

CDL CHIMICA

Corso di Biochimica (6 CFU) 48 ore

Prof.ssa **Alessandra Olianas**

Lezioni : Martedì- Giovedì 9-11

Aula 4 Blocco H - D1





Prof.ssa Alessandra Olianas

Dip. Scienze della Vita e dell'Ambiente
Sezione Biomedica (laboratorio di Biochimica)
Tel. 0706754507 (studio)

Ricevimento studenti: **si riceve per appuntamento**

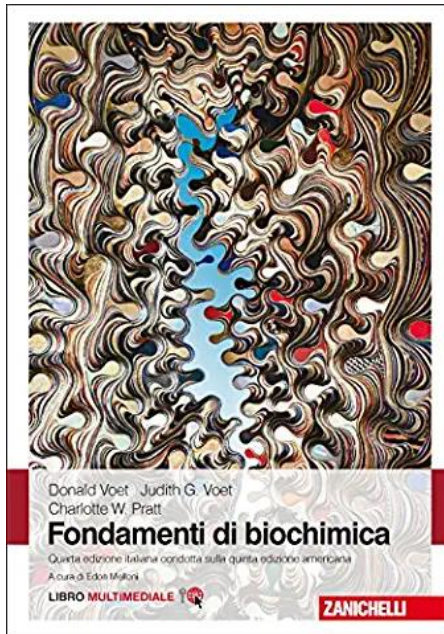
olianas@unica.it



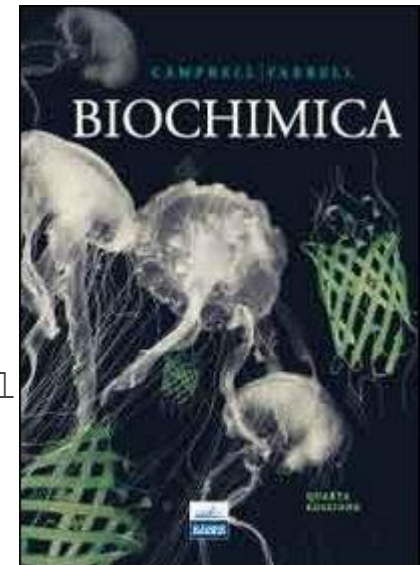
Nelson, Cox.
I **Principi di Biochimica di Lehninger**. Zanichelli



Berg, Tymoczko, Stryer.
Biochimica.
Zanichelli

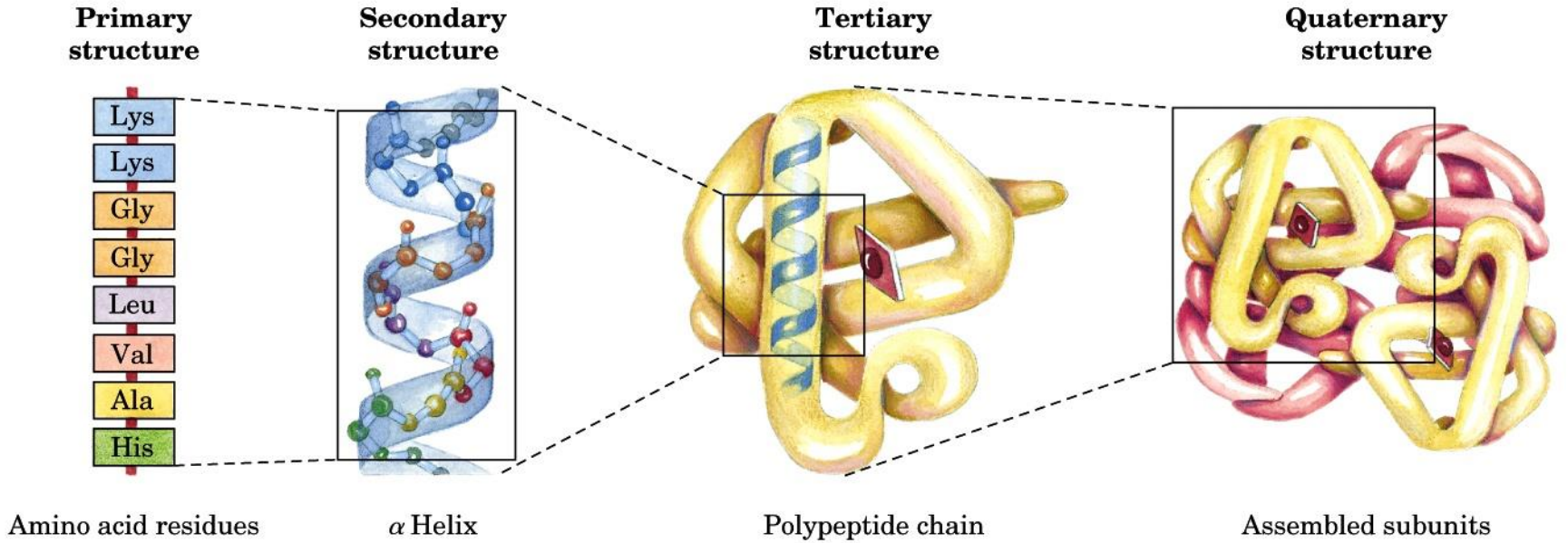


Voet, Voet. Pratt.
Fondamenti di Biochimica.
Zanichelli

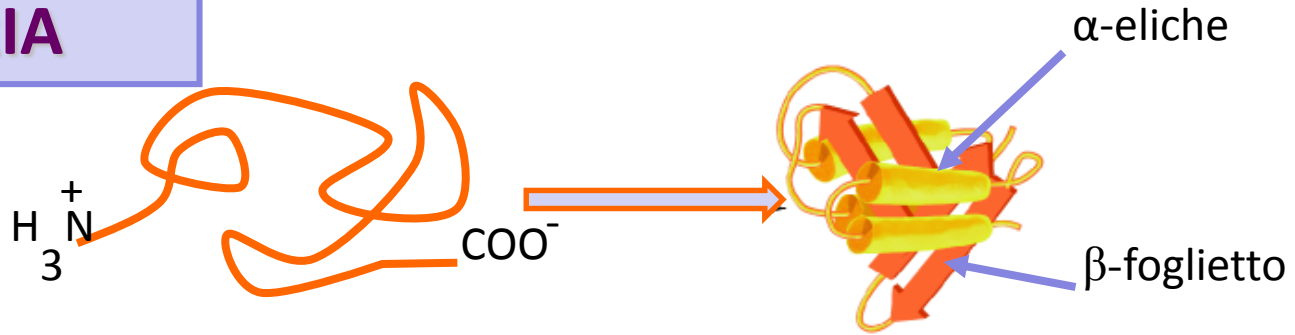


Campbell, Farrel
Biochimica.
EdiSES

PROTEINE



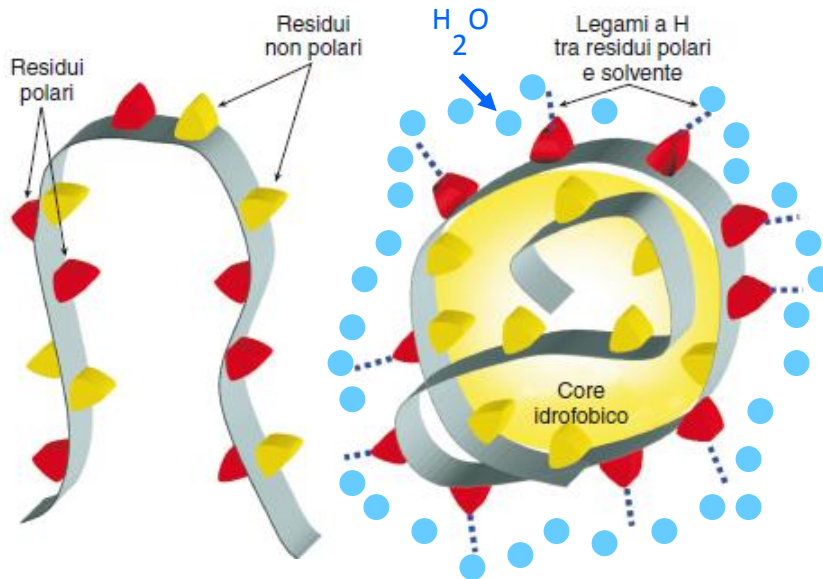
STRUTTURA TERZIARIA



La catena polipeptidica delle proteine “globulari” oltre ad organizzarsi in strutture di tipo secondario va incontro ad un ulteriore **ripiegamento** sino ad assumere una struttura fortemente impaccata.

Il ripiegamento (FOLDING) è tale che residui lontani nella struttura primaria sono avvicinati dal ripiegamento in modo da stabilire **interazioni tra le loro catene R** (interazioni a lungo raggio)

La catena polipeptidica si ripiega in modo da costringere le catene non polari ad associarsi tra loro in un CORE idrofobico da cui sono escluse le molecole d'H₂O



M.SAMAJA - R.PARONI
CHIMICA
E BIOCHIMICA

Durante l'avvolgimento le catene laterali polari tendono ad essere spinte sulla superficie esterna della proteina, a contatto con le molecole di H₂O della sfera di solvatazione

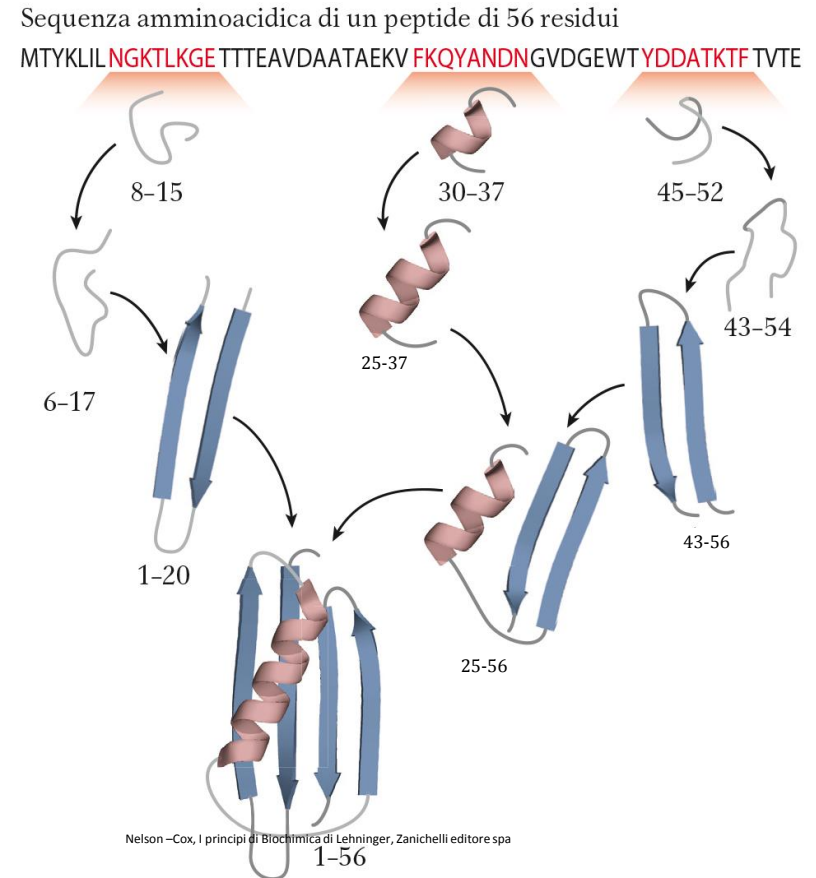
Il processo risulta energeticamente favorito dalla formazione di numerosissime interazioni tra le catene laterali degli amminoacidi che vengono avvicinati.

La catena polipeptidica assume **strutture secondarie che sono avvicinate e impaccate** mediante anse e curve della catena.

La proteina **collassa** assumendo una struttura sempre più ordinata e impaccata. Assume il ripiegamento tridimensionale che garantisce la **maggiore stabilità**

In vivo il «folding proteico» è facilitato da proteine che impediscono il ripiegamento errato di catene polipeptidiche **CHAPERONI MOLECOLARI** (es: proteine da shock termico)

Il ripiegamento (folding) di una proteina non è mai un processo casuale
Ma sempre dettato dalla sequenza aminoacidica della proteina



Il modo in cui una catena proteica si avvolge dipende dal tipo di interazioni che si stabiliscono fra le catene laterali dei suoi residui amminoacidici.

Una proteina, fra tutti i possibili ripiegamenti, addotta quello in cui le interazioni fra le catene R dei suoi residui sono **OTTIMALI** e consentono di raggiungere la maggior stabilità (e quindi uno stato di minima energia)

La proteina addotta la sua **CONFORMAZIONE NATIVA**.

Non covalenti

Interazioni idrofobiche

Interazioni di van der

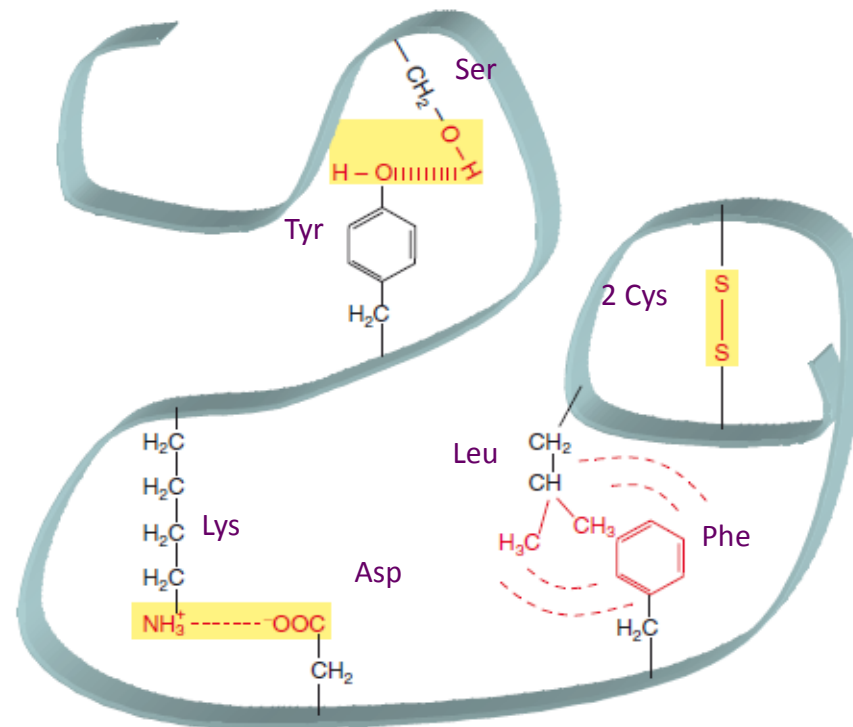
Waals

Legami idrogeno

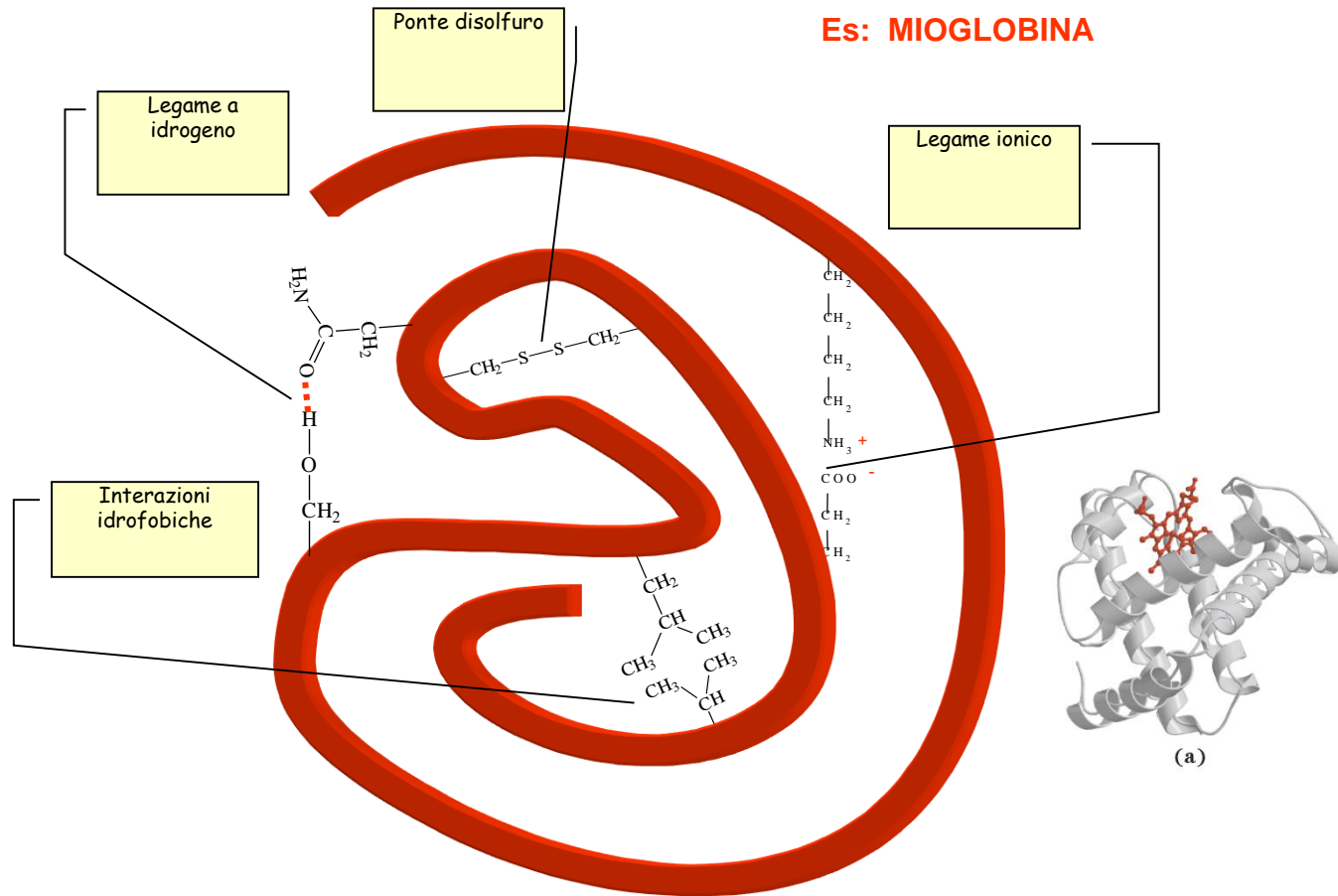
Interazioni ioniche

Covalenti

Ponti disolfuro



struttura terziaria prot **GLOBULARI**



Denaturazione delle proteine:

perdita della struttura tridimensionale sufficiente a determinare la perdita della funzione

Agenti denaturanti:

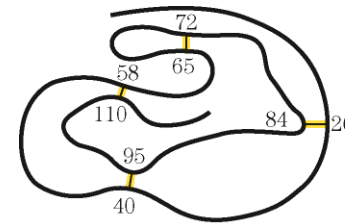
_CALORE (agisce sui legami idrogeno)

_pH ESTREMI (agiscono sulle interazioni ioniche e legami idrogeno)

_SOLVENTI o SOLUTI ORGANICI (es. alcoli, acetone, urea, cloruro di guanidina) - (agiscono su interazioni idrofobiche)

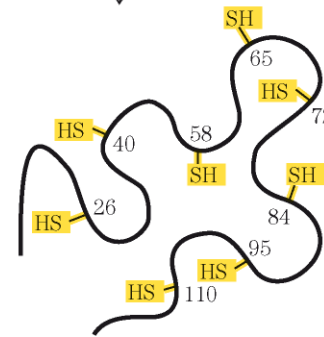
_DETERGENTI (es. SDS) - (agiscono su interazioni idrofobiche)

_AGENTI RIDUCENTI (β -mercaptoetanolo, ditiotreitolo) - (agiscono sui ponti disolfuro)



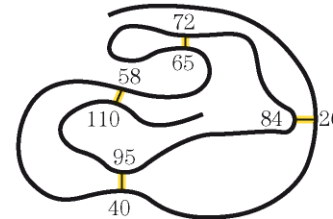
Stato nativo,
cataliticamente attivo

aggiunta di urea
e di mercaptoetanolo



Stato srotolato,
inattivo. I ponti
disolfuro sono stati
ridotti a residui
di Cys

allontanamento
dell'urea
e del mercaptoetanolo



Stato nativo,
cataliticamente attivo.
I ponti disolfuro dei
quattro residui di
cisteina si sono
riformati
correttamente

Rinaturazione delle proteine

Protein Folding & Disease

Almeno 35 malattie fatali umane sono dovute all'accumulo extracellulare di proteine non correttamente ripiegate
=AMILOIDI

AMILOIDOSI:

Associazione spontanea di proteine non correttamente ripiegate

Le amiloidosi sono un gruppo di malattie causate dal deposito in vari tessuti di proteine anomale.

In ciascun tipo di amiloidosi, una proteina prodotta dall'organismo tende ad accumularsi in diversi organi e tessuti sotto forma di fibrille.

I depositi formati da queste fibrille sono chiamati **amiloidi**.

Il progressivo accumulo dell'amiloide provoca un danno degli organi coinvolti e causa i sintomi della malattia.

Ripiegamento non corretto delle proteine

TABLE 6-4 Some Protein Misfolding Diseases

Disease	Defective Protein
Alzheimer's disease	Amyloid- β protein
Amyotrophic lateral sclerosis	Superoxide dismutase
Fibrinogen amyloidosis	Fibrinogen α chain
Huntington's disease	Huntingtin with polyglutamate expansion
Light chain amyloidosis	Immunoglobulin light chain
Lysozyme amyloidosis	Lysozyme
Parkinson's disease	α -Synuclein
Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs)	Prion protein



MALATTIE PRIONICHE

(morbo della mucca pazza) malattia di Creutzfeldt-Jacob

Encefalopatia spongiforme bovina (BSE)

MALATTIE PRIONICHE

(morbo della mucca pazza) malattia di Creutzfeldt-Jacob

Prione, dall'inglese *prion* (acronimo di "**PR**oteinaceus **I**nfective **ON**ly **p**article"=particella infettiva solamente proteica), è il nome attribuito da [Stanley B. Prusiner](#) ad un allora ipotetico "agente infettivo non convenzionale" di natura proteica.

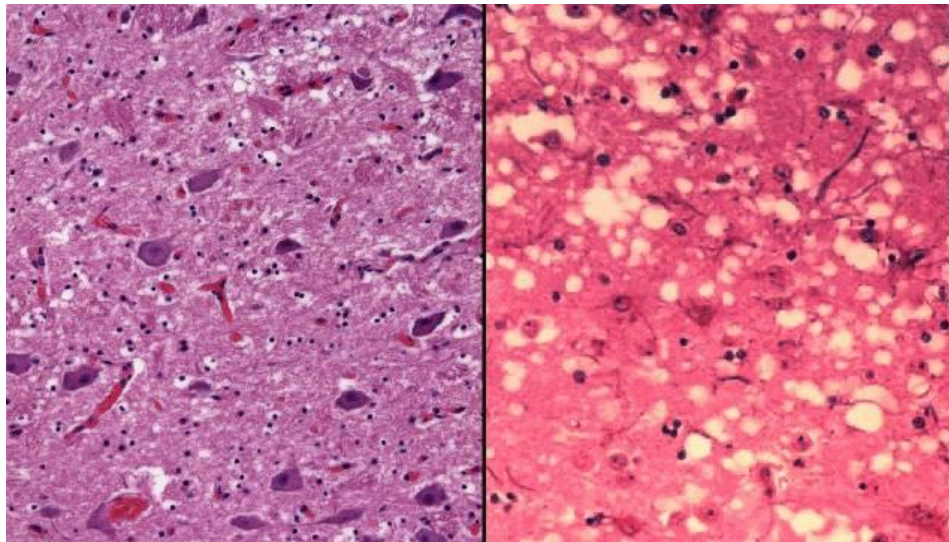
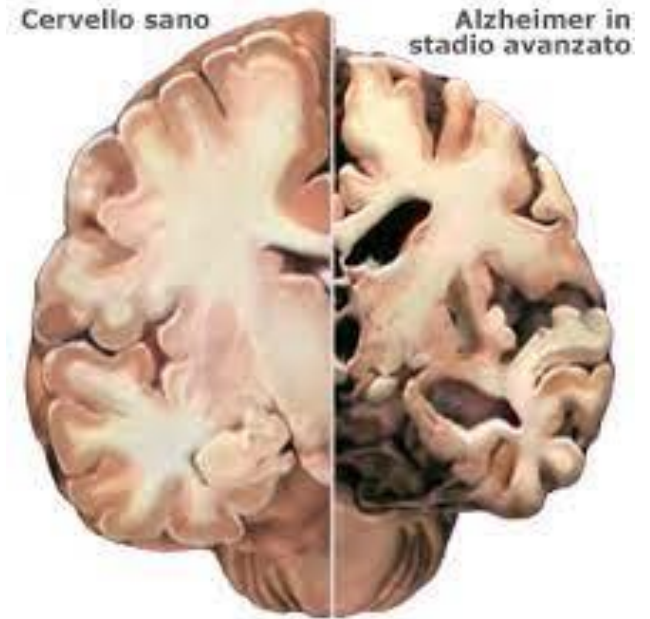
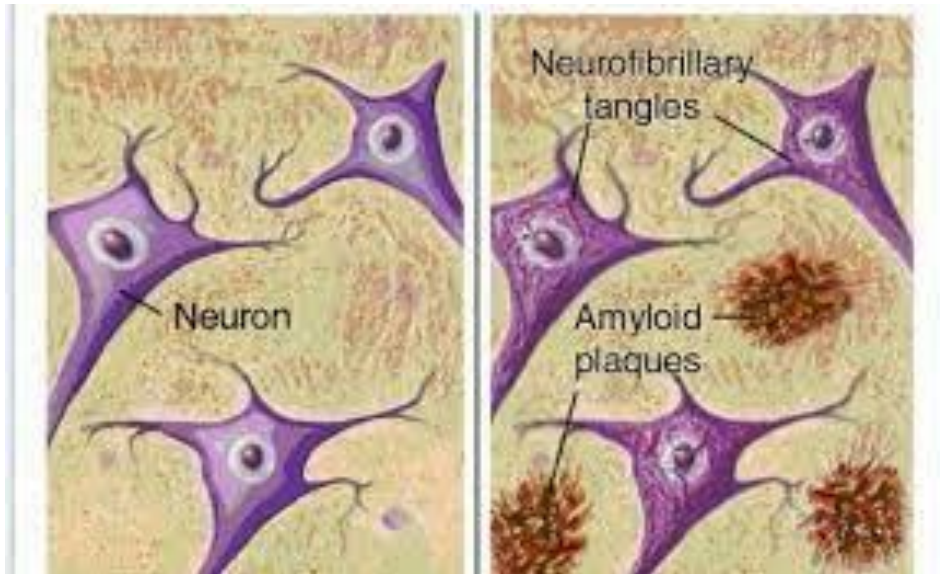
Proteina -> 28 kDa chiamata prione

Prioni = glicoproteine naturali localizzate nelle membrane cellulari (tessuto nervoso)

La proteina si avvolge in maniera anomala e diverse molecole interagiscono tra di loro formando placche insolubili.

[Stanley B. Prusiner](#) (Premio Nobel nel 1997)

Beta Amiloidosi



Cervello normale

Cervello spongiforme

Encefalopatia spongiforme bovina

Alzheimer:

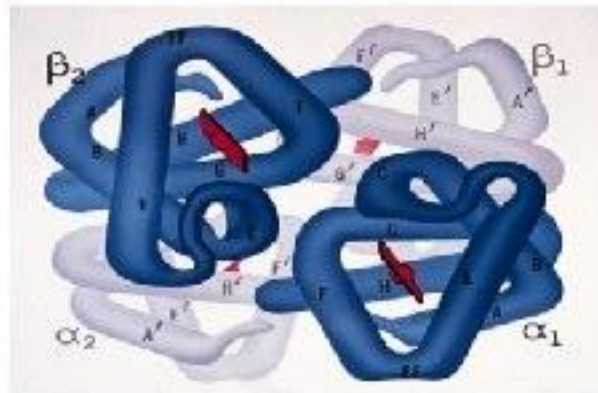
2 proteine



(β -amiloide e tau)

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**.



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 O₂ sufficiente e costante:

◇ **un sistema circolatorio adeguato;**

◇ **molecole trasportatrici di O₂, 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).

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

Mb si trova nei muscoli e funziona soprattutto come deposito di O_2

- ha una grande affinità per l' O_2
- lega l'ossigeno quando l'Hb delle emazie lo ha già ceduto
- cede l'ossigeno solo quando la pressione parziale del gas (pO_2) scende a livelli molto bassi.

*

la solubilità di O_2 nel plasma è molto bassa; grazie all'emoglobina nel sangue c'è una concentrazione di ossigeno 100 volte superiore a quella del plasma

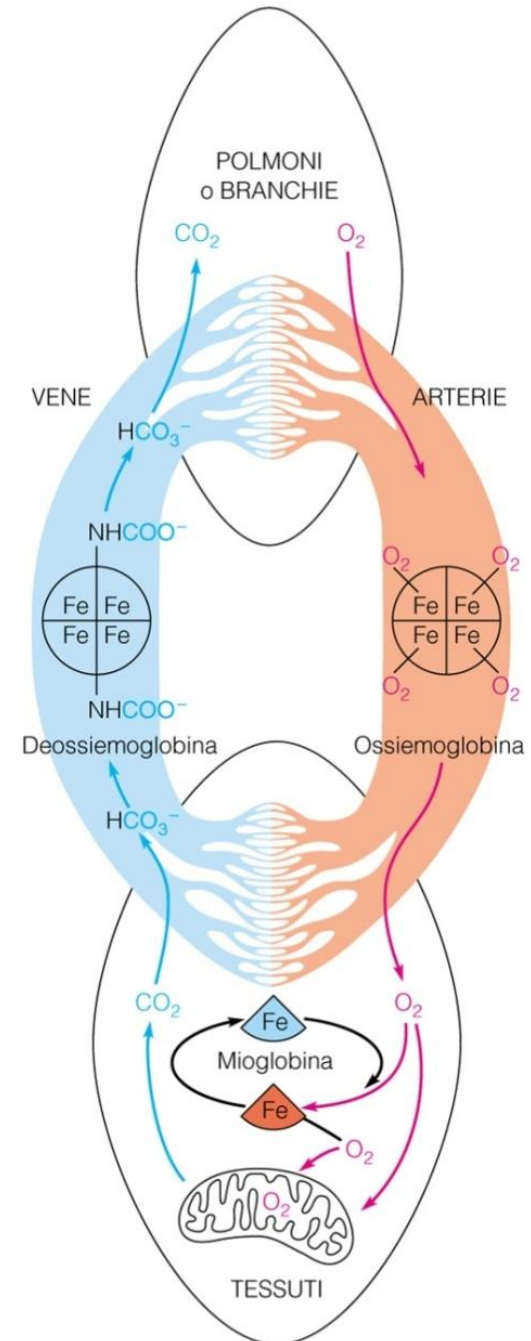
EMOGLOBINA & MIOGLOBINA

Hb

Mb

Si legano reversibilmente con l' O_2

- rendono possibile il trasporto dai polmoni ai tessuti (Hb)
- l'immagazzinamento nel muscolo (Mb).

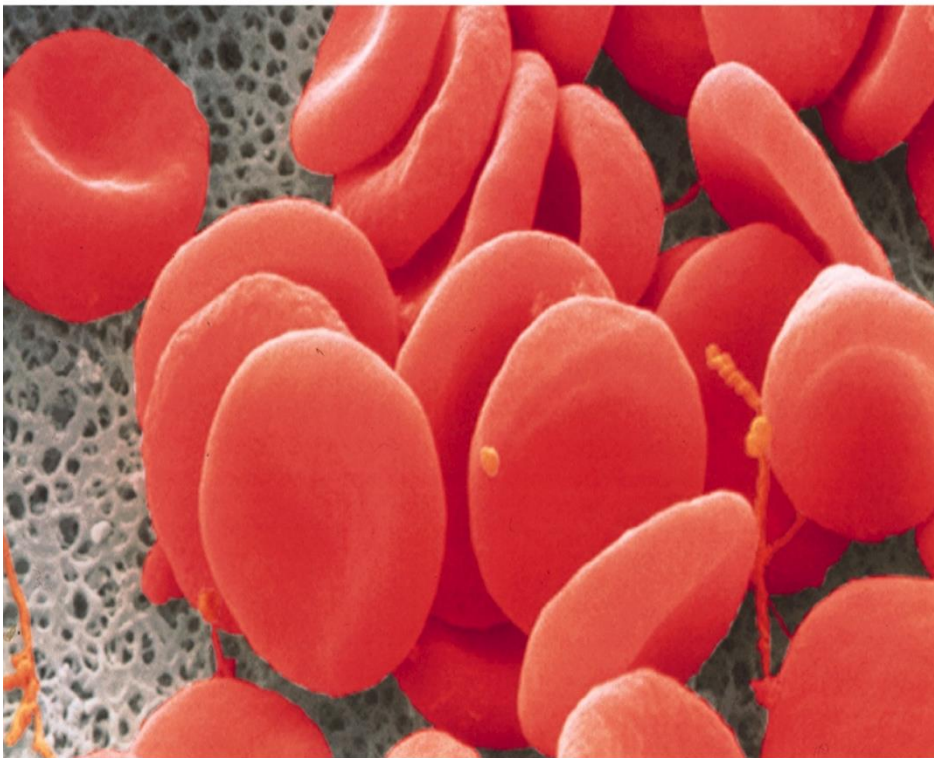


EMOGLOBINA (Hb)

1) Trasporta l'O₂ in tutti i vertebrati e in alcuni invertebrati

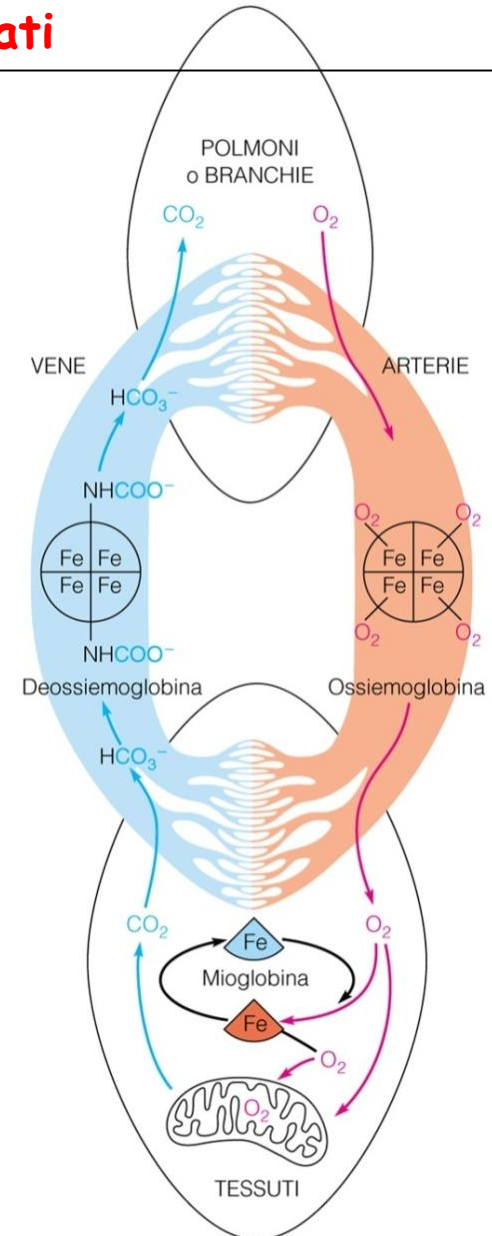
2) Gioca un ruolo nella rimozione della CO₂ dai tessuti (prodotto dell'ossidazione dei metaboliti) --> rimossa ed espirata

Ogni eritrocita contiene circa 300 milioni di molecole di emoglobina



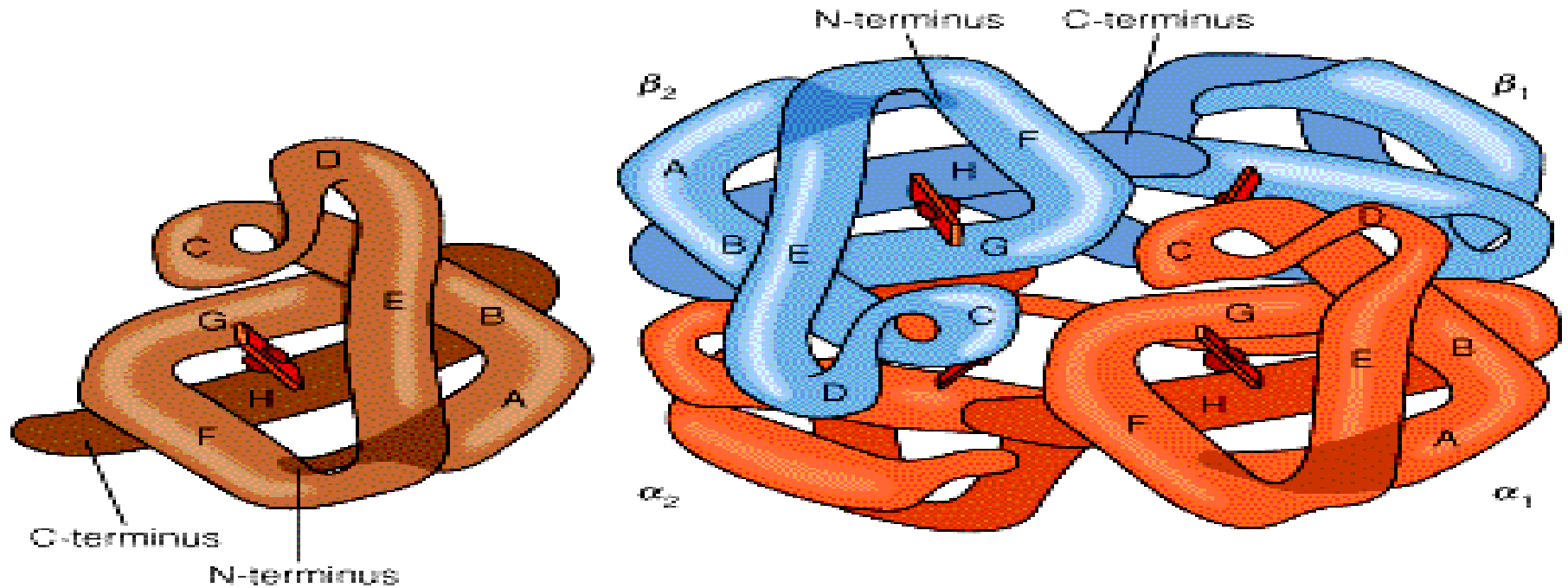
(a)

2 μm



EMOGLOBINA & MIOGLOBINA

Proteine globulari complesse
(contengono un **gruppo prostetico**)



La porzione peptidica di qualsiasi proteina senza il gruppo prostetico viene chiamata **apoproteina**,

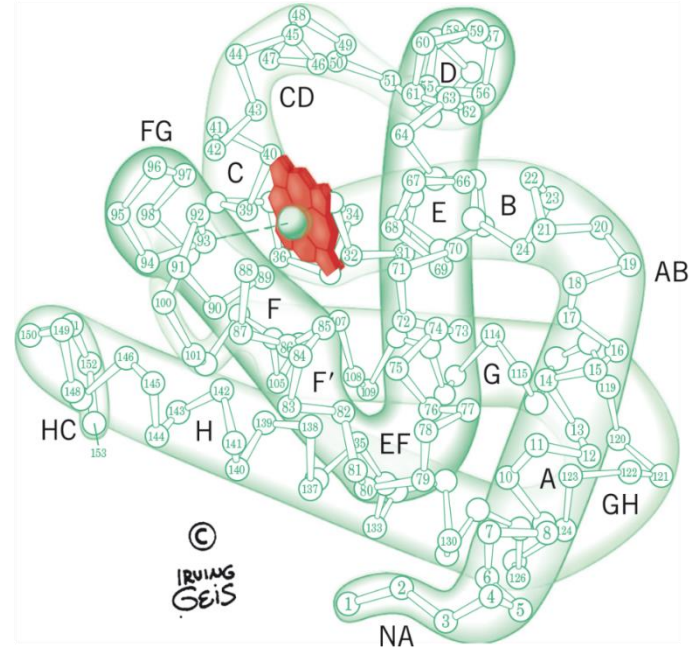
Porzione proteica + gruppo prostetico \rightarrow oloproteina

Mioglobina (lega l'O₂ e si trova nel tessuto muscolare)

- Proteina monomerica (153 AA)
- Facilita la diffusione dell'O₂ nel muscolo
- 80% degli AA sono disposti ad α -elica

(8 α -eliche identificate con le lettere A, B, C.... \rightarrow H)

PM= ~ 17000 Da



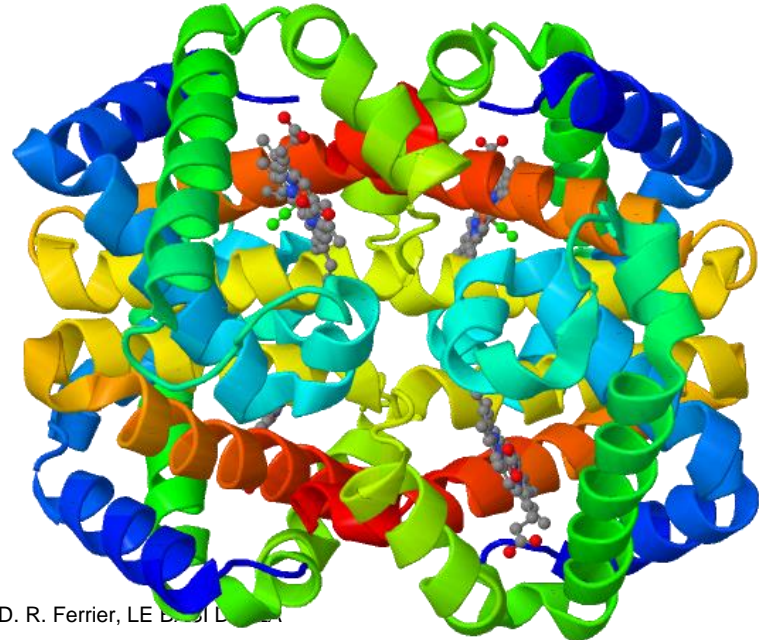
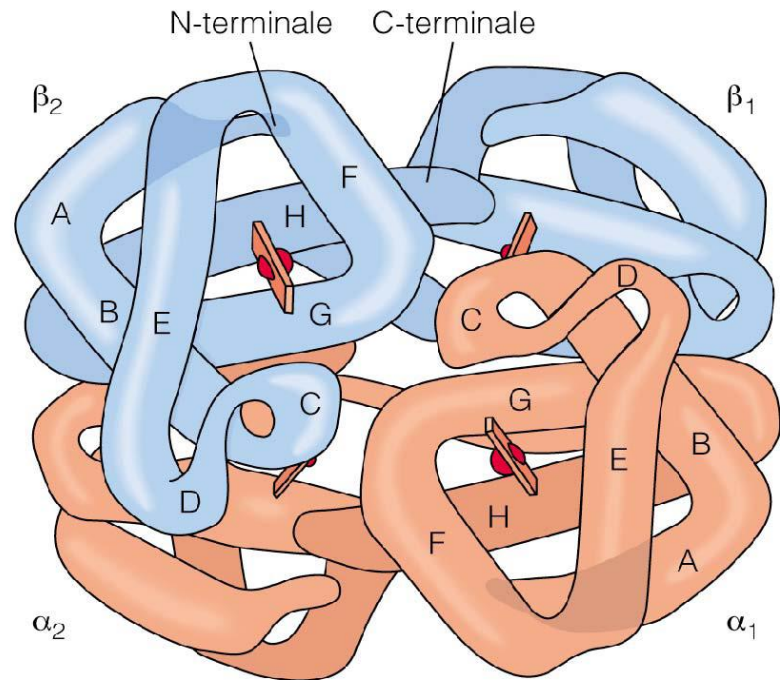
Emoglobina

➤ Proteina tetramericata costituita da 4 diverse subunità:

2 subunità α con 7 α eliche

2 subunità β con 8 α eliche

➤ Trasporto dell' O_2 dai polmoni alla cellula



Emoglobina (adulto)

HbA ($\alpha_2\beta_2$) 99%
HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) 0,5%
HbF ($\alpha_2\gamma_2$) 0,5%

Emoglobina (fetale)

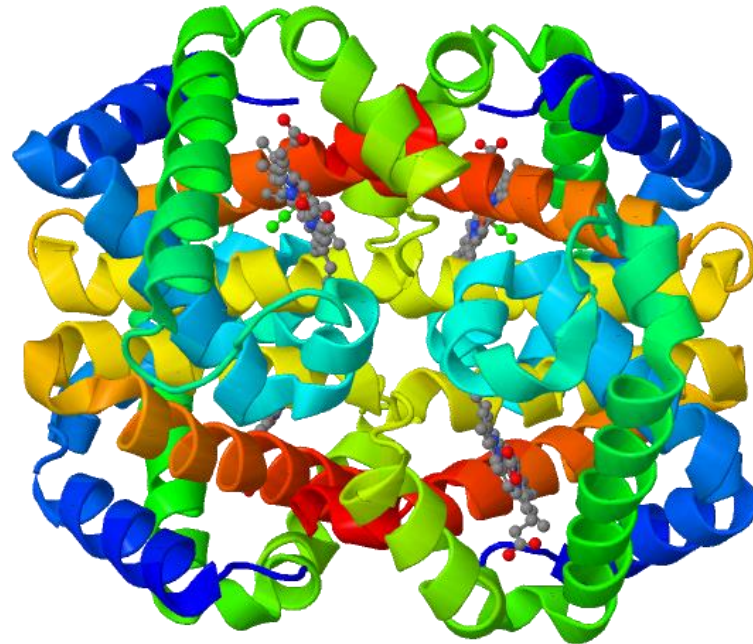
HbF ($\alpha_2\gamma_2$)

α -> 141 AA

β -> 146 AA

δ -> 146 AA

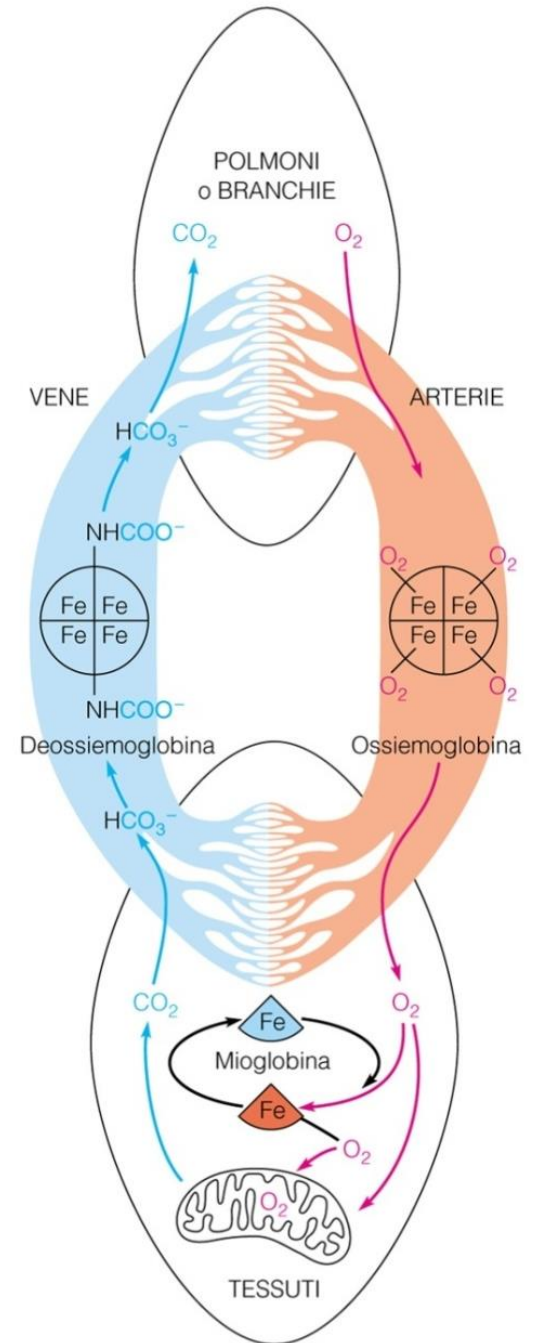
γ -> 146 AA



L'emoglobina

trasporta l'O₂ dai polmoni ai tessuti

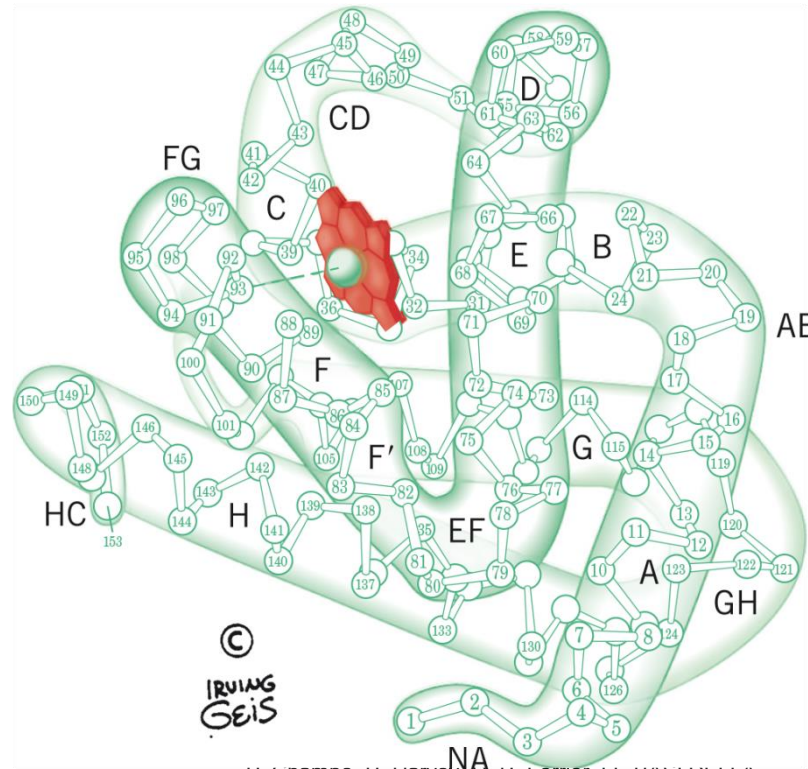
La **Mb** è in grado di legare l'ossigeno rilasciato dall'emoglobina nel circolo sanguigno ai tessuti e trasportarlo ai vari organuli cellulari che lo utilizzano (es. mitocondri)



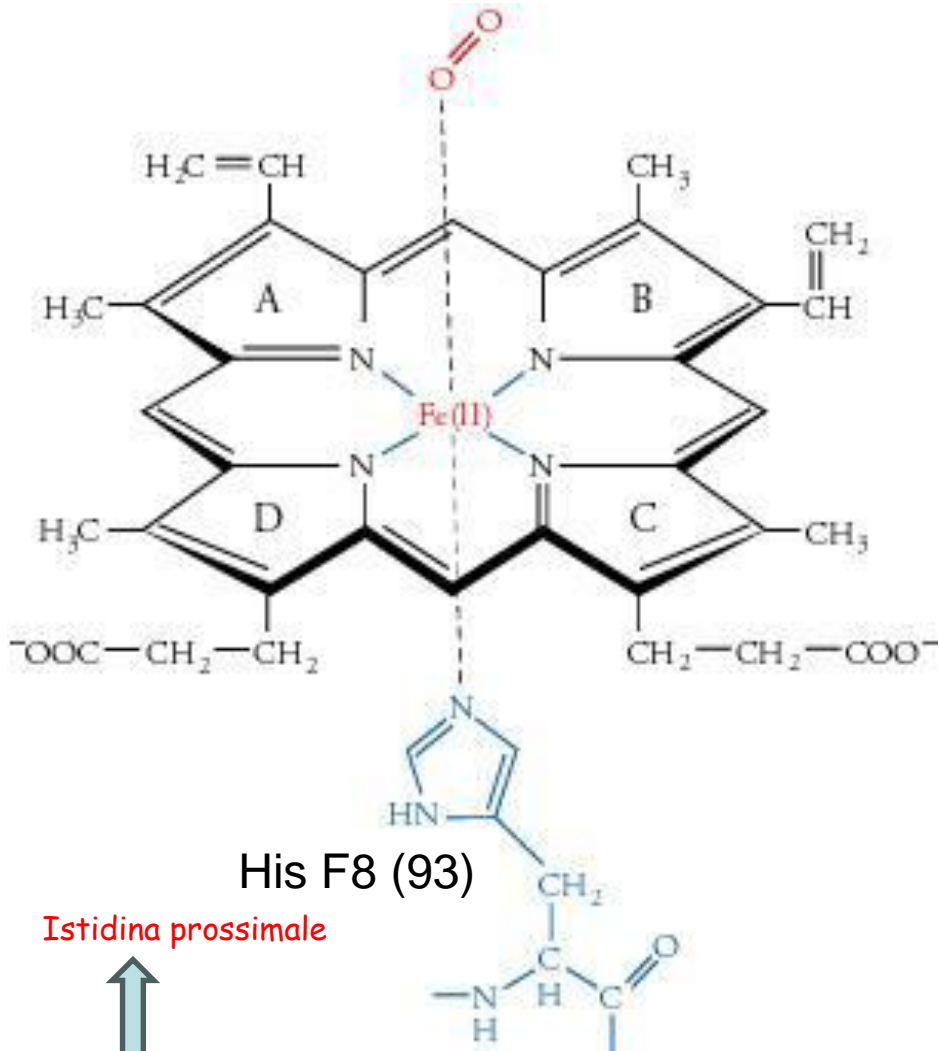
➤ Nella Mb e Hb ogni subunità è costituita da due parti:

-proteica (globina)

-porzione non proteica (eme)



EME: PROTOPORFIRINA IX + Fe^{2+} =

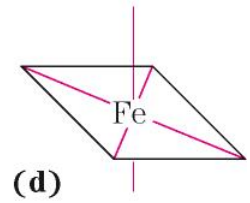
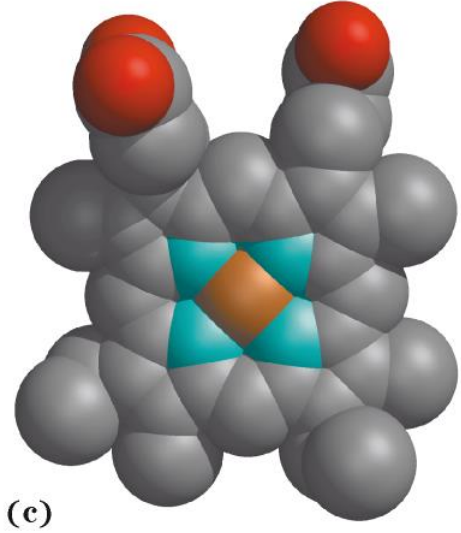
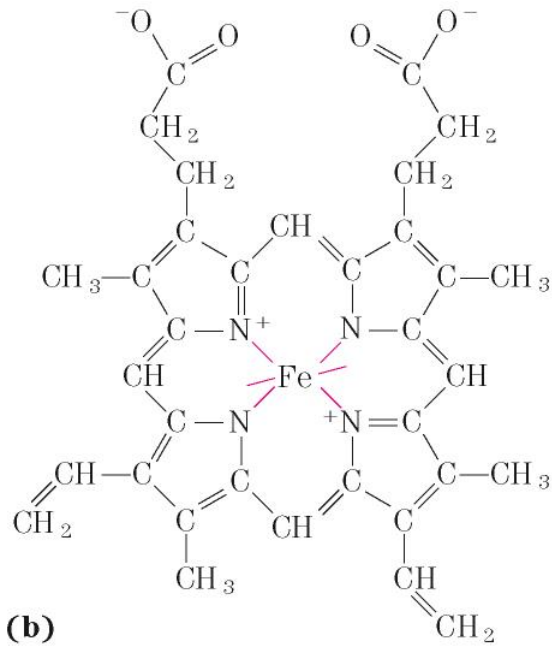
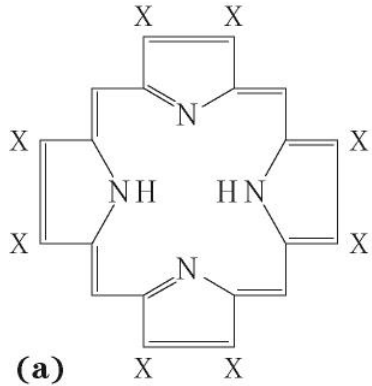


EME:

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

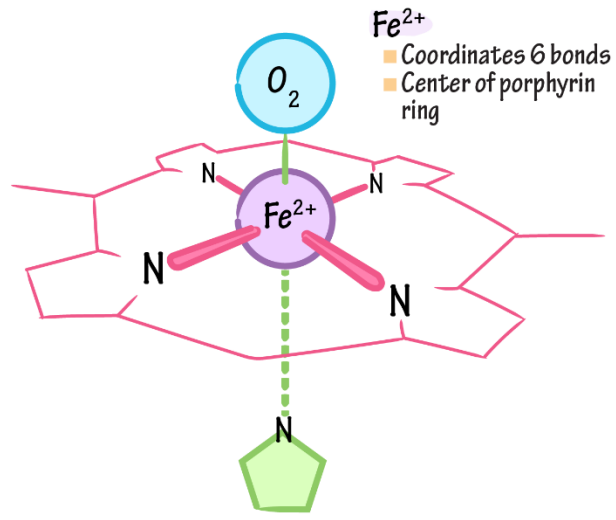
PROTOPORFIRINA IX
appartiene ad una classe di
composti chiamati **porfinine**
(citocromi, clorofilla)

porfirina

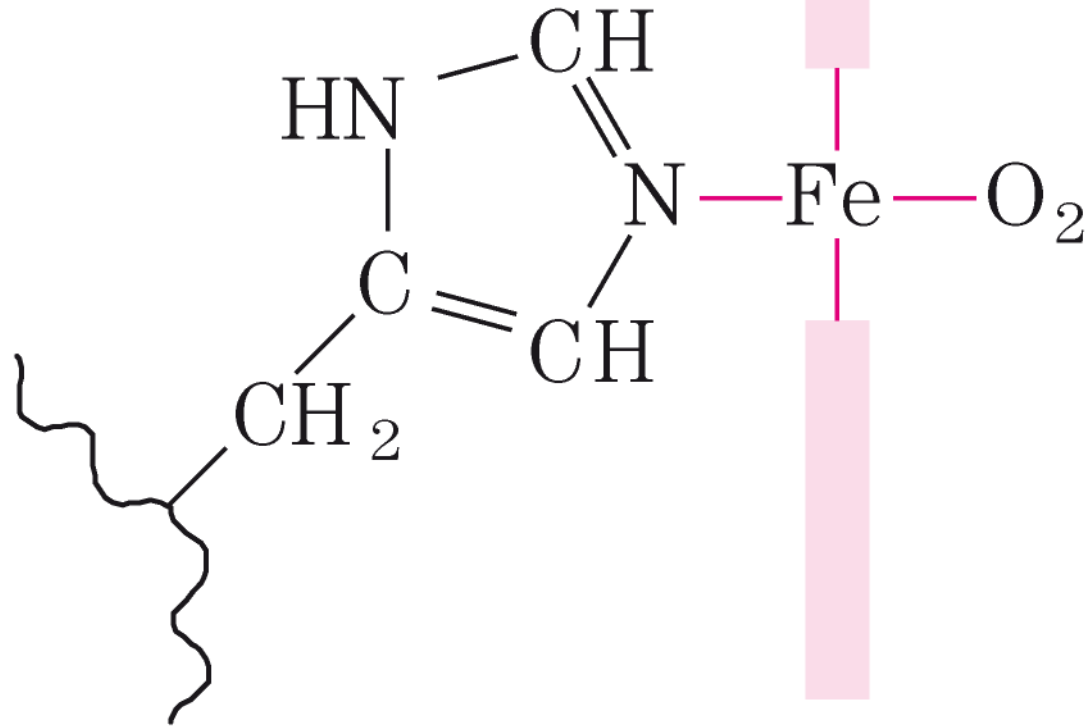


Heme Group

Protoporphirina IX

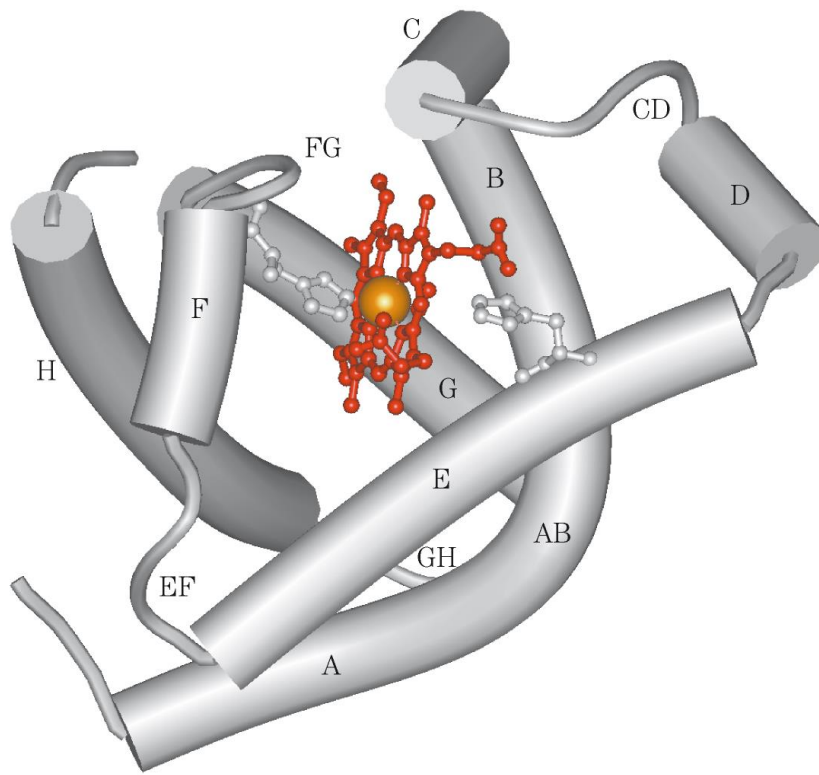


Vista di lato



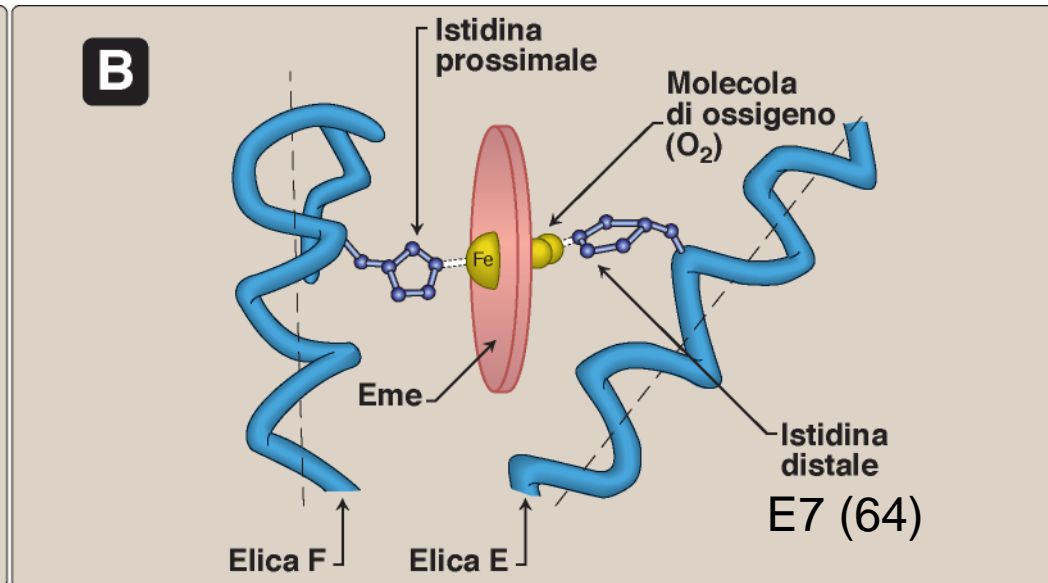
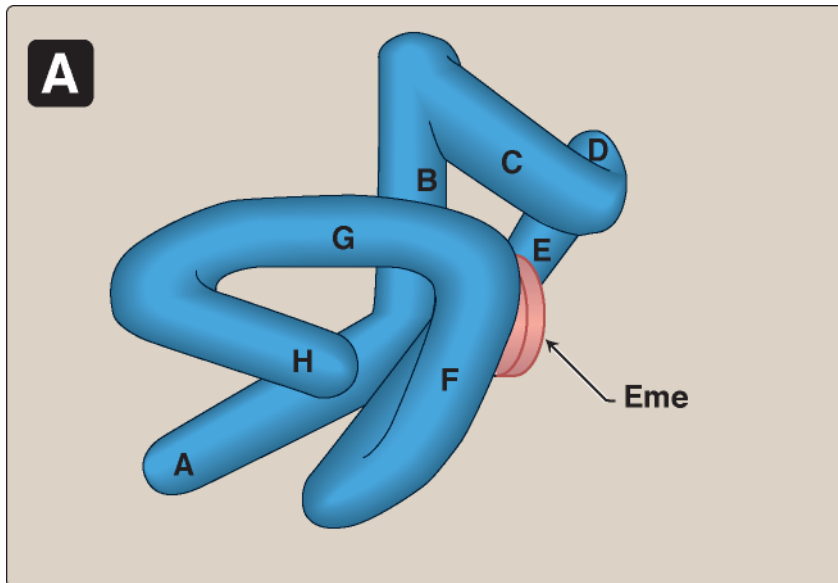
Residuo
di istidina

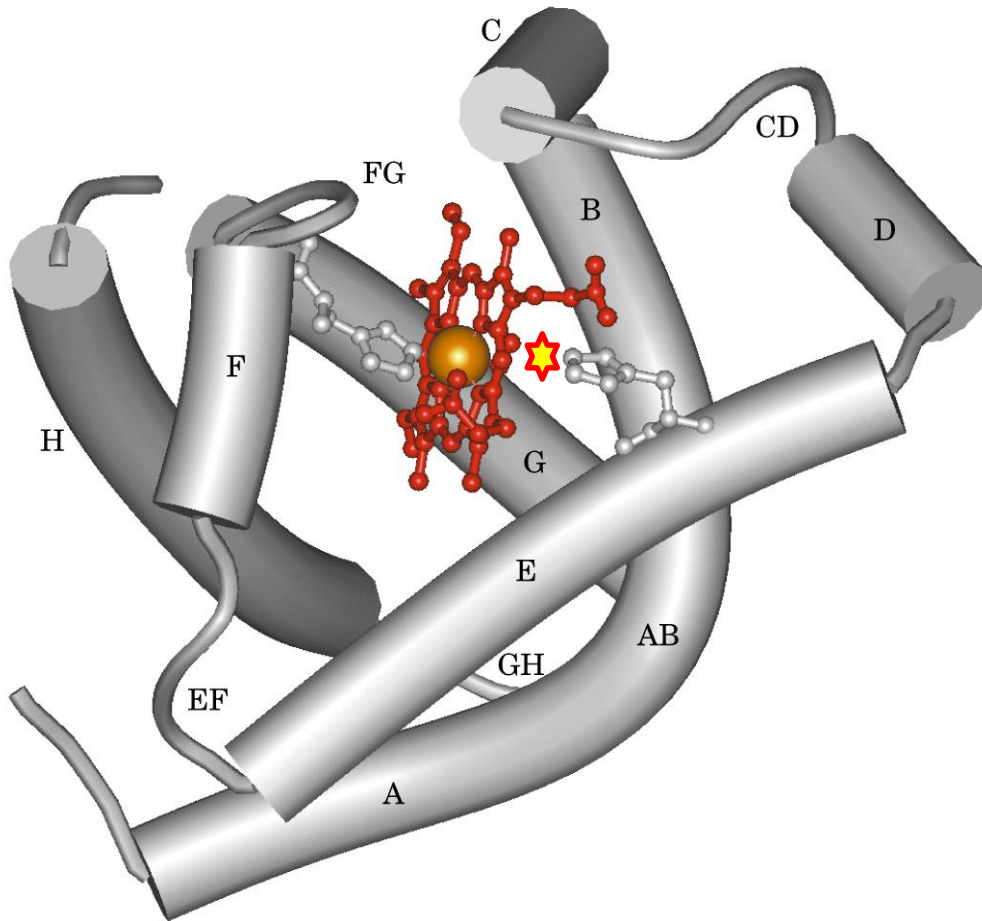
Piano
dell'anello
porfirinico



Gruppo EME

Il legame con l'ossigeno è stabilizzato da un legame idrogeno tra l'ossigeno e l'**istidina distale** (His 64 o E7)





Il Fe^{2+} dell'eme può legare:

1. l' O_2 nell'**ossiemo globina**;
2. il CO nella **carbossiemo globina**;
3. l' H_2O nella **metaemo globina**,



Unico caso in cui il Fe dell'eme è trivalente (Fe^{3+}),



La molecola perde la capacità di trasportare l'ossigeno.

Carbossi-mioglobina e carbossi-emoglobina (Hb-CO)

CO legato al gruppo eme.

(non CO₂!!!)

Il legame con il CO è circa 300 volte più stabile di quello con l'O₂.

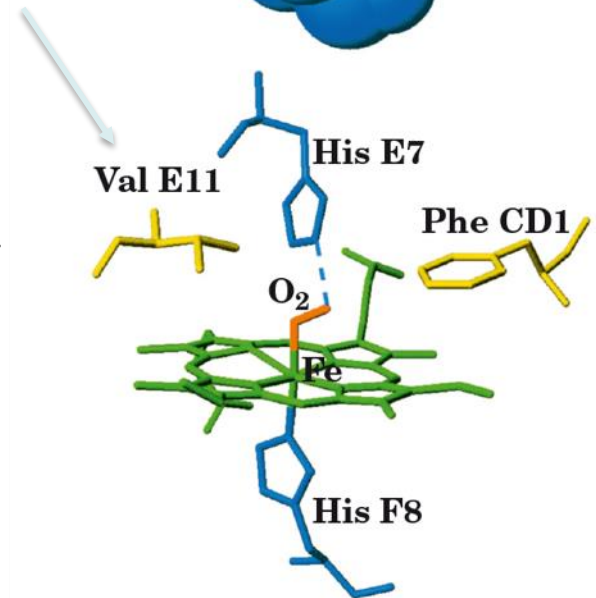
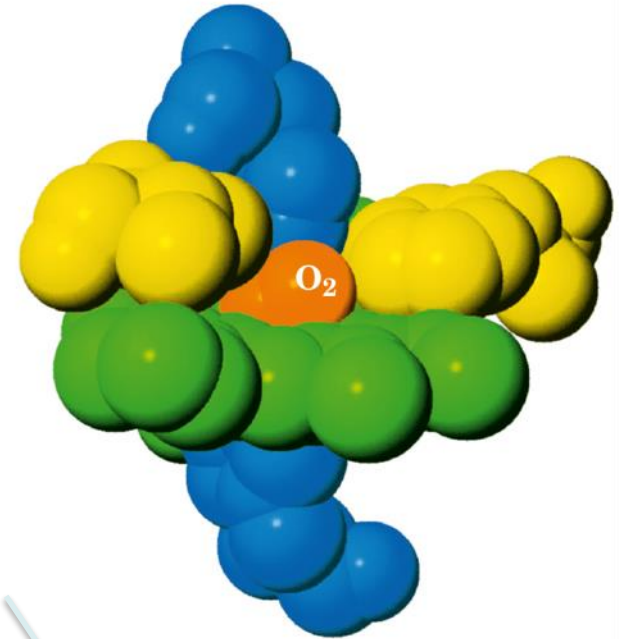
Quando nell'aria è presente 0.2% di CO in 1 ora si ha perdita di coscienza e in circa 4 ore si ha morte per asfissia (circa 2/3 di Hb sono legati a CO).



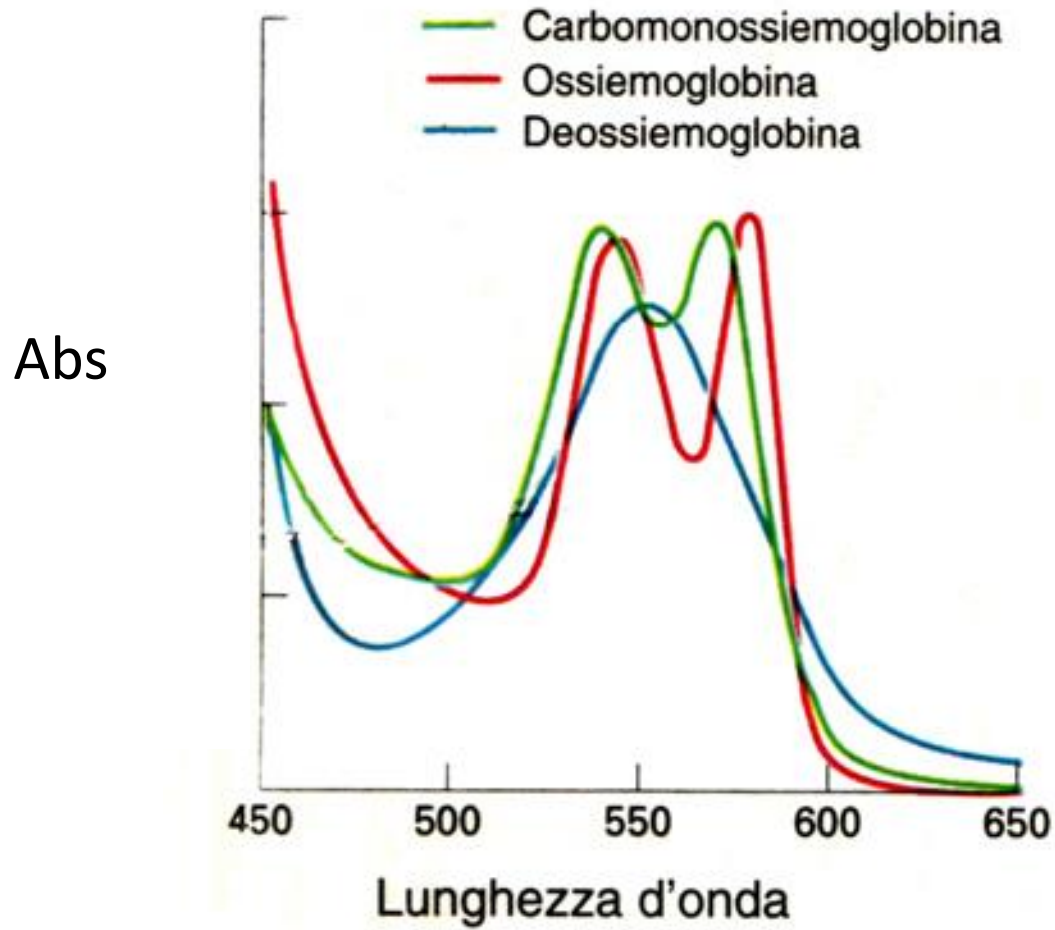
Protezione dell'eme da parte della globina

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

- impediscono al ferro dell'eme di ossidarsi da **Fe²⁺** ferroso a **Fe³⁺** ferrico;
- creano un **sito attivo idrofobico**, in cui si lega **O₂**
- proteggono l'**eme** da ligandi indesiderabili (esempio **CO** monossido di carbonio).

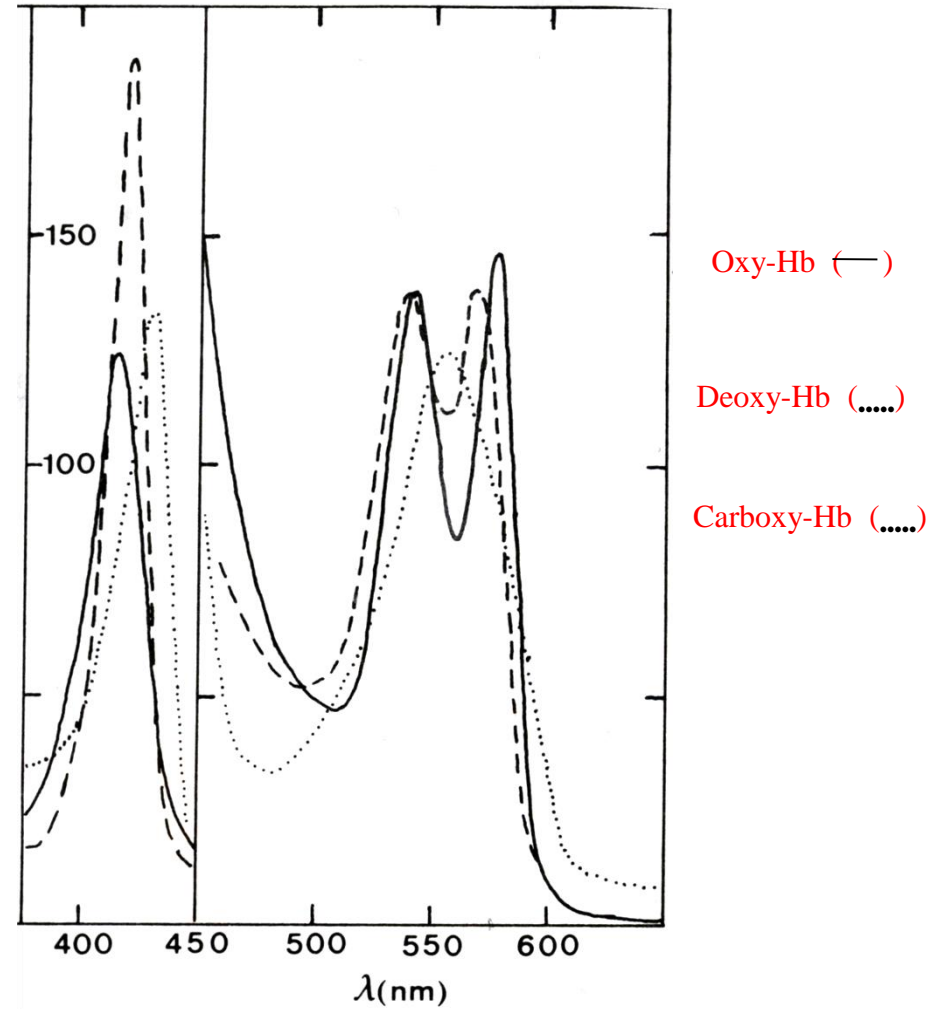
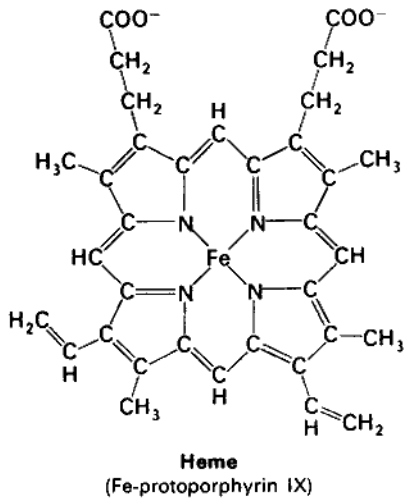


Spettro di assorbimento dell'Hb



- Gruppi prostetici (proteine coniugate): p.es gruppo eme 410-415 nm, 500-600 nm

Proteina coniugata: Hb

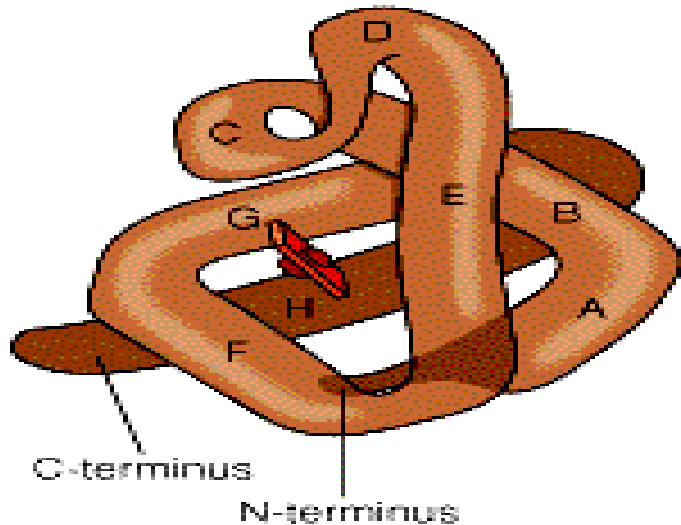


MIOGLOBINA

1 gruppo prostetico



1 molecola di ossigeno



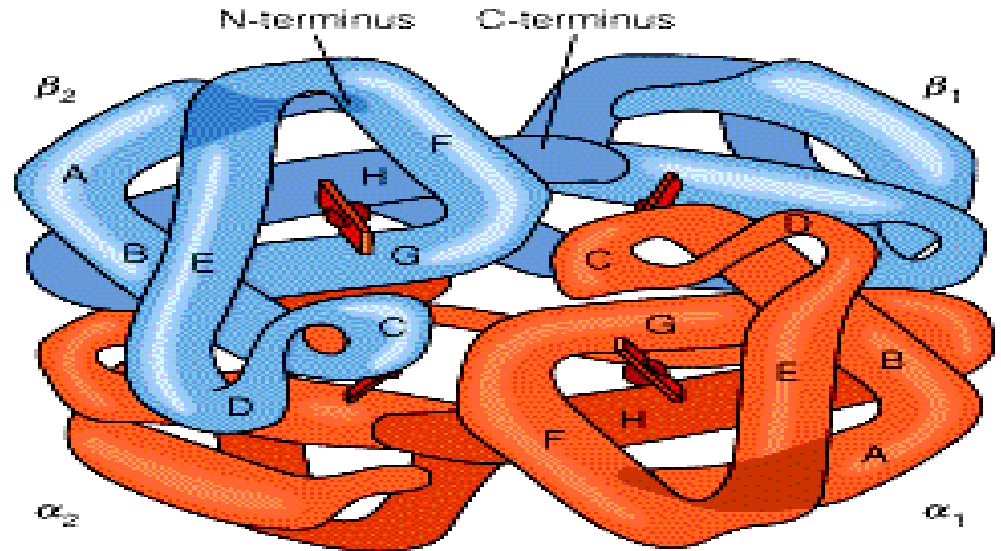
Il legame con l'ossigeno NON è cooperativo

EMOGLOBINA

4 gruppo prostetici



4 molecole di ossigeno

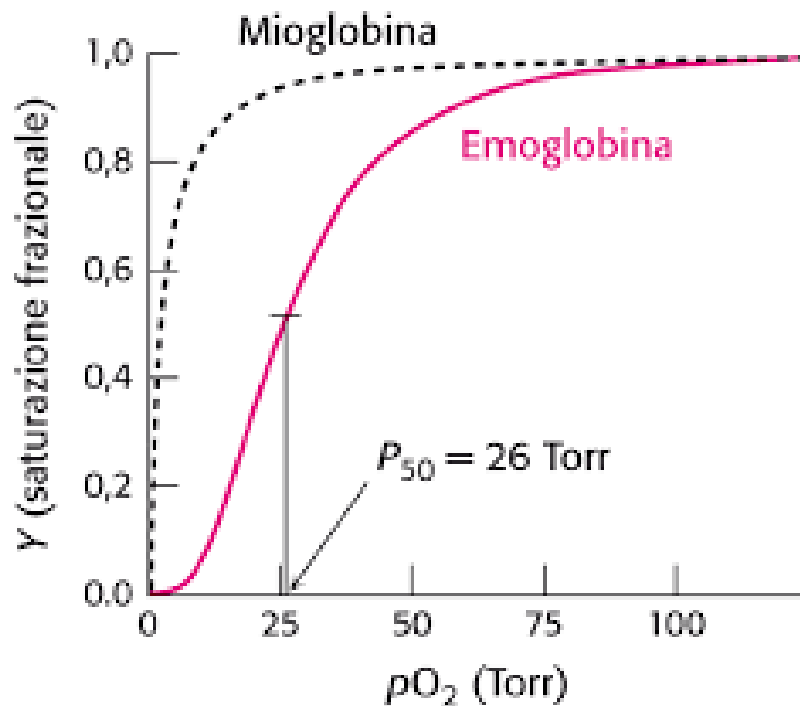


Il legame con l'ossigeno è cooperativo

Il legame con l'ossigeno è cooperativo (Hb):

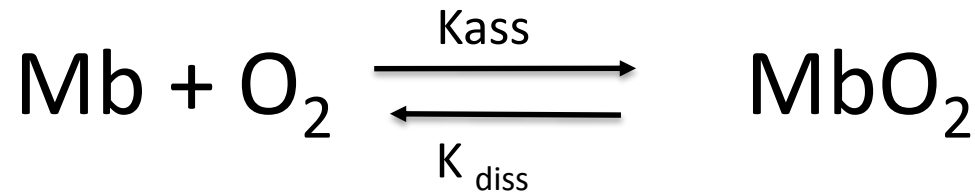


Il legame di una molecola di ossigeno facilita il legame delle altre molecole di ossigeno



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

Proteina (**P**) + Ligando (**L**) \leftrightarrow PL



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

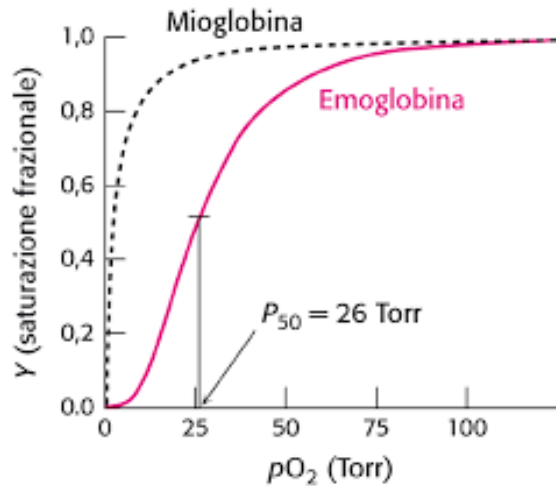
$$K_{\text{diss}} = \frac{[\text{M b}] [\text{O}_2]}{[\text{M b O}_2]}$$

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

FRAZIONE DI SATURAZIONE

$$Y = \frac{\text{Siti occupati}}{\text{Totale siti disponibili}}$$

$$Y = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{MbO}_2] + [\text{Mb}]}$$



Y = 1, Mb completamente ossigenata
Y = 0, Mb completamente deossigenata

Y si esprime in % o frazione di saturazione

LA FRAZIONE DI SATURAZIONE DIPENDE DA:

1) dalla concentrazione del ligando [O₂] che si esprime come pO₂

2) dall'affinità che la proteina ha per il suo ligando, cioè dalla costante di dissociazione (K_{diss}) del complesso MbO₂

$$Y = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{MbO}_2] + [\text{Mb}]}$$



Y= 1, Mb completamente ossigenata
Y= 0, Mb completamente deossigenata

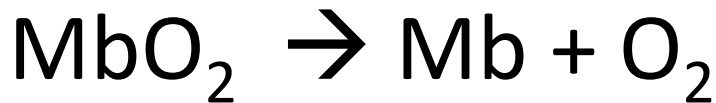
Possiamo riscrivere l'equazione in funzione della concentrazione di O_2 e della K_{diss}

$$Y = \frac{[MbO_2]}{[MbO_2] + [Mb]}$$



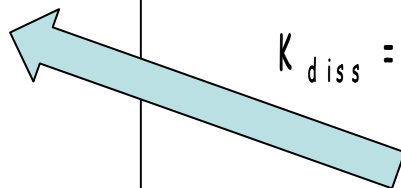
$$Y = \frac{\frac{[Mb] [O_2]}{K_{diss}}}{\frac{[Mb] [O_2]}{K_{diss}} + [Mb]}$$

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



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

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

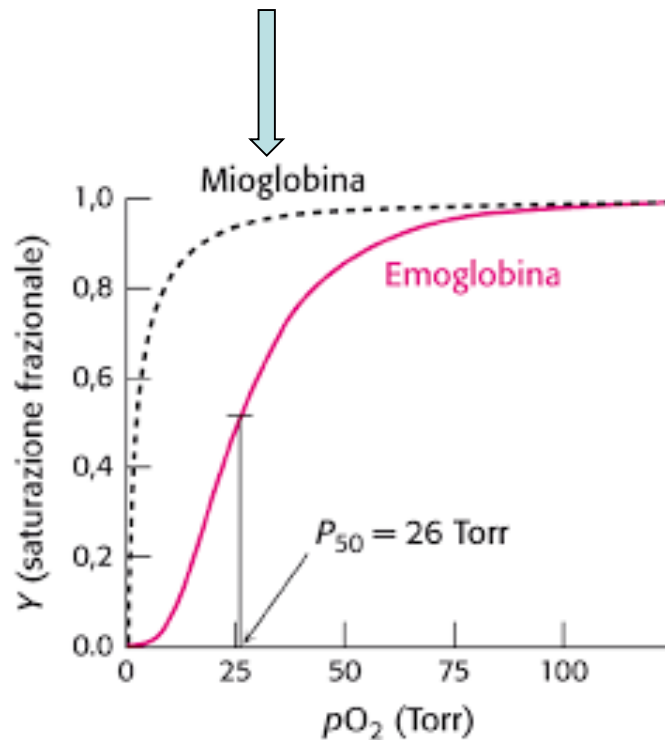


$$Y = \frac{[O_2]}{K_{diss} + [O_2]}$$

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

Equazione di Hill

Equazione che descrive una
IPERBOLE RETTANGOLARE



1 atmosfera = 760 Torr = 133.32 pascal

La frazione di saturazione \bar{Y} , la concentrazione di O_2 , e la K_{diss} sono legate da una relazione matematica:

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

→ $[O_2] = pO_2$ (pressione parziale di ossigeno)

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

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

$$\frac{1}{2} = \frac{pO_2}{K_{diss} + pO_2} \rightarrow K_{diss} + pO_2 = 2pO_2 \rightarrow K_{diss} = 2pO_2 - pO_2 = pO_2$$

$K_{diss} = p50$

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

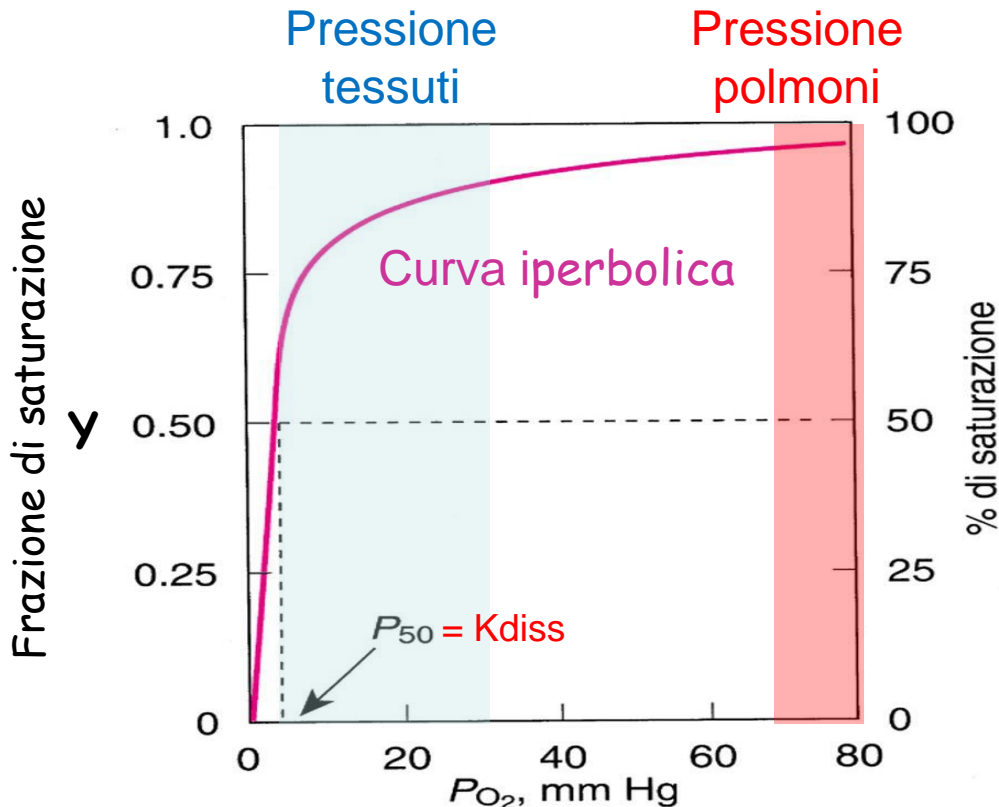
La p50 è la pressione parziale di ossigeno alla quale la Mb è saturata al 50%

Legame O_2 -Mb



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

CURVA di Legame dell'ossigeno alla Mb



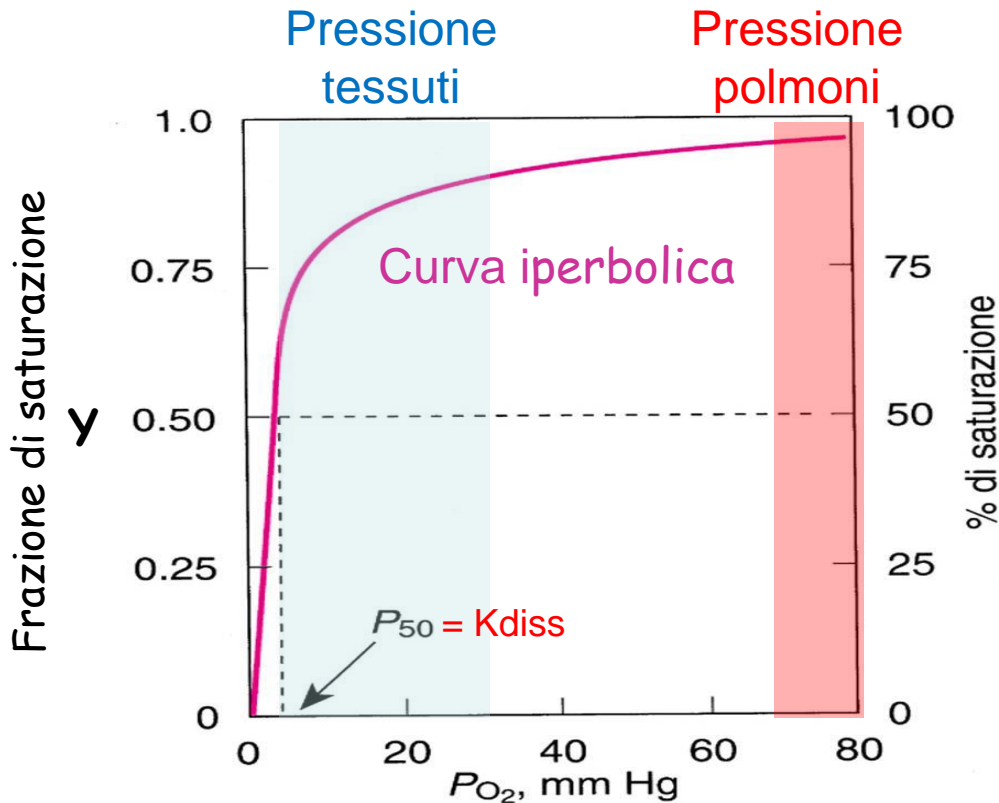
Numero di molecole che hanno legato l' O_2 rispetto al totale

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

La p_{50} della Mb è molto bassa (3-4 mmHg) (K_{diss} molto bassa) e quindi l'affinità dell'emoproteina per l' O_2 è molto alta.

Mb
↓
p50 molto piccola
↓
elevata affinità per l'O₂

IMPORTANTE perché la Mb deve estrarre l'ossigeno dal sangue (che verrà ceduto dall'emoglobina).



↓
Minore è la p50 più bassa sarà la K_{diss} e quindi maggiore sarà l'affinità dell'emoproteina per l'O₂

Più è grande il valore della p50 più è grande la K_{diss} e quindi minore l'affinità dell'emoproteina per l'O₂ (Hb)

La mioglobina funziona da deposito di O_2 a livello muscolare.

Quando il muscolo è a riposo la mioglobina lega l' O_2 ,

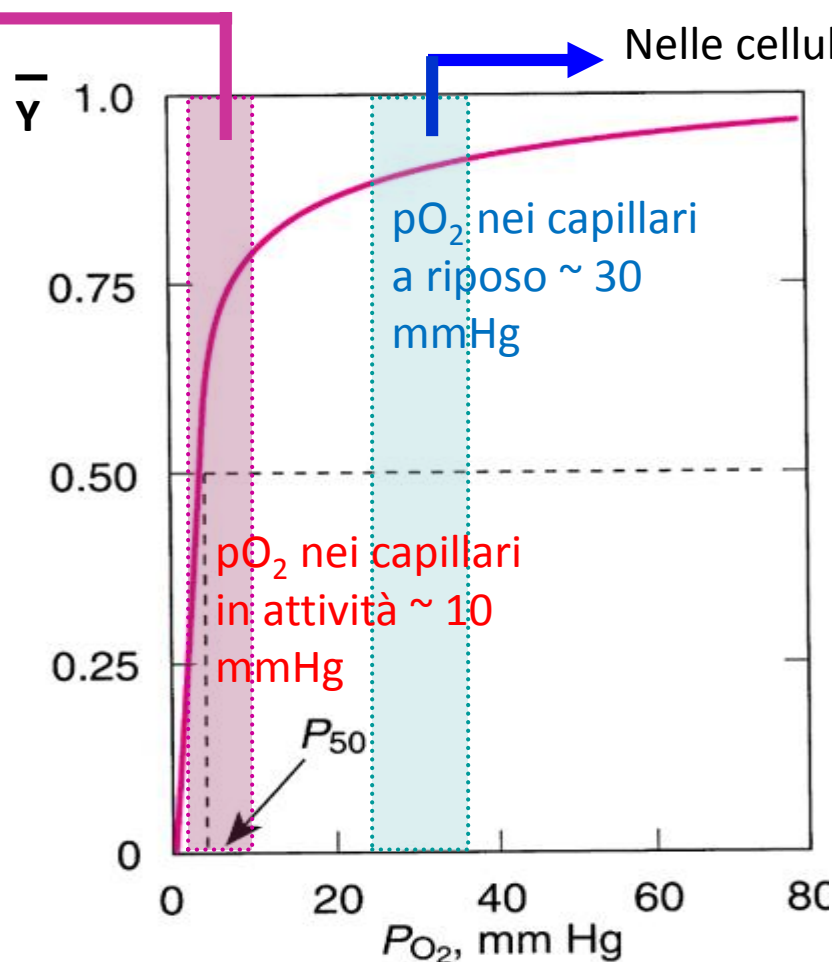
Quando il muscolo è attivo viene consumato O_2 diminuisce la pressione a livello dei tessuti la mioglobina rilascia l' O_2

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

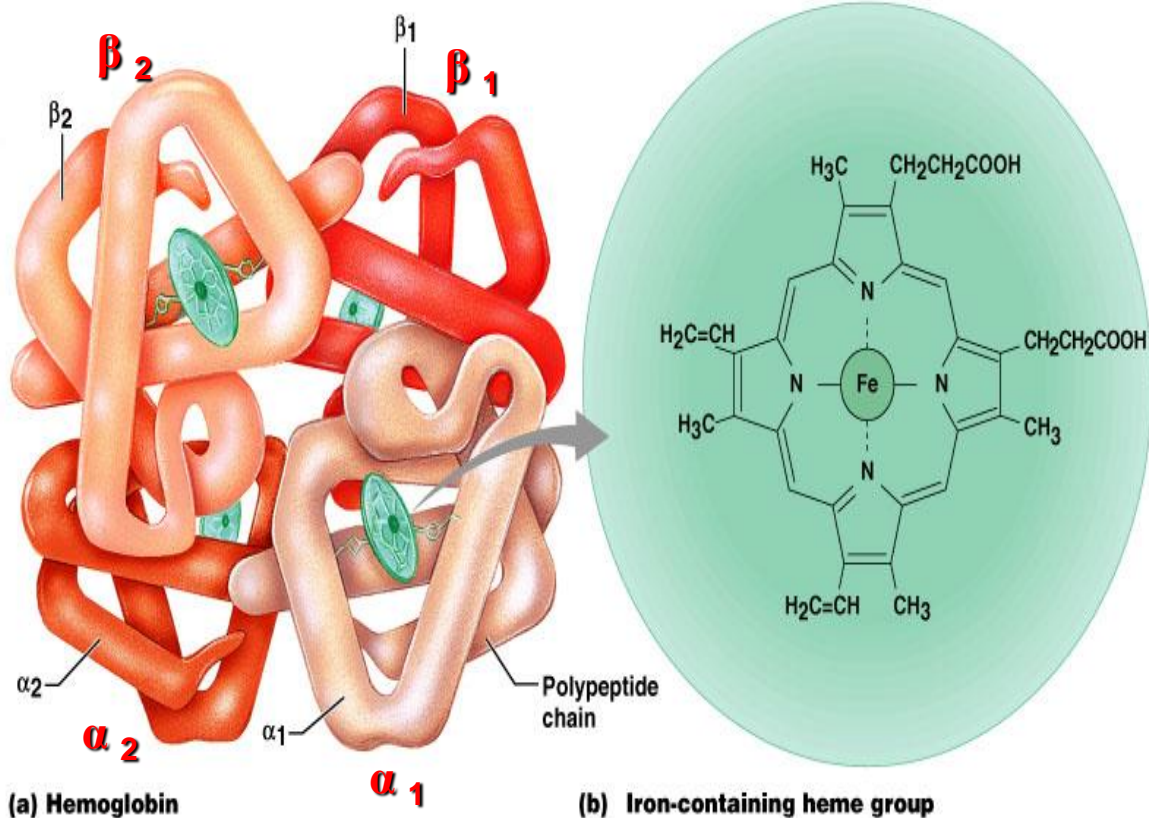
Mb è quasi satura: accumula O_2

Fase di ossigenazione

EMOGLOBINA (Hb)

Trasporto reversibile di O_2
dai polmoni ai tessuti

Trasporta reversibile di
anidride carbonica CO_2 .



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

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 α e 2 catene β , ciascuna con struttura simile a quella della mioglobina.

$\alpha_2 \beta_2$

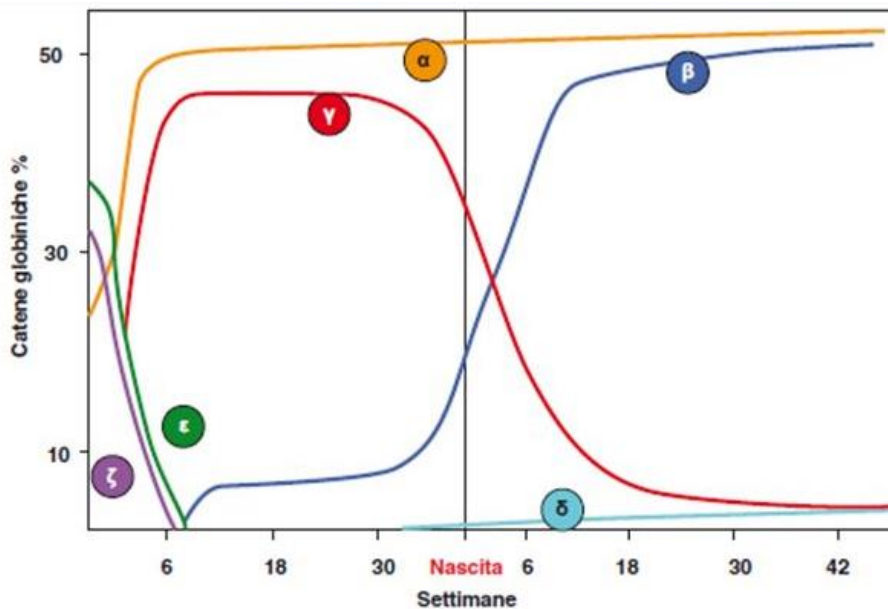
L'emoglobina fetale (HbF) è costituita da 2 catene α e 2 catene γ .

$\alpha_2 \gamma_2$



La sostituzione delle catene β (Hb adulta) con catene γ (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 ₂	$\alpha_2\delta_2$	2-5%
HbA _{1c}	$\alpha_2\beta_2$ -glucosio	3-9%

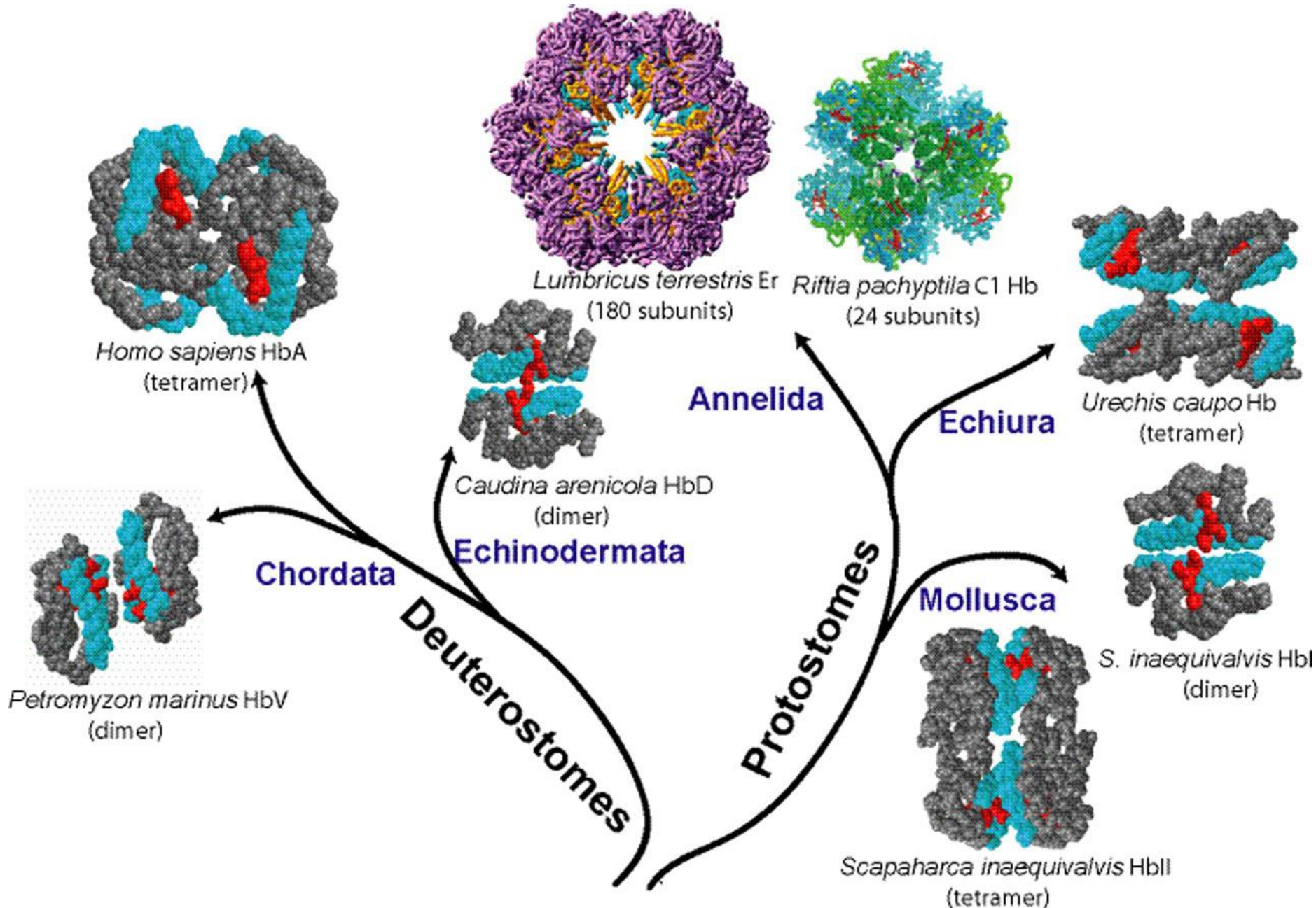


Espressione dei geni globinici durante l'ontogenesi

Figura 25.35

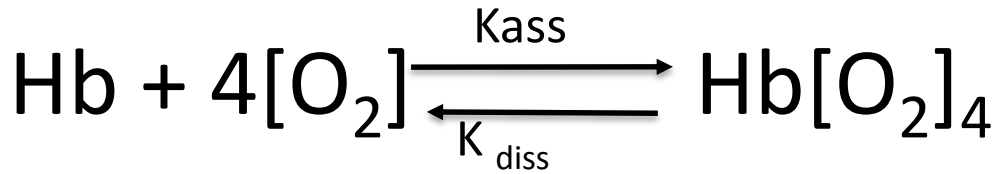
Entità percentuale della produzione delle diverse catene emoglobiniche nel corso della gravidanza e nel primo anno di vita.

Diversità nelle strutture dell'EMOGLOBINE nel mondo animale



Hb

Il grado di ossigenazione della Hb 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

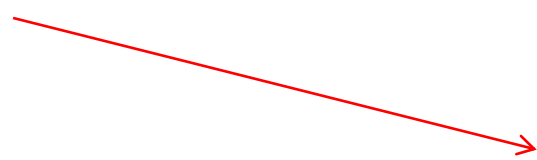
$$\bar{Y} = \frac{pO_2^n}{K_{diss} + pO_2^n}$$

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

n è il coefficiente di Hill e può avere valori

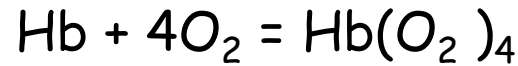
1 (Mb)

4 (Hb)

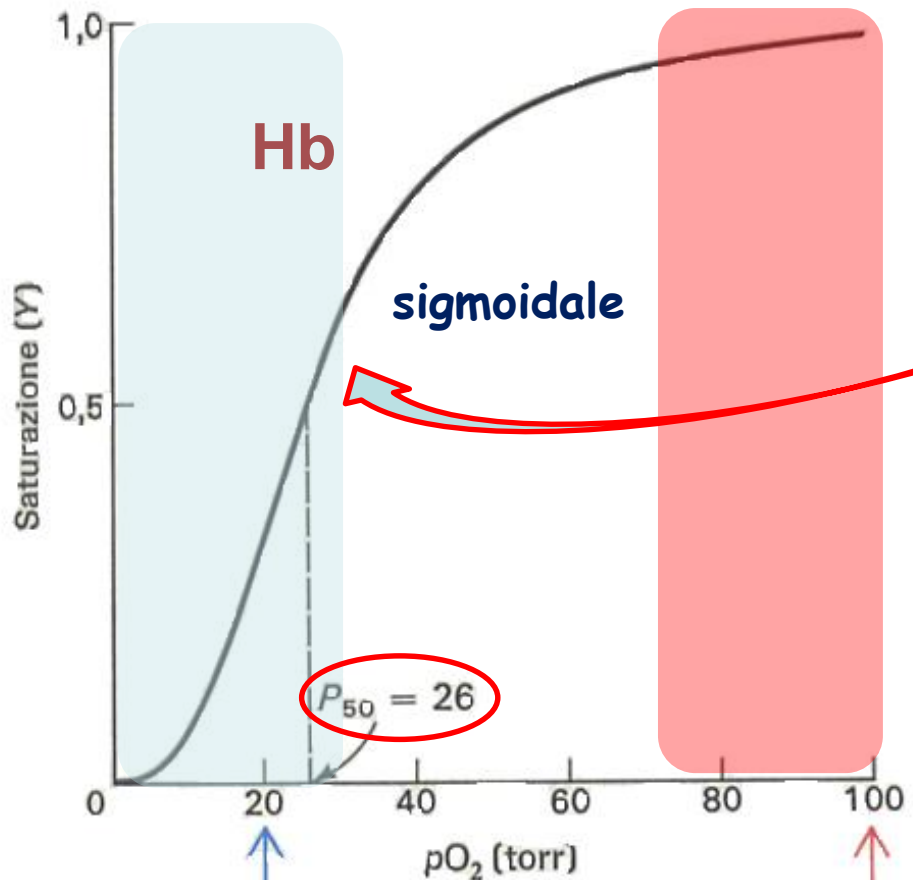

$$\bar{y} = \frac{pO_2}{K_{diss} + pO_2}$$

INDICA IL GRADO DI COOPERATIVITÀ TRA LE SUBUNITA'

Curva di dissociazione dell'O₂ per l'emoglobina

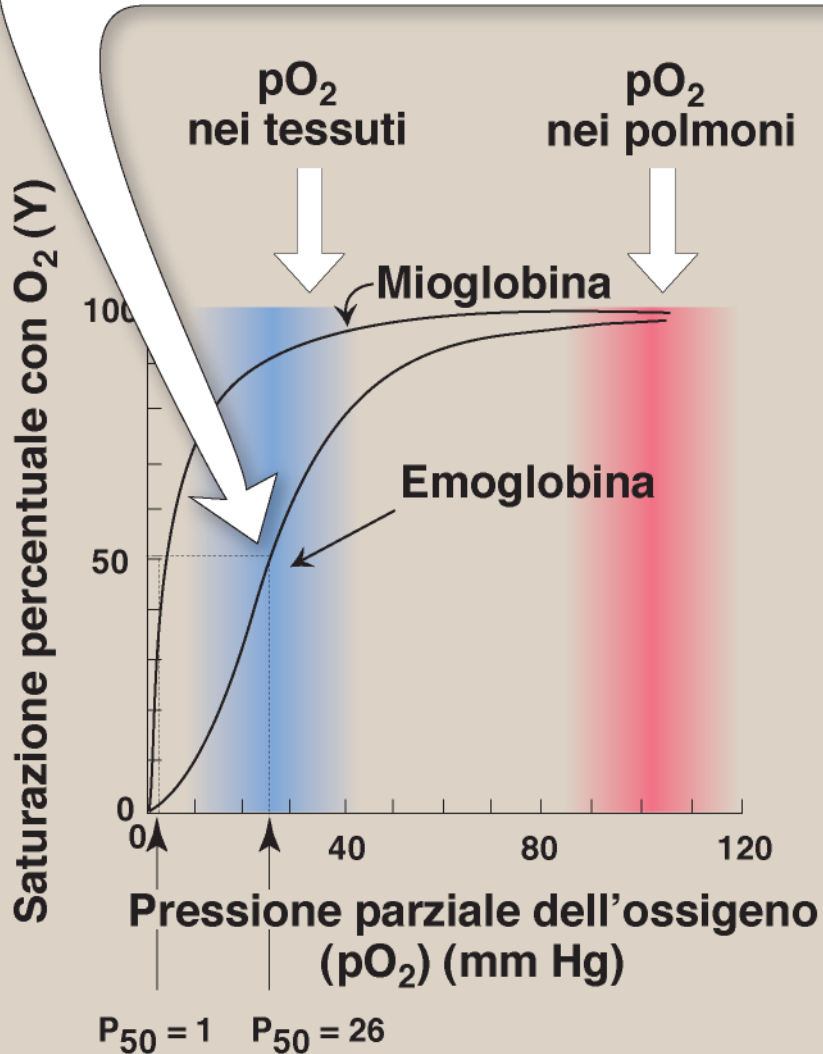


$$\bar{Y} = \frac{p\text{O}_2^n}{p50^n + p\text{O}_2^n}$$



L'emoglobina lega l'O₂ quando la pressione parziale del gas (pO₂) è elevata (**polmoni**) e lo rilascia quando la pressione è bassa (**tessuti**).

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.

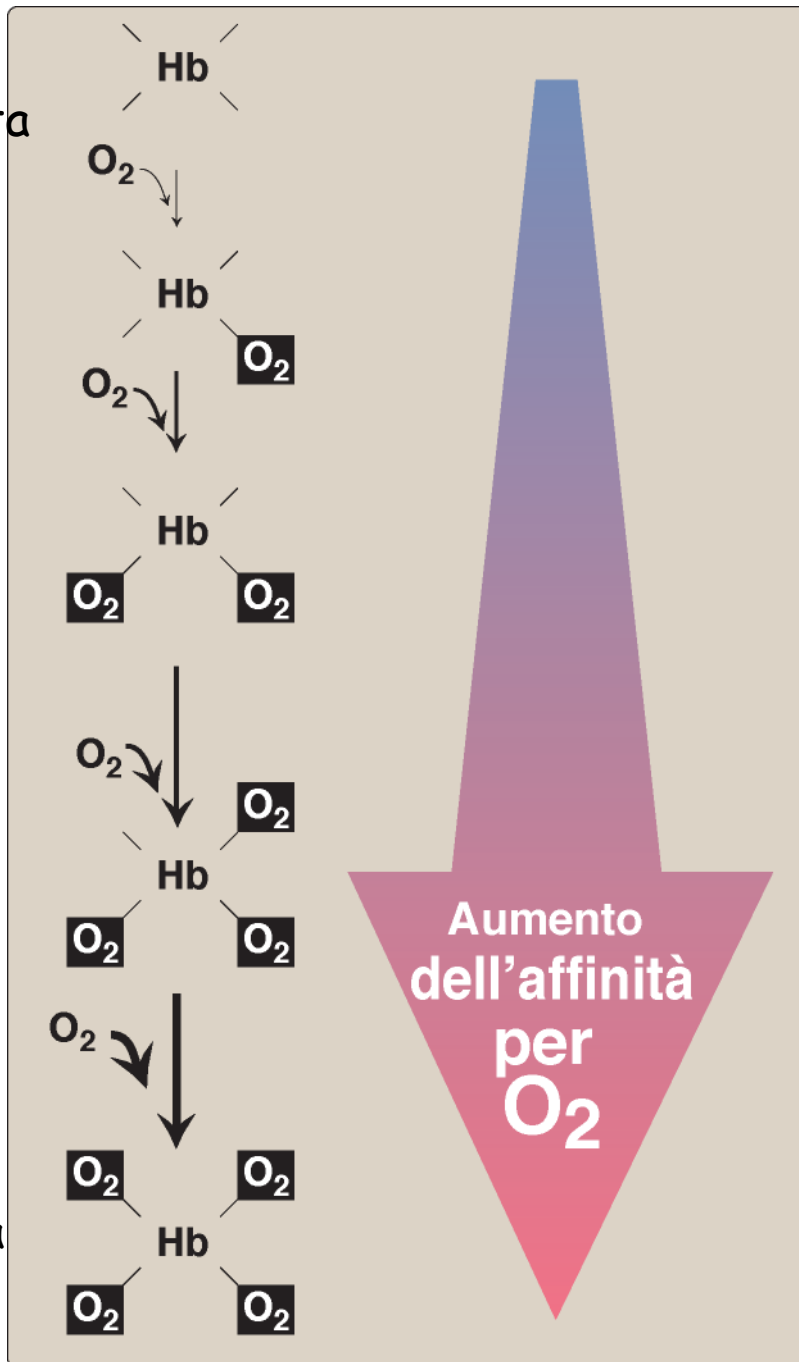


CURVA SIGMOIDALE



LEGAME COOPERATIVO

Emoglobina
deossigenata

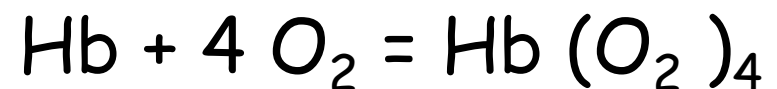


Emoglobina
ossigenata

**CURVA SIGMOIDALE =
LEGAME COOPERATIVO**

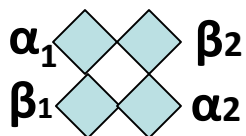
Il legame
dell'ossigeno è
cooperativo

**EMOGLOBINA si lega all'O₂ con
affinità crescente**

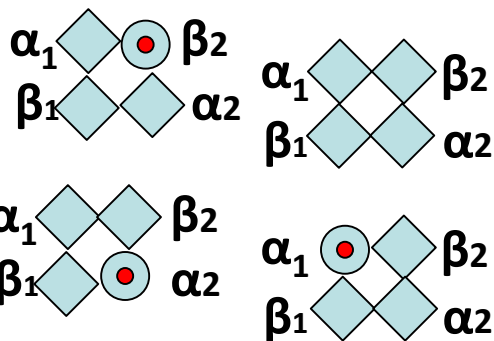


La Transizione idealmente si completa: quando sono occupati gli ultimi siti e tutte le molecole di Hb sono nella forma ad alta affinità

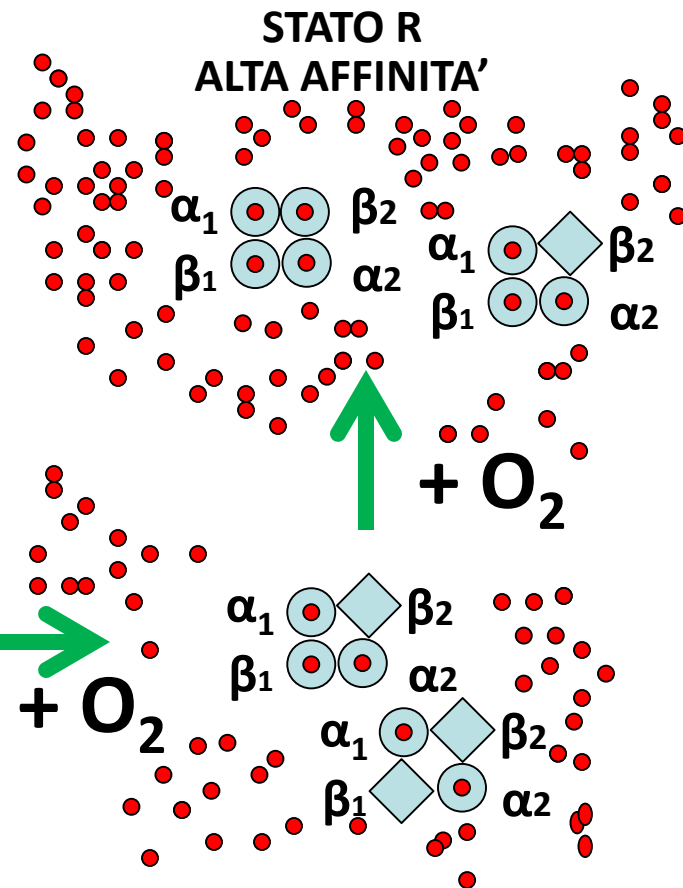
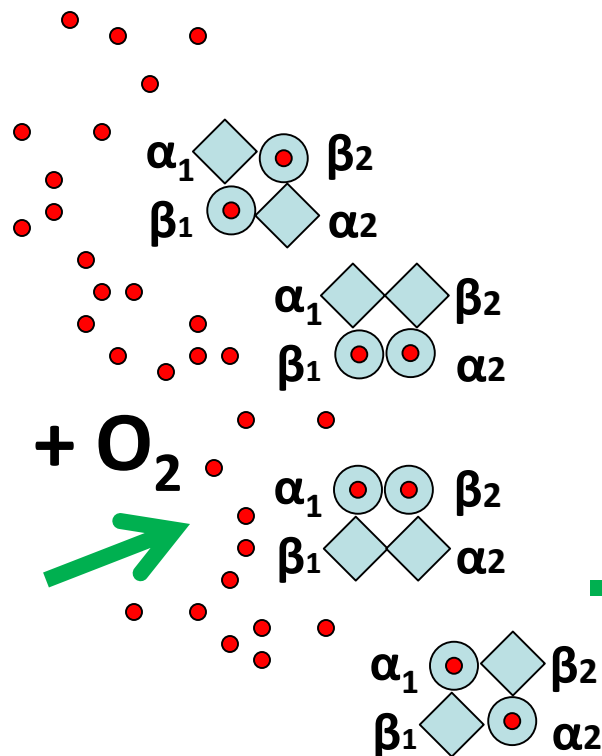
STATO T
Hb a bassa affinità



+ O₂



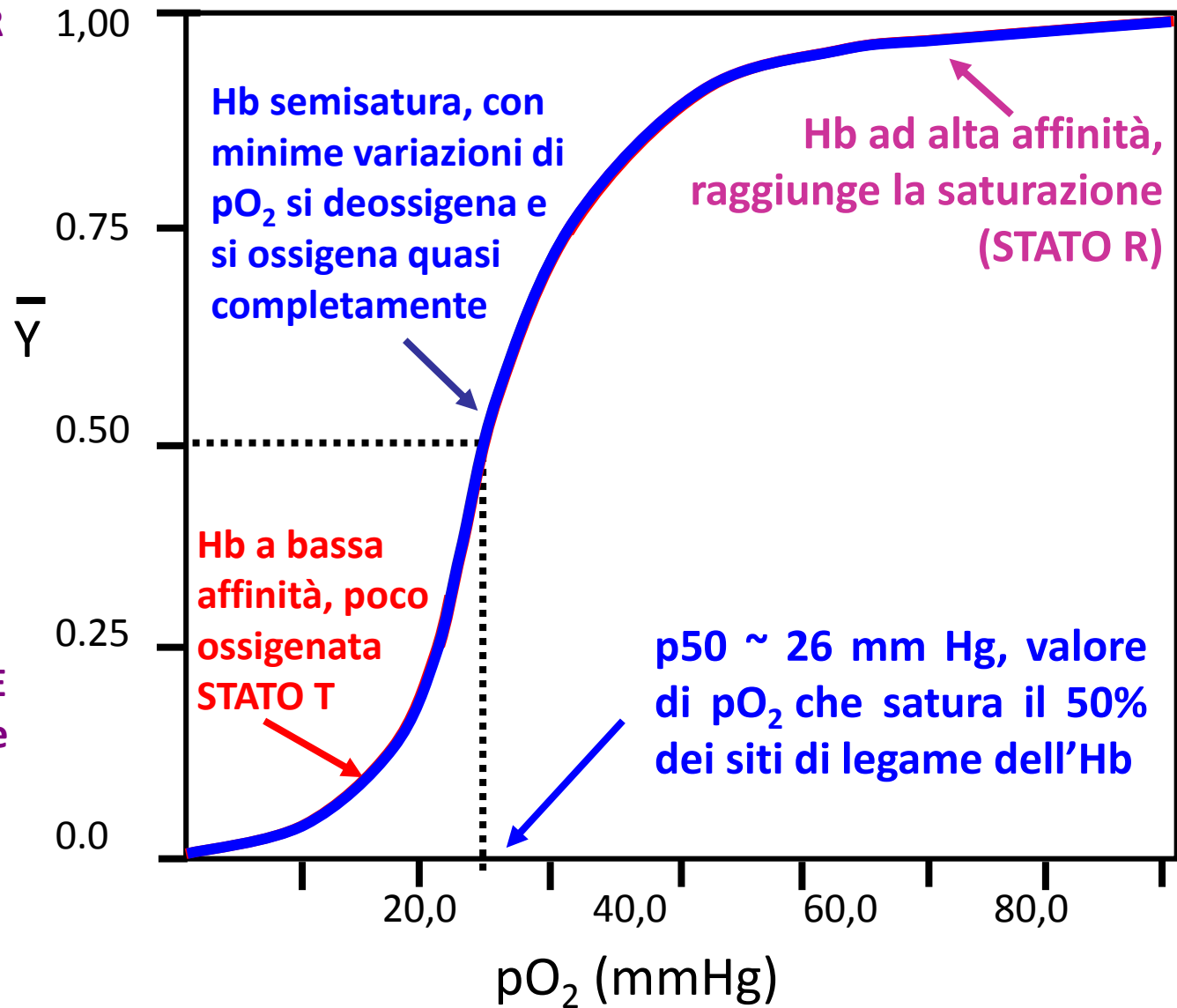
Legame con la molecola di O₂ >> **cambia la struttura 3^{aria}** della subunità legata



CON LA PARZIALE OSSIGENAZIONE (almeno un sito occupato dall'O₂ in ciascuno dei 2 dimeri $\alpha\beta$) l'intera proteina **modifica la sua struttura 4^{aria}** assumendo una struttura piu' disponibile ad accettare altre molecole di O₂.

Graficamente la relazione esistente fra \bar{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



Deoxy-Hb (stato T)

Oxy-Hb (stato R)

L'Hb passa da una struttura a bassa affinità per l'O₂ (T) ad una struttura ad alta affinità (R) in funzione della concentrazione di O₂ (pO₂).

IL LEGAME CON L'O₂ MODIFICA LA STRUTTURA DELLA PROTEINA

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.

Deoxy-Hb (stato T)

Oxy-Hb (stato R)

L'Hb passa da una struttura a bassa affinità per l'O₂ (T) ad una struttura ad alta affinità (R) in funzione della concentrazione di O₂ (pO₂).

IL LEGAME CON L'O₂ MODIFICA LA STRUTTURA DELLA PROTEINA

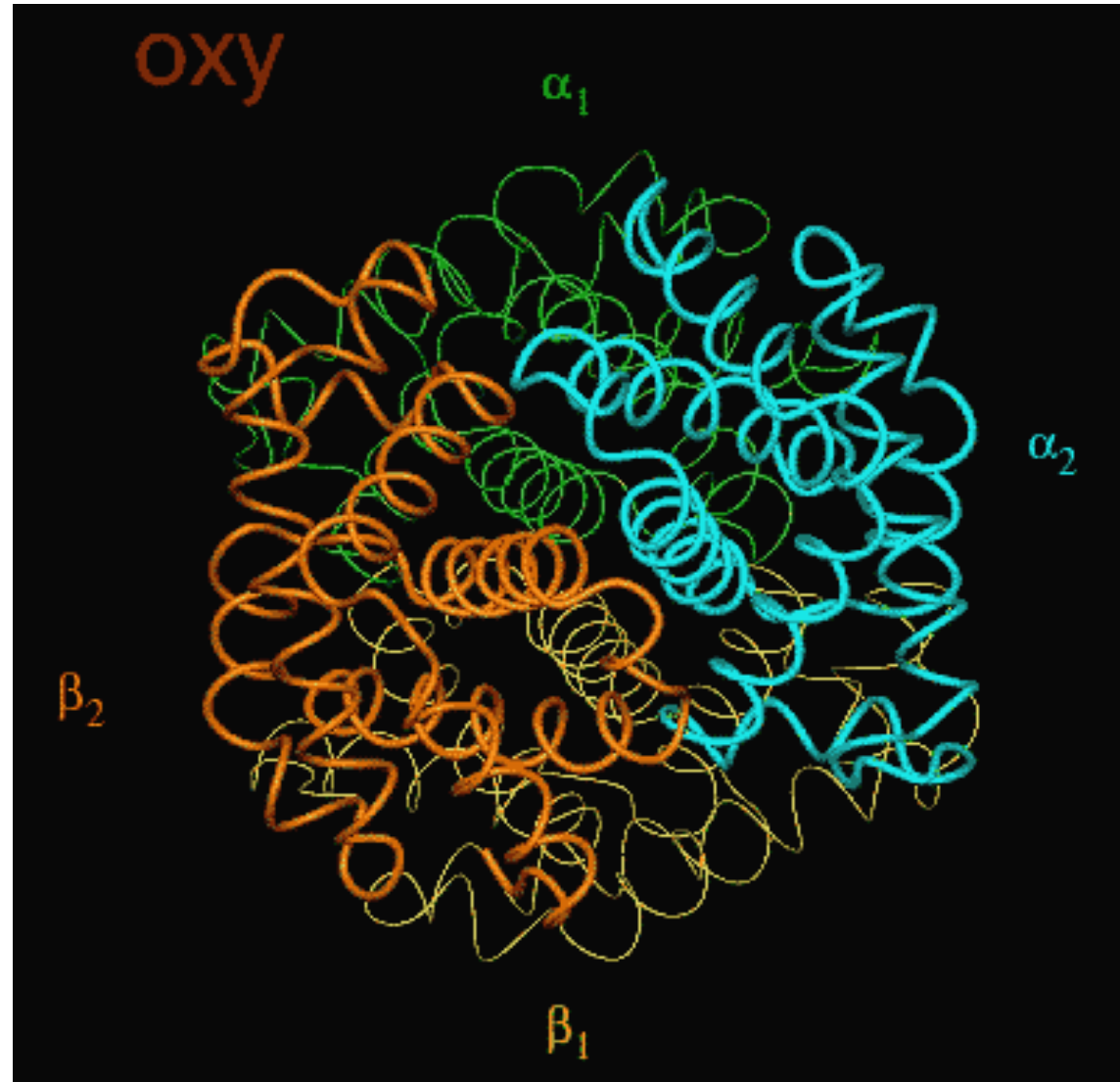
La cooperatività di legame dell'emoglobina è possibile perché lo stato di ossigenazione di un sito può essere comunicato agli altri siti (SONO COOPERATIVI) attraverso un cambiamento della struttura dell'Hb.

Allosteria

(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.



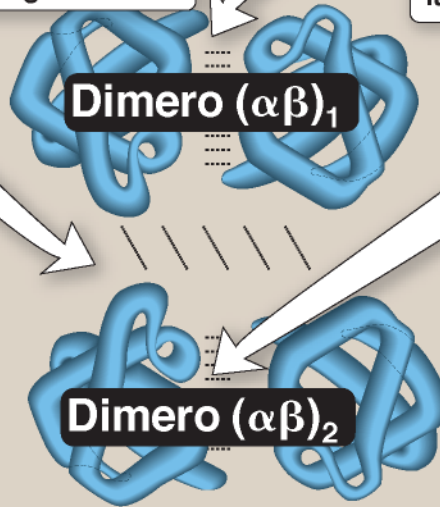
L'emoglobina esiste in due forme:

deossigenata = **T**

ossigenata = **R**;

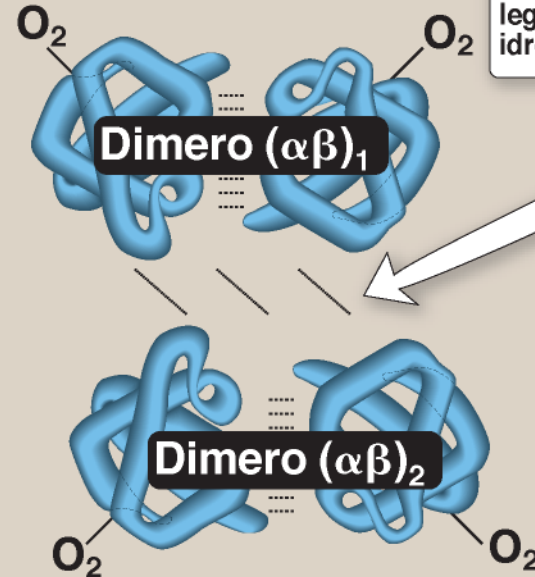
Nell'emoglobina deossigenata, tra i due dimeri $\alpha\beta$ si stabiliscono deboli legami ionici e legami a idrogeno.

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

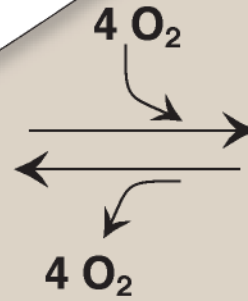


Struttura "T", o tesa, della deossi-emoglobina

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



Legame **Hb** con O_2 ---> modificazione strutturale.

T (interazioni ioniche o ponti salini) fra catene laterali di aminoacidi (es. Asp-His)

R (ponti salini spezzati).

Il fenomeno avviene in direzione opposta quando l'emoglobina rilascia l'ossigeno.

COSA SUCCEDE ALLA STRUTTURA DELLA EMOGLOBINA QUANDO AVVIENE LA TRANSIZIONE T \leftrightarrow R?

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

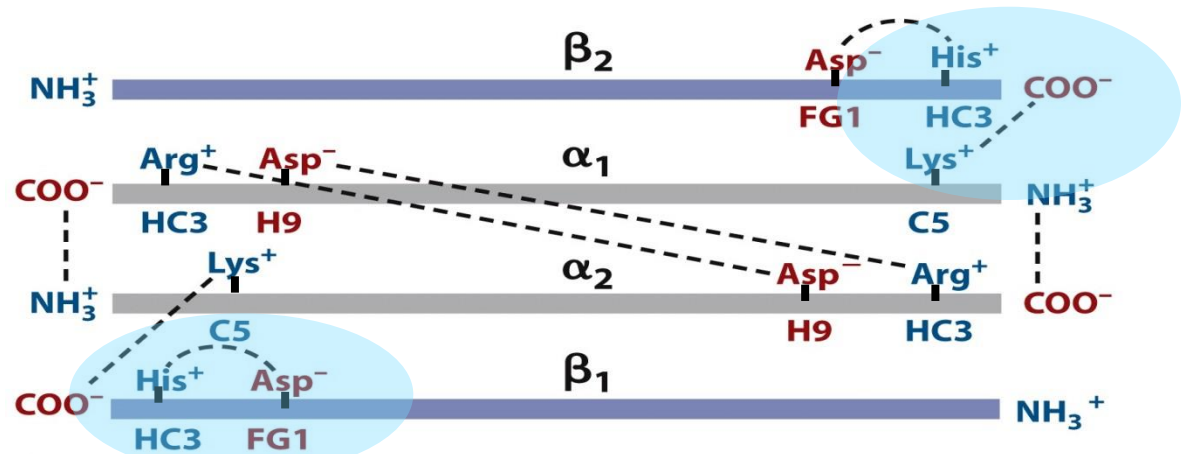
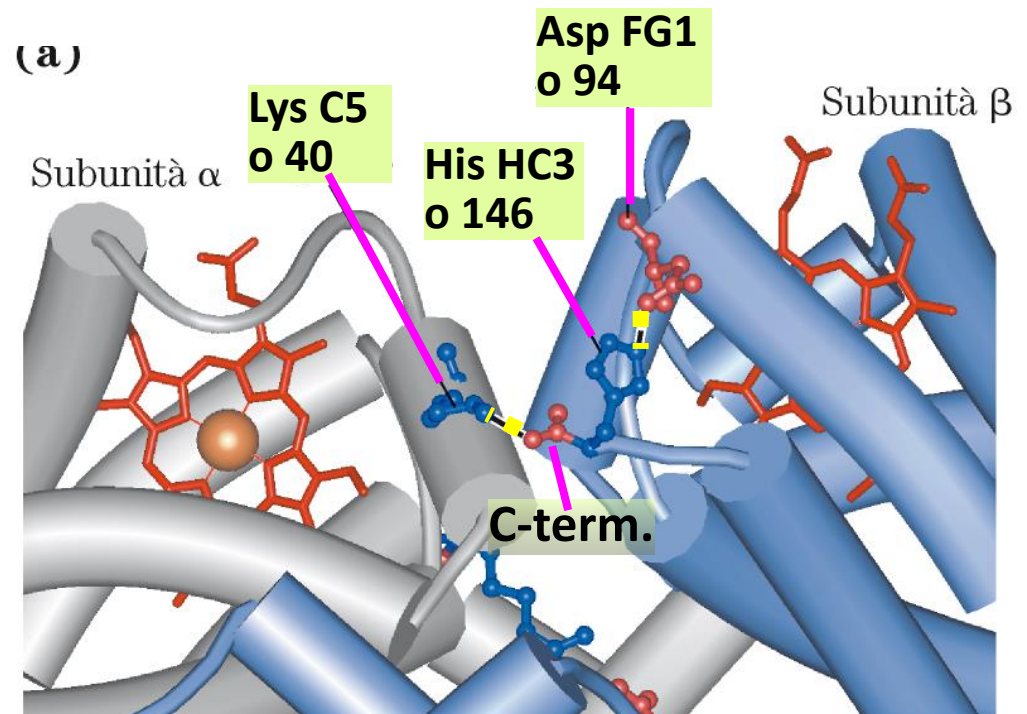


Figure 5-9b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

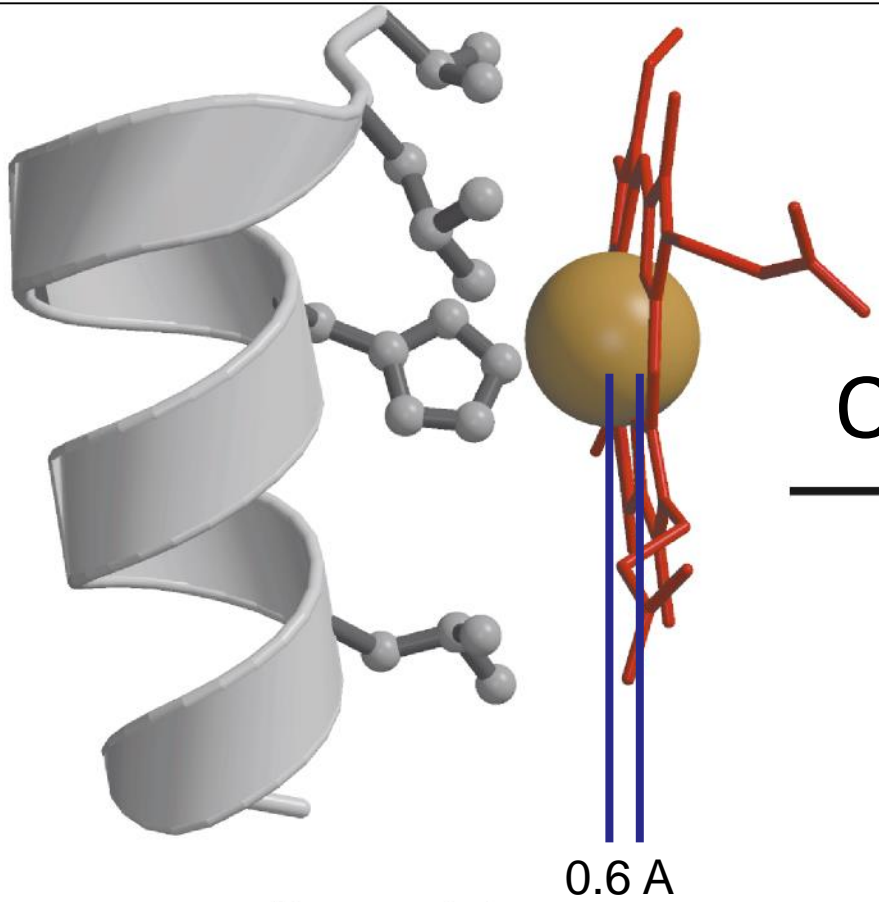
DURANTE LA TRANSIZIONE T \rightarrow R SI ROMPONO ALCUNI LEGAMI nell'interfaccia α_1/β_2 e α_2/β_1 :

- fra l'His146 e Asp94 delle catene β
- fra la Lys40 delle catene α e l'estremità COO⁻ delle catene β



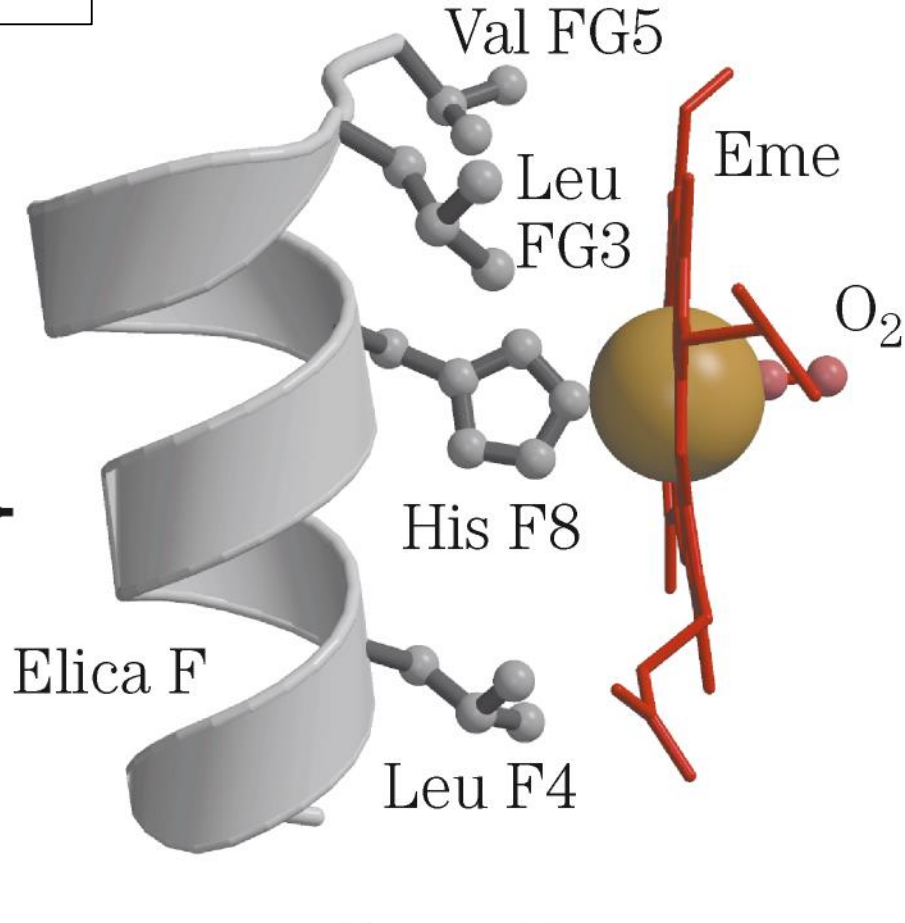
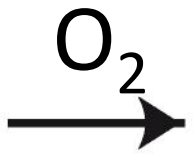
- Ferro ----fuori dal piano dell'eme
- Eme---→ distorto
- His F8 -→ asse non perpendicolare al piano dell'eme
 • (inclinato di 8°)

Il ferro si sposta nell'eme che si appiattisce
 Riarrangiamento della His F8



Stato T

Perutz MF



Stato R

His F8 trascina l'elica F e angolo FG (rottura di ponti salini)

L'Hb è una proteina ALLOSTERICA.

Contiene 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^{aria} e anche della struttura 4^{aria} 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**

EMOGLOBINA

L'Hb è una proteina **ALLOSTERICA**.

Contiene 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^{aria} e anche della struttura 4^{aria} 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**

➤ EFFETTORI ALLOSTERICI O MODULATORI

ALLOSTERICI:

➤ $[H^+]$

➤ 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

MODULATORI ETEROTROPICI NEGATIVI.

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 O₂ è fortemente influenzato dal **pH** e dalla **pCO₂**.

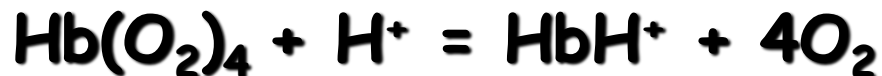
Nei tessuti----> pH è basso (aumentano gli H⁺) e la pCO₂ è elevata, l'affinità di Hb per O₂ diminuisce, -> O₂ viene liberato

H⁺ e CO₂ si legano all'Hb.

Il contrario avviene nei capillari polmonari.

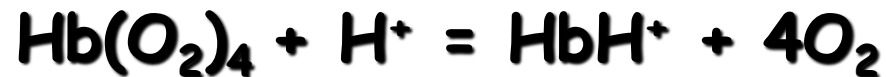
L'effetto del **pH** e della **CO₂** sull'affinità di Hb per O₂ è denominato

Effetto Bohr:



L'effetto del pH e della CO₂ sull'affinità di Hb per O₂ è denominato

Effetto Bohr:



Nei tessuti l'Hb rilascia O₂,

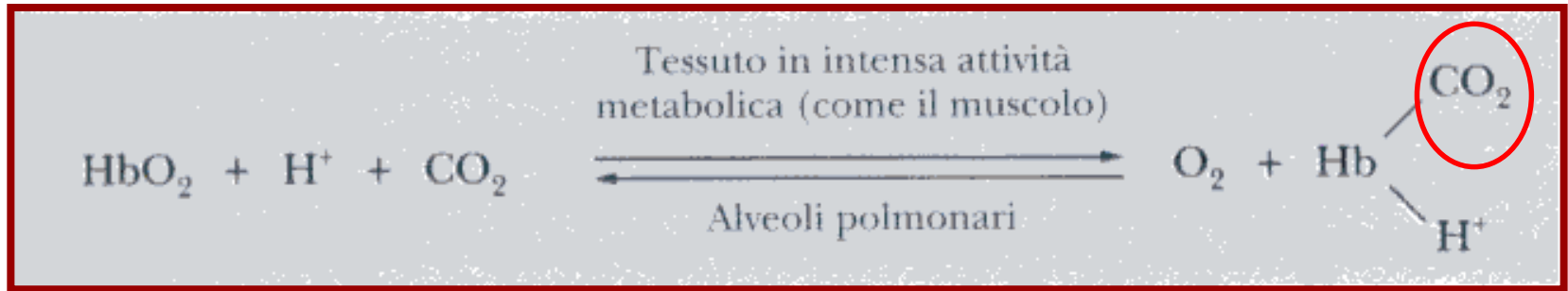
-basse pO₂

- 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 H⁺ si legano a 3 coppie di siti sull'Hb:
la più importante è l'His 146 delle catene β**

Nei tessuti ad elevato metabolismo, (muscoli in attività) in cui c'è una notevole produzione di composti acidi e di CO₂, l'Hb cede più facilmente l'O₂ e lega gli H⁺ e la CO₂.

Nei polmoni avviene esattamente il contrario.

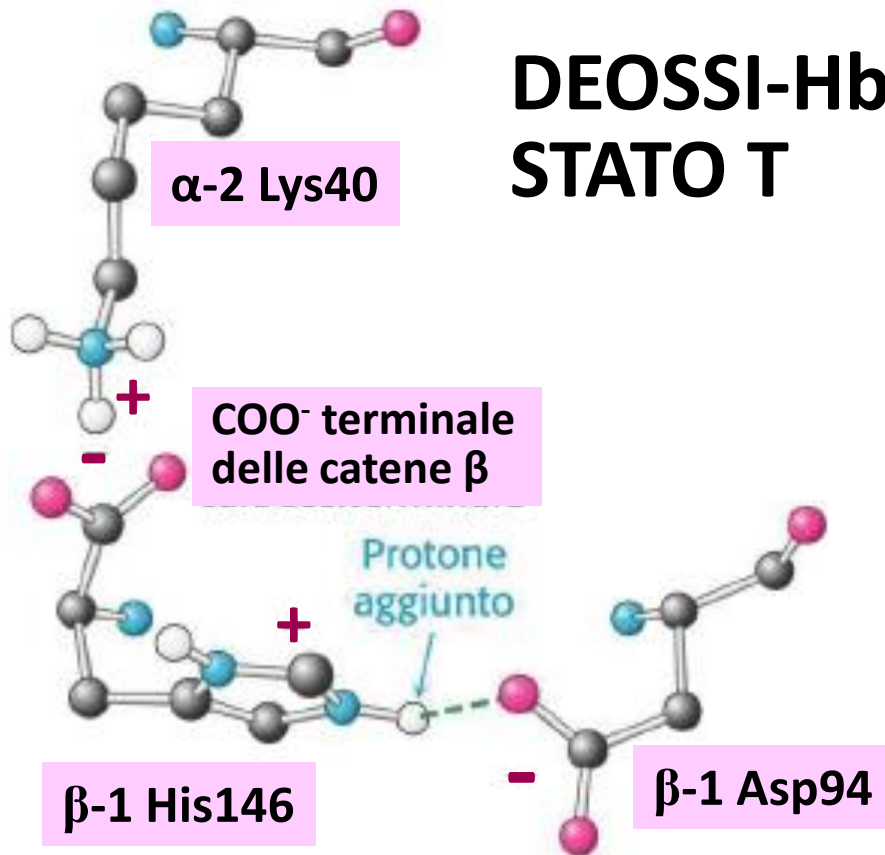
COME SPIEGARE IL MECCANISMO DELL'EFFETTO BOHR?

La DEOSSI-Hb ha una maggiore tendenza a protonarsi della OSSI-Hb, -> 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 β .

DEOSSI-Hb STATO T

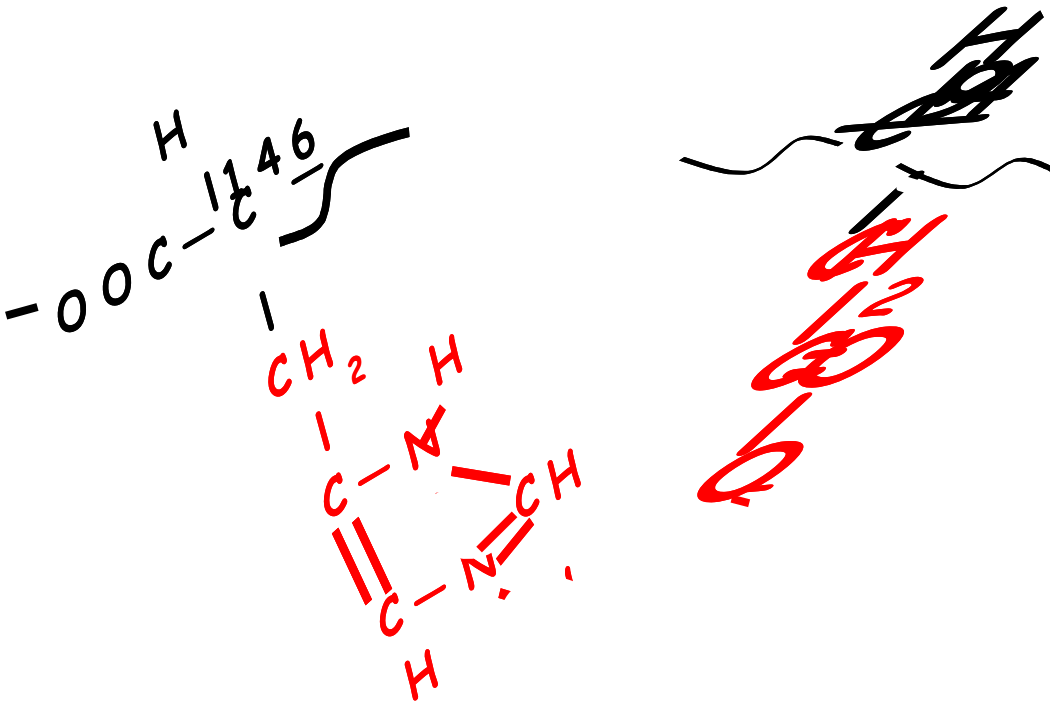


Quando l'Hb inizia a deossigenarsi, l'His-146 delle catene β diventa più basica, il suo pK_R aumenta (> 7.2)

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

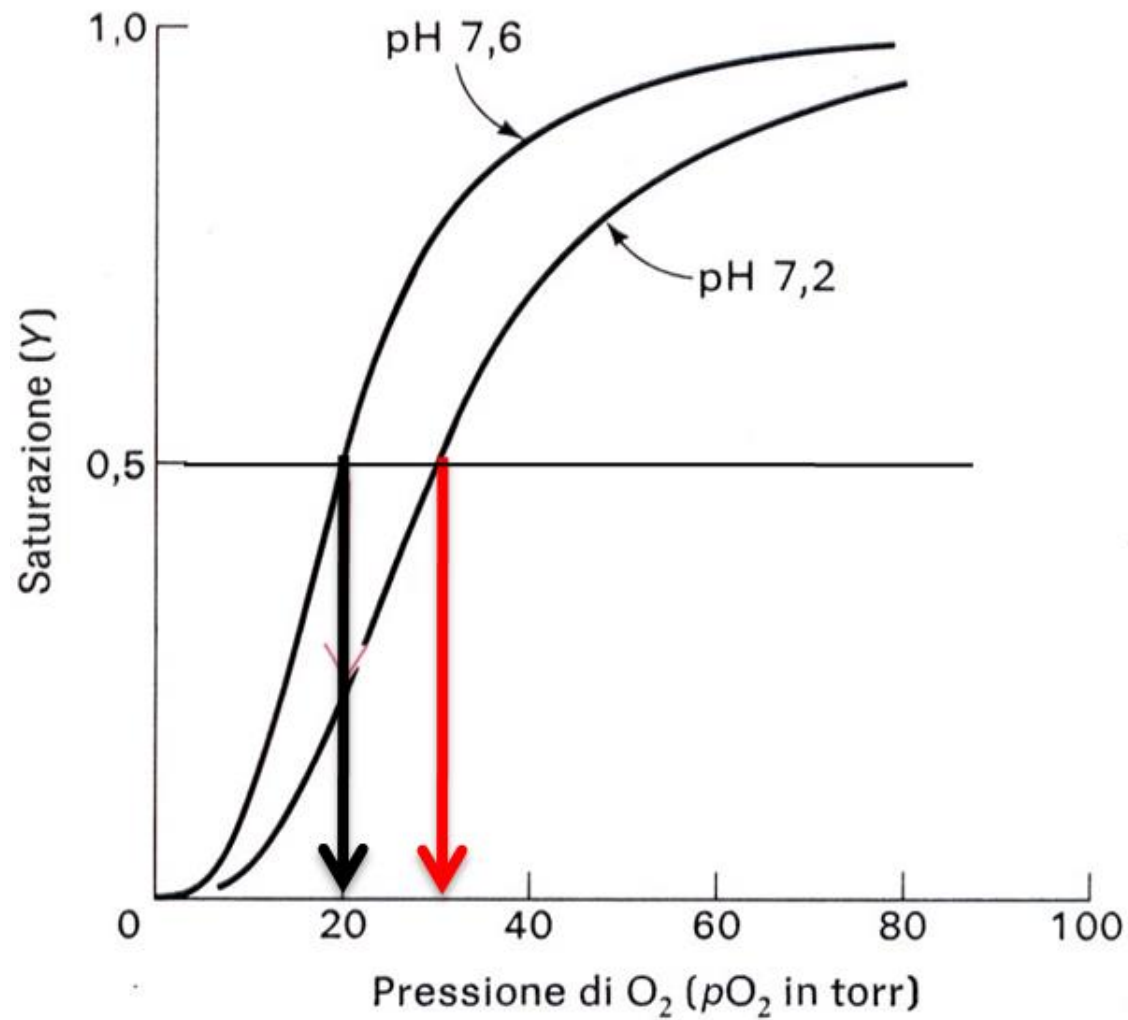
A livello polmonare l'Hb inizia a legare O₂: inizia la transizione allosterica (T > R), l'His-146 delle catene β diventa più acida, il suo pK_R diminuisce (~6.5)

Nei capillari polmonari il pH è ~7.6, nel torrente circolatorio è ~7.2 (maggiore rispetto al pK_R 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.
(Stato R)



Hb trasporta H^+ e CO_2 , dai tessuti ai polmoni ed ai reni, organi deputati alla loro escrezione.

Trasporto della CO_2

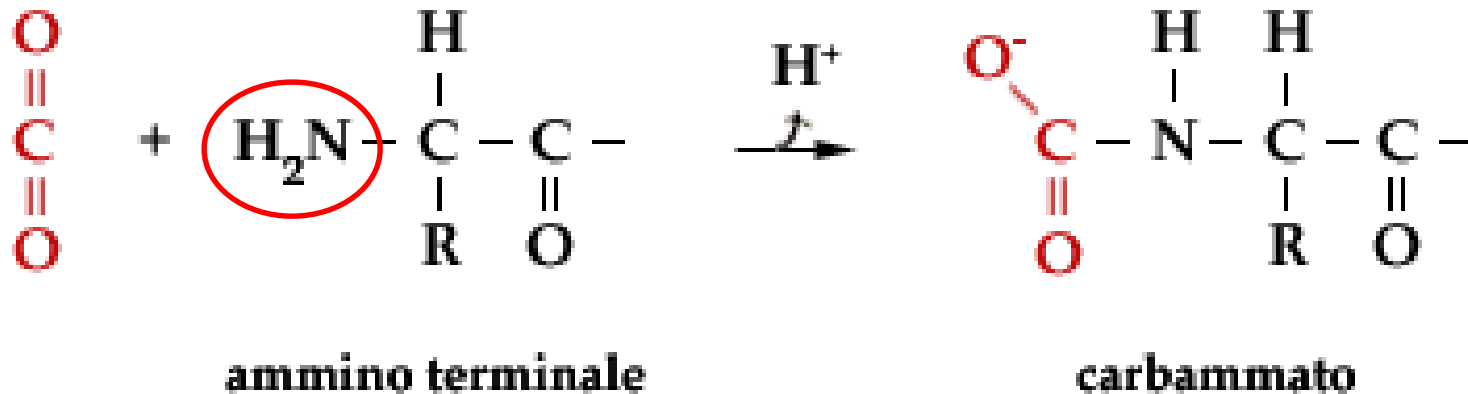
- CO_2 liberamente disciolta nel plasma

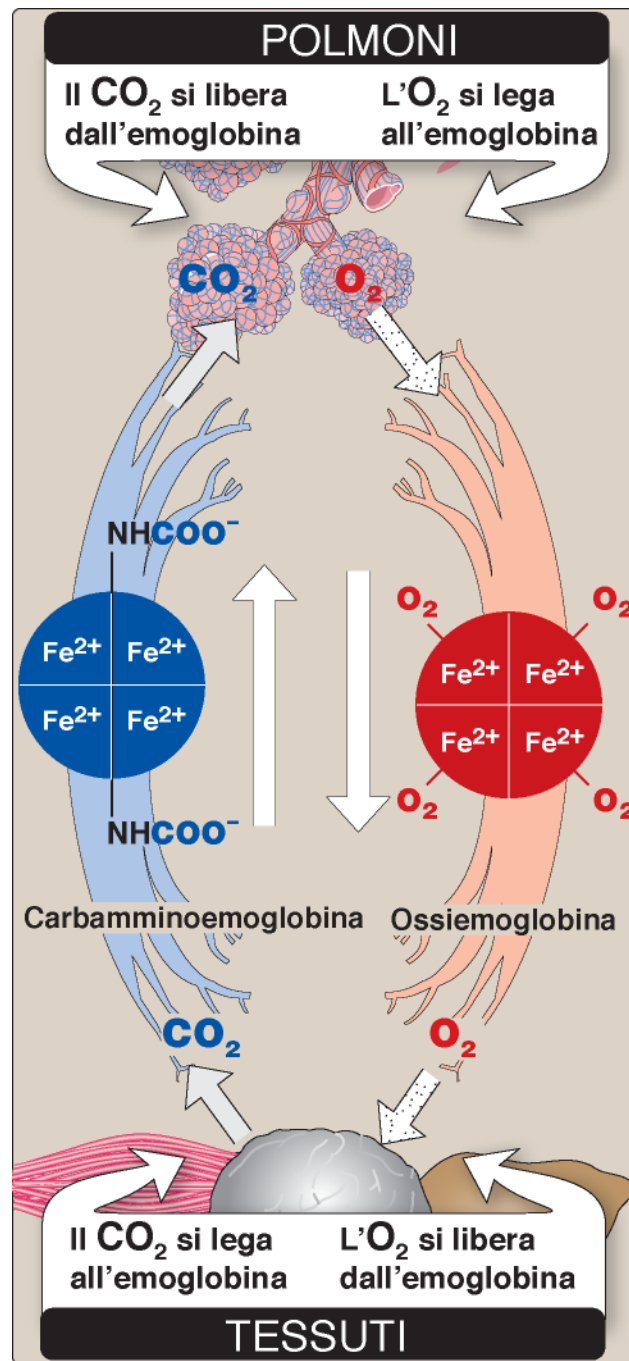
1) disciolta: segue la Legge di Henry come l' O_2 ma è 20 volte più solubile di questo. In questa forma costituisce il 10% del gas liberato dal sangue venoso nel polmone.

- CO_2 trasportata come carbammati (15-20%)
- CO_2 trasportata come bicarbonato

2) Parte della CO₂ 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



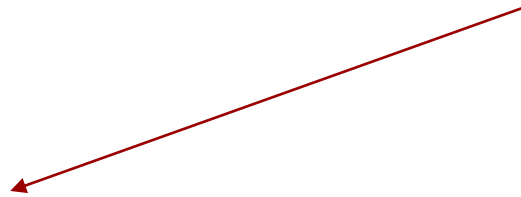


La maggior parte della CO_2 che diffonde nelle emazie reagisce con l' H_2O formando H_2CO_3 , grazie alla presenza di un enzima, **l'anidrasi carbonica** (P.M. 30000, contiene Zn)



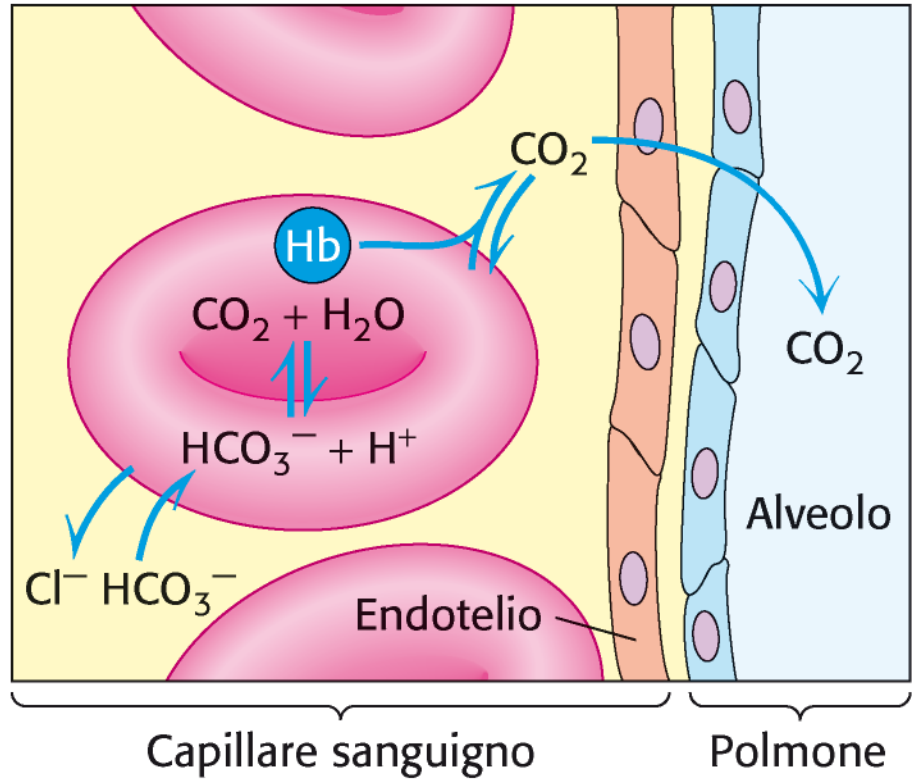
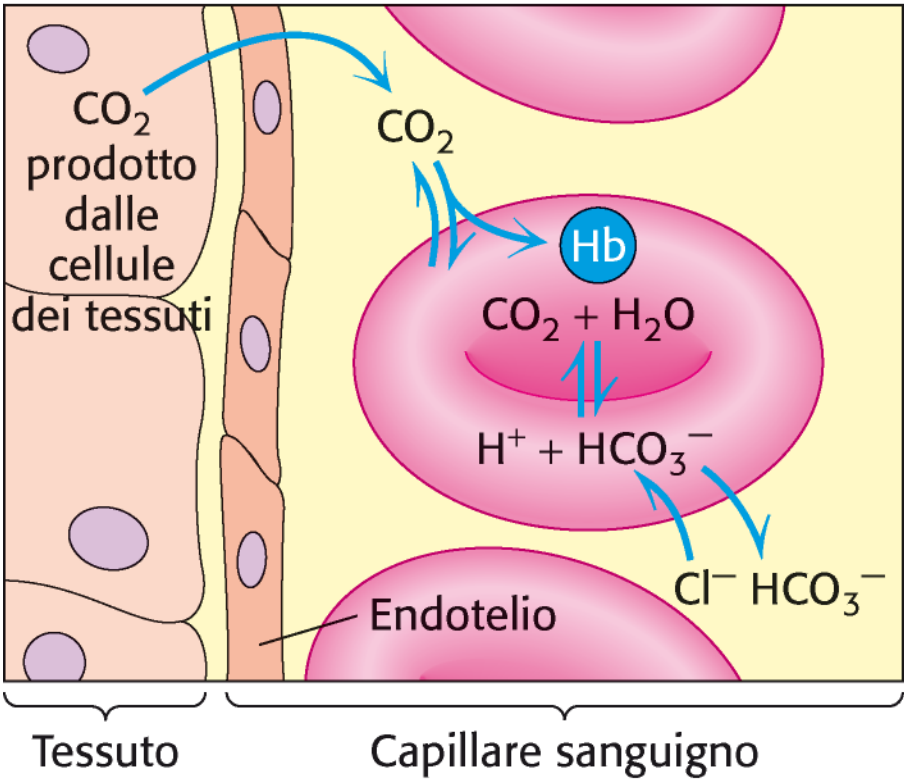
H^+

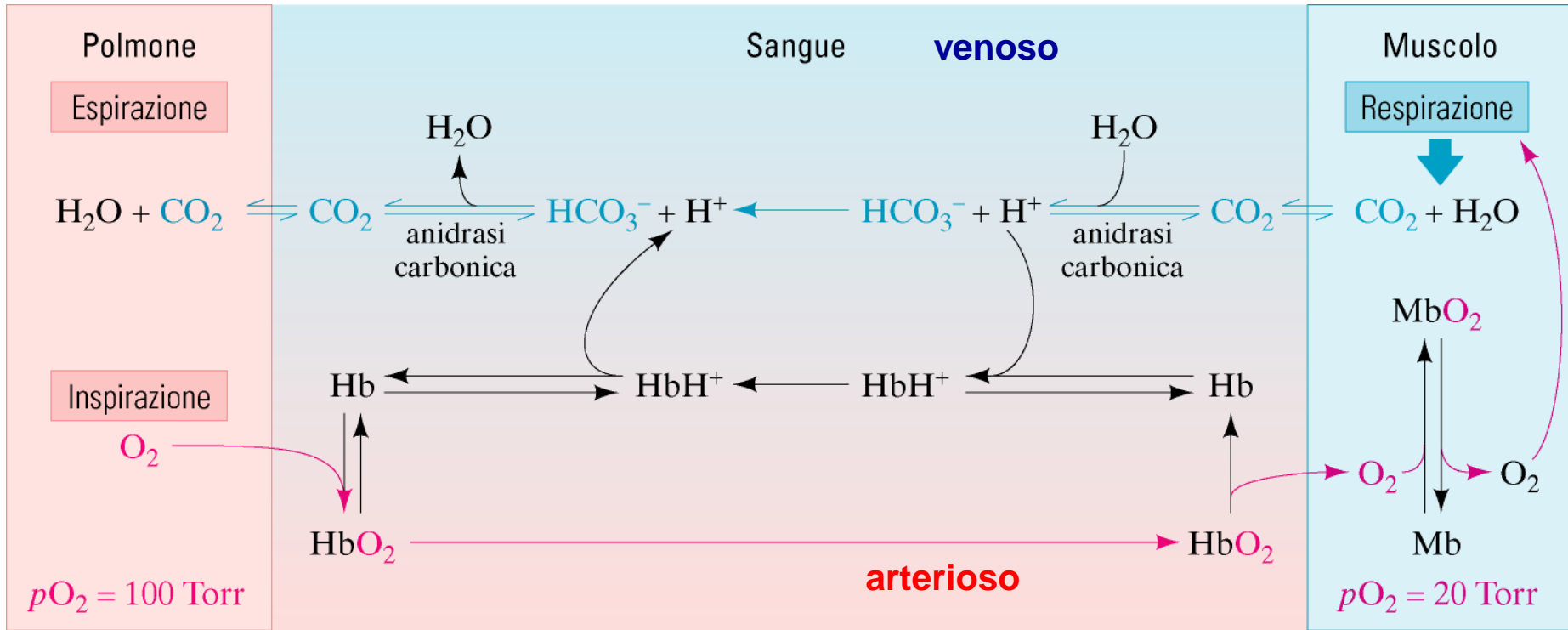
HCO_3^-



Gli ioni H^+ si legano alla DEOSI-Hb (che più basica della forma OSSI-Hb ed è quindi un accettore di protoni migliore)

passano dal globulo rosso al plasma attraverso una proteina di membrana

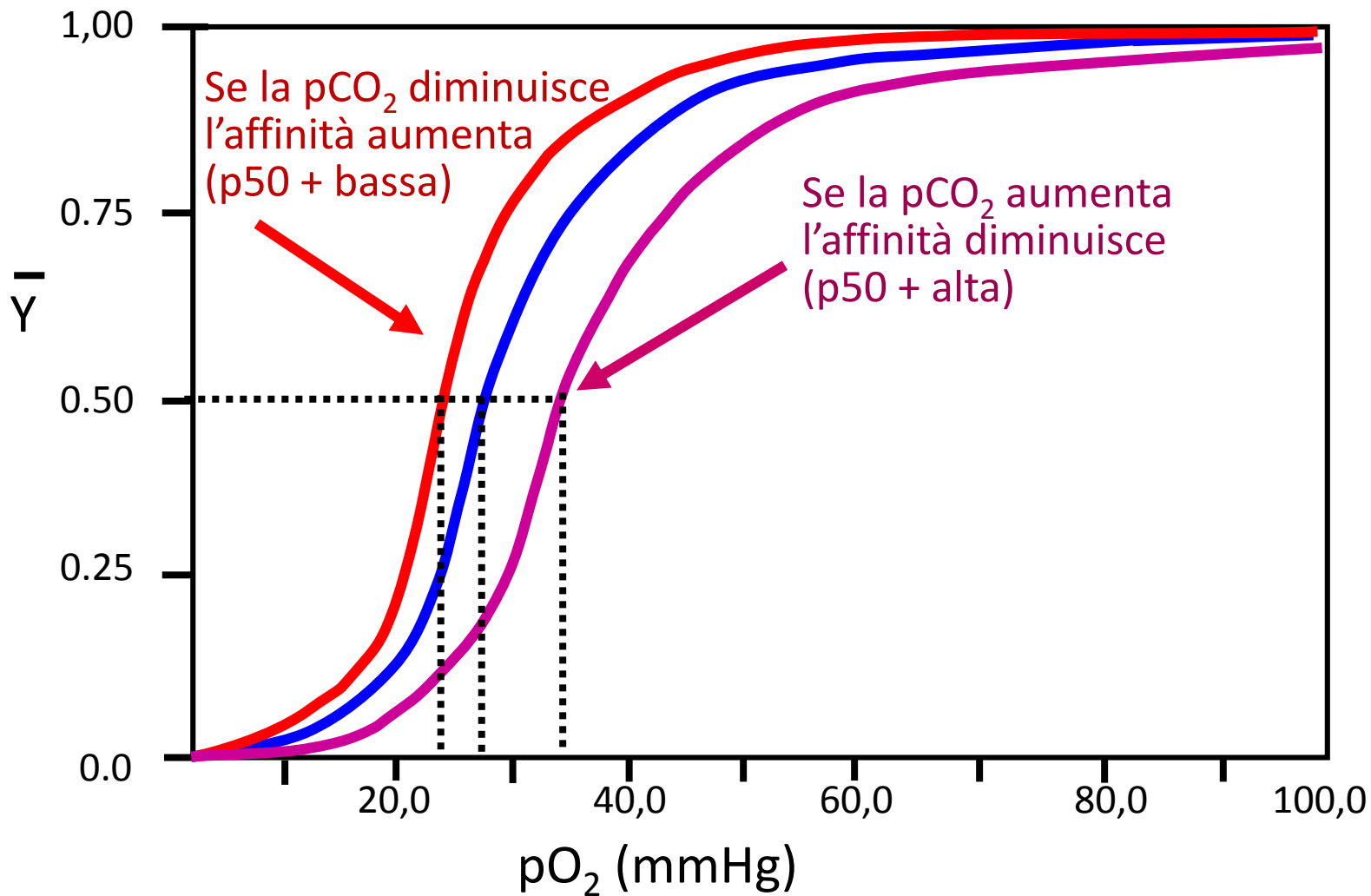


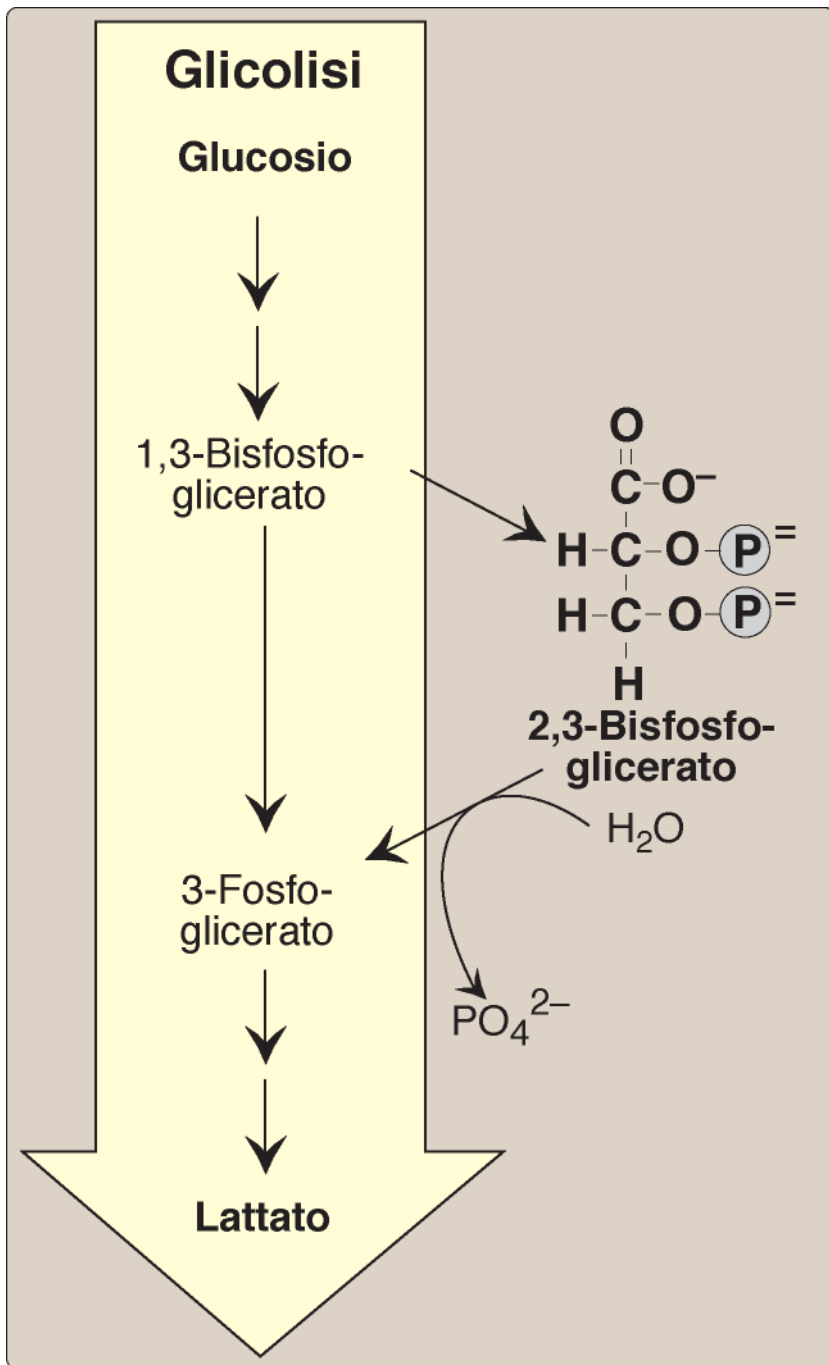


CO₂



Effettore allosterico
negativo per l'Hb





2,3 BPG

➤ Il **2,3 BPG** è una piccola molecola dotata di cariche **negative** che consente il legame alle cariche **positive** delle 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

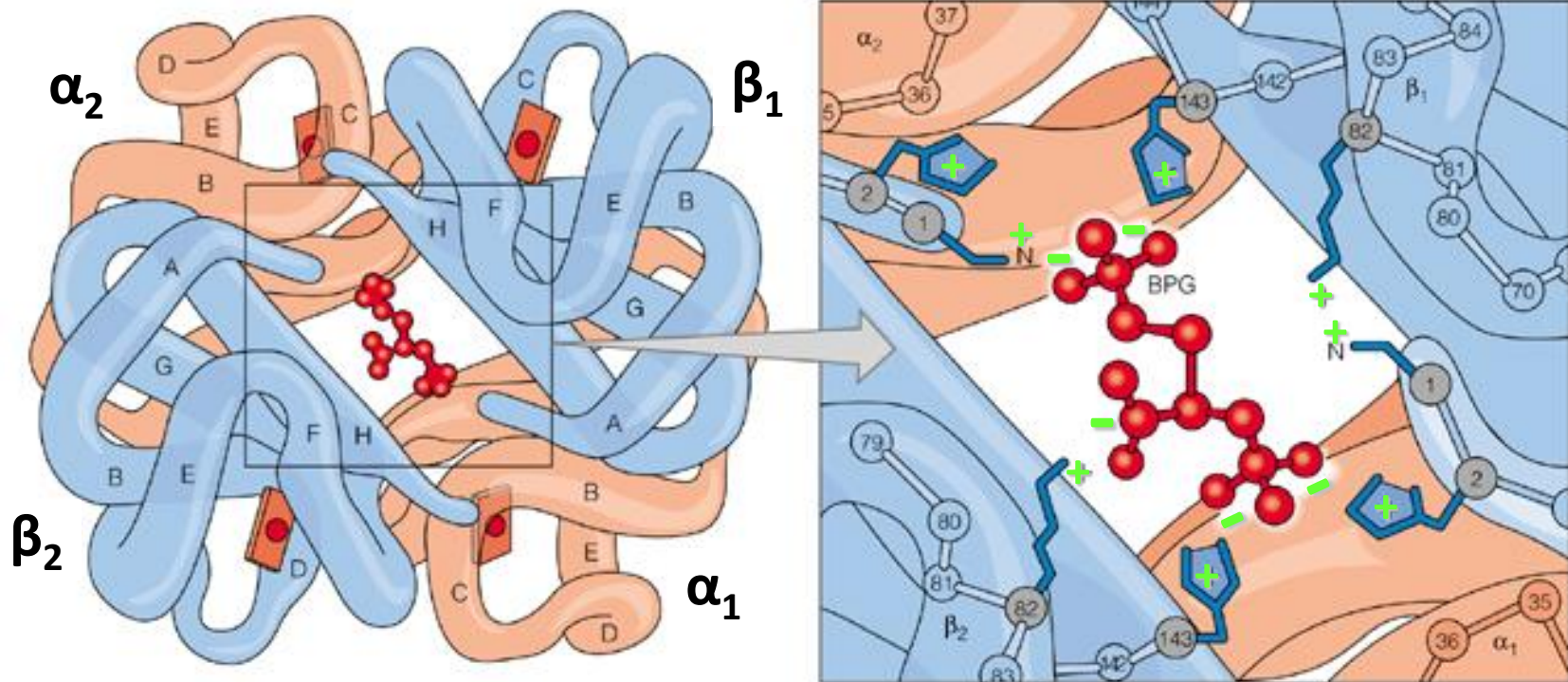
Il 2,3-BPG ha interazioni elettrostatiche con gruppi carichi positivamente che sporgono nella cavità centrale della DEOSSI-Hb:

- NH_3^+ N-terminale
- Lys-82
- His-143
- His-2

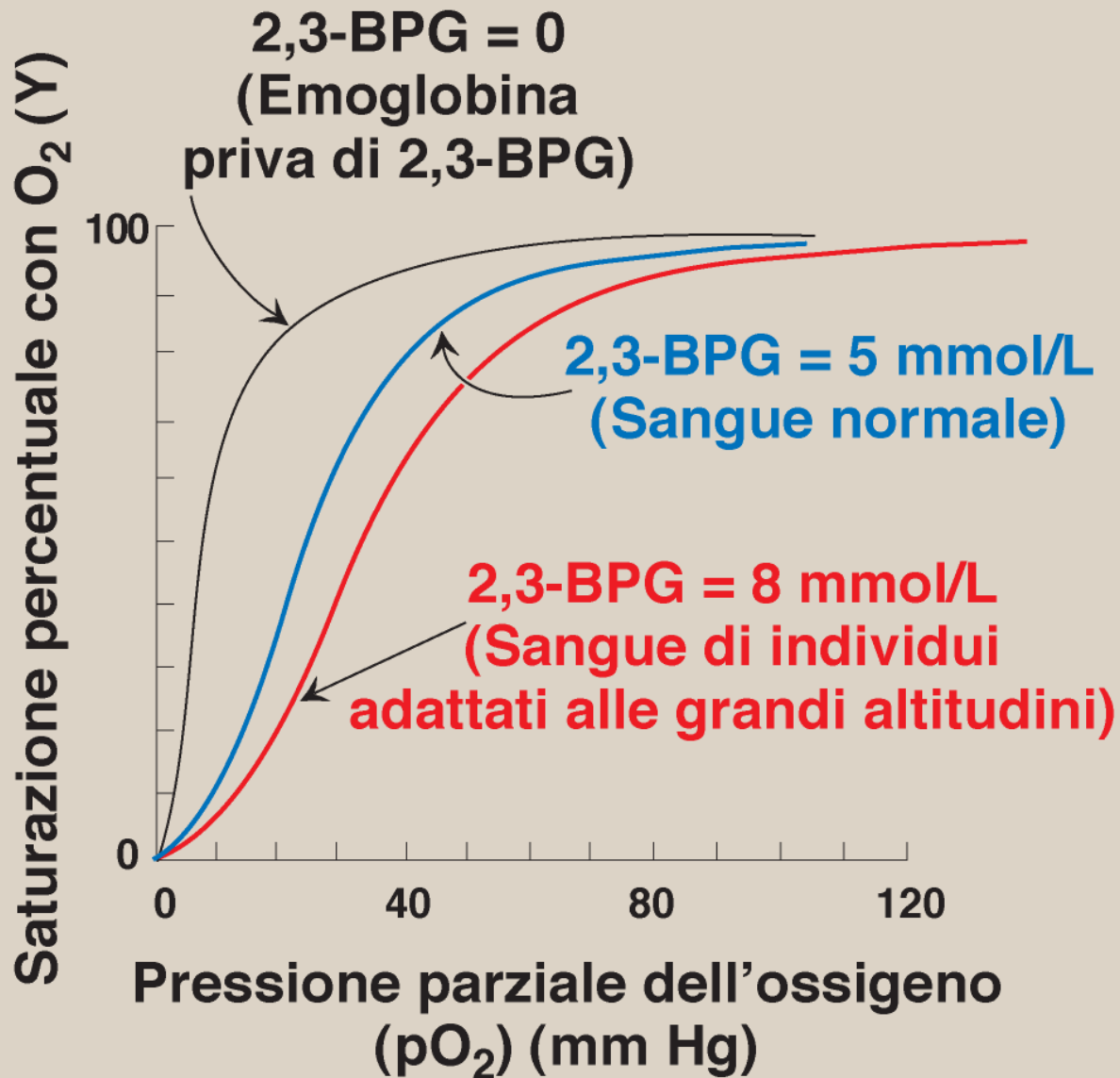
delle 2 catene β

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 O_2 si innesca il cambiamento conformazionale che distrugge i ponti salini, la cavità centrale si restringe e il 2,3-BPG viene espulso.



EMOGLOBINA FETALE (HbF)

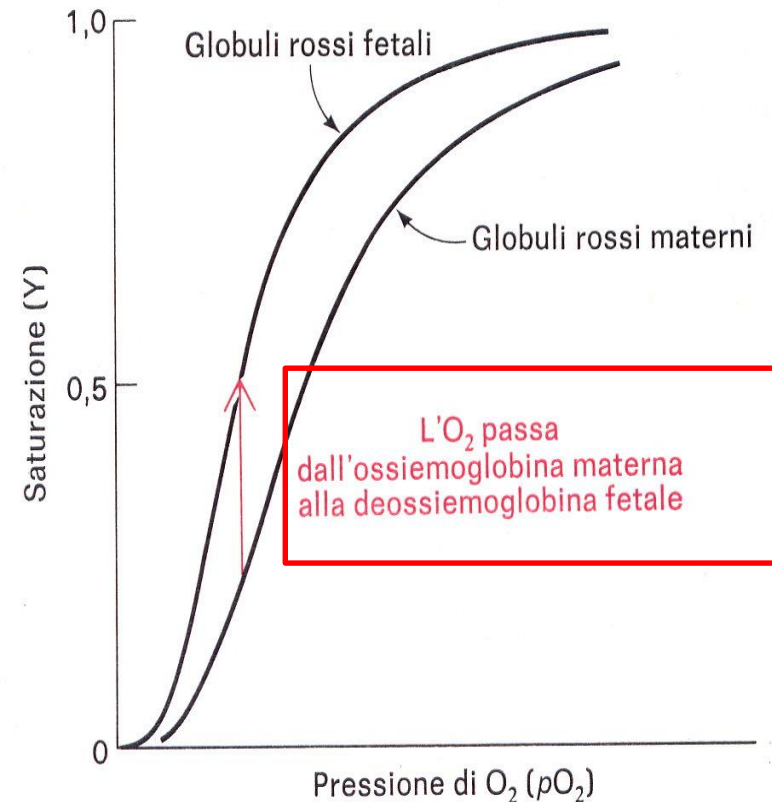
Il significato del **2,3 BPG** appare chiaro se si confronta la curva di saturazione di **Hb** con O_2 in sangue materno e fetale.

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

le catene γ 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**, 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

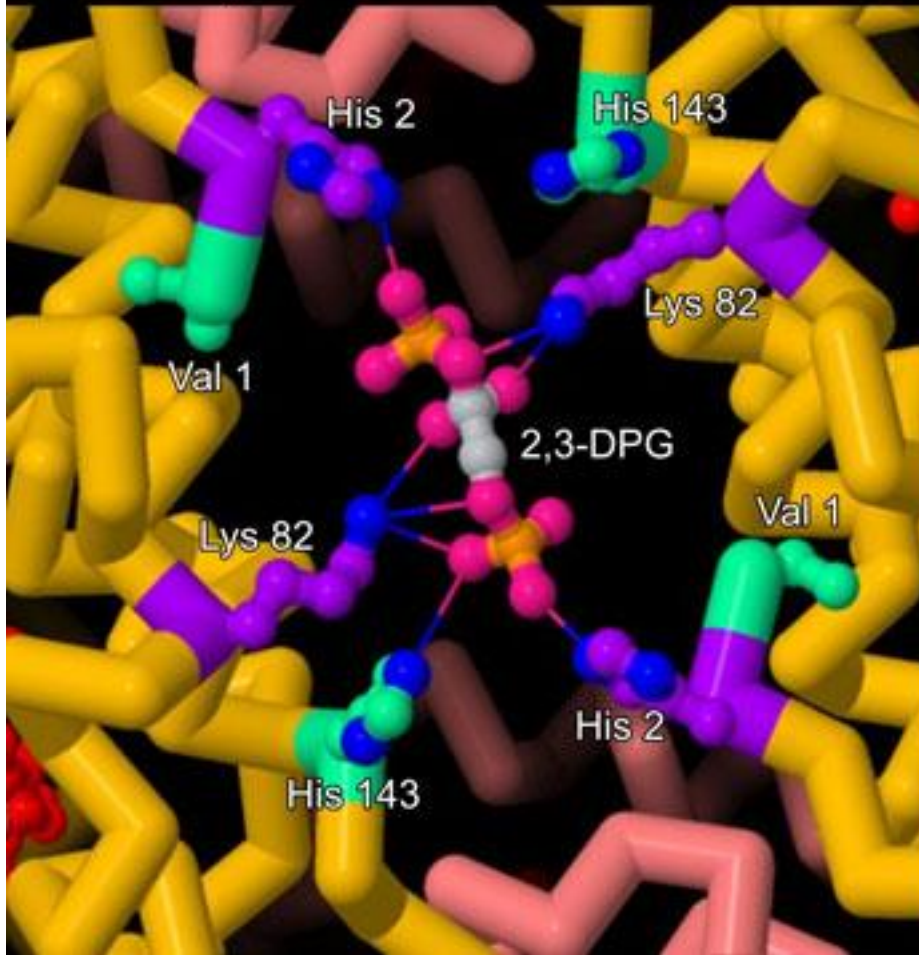
- NH_3^+ N-terminale Val-1
- Lys-82
- **His-143**
- His-2

CATENE GAMMA

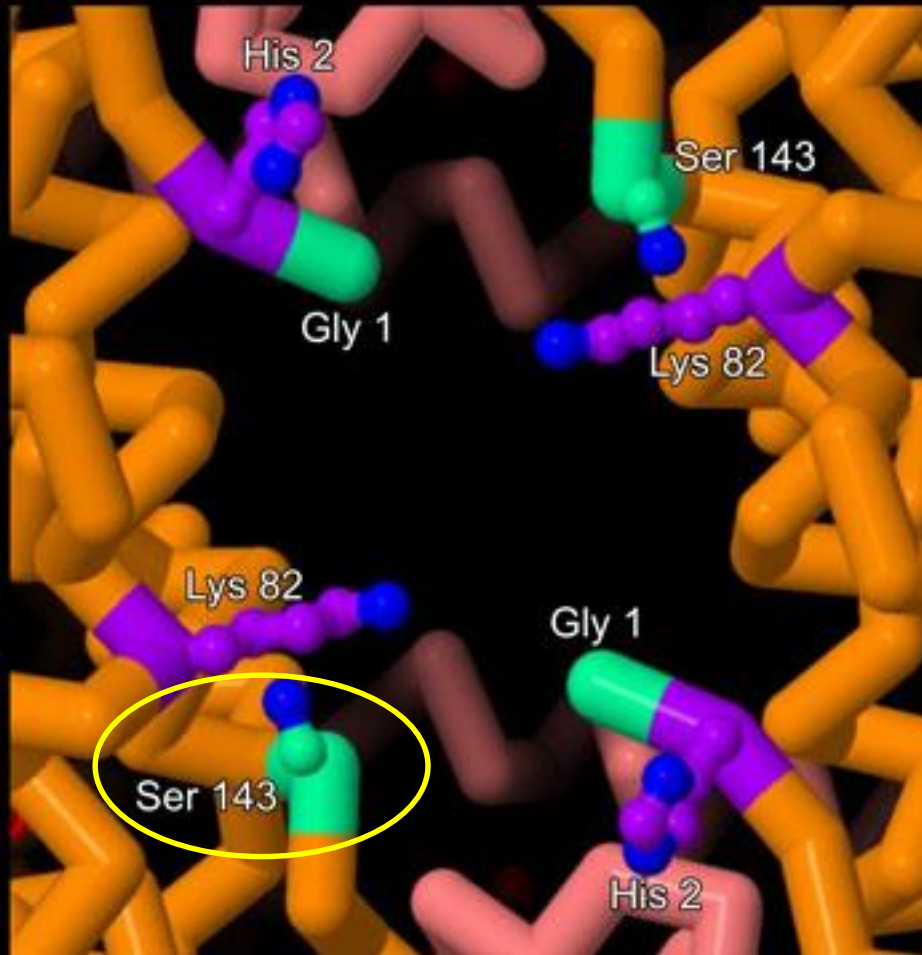
- NH_3^+ N-terminale Gly-1
- Lys-82
- Ser-143**
- His-2



Adult Hemoglobin



Fetal Hemoglobin



Adattamento alle elevate altitudini

A 3000m pO₂ solo 70 % rispetto al livello del mare

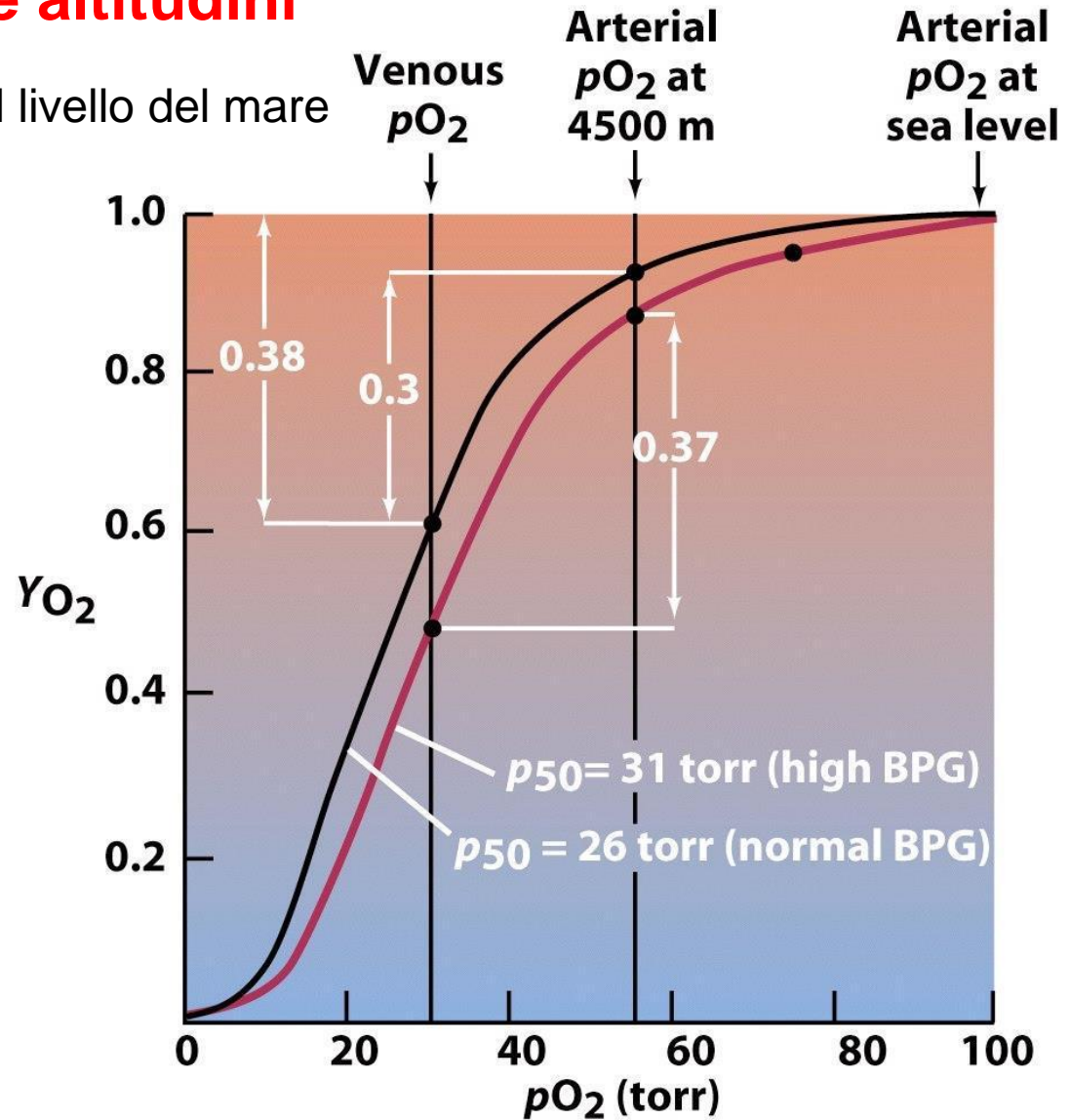
RISPOSTE FISIOLOGICHE

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



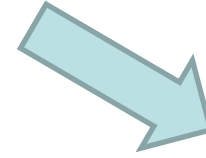
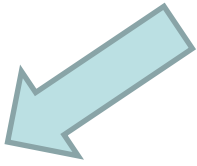
>> diminuisce l'affinità dell'Hb per l'O₂ (aumenta la p₅₀)

>> aumenta il rilascio di O₂ ai tessuti che altrimenti non sarebbero sufficientemente ossigenati



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

Emoglobinopatie



- Alterazioni strutturali

HbS, HbC o varianti emoglobiniche
(con aumentata o diminuita affinità
per l'ossigeno)

Difetti quantitativi (α - e β -talassemie)

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 ^a	Mutazione	Effetto
Hammersmith	Phe CD1(42) β \rightarrow Ser	Indebolisce il legame dell'eme
Bristol	Val E11(67) β \rightarrow Asp	Indebolisce il legame dell'eme
Bibba	Leu H19(136) α \rightarrow Pro	Disgrega l'elica H
Savannah	Gly B6(24) β \rightarrow Val	Disgrega l'interfaccia tra le eliche B ed E
Philly	Tyr C1(35) α \rightarrow Phe	Rottura di legami idrogeno a livello dell'interfaccia α_1 - β_1
Boston	His E7(58) α \rightarrow Tyr	Promuove la formazione di metaemoglobina
Milwaukee	Val E11(67) β \rightarrow Glu	Promuove la formazione di metaemoglobina
Iwate	His F8(87) α \rightarrow Tyr	Promuove la formazione di metaemoglobina
Yakima	Asp G1(99) β \rightarrow His	Rottura di un legame idrogeno che stabilizza la conformazione T
Kansas	Asn G4(102) β \rightarrow Thr	Rottura di un legame idrogeno che stabilizza la conformazione R

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

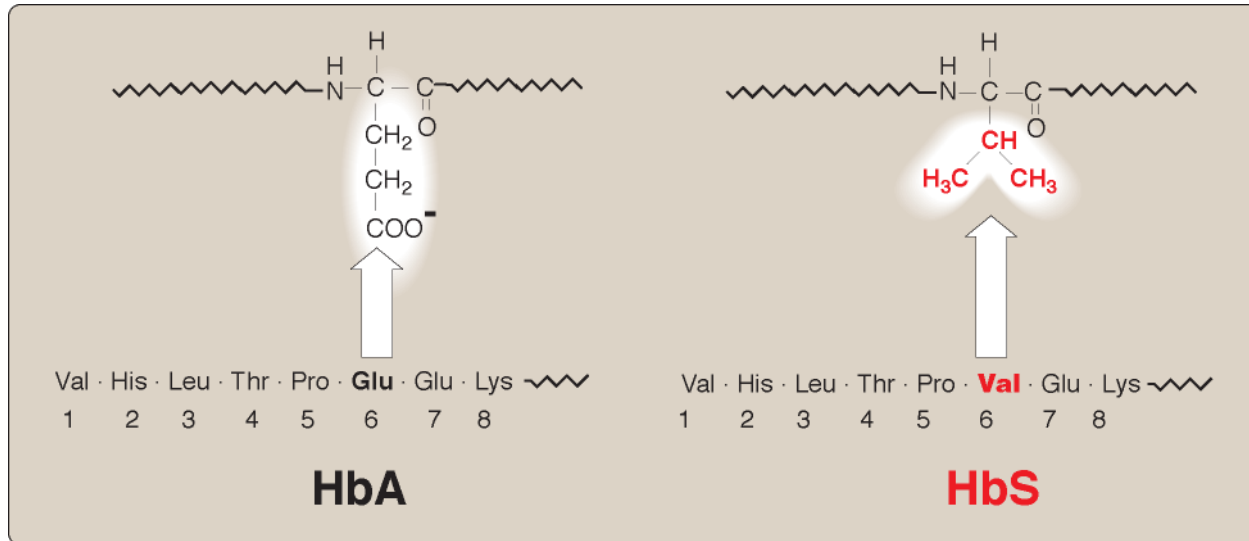
ca il 5% della popolazione mondiale possiede almeno una variante emoglobinica

HbS

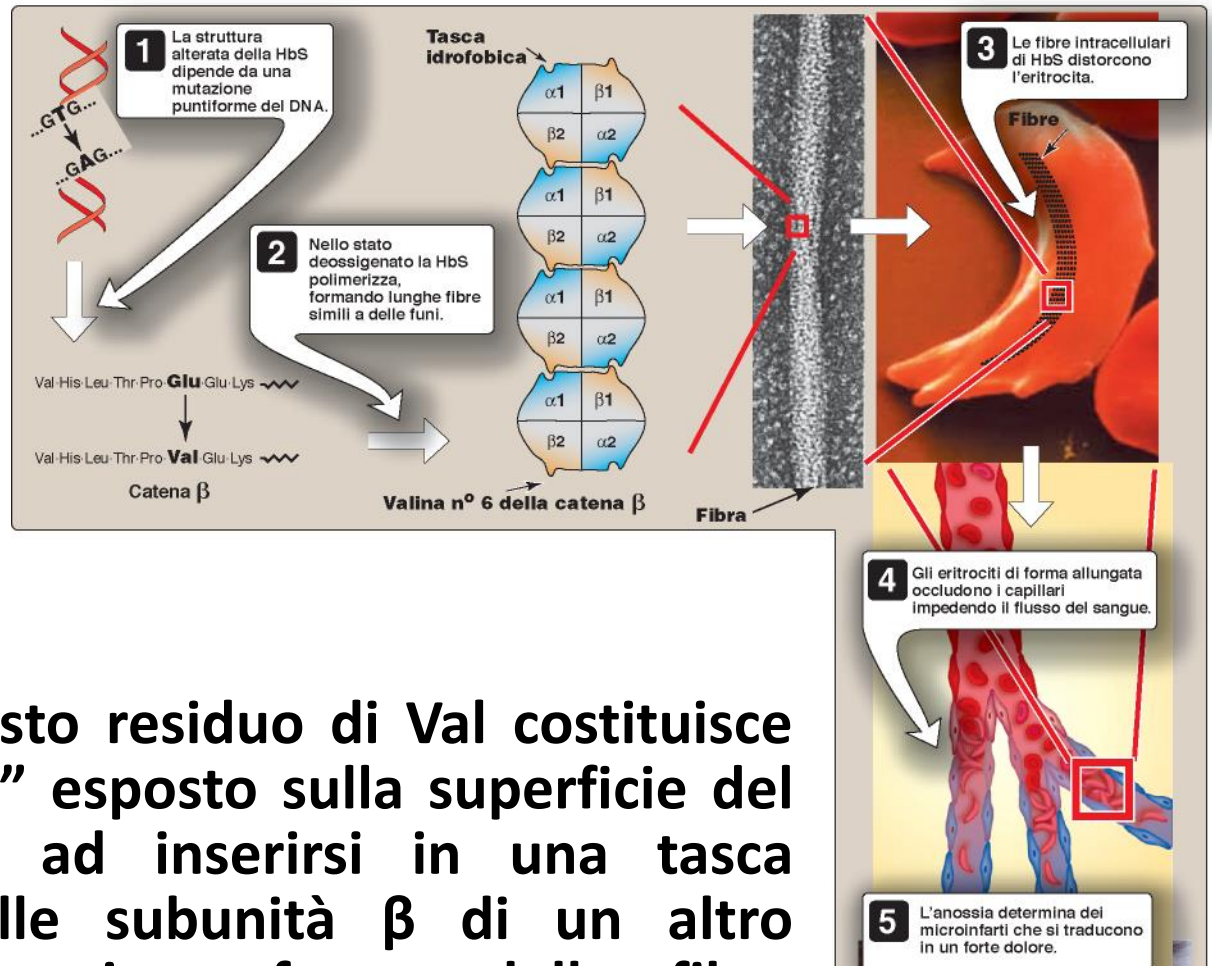
- alta incidenza nelle zone tropicali

ANEMIA FALCIFORME (“SICKLE CELLS DISEASE”): **Anemia falciforme**

Mutazione puntiforme nel gene della catena β

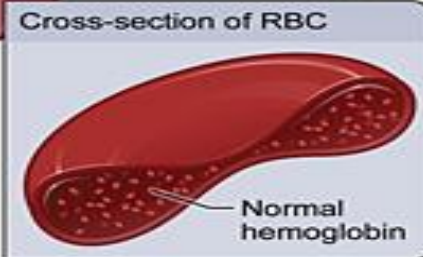
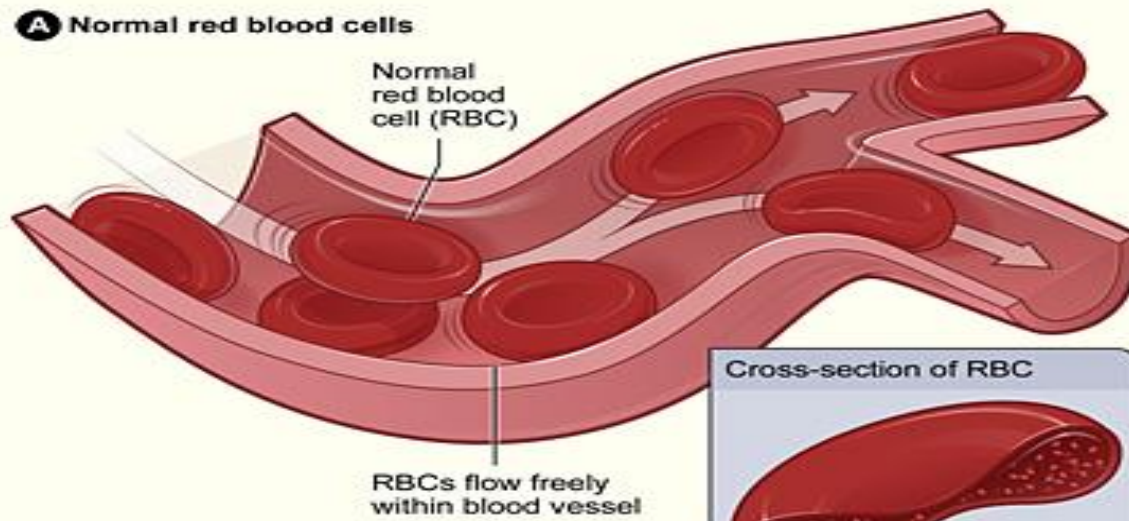


Nell’anemia falciforme viene prodotta una variante emoglobinica chiamata **Hb-S** nella quale il residuo di **Glu in posizione 6 delle catene β** è sostituito da un residuo di **Val**.

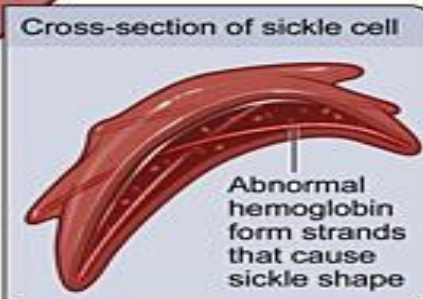
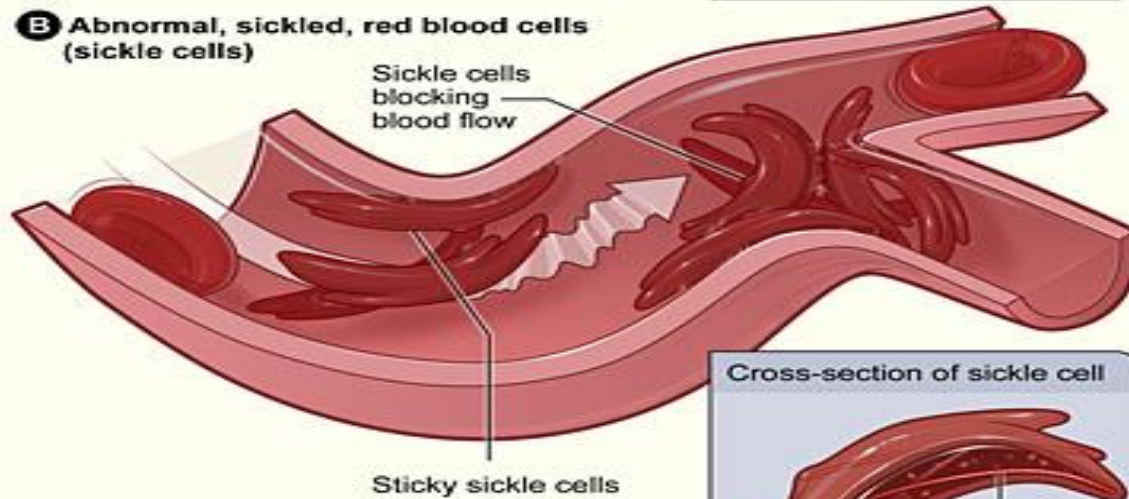


Nella **Deossi-Hb-S** questo residuo di Val costituisce un “punto appiccicoso” esposto sulla superficie del tetramero, infatti va ad inserirsi in una tasca idrofobica situata nelle subunità β di un altro tetramero: l’Hb polimerizza, forma delle fibre insolubili

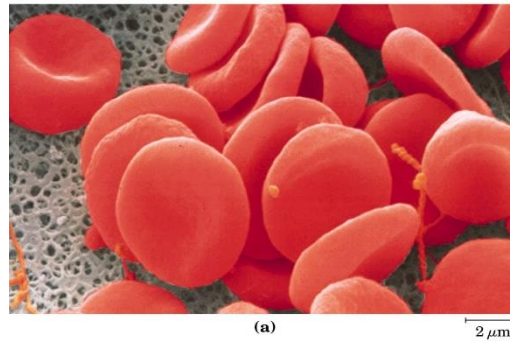
A Normal red blood cells



B Abnormal, sickled, red blood cells (sickle cells)



Globuli rossi



- Il globulo rosso perde il nucleo prima di lasciare il midollo osseo
- Il globulo rosso perde i ribosomi e i mitocondri entro i primi 2 giorni dall'ingresso nella circolazione
- Non è in grado di sintetizzare proteine
- Non è in grado di eseguire la fosforilazione ossidativa

TUTTAVIA HA UN METABOLISMO ATTIVO CHE LO MANTIENE VITALE PER 120 GIORNI E CHE PROTEGGE IL FERRO DELL'EMOGLOBINA DALLA OSSIDAZIONE

Perché ha una alta incidenza nelle aree tropicali???

Una alta incidenza per l'HbS coincide anche con un'alta incidenza di una malattia parassitaria (malaria) trasmessa da una zanzara tropicale (Anophele



Il parassita malarico (*Plasmodium falciparum*) è una delle specie di plasmodio responsabili della malaria compie il suo ciclo vitale nel globulo rosso

Aumentata fragilità dei globuli rossi a falce (negli eterozigoti) interrompe il ciclo vitale del parassita.

Eterozigoti-→ sopravvivenza maggiore

TALASSEMIE : α -talassemia e β -talassemia

Malattie ereditarie caratterizzate da anemia cronica di gravità variabile che deriva da un difetto quantitativo nella produzione di emoglobina.

β -talassemia

1) Talassemia major o morbo di Cooley (più grave)

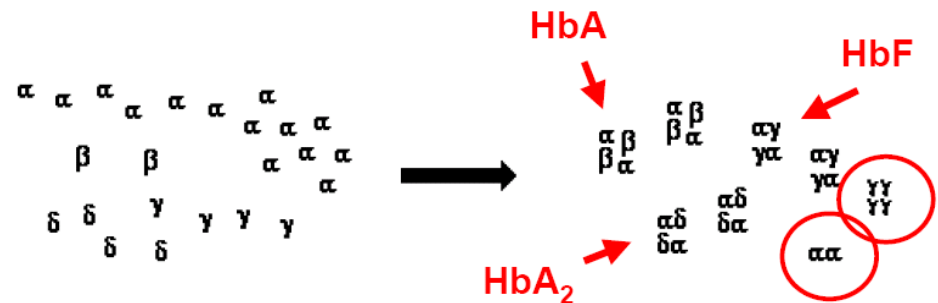
- Nessuna sintesi delle catene globiniche β

2) Talassemia intermedia

- ridotta sintesi delle catene globiniche β

Mancata sintesi dell'HbA

Le catene α in eccesso precipitano



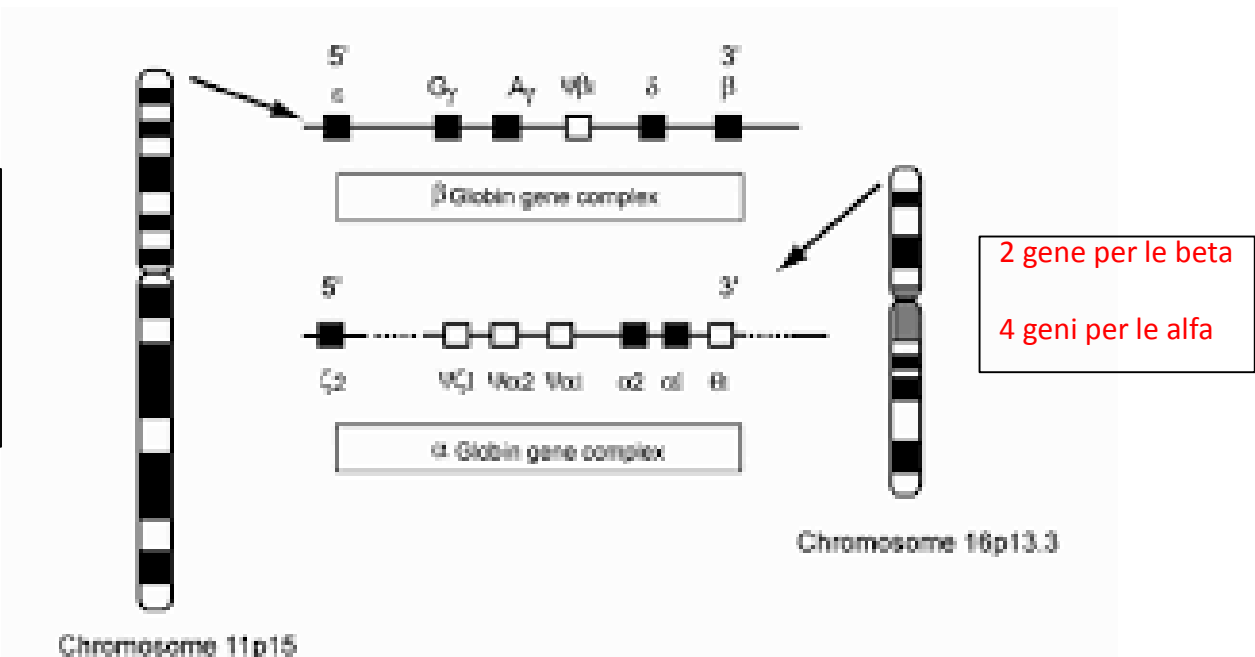
- beta globina non è necessaria durante vita fetale: talas compare solo alcuni mesi dopo la nascita

Le catene **beta, gamma e delta** sono codificate da un gene localizzato nel cromosoma **11**



Le catene **alfa** sono codificate da un gene localizzato nel cromosoma **16**

Tutte le cellule umane sono **diploidi** (hanno due copie di ogni cromosoma) ad eccezione di quelle germinali (spermatozoi o ovuli)



Gene per le beta globine

- β \rightarrow normale
- β' \rightarrow variante

\rightarrow omozigote ($\beta + \beta$)



Emoglobina «normale» HbA

\rightarrow eterozigote ($\beta + \beta'$)

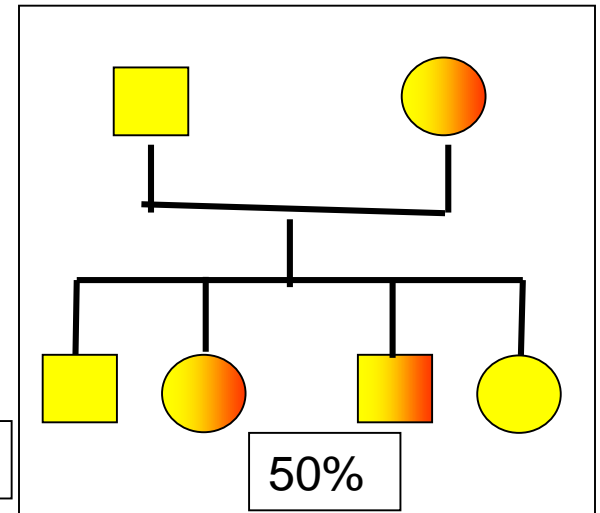
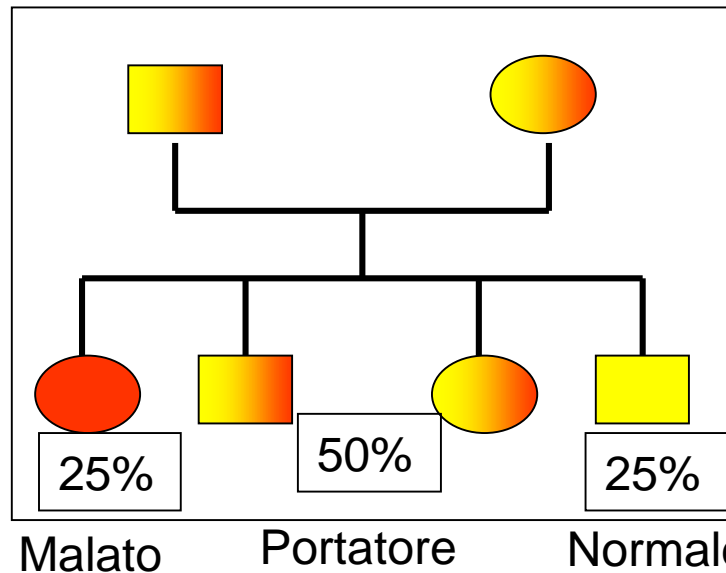
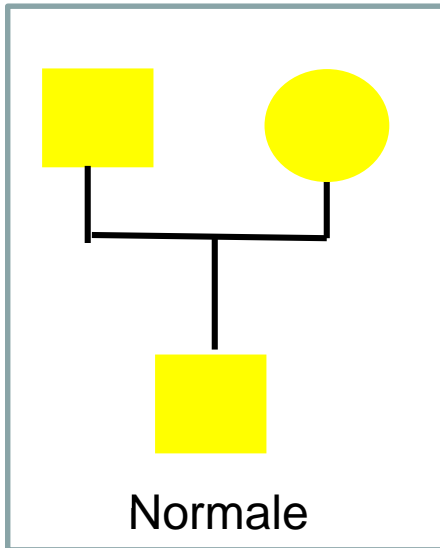


HbA + Hb variante

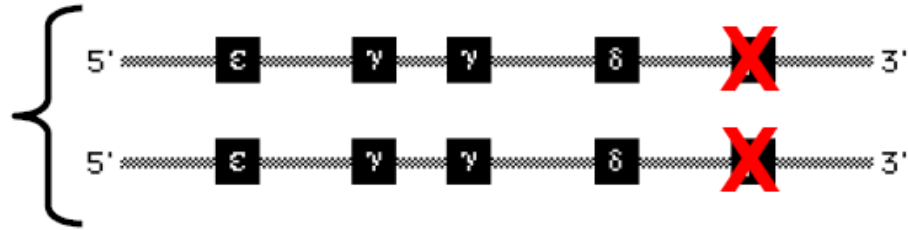
\rightarrow omozigote per la variante ($\beta' + \beta'$)



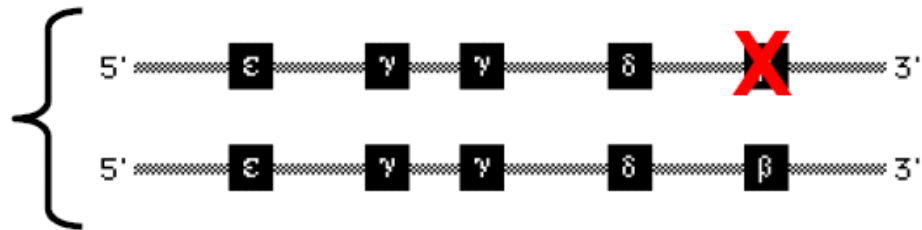
Hb variante



β -talassemia major



β -talassemia minor
tratto β -talassemico
 β -talassemia eterozigote



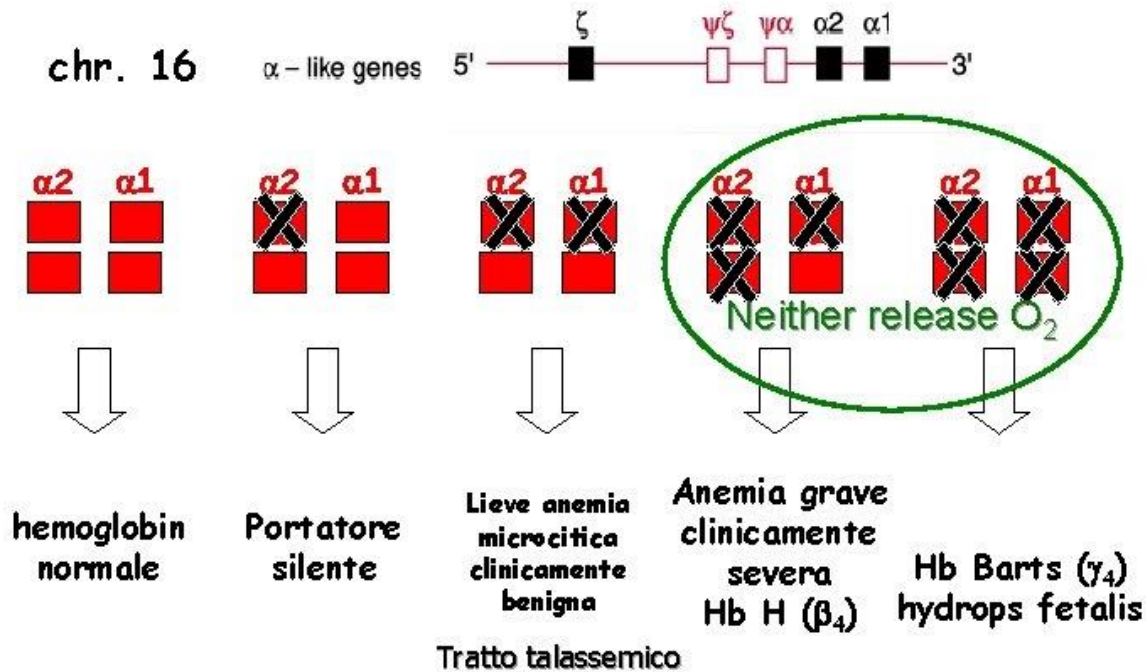
CLINICA DEL MORBO DI COOLEY

- Rilievo, in genere entro i primi sei mesi di vita, di grave anemia con:
 - Pallore-colorito itterico
 - Splenomegalia: per iperplasia della polpa rossa secondaria all'esaltata eritrocateresi
 - Epatomegalia: per persistenza post fetale di mielopoiesi extramidollare e per alterazioni del circolo epato-splenico
 - Insufficienza cardiaca
- Ritardato sviluppo somatico e sessuale

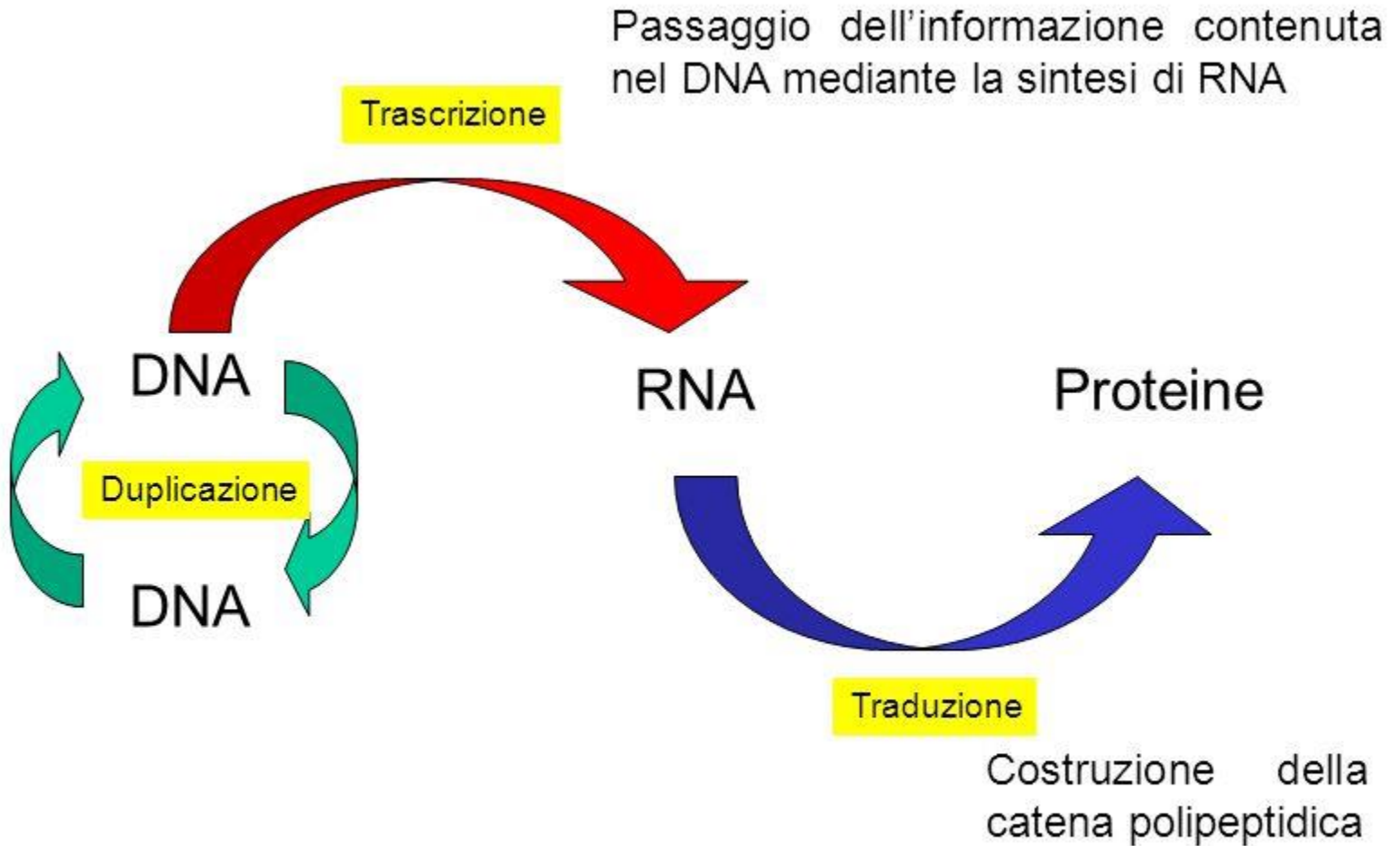
Alfa-TALASSEMIE

- 4 geni alpha

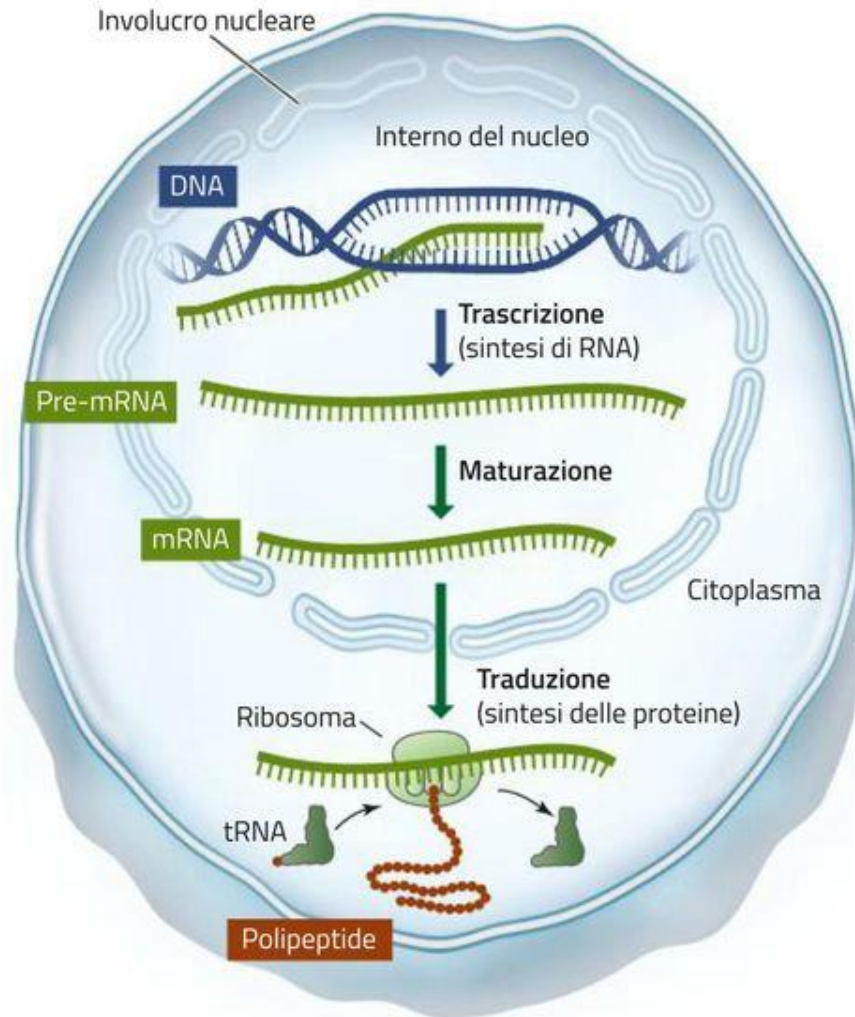
Base genetica di α thalassemia:
 • soprattutto delezioni



Dal DNA alla Proteina



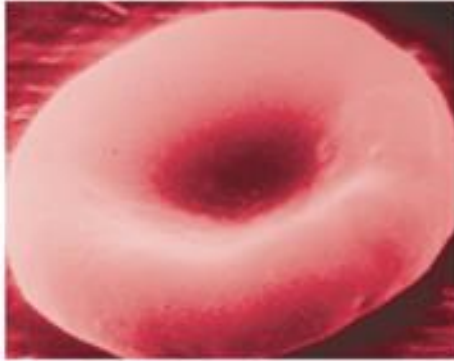
Dai geni alle proteine



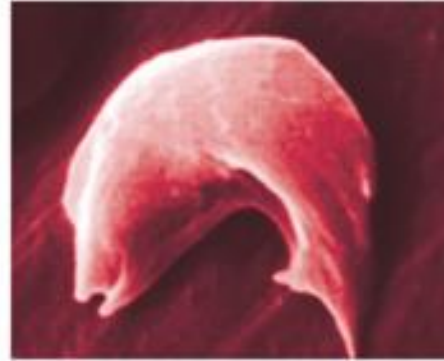
Il **gene** è un tratto di DNA che contiene le informazioni per la produzione di una **catena polipeptidica**.

I geni dirigono la sintesi delle proteine

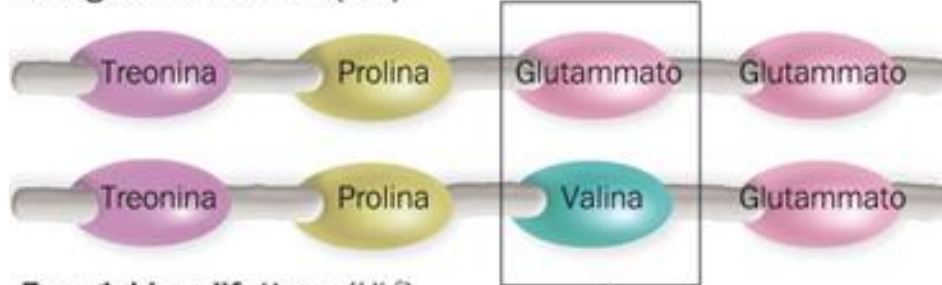
Globulo rosso normale



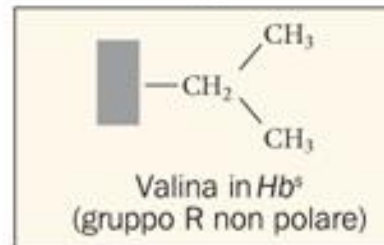
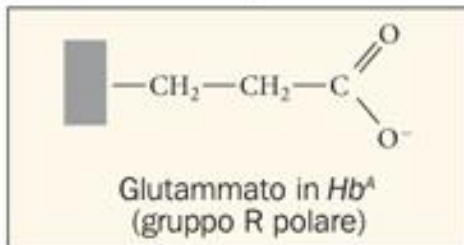
Globulo rosso falciforme



Emoglobina normale (Hb^A)



Emoglobina difettosa (Hb^S)



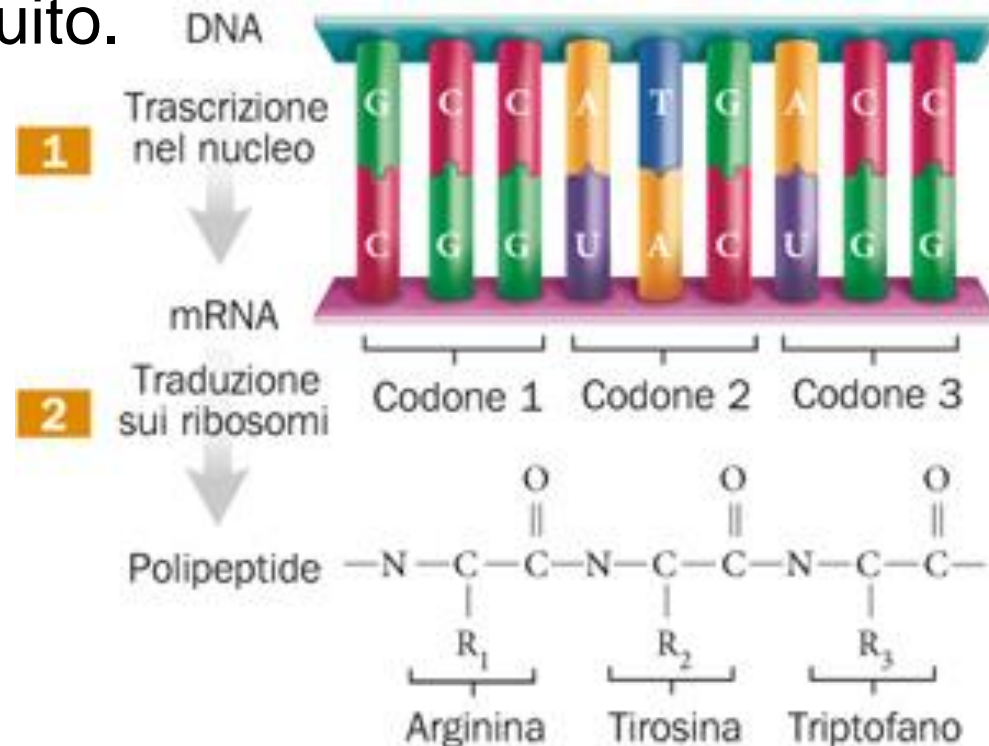
I geni sono espressi nelle proteine.

L'ipotesi «**un gene, un enzima**» è basata sull'osservazione che un gene difettoso dà origine a un enzima esso stesso difettoso.

ZANICHELLI

La costruzione di una proteina prevede due fasi: la trascrizione e la traduzione

1. Durante la **trascrizione** il DNA viene usato come stampo per la formazione dell'RNA messaggero (mRNA).
2. Durante la **traduzione**, un RNA trascritto dirige la sequenza degli amminoacidi di un polipeptide che deve essere costruito.



ZANICHELLI

Prima base	Seconda base				Terza base
	U	C	A	G	
U	UUU fenilalanina	UCU serina	UAU tirosina	UGU cisteina	U
	UUC fenilalanina	UCC serina	UAC tirosina	UGC cisteina	C
	UUA leucina	UCA serina	UAA stop	UGA stop	A
	UUG leucina	UCG serina	UAG stop	UGG triptofano	G
C	CUU leucina	CCU prolina	CAU istidina	CGU arginina	U
	CUC leucina	CCC prolina	CAC istidina	CGC arginina	C
	CUA leucina	CCA prolina	CAA glutammina	CGA arginina	A
	CUG leucina	CCG prolina	CAG glutammina	CGG arginina	G
A	AUU isoleucina	ACU treonina	AAU asparagina	AGU serina	U
	AUC isoleucina	ACC treonina	AAC asparagina	AGC serina	C
	AUA isoleucina	ACA treonina	AAA lisina	AGA arginine	A
	AUG (start)	ACG treonina	AAG lisina	AGG arginine	G
G	GUU valina	GCU alanina	GAU aspartato	GGU glicina	U
	GUC valina	GCC alanina	GAC aspartato	GGC glicina	C
	GUA valina	GCA alanina	GAA glutamata	GGA glicina	A
	GUG valina	GCG alanina	GAG glutamata	GGG glicina	G

Una tripletta di basi codifica per un amminoacido

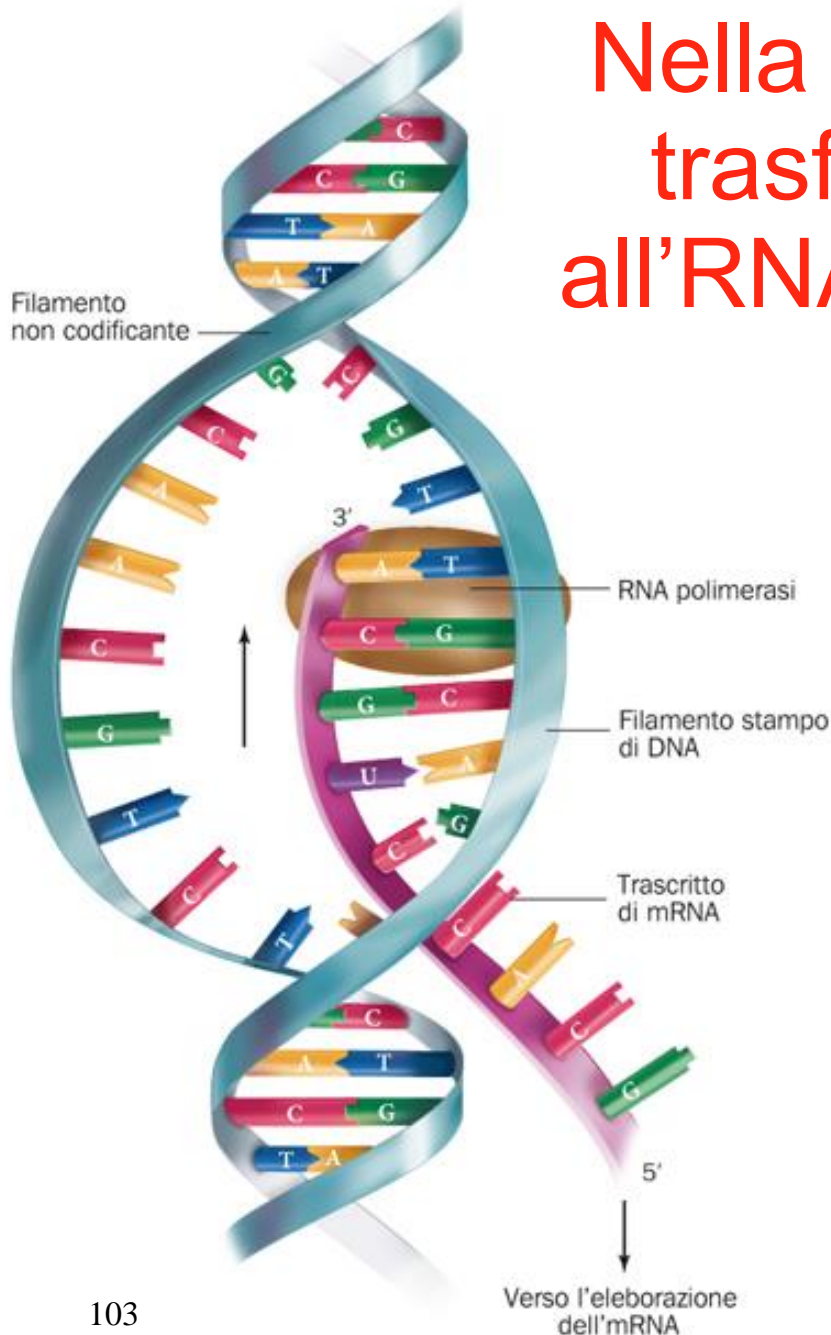
La sequenza di nucleotidi del DNA (il **codice genetico**) specifica l'ordine degli amminoacidi di un polipeptide.

Il codice genetico è basato su una tripletta di basi, ossia un **codone**, che è una sequenza precisa di tre basi nucleotidiche indicate da tre lettere, per esempio AUC, e corrisponde a un amminoacido.

Il codice genetico è **universale**.

ZANICHELLI

Nella trascrizione ogni gene trasferisce l'informazione all'RNA messaggero (mRNA)



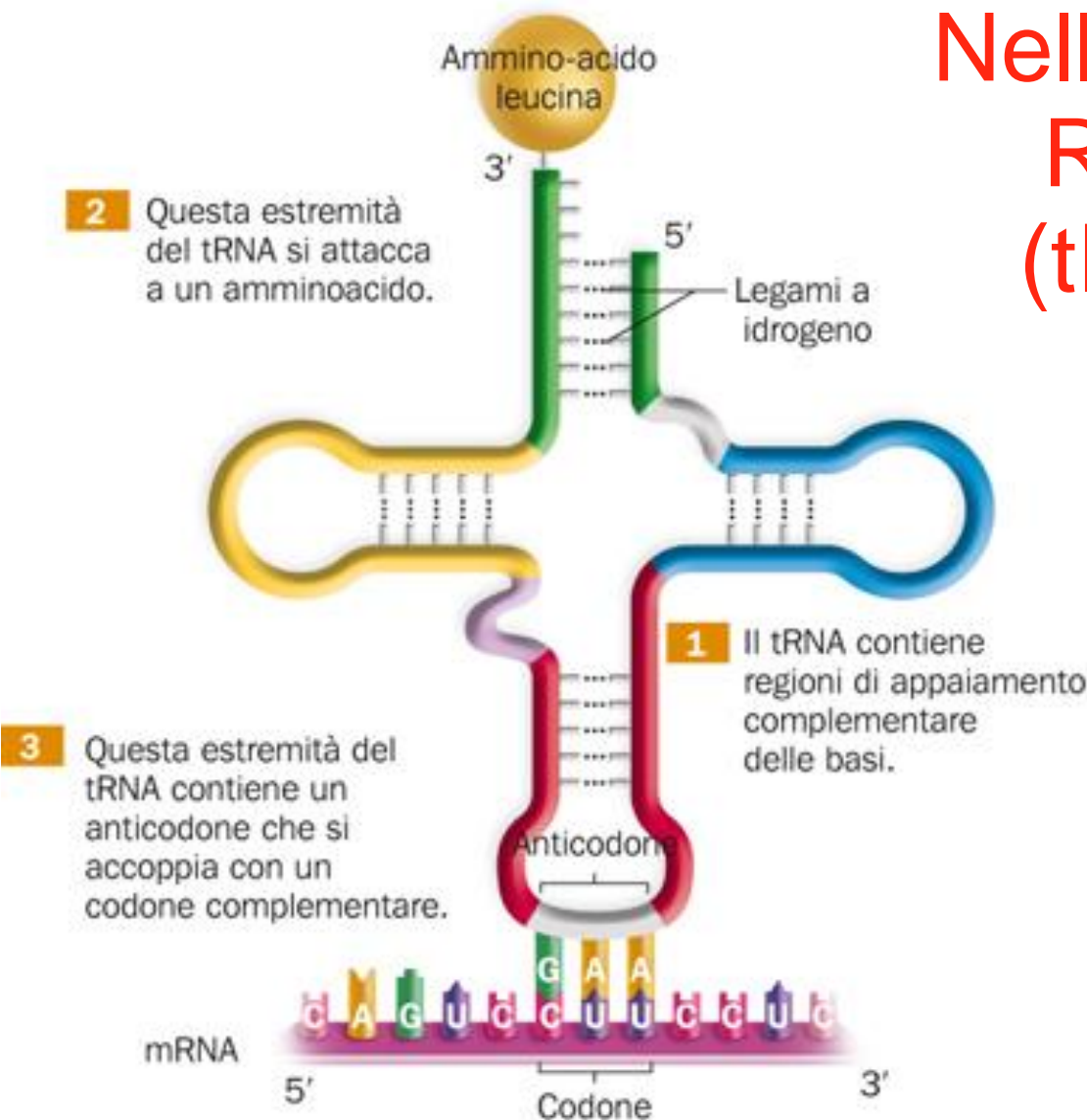
Un segmento di doppia elica di DNA si srotola e si apre al centro, cosicché i **nucleotidi di RNA** si possano appaiare, man mano che il filamento di DNA viene trascritto. I nucleotidi si uniscono uno alla volta grazie al lavoro dell'**RNA polimerasi**.

ZANICHELLI

Nella traduzione, ogni RNA di trasporto (tRNA) veicola un aminoacido

I **tRNA** trasferiscono gli aminoacidi che si trovano nel citoplasma ai ribosomi, dove l'**mRNA** viene trasformato nella sequenza di aminoacidi che corrisponde a una proteina.

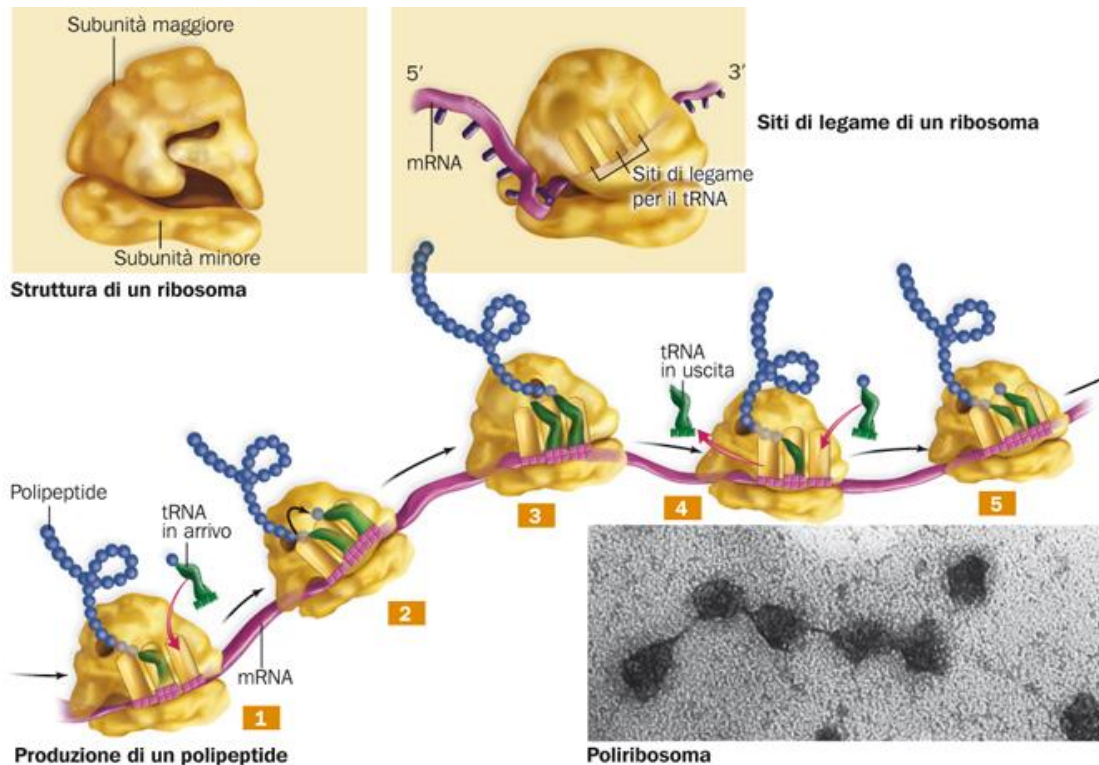
Gli **anticodoni** del tRNA si accoppiano con i **codoni** complementari dell'mRNA.



ZANICHELLI

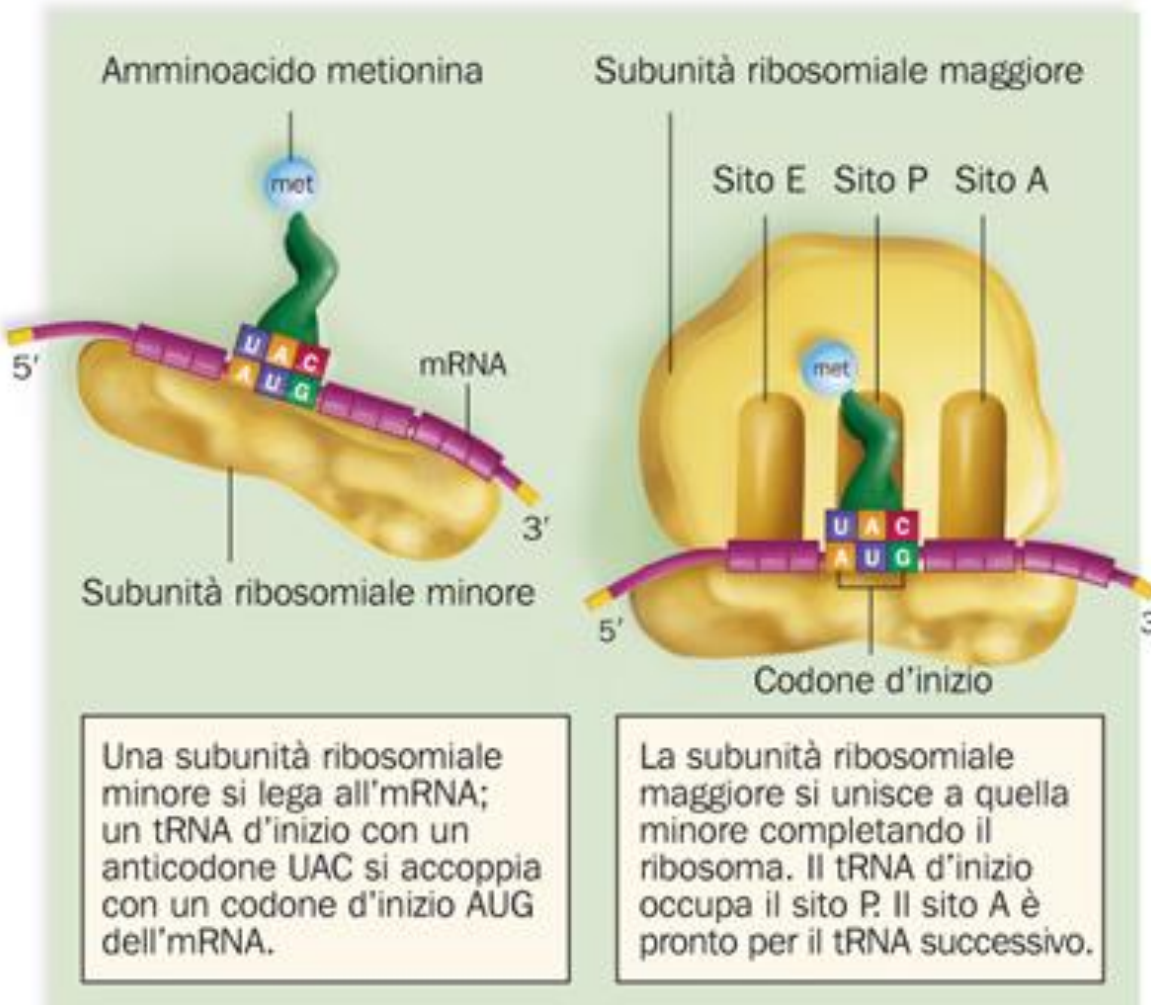
La traduzione ha luogo presso i ribosomi presenti nel citoplasma

I **ribosomi** hanno un sito di legame per l'**mRNA** e tre siti di legame per il **tRNA**. Quando un ribosoma si sposta lungo una molecola di mRNA, il polipeptide in formazione si allunga di un amminoacido alla volta. Spesso molti ribosomi sono associati e in fase di traduzione dello stesso mRNA. L'intero complesso di traduzione è detto **poliribosoma**.



ZANICHELLI

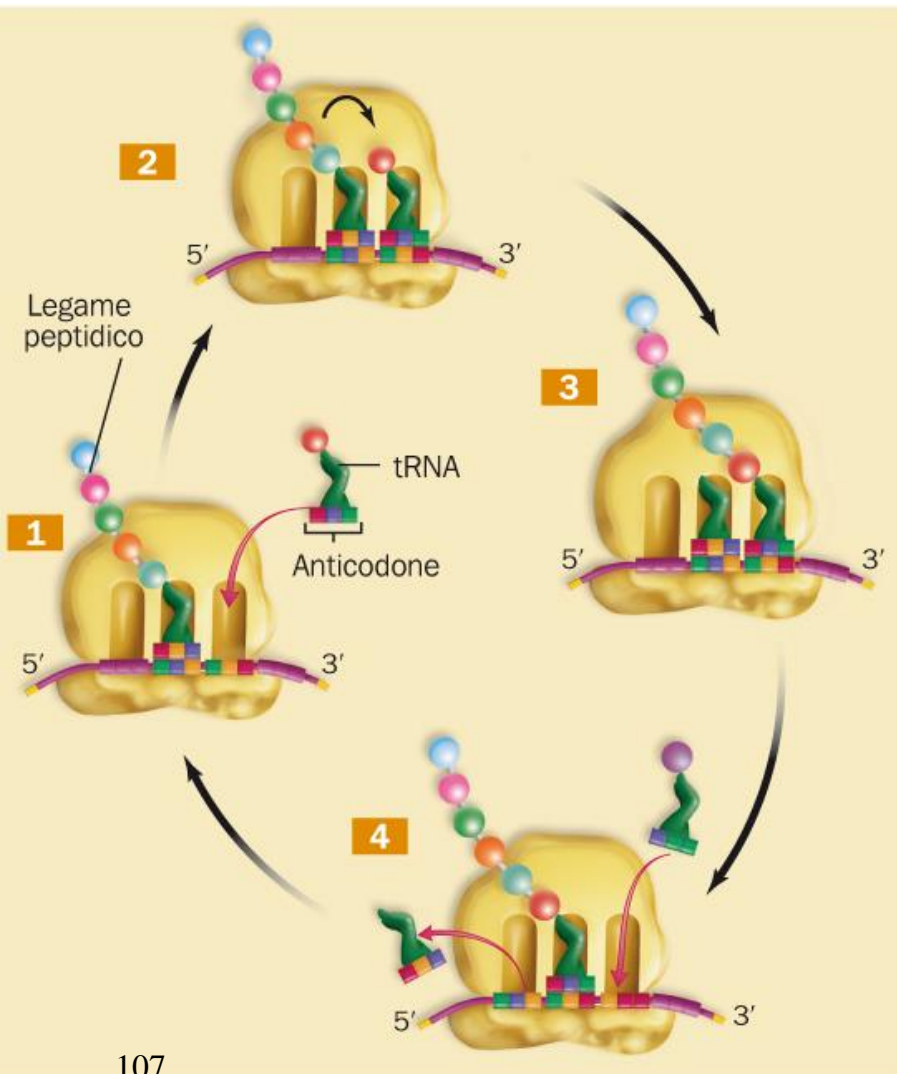
La 1^a fase della traduzione dell'mRNA in polipeptidi è detta «inizio»



L'**inizio** è la fase che mette insieme tutti i componenti necessari alla traduzione. Il **codone di inizio** è AUG. Ogni ribosoma ha 3 siti di attacco per i tRNA: **sito E** (da *exit*), **sito P** (da *peptide*) e **sito A** (da *amminoacido*).

ZANICHELLI

La 2^a fase della traduzione è l'allungamento



Durante l'**allungamento**, un tRNA che porta un peptide si trova sul sito P e un tRNA associato al proprio amminoacido sta arrivando al sito A. Una volta che il tRNA successivo si aggancia al sito A, il peptide in via di formazione sarà trasferito a questo tRNA.

Poi, avviene la **traslocazione**: l'mRNA si sposta in avanti, in modo che il tRNA che porta agganciato il peptide si trovi ora al sito P del ribosoma. Infine, il tRNA usato fuoriesce dal sito E.

ZANICHELLI