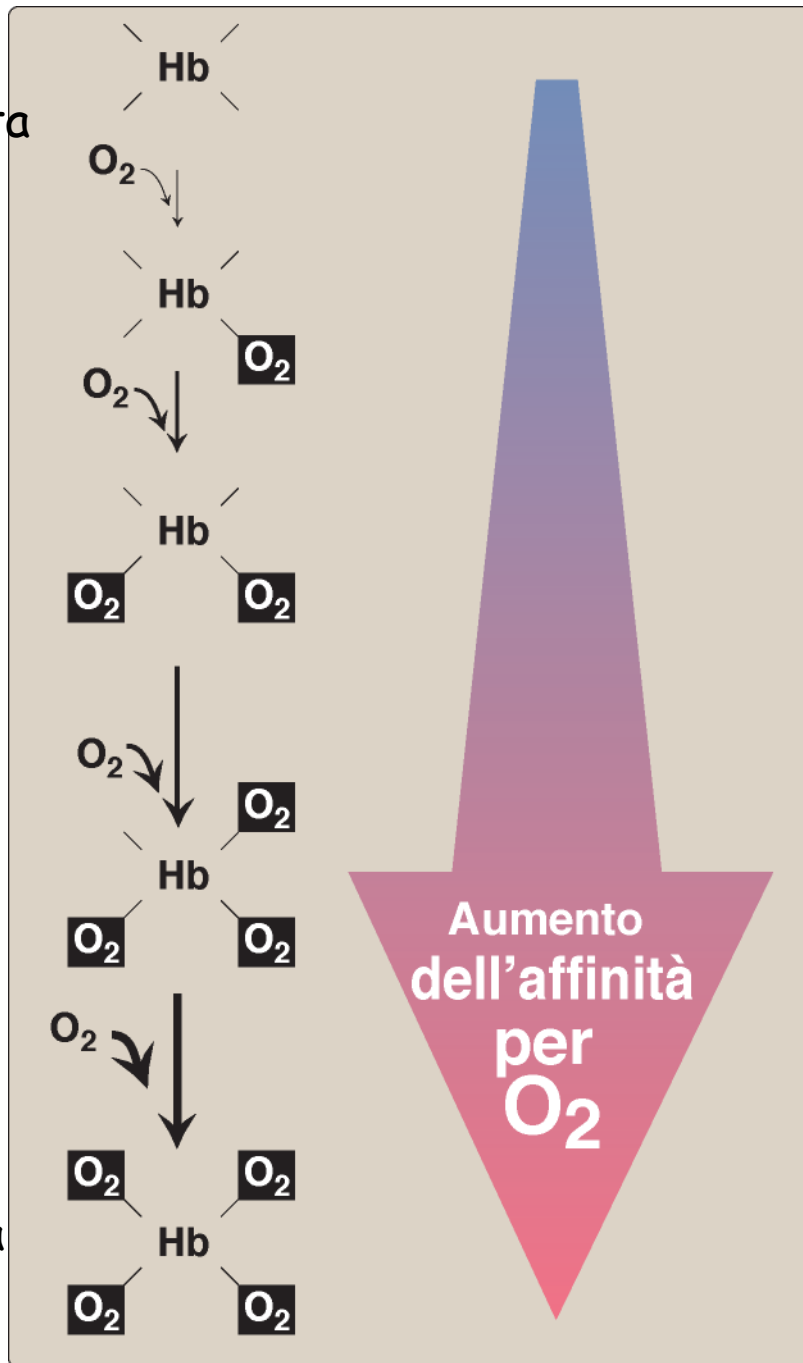


Efficace nel rilasciare l'O<sub>2</sub> nel muscolo, e nel legarlo nel polmone



**CURVA SIGMOIDE**

Emoglobina  
deossigenata

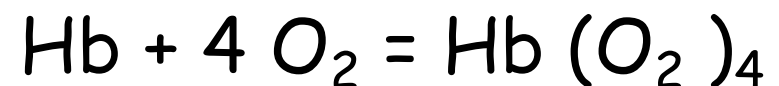


Emoglobina  
ossigenata

**CURVA SIGMOIDALE =  
LEGAME COOPERATIVO**

Il legame  
dell'ossigeno è  
cooperativo

**EMOGLOBINA si lega all'O<sub>2</sub> con  
affinità crescente**



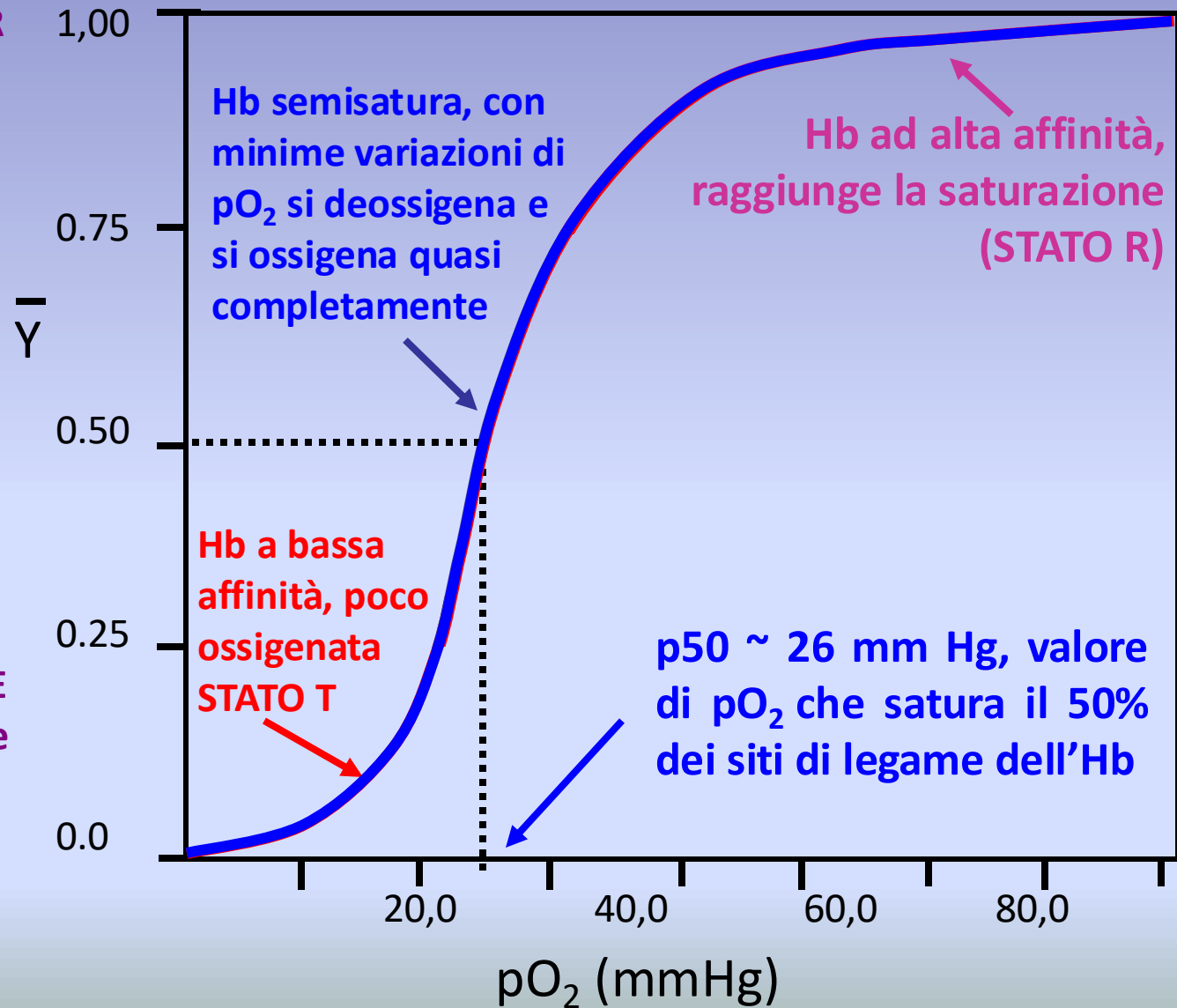
La cooperatività di legame dell'emoglobina è possibile perché lo stato di ossigenazione di un sito può essere comunicato agli altri siti (SONO COOPERATIVI) attraverso un cambiamento della struttura dell'Hb.

L'Hb passa da una struttura a bassa affinità per l'O<sub>2</sub> (DEOSSI-Hb >> stato T) ad una struttura ad alta affinità (OSSI-Hb >> stato R) in funzione della concentrazione di O<sub>2</sub> (pO<sub>2</sub>).

IL LEGAME CON L'O<sub>2</sub>  
MODIFICA LA STRUTTURA  
DELLA PROTEINA

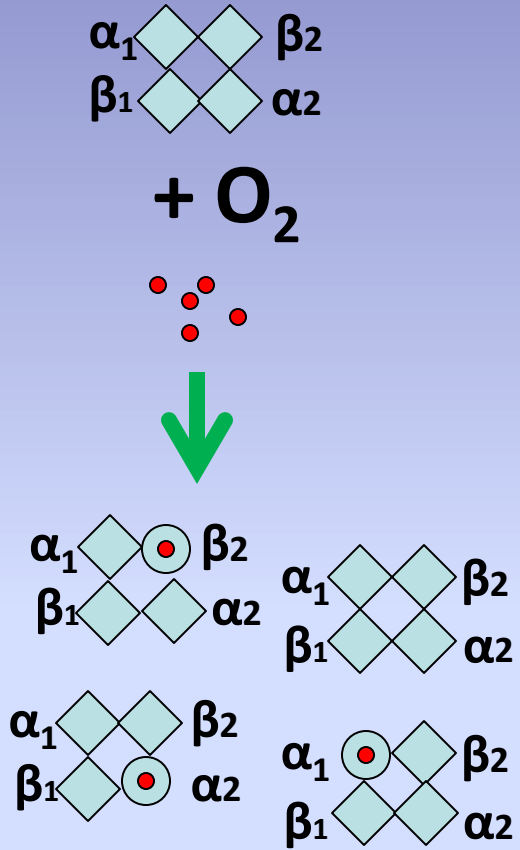
Graficamente la relazione esistente fra Y e  $pO_2$  è rappresentato da una **CURVA DI OSSIGENAZIONE SIGMOIDALE**, infatti il legame Hb/ $O_2$  è di tipo **COOPERATIVO**.

- a) L'AFFINITA' DELL'Hb PER L'OSSIGENO AUMENTA MANO A MANO CHE LE MOLECOLE DI  $O_2$  OCCUPANO I GRUPPI EME.
- b) Esiste una cooperatività positiva fra i siti di legame dell'ossigeno (fra i gruppi EME)
- c) Il legame di 1 molecola di  $O_2$  ad un gruppo EME facilita il legame di altre molecole di  $O_2$  agli altri gruppi EME



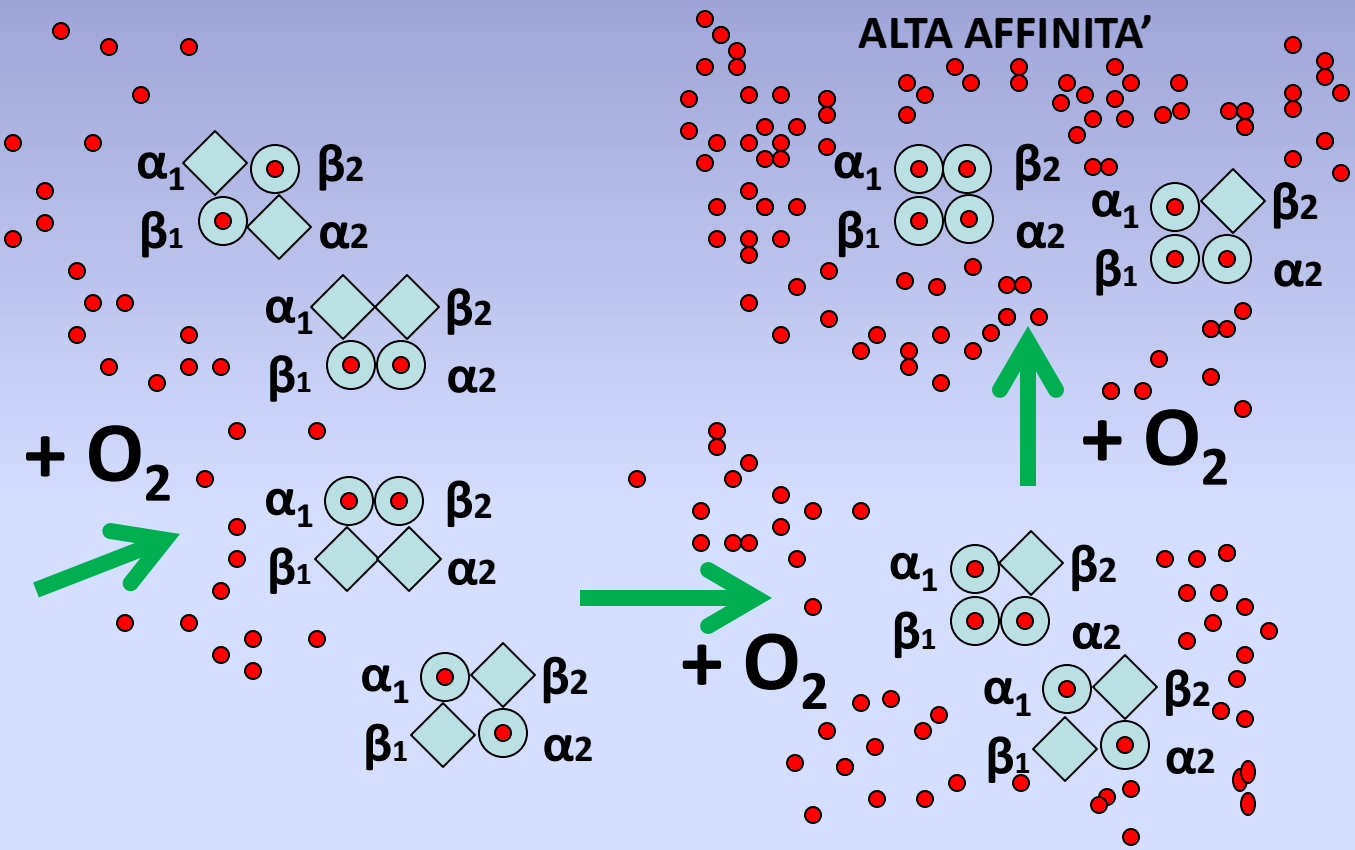
**La Transizione idealmente si completa: quando sono occupati gli ultimi siti e tutte le molecole di Hb sono nella forma ad alta affinità**

**STATO T**  
Hb a bassa affinità



Legame con la molecola di O<sub>2</sub> >> **cambia la struttura 3<sup>aria</sup>** della subunità legata

**STATO R**  
**ALTA AFFINITA'**



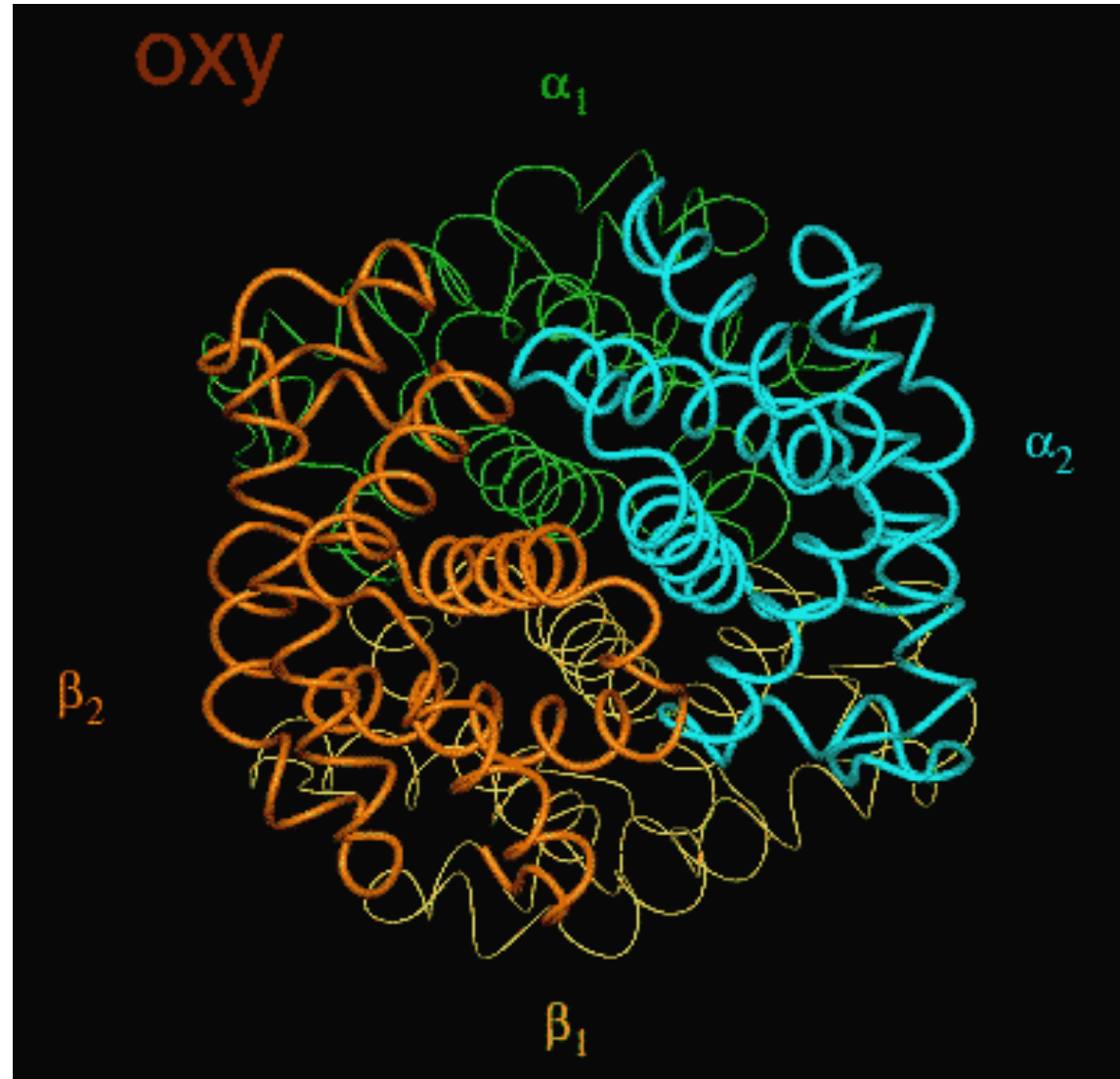
**CON LA PARZIALE OSSIGENAZIONE** (almeno un sito occupato dall'O<sub>2</sub> in ciascuno dei 2 dimeri  $\alpha\beta$ ) l'intera proteina **modifica la sua struttura 4<sup>aria</sup>** assumendo una struttura piu' disponibile ad accettare altre molecole di O<sub>2</sub>.

# Allosterismo

## (modificazione della struttura quaternaria)

È un fenomeno per cui le proteine con struttura quaternaria (emoglobina e moltissimi enzimi) possono essere modificate nella disposizione spaziale delle sub-unità costituenti.

L'emoglobina è una proteina allosterica la cui struttura quaternaria viene modificata dal legame di  $O_2$  alle 4 sub-unità: i 4 siti attivi cooperano positivamente, legando  $O_2$  con affinità crescente e questo causa cambiamento progressivo di struttura quaternaria.



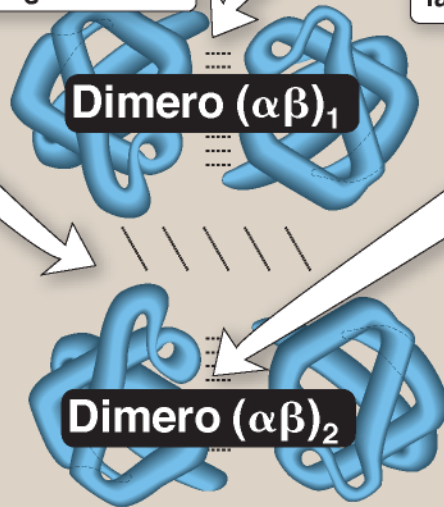
# L'emoglobina esiste in due forme:

deossigenata = T

ossigenata = R;

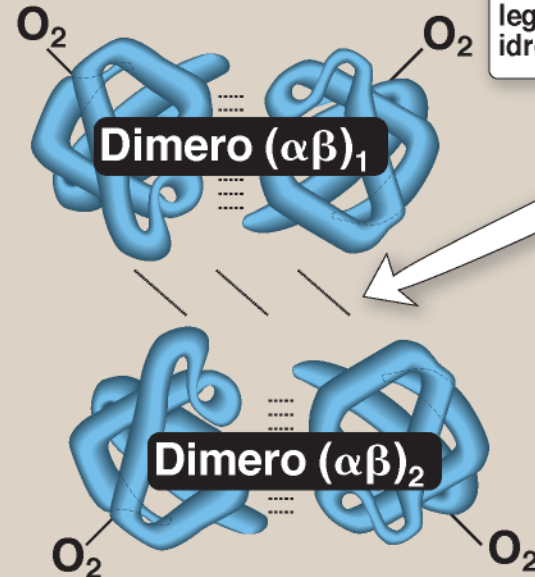
Nell'emoglobina deossigenata, tra i due dimeri  $\alpha\beta$  si stabiliscono deboli legami ionici e legami a idrogeno.

I dimeri  $\alpha\beta$  sono stabilizzati da interazioni forti, principalmente di natura idrofobica, tra la catena  $\alpha$  e la catena  $\beta$ .



Struttura "T", o tesa, della deossi-emoglobina

Nel passaggio allo stato ossigenato si rompono alcuni dei legami ionici e a idrogeno tra i dimeri  $\alpha\beta$ .

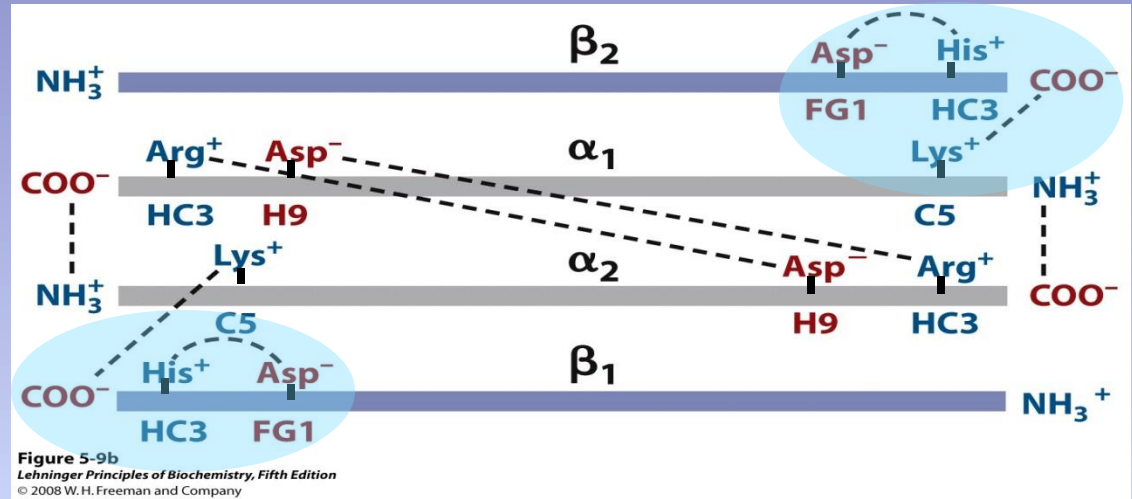


Struttura "R", o rilassata, della ossiemoglobina

Il legame di **Hb** con  $O_2$  induce una modificazione strutturale. La proteina passa da una **forma tesa T**, mantenuta da interazioni ioniche (ponti salini) fra catene laterali di aminoacidi (es. Asp-His) presenti nelle sub-unità, a una **forma rilassata R** (ponti salini spezzati). Il fenomeno avviene in direzione opposta quando l'emoglobina rilascia l'ossigeno.

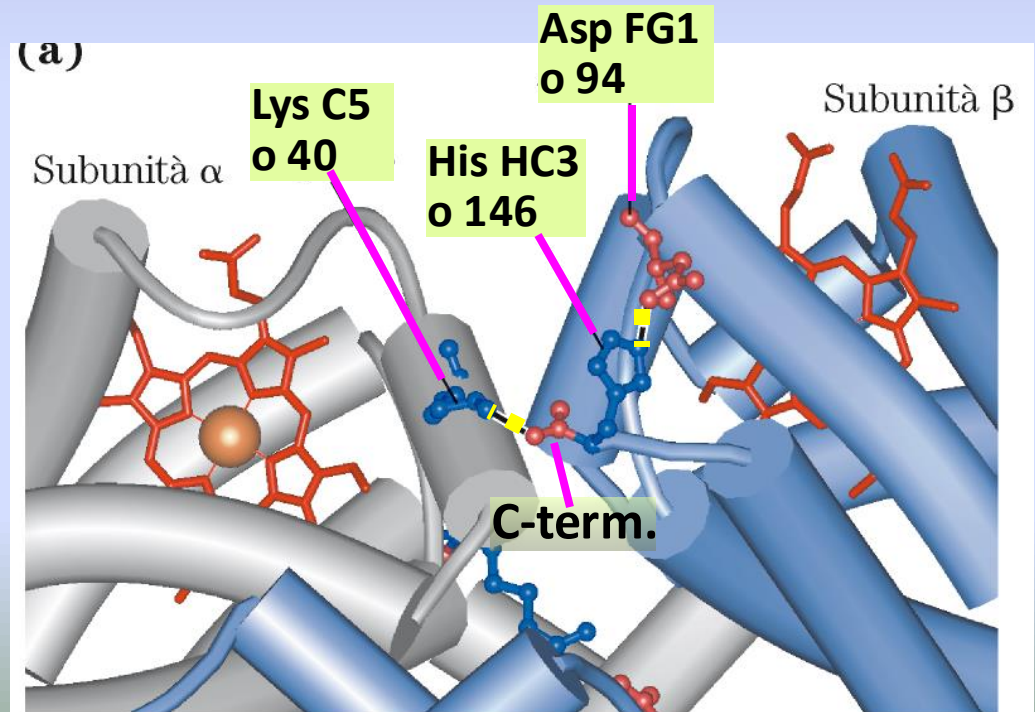
# COSA SUCCEDDE ALLA STRUTTURA DELLA EMOGLOBINA QUANDO AVVIENE LA TRANSIZIONE T $\leftrightarrow$ R?

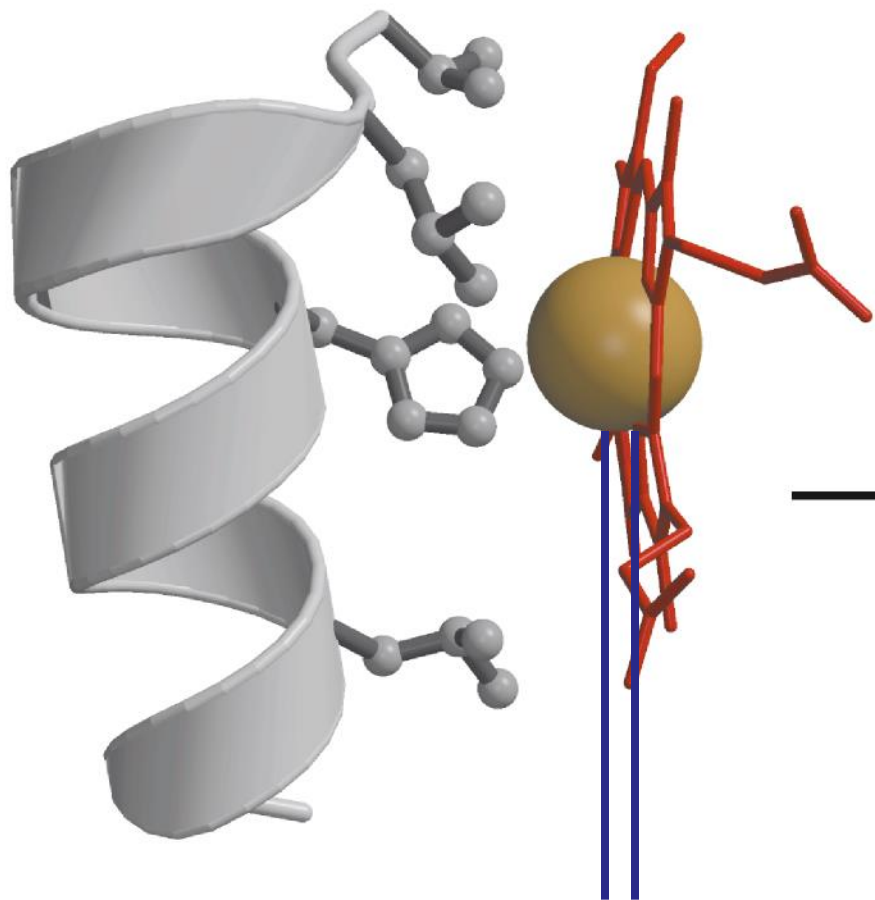
LA DEOSSI-Hb (STATO T) È STABILIZZATA DA UNA RETE DI LEGAMI IDROGENO E INTERAZIONI IONICHE INTRA- E INTER-CATENA.



DURANTE LA TRANSIZIONE T>R SI ROMPONO ALCUNI LEGAMI nell'interfaccia  $\alpha_1/\beta_2$  e  $\alpha_2/\beta_1$ :

- fra l'His146 e Asp94 delle catene  $\beta$
- fra la Lys40 delle catene  $\alpha$  e l'estremità  $\text{COO}^-$  delle catene  $\beta$



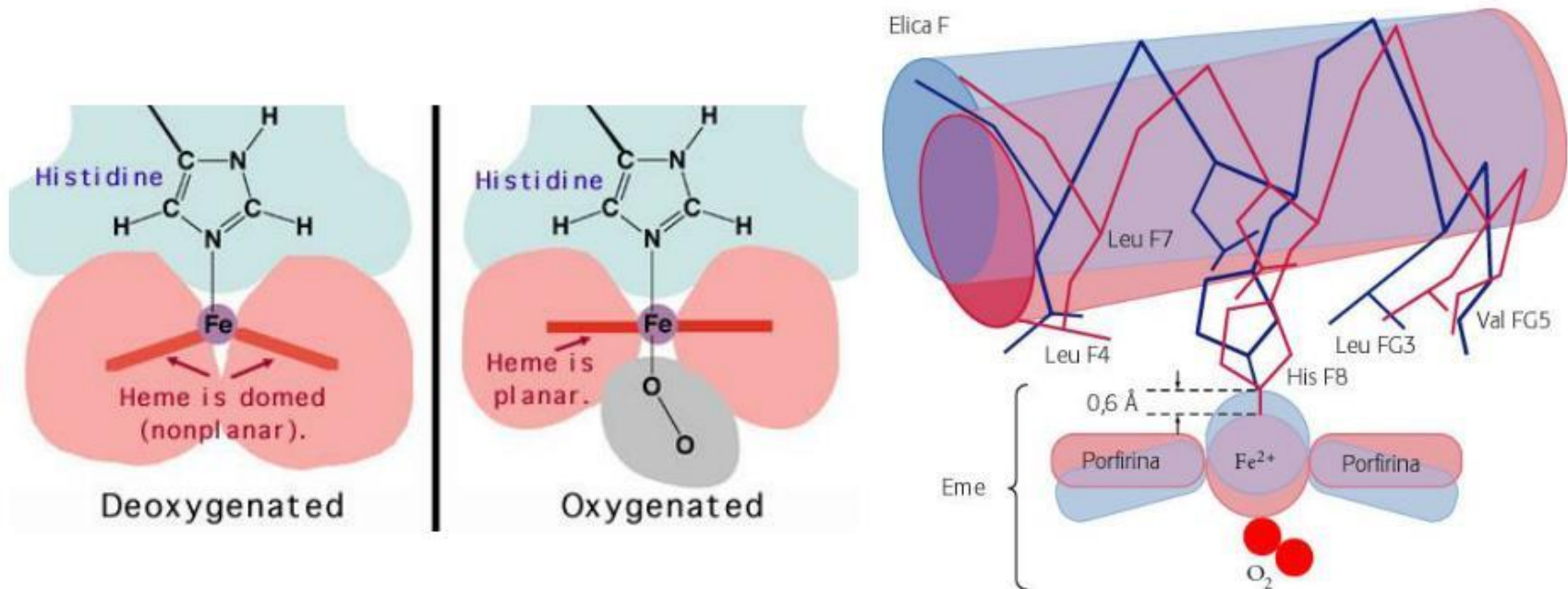


**Stato T**

0.6 A

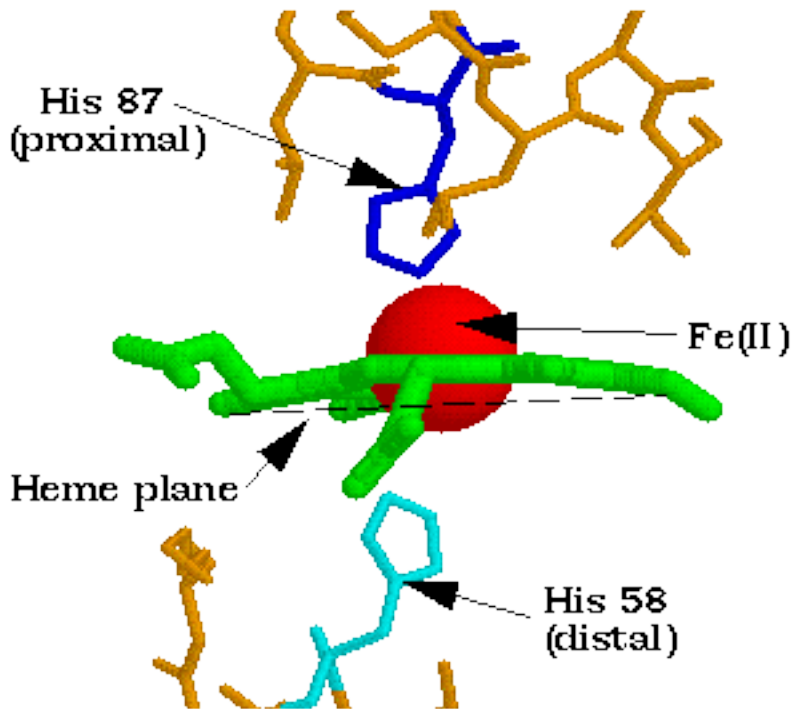
# Legame dell'ossigeno all'eme

- Il legame dell'ossigeno al  $\text{Fe}^{\text{II}}$  dell'eme determina variazioni conformazionali della struttura terziaria che avvengono senza restrizioni

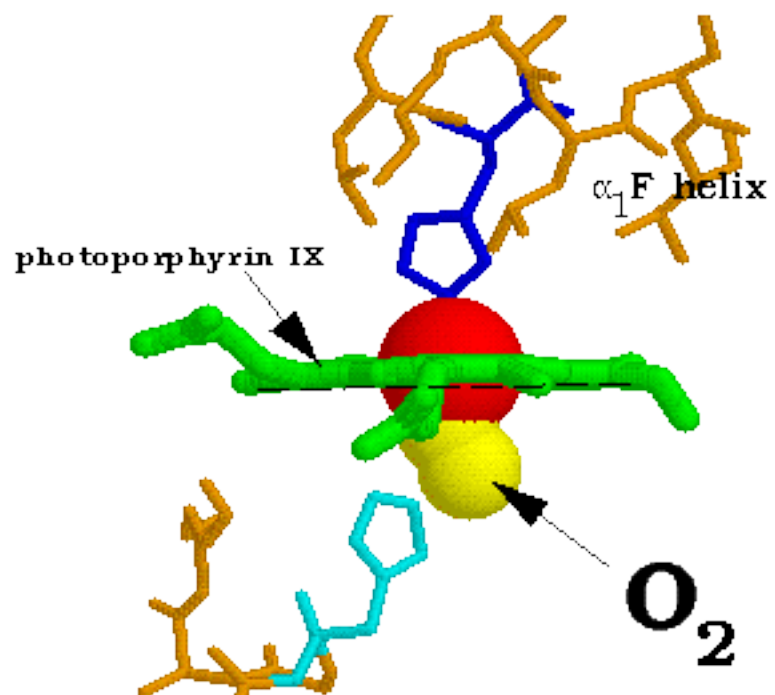


- La situazione sarebbe diversa in una struttura quaternaria!!

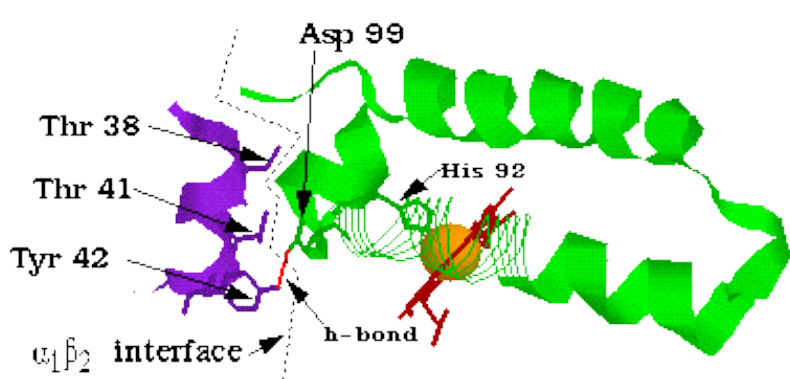
# T-state



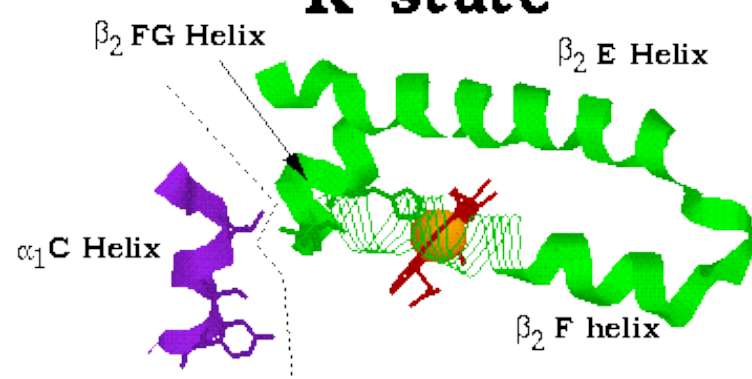
# R-state



# T-state



# R-state



## L'Hb è una proteina ALLOSTERICA.

1) Ha più siti di legame per il suo ligando

1) Il ligando è un effettore omoallosterico: occupando uno dei siti di legame della proteina influisce sull'affinità degli altri siti liberi

2) Il legame proteina/ligando causa sempre una modificazione della struttura 3<sup>aria</sup> e anche della struttura 4<sup>aria</sup> della proteina che modifica la sua affinità nei confronti del ligando stesso.

3) Ha siti di legame per altri ligandi che agiscono come molecole regolatrici (effettori eteroallosterici) che influenzano l'affinità della proteina verso il suo ligando

4) La modulazione e il legame proteina/effettori è sempre  
**REVERSIBILE**

➤ Esiste la possibilità di regolazione del legame di  $O_2$  ad **Hb** da parte di piccole molecole e ioni, presenti negli eritrociti, definiti **EFFETTORI O**

**MODULATORI**: [ $H^+$ ],  $CO_2$ , **acido 2,3 bisfosfoglicerico (2,3-BPG)**

➤ si legano con interazioni deboli in siti diversi da quello di legame dell' $O_2$  (MODULATORI ETEROTROPICI)

➤ diminuiscono l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno. Sono così **MODULATORI ETEROTOPICI NEGATIVI**.

**L'aumento di concentrazione di questi effettori causa diminuzione di affinità di Hb per  $O_2$  per cui agiscono come effettori negativi e stabilizzano la forma T.**

Regolano la transizione allosterica tra stato ad alta affinità e bassa affinità, aumentando l'efficienza dell'Hb nel rilasciare ossigeno ai tessuti.

Il legame di **Hb** con  $O_2$  è fortemente influenzato dal pH e dalla  $pCO_2$ .

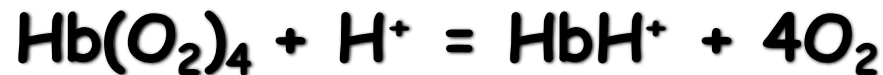
pH plasma = 7.4, ma nei **tessuti** il pH è basso (aumentano gli  $H^+$ ) e la  $pCO_2$  è alta, l'affinità di Hb per  $O_2$  diminuisce,  $O_2$  viene liberato e

**$H^+$  e  $CO_2$  si legano ad Hb.**

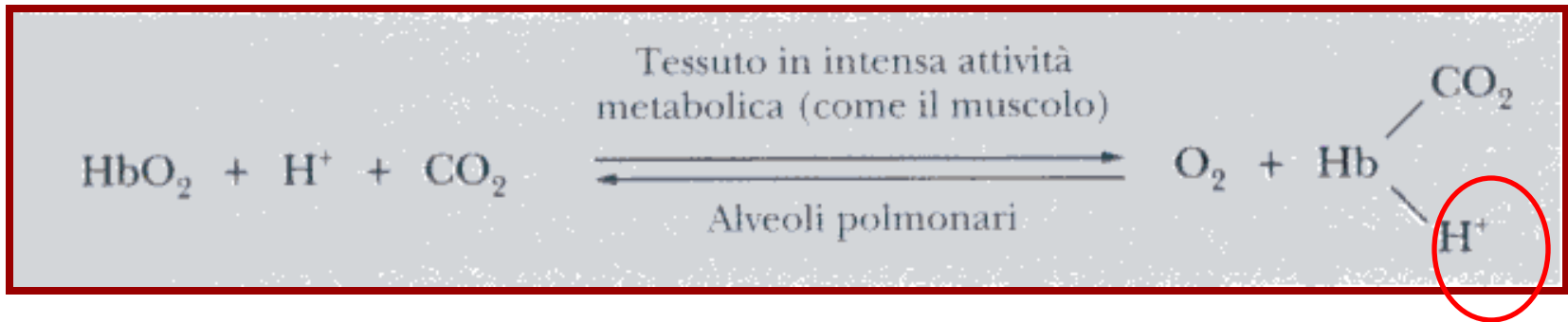
Il contrario avviene nei capillari polmonari.

L'effetto del pH e della  $CO_2$  sull'affinità di Hb per  $O_2$  è denominato

**effetto Bohr:**



Nei tessuti  $Hb(O_2)_4$  perde affinità per  $O_2$ , lo rilascia a causa delle basse  $pO_2$  e, essendo la forma deossigenata più affine per  $H^+$ , si comporta come un ottimo tampone intracellulare (azione di alcuni residui di istidina). L'azione tampone si accompagna al trasporto dell'anidride carbonica.



**Gli ioni  $\text{H}^+$  si legano a 3 coppie di siti sull'Hb: la più nota è l'His 146 delle catene  $\beta$  nei tessuti ad elevato metabolismo, come nei muscoli in attività in cui c'è una notevole produzione di composti acidi e di  $\text{CO}_2$ , l'Hb cede più facilmente l' $\text{O}_2$  e lega gli  $\text{H}^+$  e la  $\text{CO}_2$ . Nei polmoni avviene esattamente il contrario.**

PH polmoni = 7.6; pO<sub>2</sub> = 100 mmHg  
 PH tessuti = 7.2; pO<sub>2</sub> = 20 mmHg

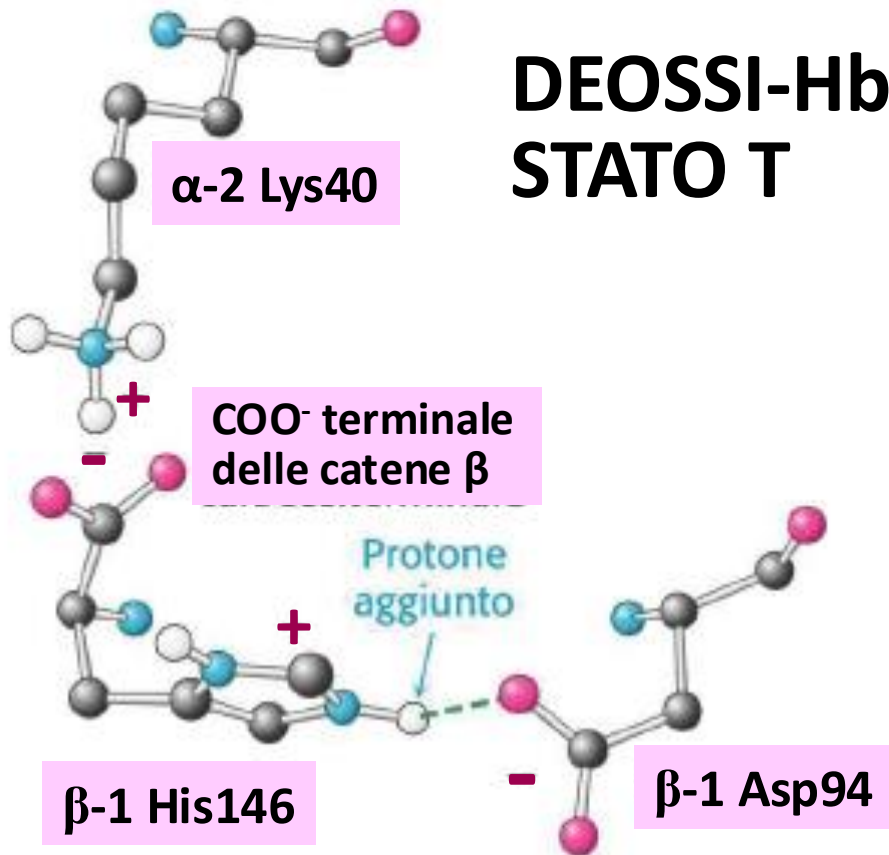
# COME SPIEGARE IL MECCANISMO DELL'EFFETTO BOHR?

La DEOSSI-Hb ha una maggiore tendenza a protonarsi della OSSI-Hb, ha un pI più alto.

L'Hb ha vari siti di legame per gli ioni  $H^+$  come:

- 1) ammino-gruppi N-terminali delle catene alfa
- 2) His 146, residuo C-terminale, delle catene  $\beta$ .

## DEOSSI-Hb STATO T



Nei tessuti la formazione di acido lattico riduce il pH (7.2). Quando l'Hb inizia a deossigenarsi,



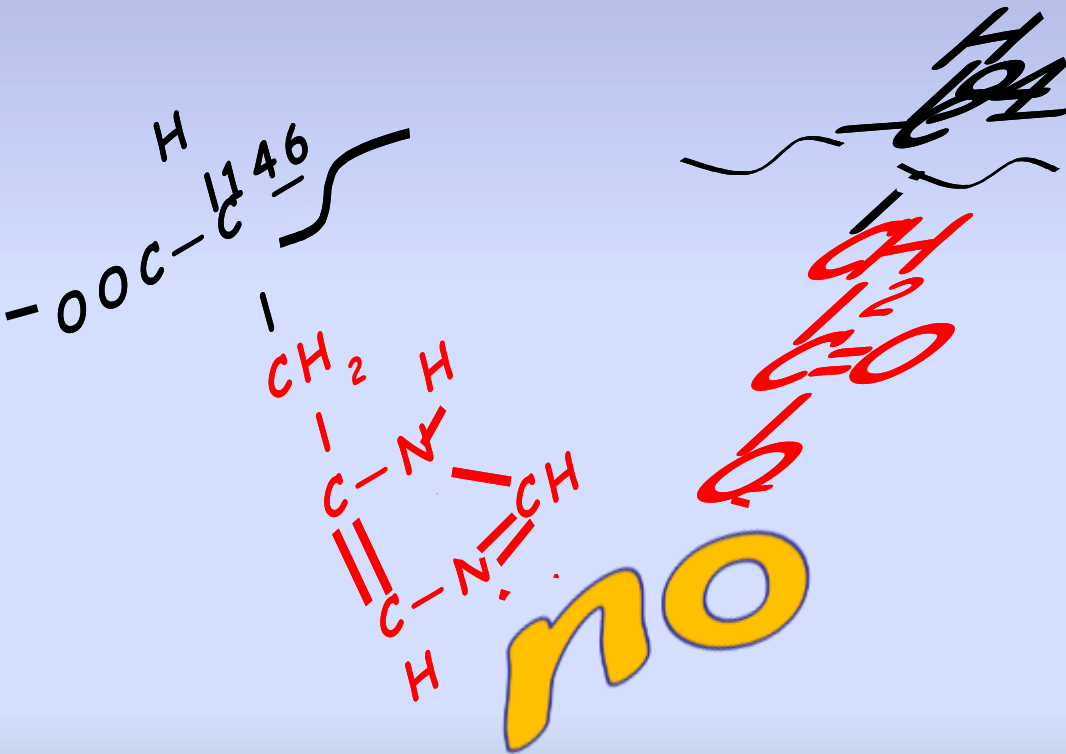
L'His-146, acquista un  $H^+$ , e protonata forma un ponte salino intra-catena con l'Asp 94, che stabilizza la forma deossi-Hb (stato T)

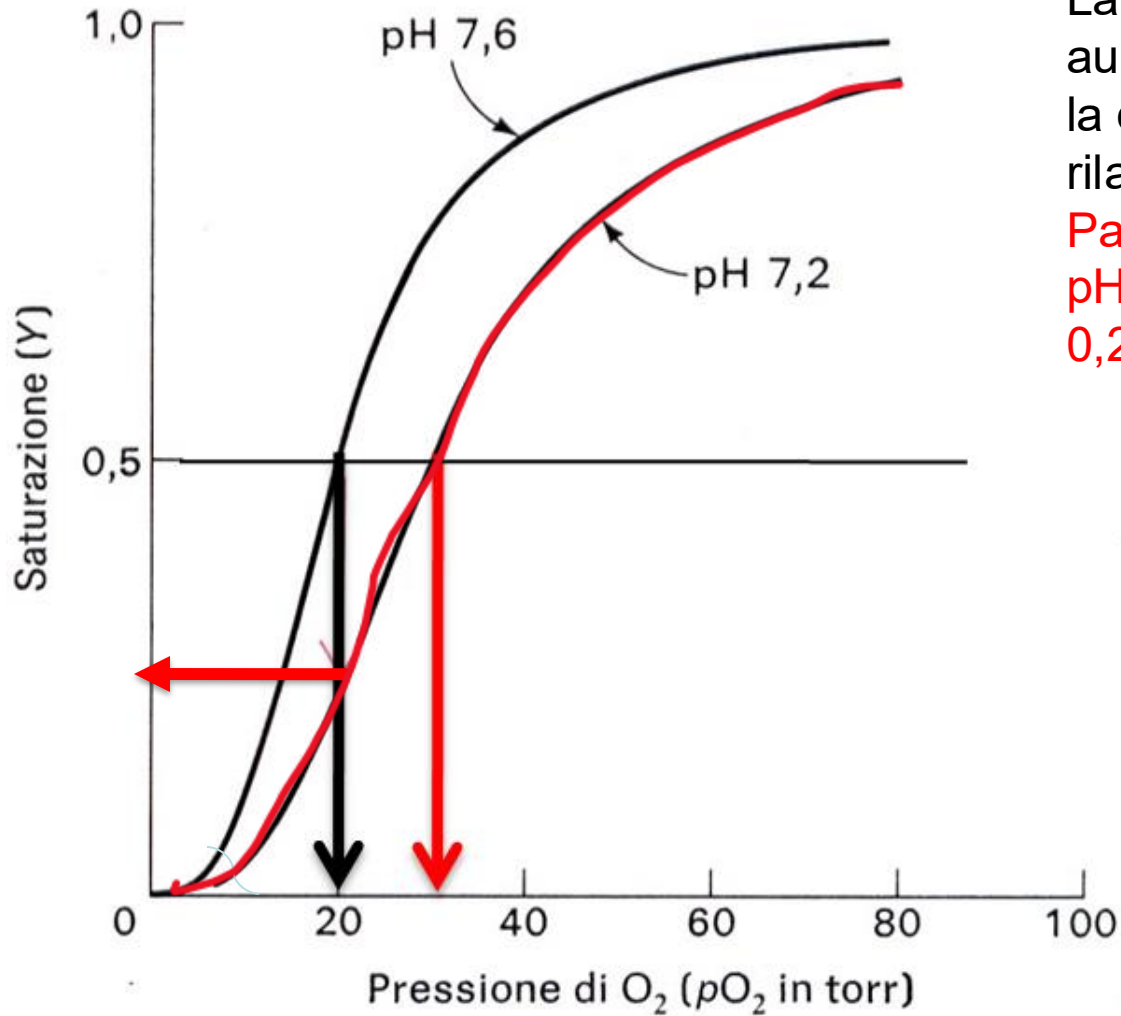
A livello polmonare l'Hb inizia a legare O<sub>2</sub>: inizia la transizione allosterica (T > R), l'His-146 delle catene β si deprotona

Nei capillari polmonari il pH è ~7.6, nel torrente circolatorio è ~7.4 (**maggiore rispetto al pK<sub>R</sub> dell'His-146**).

L'His-146 si trova nella sua forma DEPROTONATA e NON può formare il ponte salino con l'Asp 94

Questo contribuisce al cambiamento strutturale che favorisce l'ossigenazione completa della Hb.





La riduzione di pH  
aumenta notevolmente  
la quantità di O<sub>2</sub>  
rilasciata nei tessuti:  
Passando da pH 7.6 a  
pH 7.2 Y passa da 0,5 a  
0,25

In aggiunta al trasporto di  $O_2$  dai polmoni ai tessuti, Hb trasporta anche due prodotti della respirazione,  $H^+$  e  $CO_2$ , dai tessuti ai polmoni ed ai reni, organi deputati alla loro escrezione.

## Trasporto della $CO_2$

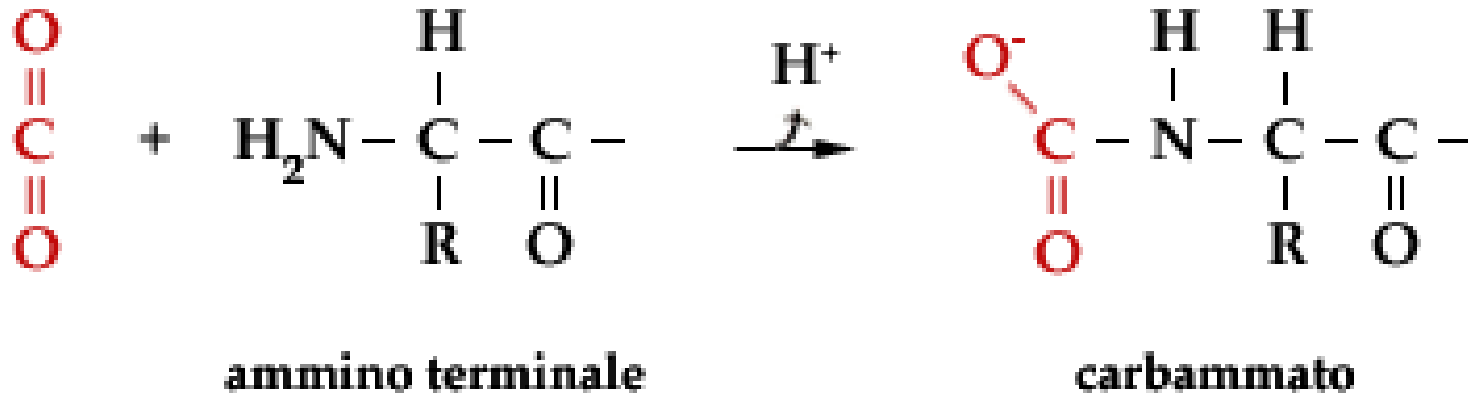
•  $CO_2$  liberamente disciolta nel plasma

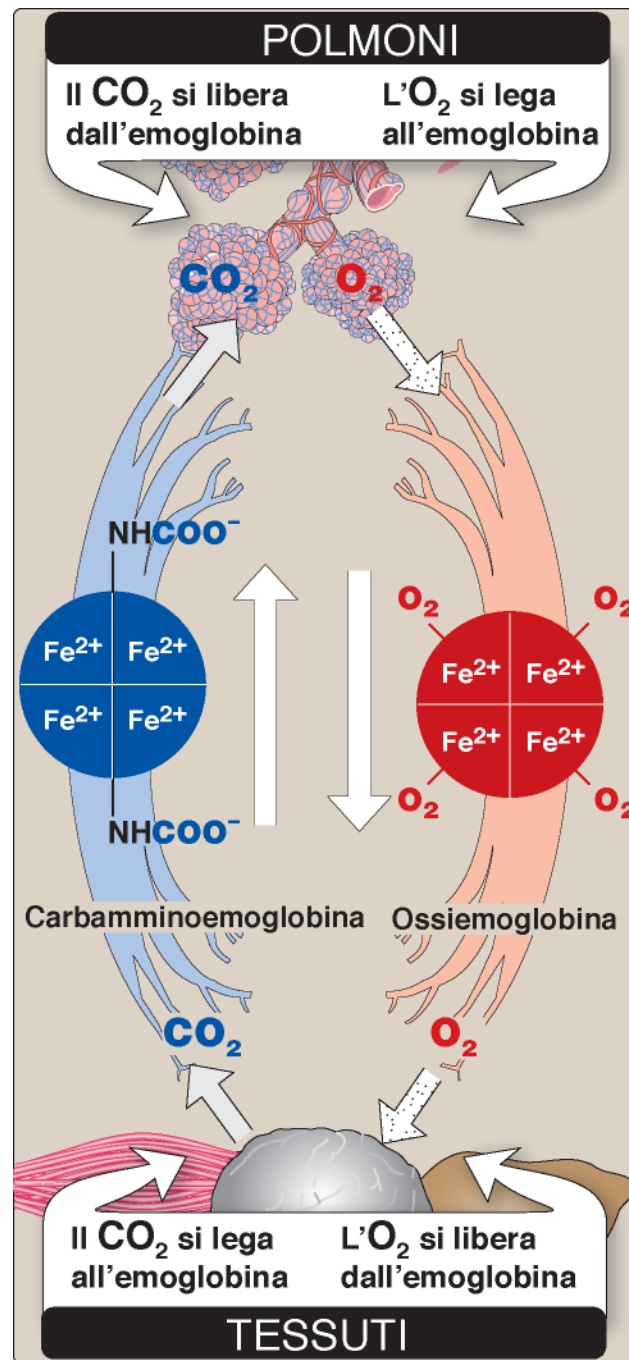
1) **disciolta**: obbedisce alla Legge di Henry come l' $O_2$  ma è 20 volte più solubile di questo. In questa forma costituisce il 10% del gas liberato dal sangue venoso nel polmone.

•  $CO_2$  trasportata come carbammati (5-15%)

•  $CO_2$  trasportata come bicarbonato

**2) Parte della CO<sub>2</sub> si lega all'Hb nelle estremità N-terminali libere delle catene globiniche formando CARBAMMATI = gruppi carichi negativamente che stabiliscono interazioni elettrostatiche con i residui carichi positivamente stabilizzando la forma T**





## TESSUTI

La maggior parte della  $\text{CO}_2$  che diffonde nelle emazie reagisce con l' $\text{H}_2\text{O}$  formando  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , grazie alla presenza di un enzima, **l'anidrasi carbonica** (P.M. 30000, contiene Zn)

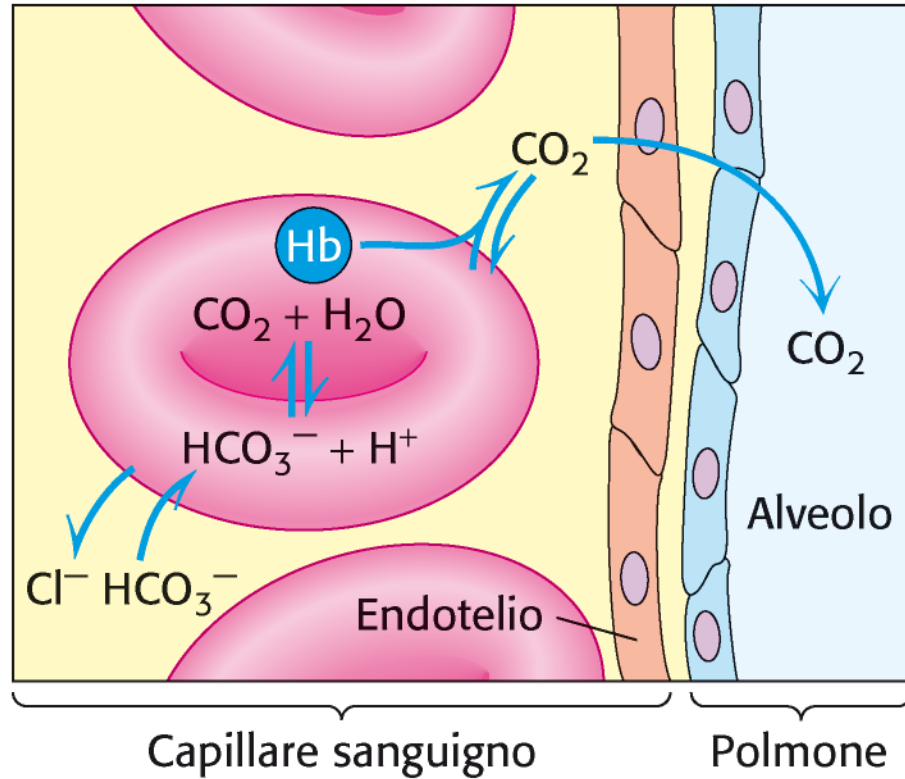
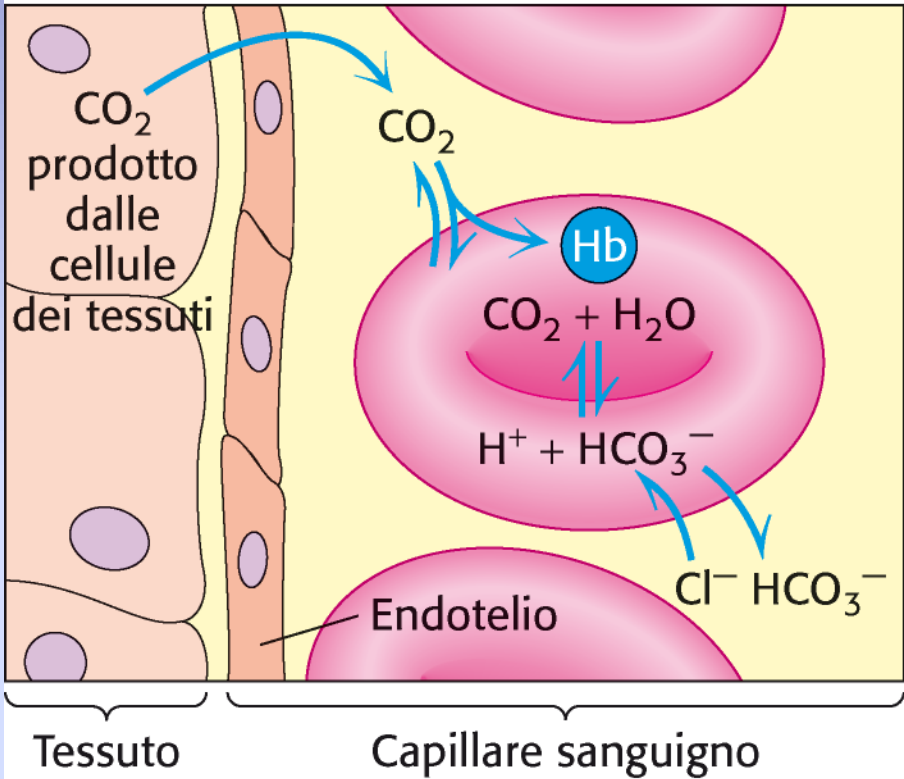


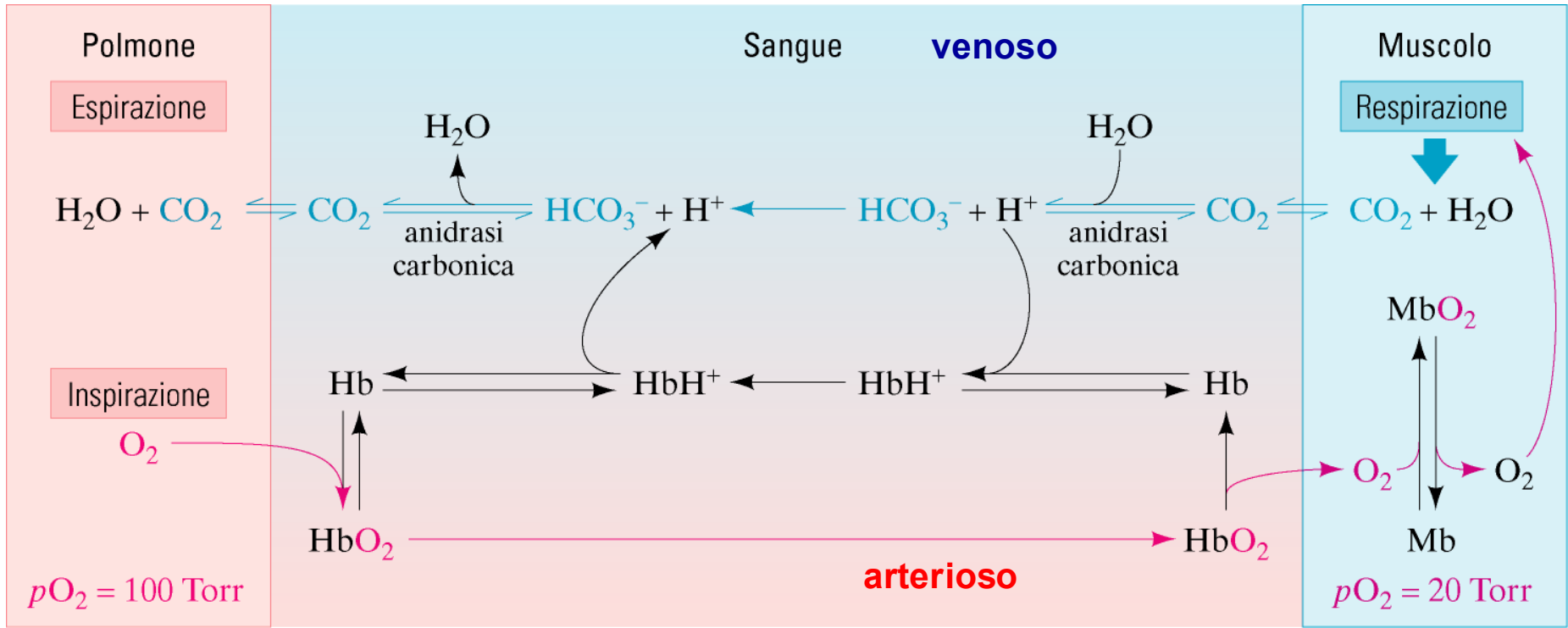
**Legati all'Hb**



**passano dal globulo rosso al plasma attraverso una proteina di membrana**

**Gli ioni  $\text{H}^+$  si legano alla DEOSSI-Hb (che più basica della forma OSSI-Hb ed è quindi un accettore di protoni migliore)**

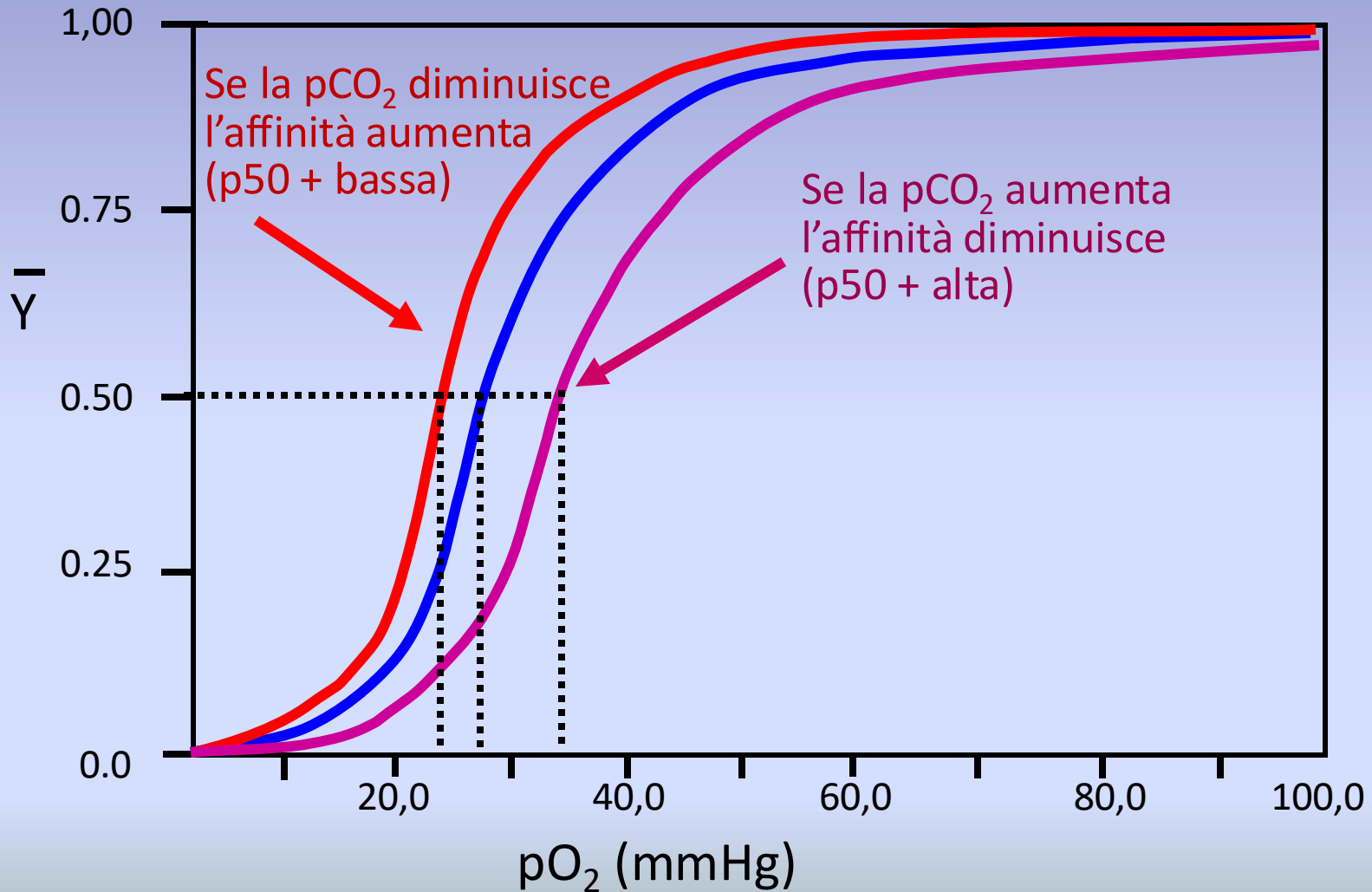




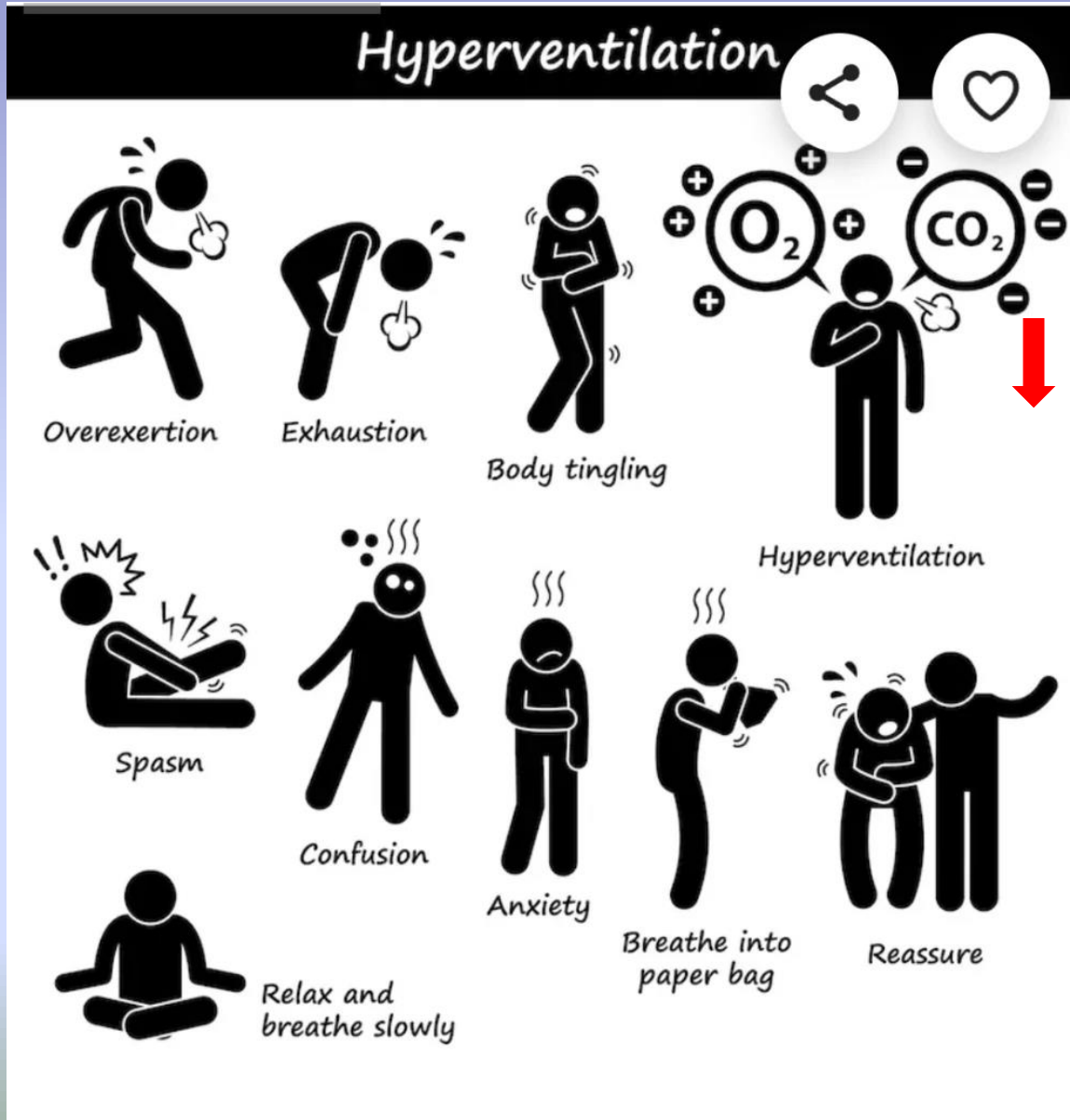
**CO<sub>2</sub>**



**Effettore allosterico  
negativo per l'Hb**

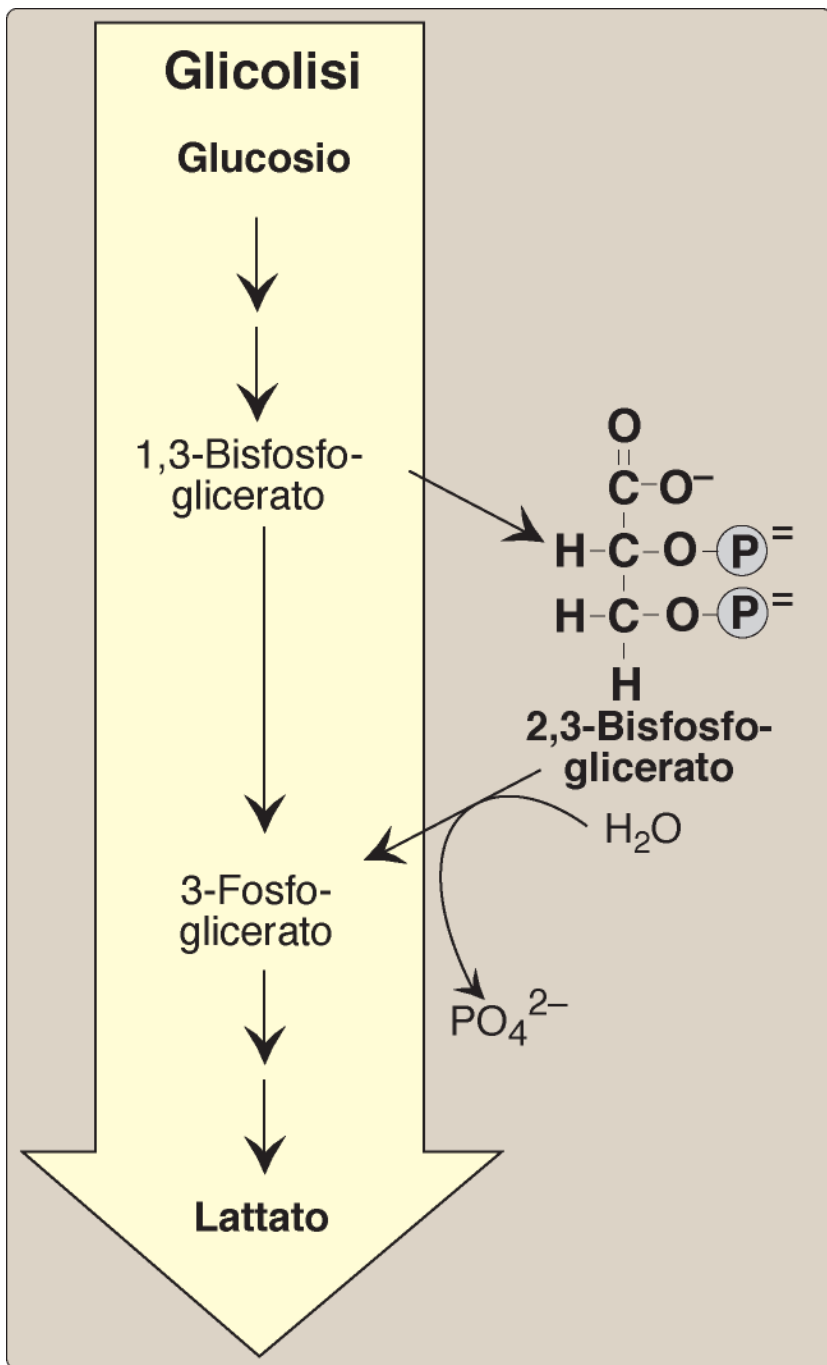


# IL RUOLO DELLA CO<sub>2</sub> NELLA STIMOLAZIONE DEL RILASCIO DI O<sub>2</sub> SI APPREZZA IN CASO DI **IPERVENTILAZIONE**



Se diminuisce la concentrazione di CO<sub>2</sub>, diminuisce anche il rilascio di ossigeno a livello tissutale: (AUMENTA L'AFFINITÀ dell'Hb per l'O<sub>2</sub>)





➤ Il **2,3 BPG** è una piccola molecola dotata di cariche **negative** che consente il legame a una serie di cariche **positive** di catene laterali di AA situati sulle **due catene β**, formando ponti salini e stabilizzando la forma T.

➤ Il **sito** per il **2,3 BPG** è presente solo nella **forma tesa T**.

➤ si lega una sola molecola di **2,3 BPG** per tetramero emoglobinico

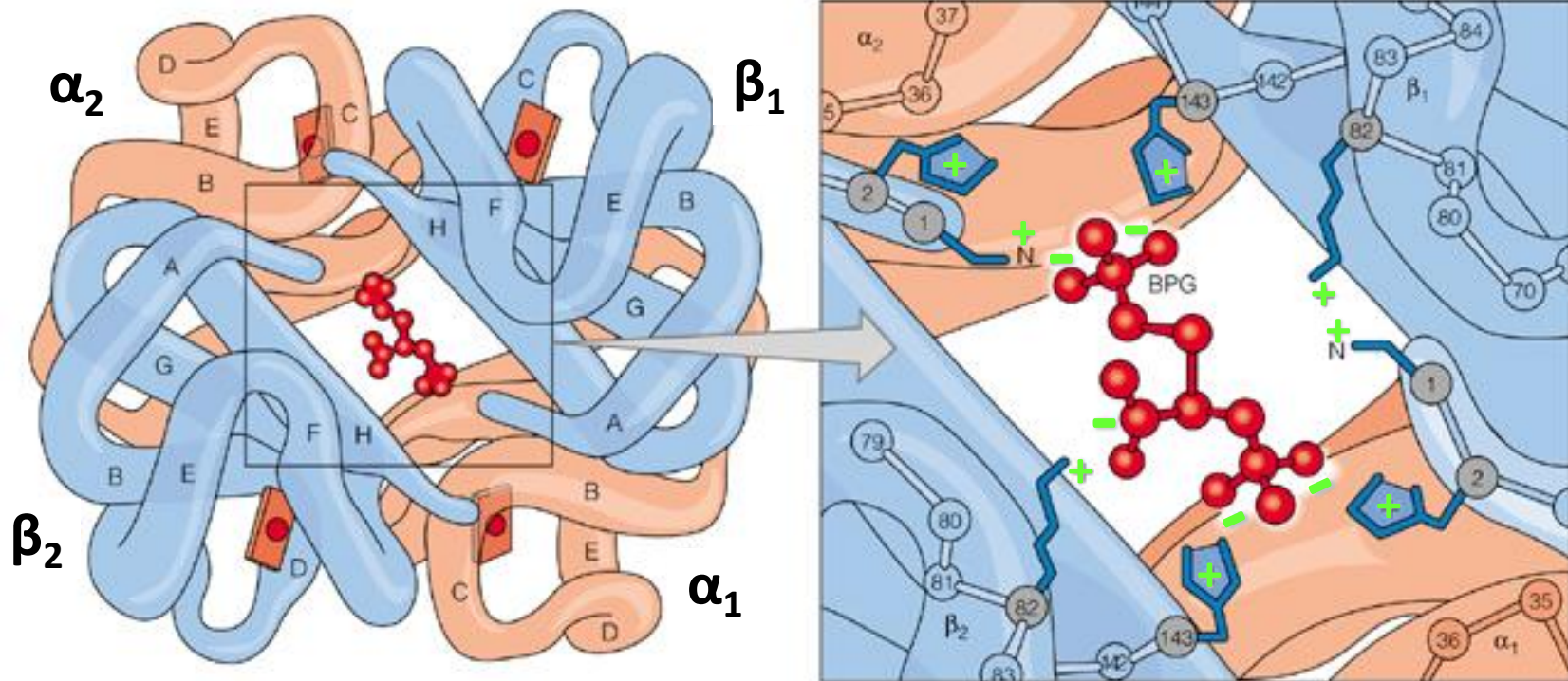
Il 2,3-BPG forma interazioni elettrostatiche con gruppi carichi positivamente che sporgono nella cavità centrale della DEOSI-Hb:

- $\text{NH}_3^+$  N-terminale
- Lys-82
- His-143
- His-2

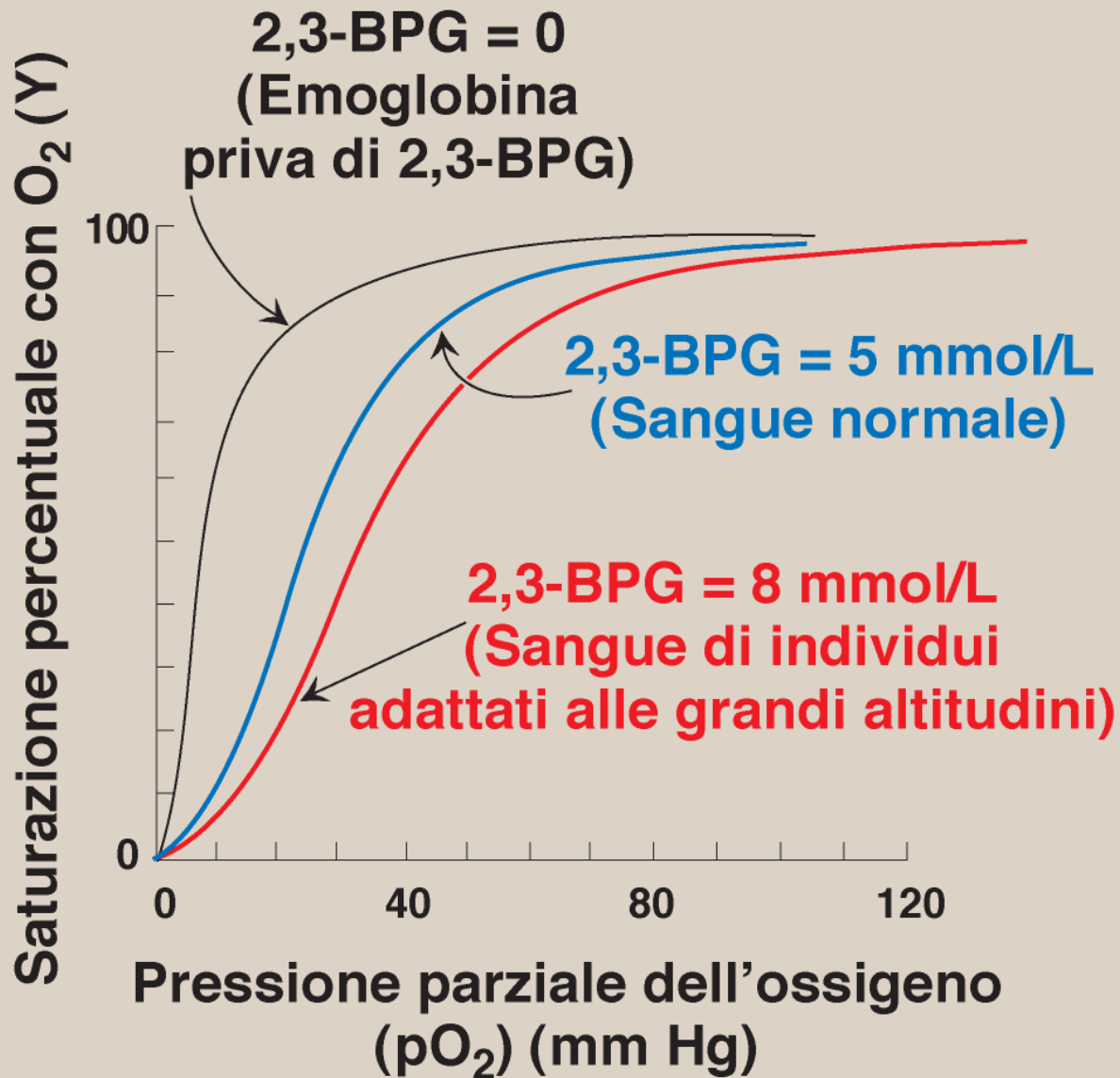
delle 2 catene  $\beta$

ciò rafforza i ponti salini della forma T dell'Hb.

Figure da: Mathews, Van Holde e Ahern "Biochimica"

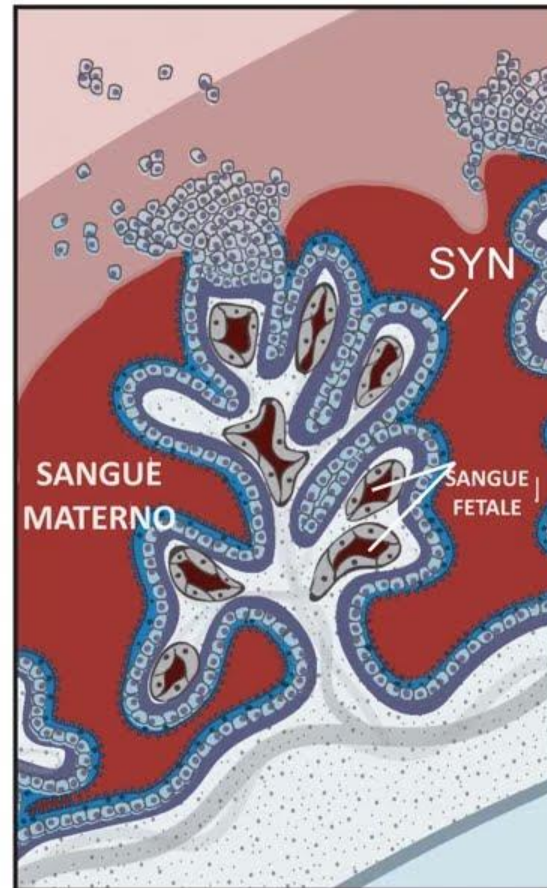
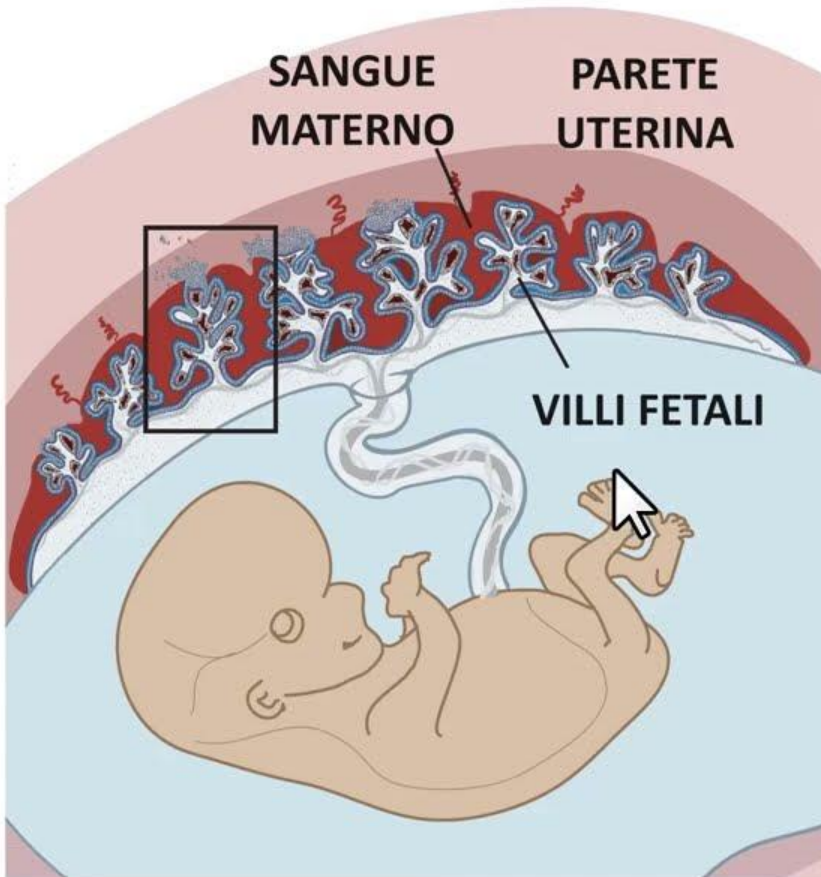


Quando l'Hb lega la prima molecola di  $\text{O}_2$  si innesca il cambiamento conformazionale che distrugge i ponti salini, la cavità centrale si restringe e il 2,3-BPG viene espulso.



# SCAMBI GASSOSI NEL FETO

Il feto scambia gas respiratori con il sangue della madre



Gli scambi gassosi con il feto avvengono tramite la placenta, un organo complesso, costituito sia da tessuti del feto che materni. Una fitta rete di capillari sanguigni dal cordone ombelicale si aprono a ventaglio all'interno della placenta e scambia gas con il sangue materno che vi circola all'interno

# EMOGLOBINA FETALE (HbF)

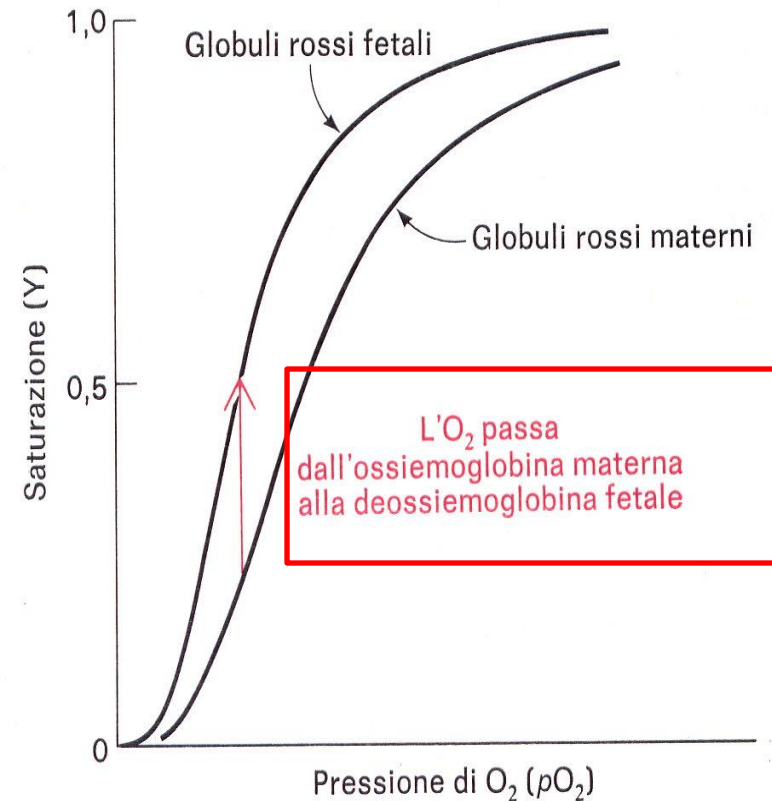
Il significato del **2,3 BPG** appare chiaro se si confronta la curva di saturazione di **Hb** con  $O_2$  in sangue materno e fetale.

Il sangue fetale contiene un'emoglobina con struttura quaternaria  $\alpha_2 \gamma_2$

le catene  $\gamma$  legano il **2,3-BPG** più debolmente rispetto all' **HbA** perché presentano un minor numero di residui carichi positivamente.

L'emoglobina fetale ha una curva di saturazione che è a sinistra di quella della emoglobina materna, indicando **maggiore affinità** per  $O_2$ .

L' $O_2$  rilasciato nella circolazione placentare da **Hb materna** a certe pressioni parziali, viene assunto da **Hb fetale**, più affine, e ciò soddisfa l'esigenza fisiologica di rifornimento di  $O_2$  al feto da parte della madre.



## Sito di legame del 2,3-BPG nell'HbA e HbF

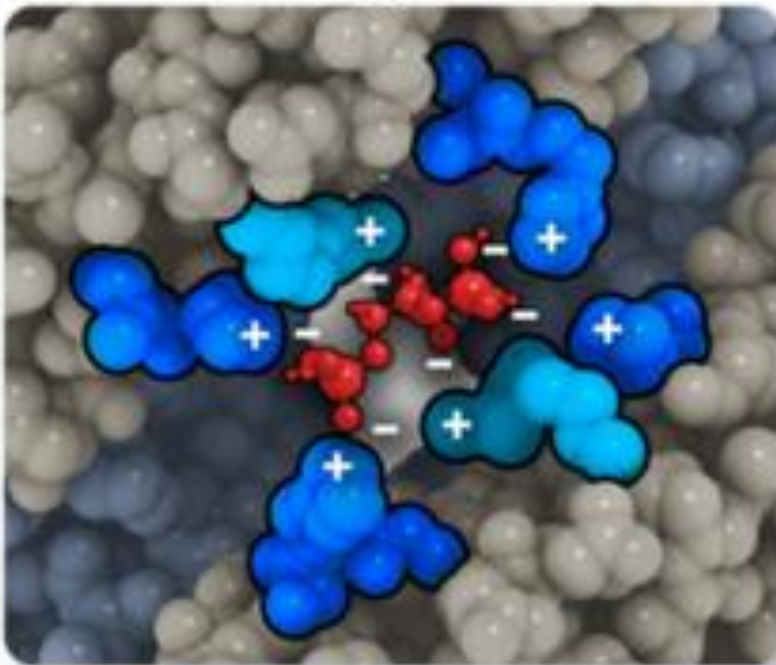
### CATENE BETA

- $\text{NH}_3^+$  N-terminale Val-1
- Lys-82
- His-143
- His-2

### CATENE GAMMA

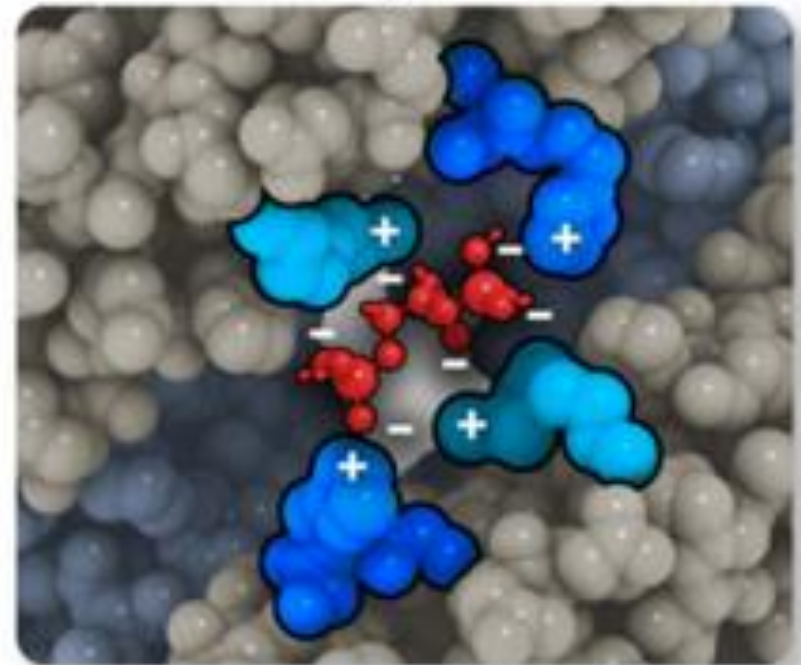
- $\text{NH}_3^+$  N-terminale Gly-1
- Lys-82
- Ser-143
- His-2

Hemoglobin A



Positively charged histidine and lysine residues secure negatively charged 2,3-BPG to the binding pocket

Hemoglobin F



Replacement of histidine by serine in fetal hemoglobin reduces positive charge of the binding pocket, limiting 2,3-BPG attachment

# Adattamento alle elevate altitudini

A 3000m pO<sub>2</sub> solo 70 % rispetto al livello del mare

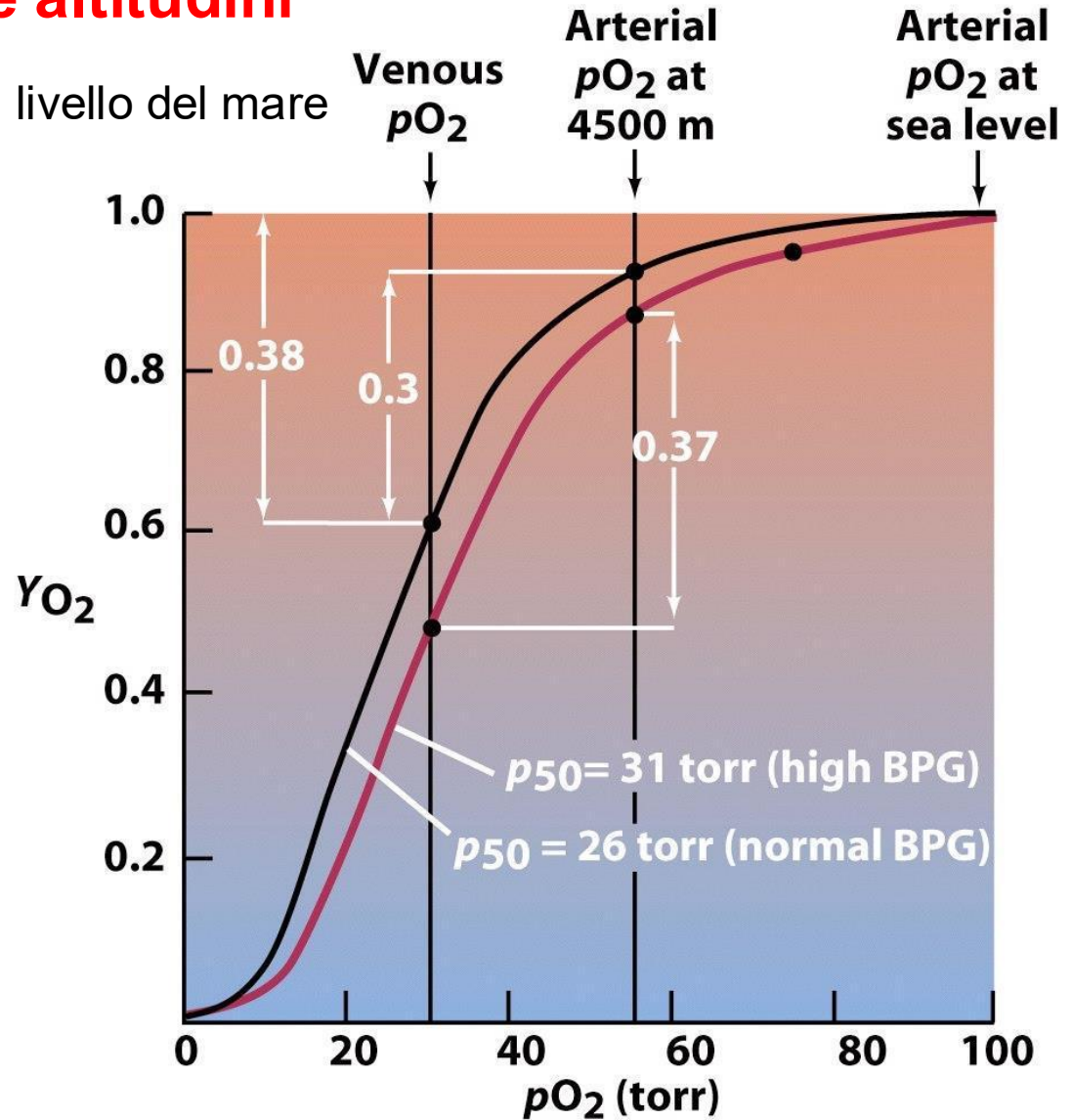
## RISPOSTE FISIOLOGICHE

- Aumento della sintesi dei Hb (diverse settimane)
- Aumento sintesi 2,3 BPG
- (4 >> 8 mM; poche ore)



>> diminuisce l'affinità dell'Hb per l'O<sub>2</sub> (aumenta la p<sub>50</sub>)

>> aumenta il rilascio di O<sub>2</sub> ai tessuti che altrimenti non sarebbero sufficientemente ossigenati



Box 7-3 Fundamentals of Biochemistry, 2/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# Le mutazioni alterano la struttura e la funzione dell'emoglobina

Sono state scoperte più di 1300 forme mutanti (varianti) dell'Hb, spesso con 1 unica sostituzione amminoacidica, non tutte le varianti emoglobiniche conducono a sintomi clinici. (info: HbVar database)

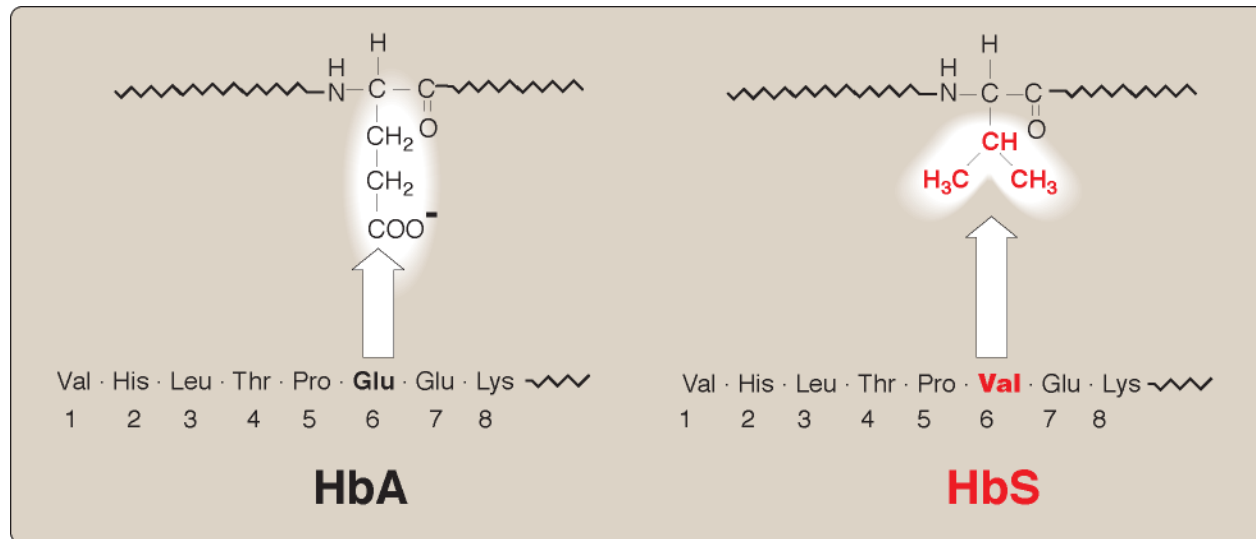
TABELLA 7.1 Alcune varianti dell'emoglobina

Nome <sup>a</sup>	Mutazione	Effetto
Hammersmith	Phe CD1(42) $\beta$ $\rightarrow$ Ser	Indebolisce il legame dell'eme
Bristol	Val E11(67) $\beta$ $\rightarrow$ Asp	Indebolisce il legame dell'eme
Bibba	Leu H19(136) $\alpha$ $\rightarrow$ Pro	Disgrega l'elica H
Savannah	Gly B6(24) $\beta$ $\rightarrow$ Val	Disgrega l'interfaccia tra le eliche B ed E
Philly	Tyr C1(35) $\alpha$ $\rightarrow$ Phe	Rottura di legami idrogeno a livello dell'interfaccia $\alpha_1$ - $\beta_1$
Boston	His E7(58) $\alpha$ $\rightarrow$ Tyr	Promuove la formazione di metaemoglobina
Milwaukee	Val E11(67) $\beta$ $\rightarrow$ Glu	Promuove la formazione di metaemoglobina
Iwate	His F8(87) $\alpha$ $\rightarrow$ Tyr	Promuove la formazione di metaemoglobina
Yakima	Asp G1(99) $\beta$ $\rightarrow$ His	Rottura di un legame idrogeno che stabilizza la conformazione T
Kansas	Asn G4(102) $\beta$ $\rightarrow$ Thr	Rottura di un legame idrogeno che stabilizza la conformazione R

<sup>a</sup> Le varianti dell'emoglobina sono solitamente denominate in base alla località in cui sono state riscontrate per la prima volta (per esempio, emoglobina Boston).

**ca il 5% della popolazione mondiale possiede almeno una variante emoglobinica**

# emoglobinopatie



**Anemia falciforme**



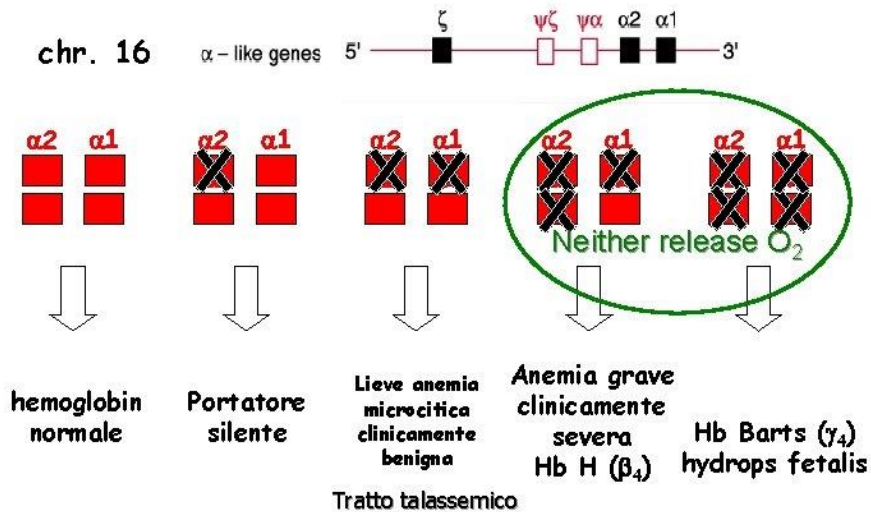
Nell'anemia falciforme viene prodotta una variante emoglobinica chiamata **Hb-S** nella quale il residuo di **Glu in posizione 6 delle catene β è sostituito da un residuo di Val.**

Nella **Deossi-Hb-S** questo residuo di Val costituisce un "punto appiccicoso" esposto sulla superficie del tetramero, infatti va ad inserirsi in una tasca idrofobica situata nelle subunità β di un altro tetramero: l'Hb polimerizza, forma delle fibre insolubili

Vantaggio evolutivo per l'eterozigote

## Base genetica di $\alpha$ thalassemia:

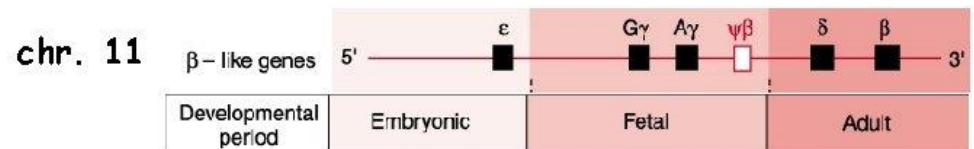
- soprattutto delezioni



# TALASSEMIE

## Base genetica di $\beta$ thalassemia:

- 4 geni alpha

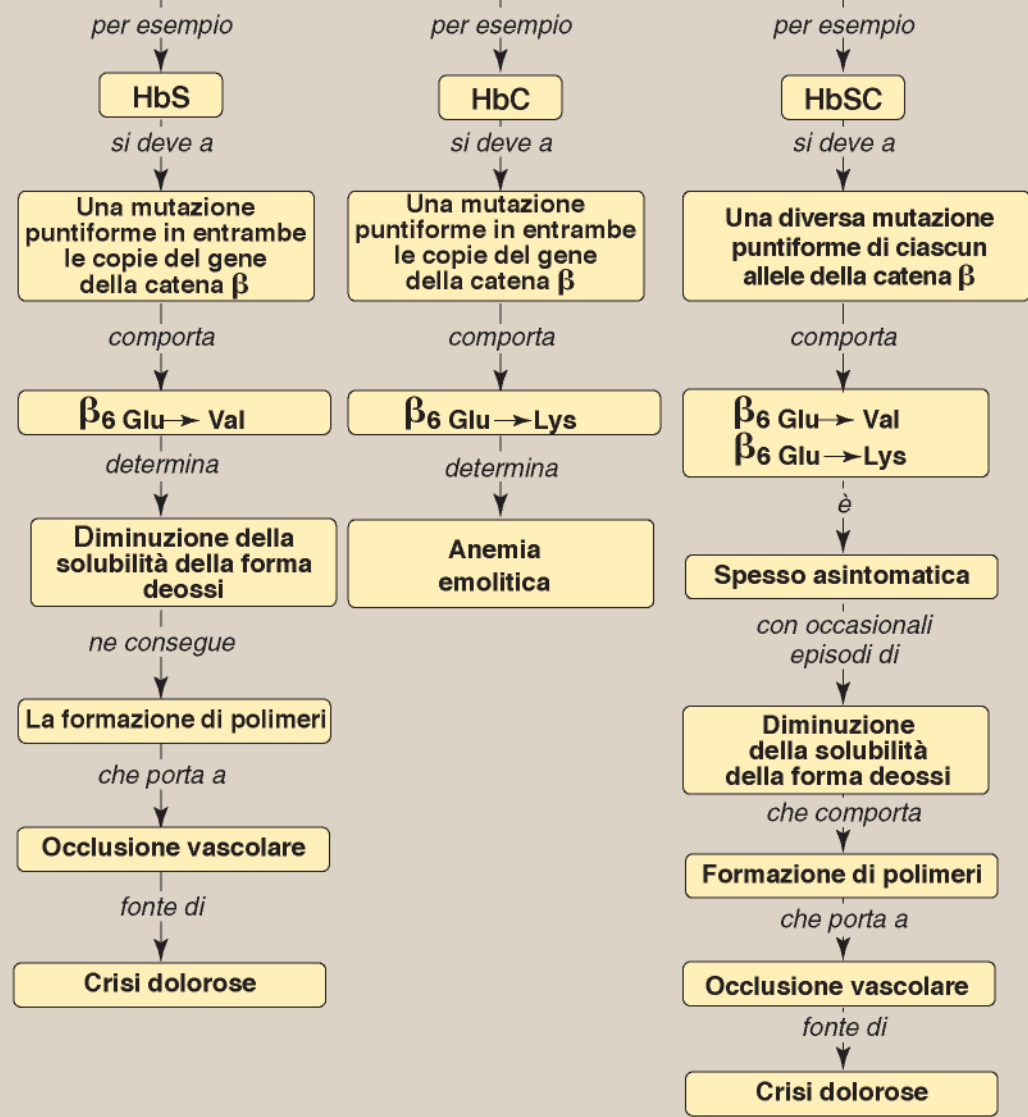


- solo 2 geni beta
- Diminuiti livelli di beta provocano anemia ipocromica e microcitica. Le catene alfa in eccesso precipitano
- beta globina non è necessaria durante vita fetale: talassemia beta compare solo alcuni mesi dopo la nascita

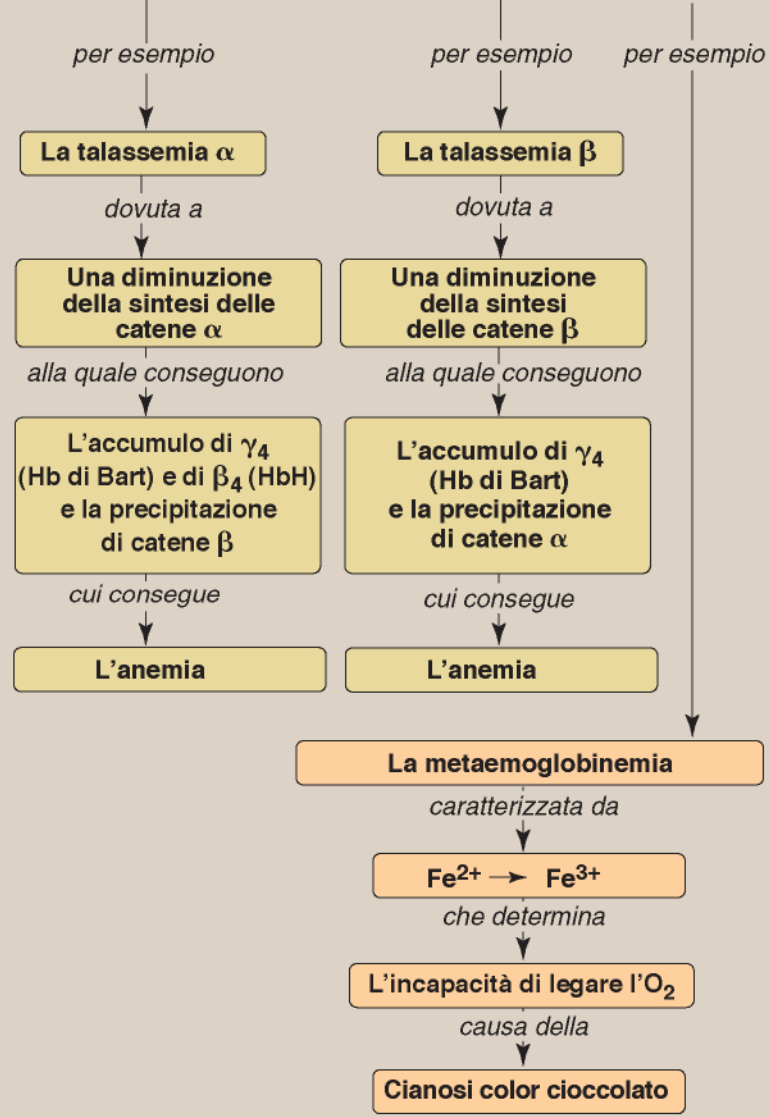


# Emoglobinopatie

## Sintesi di emoglobine anormali sul piano strutturale



## Sintesi di quantità insufficienti di emoglobina normale



# Domande & Risposte

- **1. Perché la curva di legame della mioglobina è iperbolica e non sigmoide come quella dell'emoglobina?**
  - → La mioglobina è monomerica e non mostra cooperatività, quindi la curva è iperbolica. L'emoglobina è tetramerica e cooperativa, generando una curva sigmoide.
- **2. Qual è il significato fisiologico di una  $p_{50}$  così bassa per la mioglobina (~4 mmHg)?**
  - → Indica elevata affinità per l' $O_2$ : la mioglobina lega ossigeno anche a basse  $pO_2$ , funzionando come deposito muscolare e rilasciandolo solo in condizioni di forte richiesta.
- **3. Come si calcola la frazione di saturazione (Y) e perché dipende da  $pO_2$  e  $K_{diss}$ ?**
  - → Si usa la formula  $Y = [O_2]/(K_{diss} + [O_2])$ . Dipende dalla pressione parziale di ossigeno e dalla costante di dissociazione, che riflette l'affinità della proteina per il ligando.