CDL BIOTECNOLOGIE FARMACEUTICHE [60/97]

CI Biochimica e laboratorio di biochimica 108 ore (12 CFU)

Biochimica 48 ore (6 CFU) Prof.ssa Alessandra Olianas (1 semestre)

Laboratorio di biochimica 60 ore (6 CFU) Prof.ssa Francesca Pintus (2 semestre)
[24 ore (3 CFU) lezioni frontali + 36 ore (3 CFU) laboratorio]

Lezioni :

Lunedì- 9-11	aula 7 Blocco H2 (ex H - D2)
Mercoledì 11-13	aula 202 blocco F
Venerdì 9-11	aula 7 Blocco H2 (ex H - D2)

Prof.ssa Alessandra Olianas

Dip. Scienze della Vita e dell'Ambiente
Sezione Biomedica (laboratorio di Biochimica)
Blocco D scala C
Tel. 070/6754507 (studio)

Ricevimento studenti: si riceve per appuntamento

olianas@unica.it



Alessandra Olianas

Dipartimento di Scienze della vita e dell'ambiente

Ruolo Professore associato

Area scientifico disciplinare Scienze biologiche

Settore scientifico disciplinare BIO/10 BIOCHIMICA

Email olianas@unica.it

Telefono 070/675-4507

Indirizzo cittadella universitaria 09046 Monserrato

Curriculum

Insegnamenti

Materiale didattico

Altre Attività

Tesi

Ricerca

Avvisi

Agenda

Materiale didattico Biochimica CDL Biotecnologie farmaceutiche

Lezioni di Biochimica applicata

Data: 09 marzo 2026

Materiale didattico di Biochimica CDL Chimica

Data: 09 marzo 2026

ACS lessons 2025-2026

Data: 29 ottobre 2025

Curriculum

Insegnamenti

Materiale didattico

Altre Attività

Tesi

Ricerca

Avvisi

Agenda



Prof. Alessandra Olianas

.

E’ vietata la copia e la riproduzione dei contenuti e immagini in qualsiasi forma. E’ inoltre vietata la redistribuzione e la pubblicazione dei contenuti e immagini non autorizzate espressamente dall'autore.

Di seguito titolo, autore e editore delle fonti da cui sono state prese le immagini e i video mostrati durante le lezioni di Biochimica come supporto didattico e utili per la preparazione dell'esame:

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

Voet, Voet. Pratt.
Fondamenti di Biochimica. Zanichelli

Berg, Tymoczco, Stryer. Biochimica. Zanichelli

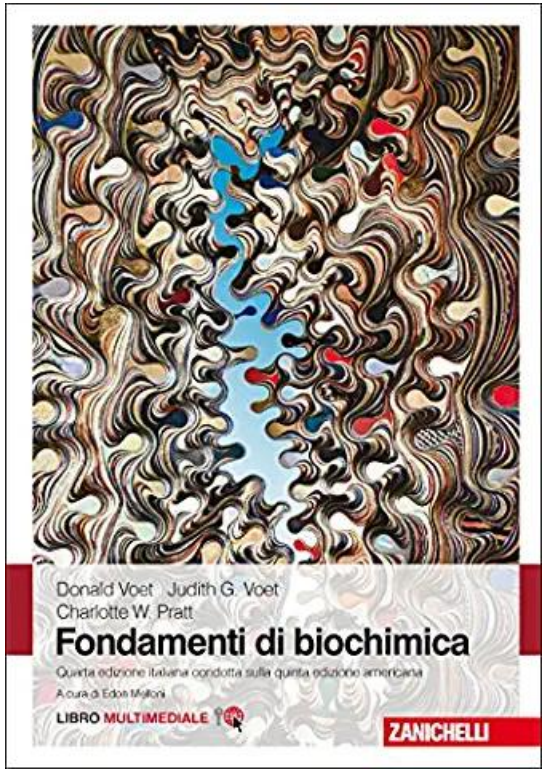
Adesione e l’utilizzo dei canali WhatsApp

Gli studenti troveranno le istruzioni nel primo post del nostro profilo instagram

UNICA_BIOFARM



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



Voet, Voet. Pratt.
Fondamenti di Biochimica. Zanichelli

PROGRAMMA DEL CORSO

-Glucidi. nomenclatura e classificazione, richiami di stereoisomeria. Anomeria, mutarotazione. Legame glicosidico. Disaccaridi di interesse biologico. Polisaccaridi.

- Aminoacidi: nomenclatura e classificazione, proprietà acido-base degli aminoacidi, pKa, pI. Curve di distribuzione ionica. Legame peptidico proprietà acido-base di peptidi e proteine

-Proteine: struttura secondaria, terziaria, e quaternaria. Modificazioni post-traduzionali, glicosilazione.

-- Eme e emoproteine. Mioglobina ed emoglobine, caratteristiche strutturali e ruoli biologici. Curve di ossigenazione, cooperatività e allosteria.

Le basi puriniche e pirimidiniche. I nucleotidi.

- Lipidi: Acidi grassi. Nomenclatura. Classificazione e struttura dei lipidi. Trigliceridi, fosfoglicerolipidi, sfingolipidi, colesterolo.

-Cinetica enzimatica. Catalisi enzimatica. Equazione di Michaelis e Menten, Km, Kcat, Vmax, V0. Equazione dei doppi reciproci. Interpretazione dei grafici. Inibitori reversibili e irreversibili. Modulazione covalente e allosterica dell'attività enzimatica.

-Vitamine e coenzimi: vitamina A, D e C. Coenzimi nicotinammidici e flavinici, coenzima A, Tiamina pirofosfato, piridossal-fosfato, biotina. Struttura e meccanismi di reazione.

-

Metabolismo e metabolismo energetico, anabolismo, catabolismo. Produzione di energia, trasporto, stoccaggio dell'energia metabolica: ATP e analoghi.

- Metabolismo glucidico: glicolisi e gluconeogenesi, cenni di regolazione ormonale, glicolisi aerobica e anaerobica. Sistemi navetta del NADH e fermentazioni lattiche e alcoliche. Metabolismo del piruvato.

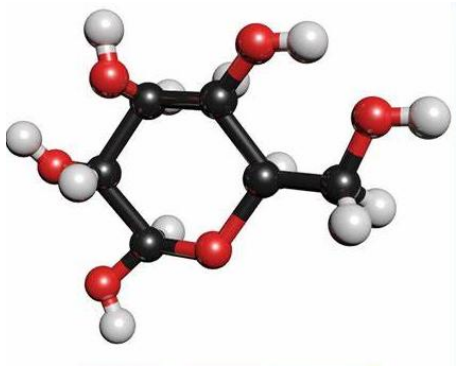
-Ciclo dell’acido citrico, reazioni e meccanismi catalitici.

- Metabolismo lipidico: Mobilizzazione degli acidi grassi. beta-ossidazione, reazioni e regolazione. Chetogenesi.

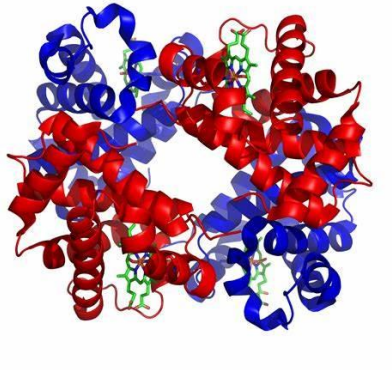
- Metabolismo proteico: ruoli biologici degli amminoacidi, transaminazione, deaminazione ossidativa, destino dell'ammoniaca, ciclo dell'urea.

-Fosforilazione ossidativa: Catena respiratoria, organizzazione dei complessi redox, ATP sintasi e suo meccanismo, controllo respiratorio, agenti disaccoppianti.

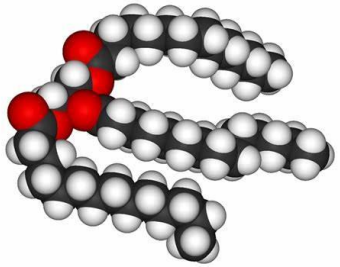
Macromolecole biologiche nella cellula



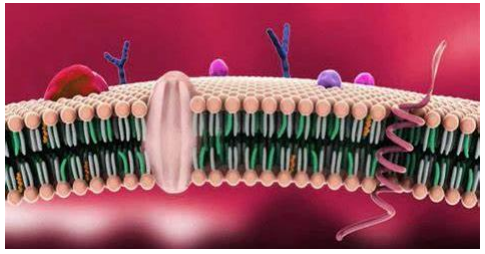
Carboidrati

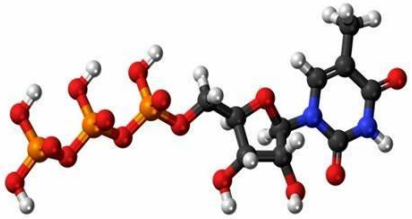


Proteine



Lipidi



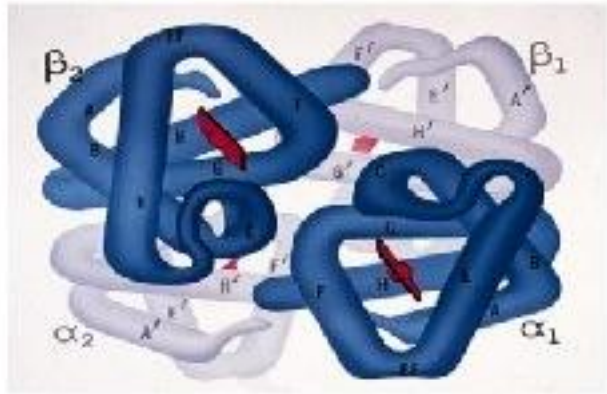


Nucleotidi



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 O_2 sufficiente e costante:

- **un sistema circolatorio adeguato;**

- **molecole trasportatrici di O_2, 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

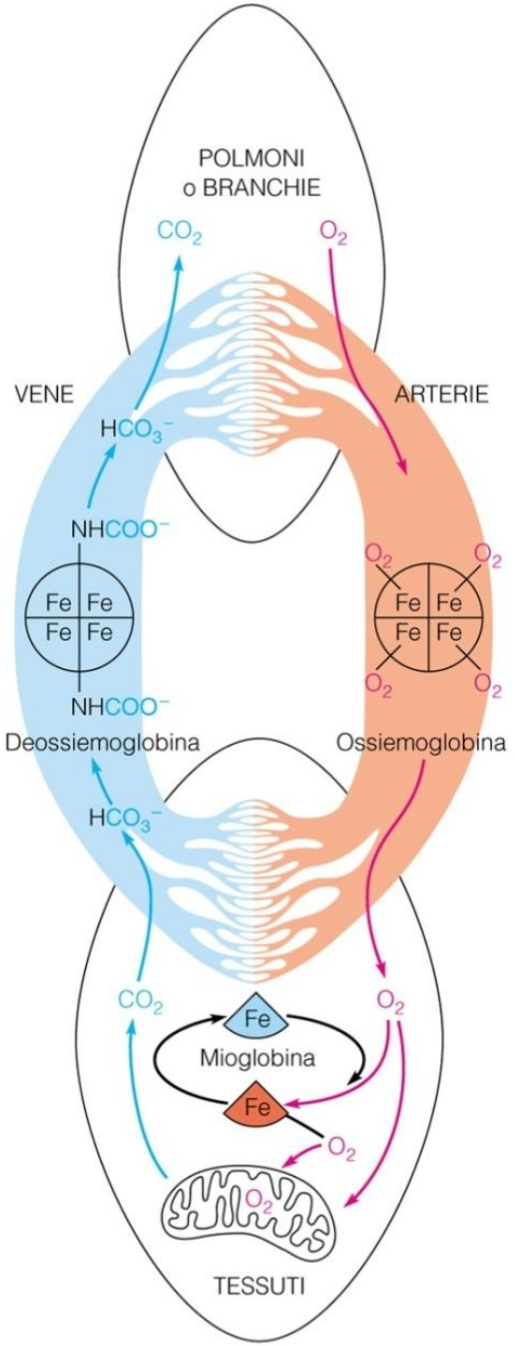
EMOGLOBINA & MIOGLOBINA

Hb

Mb

Si legano <u>reversibilmente</u> con l'O_2

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



P. Champe, R. Harvey, D. R. Ferrier, LE BASI DELLA BI(

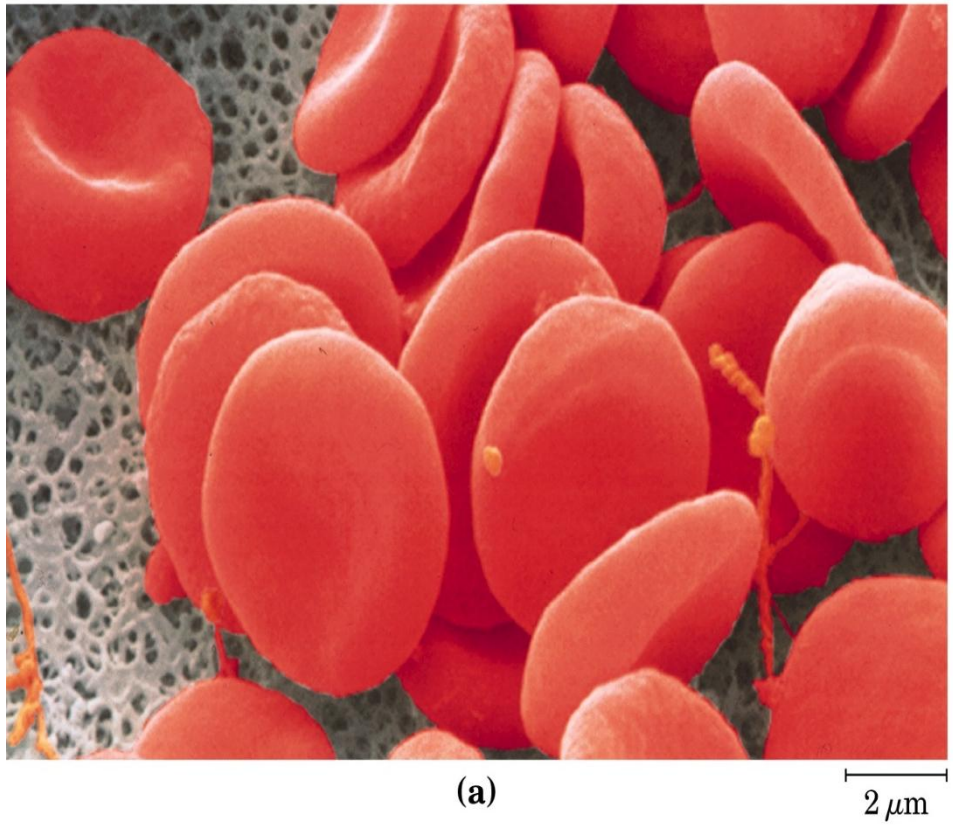
Editore S.p.A

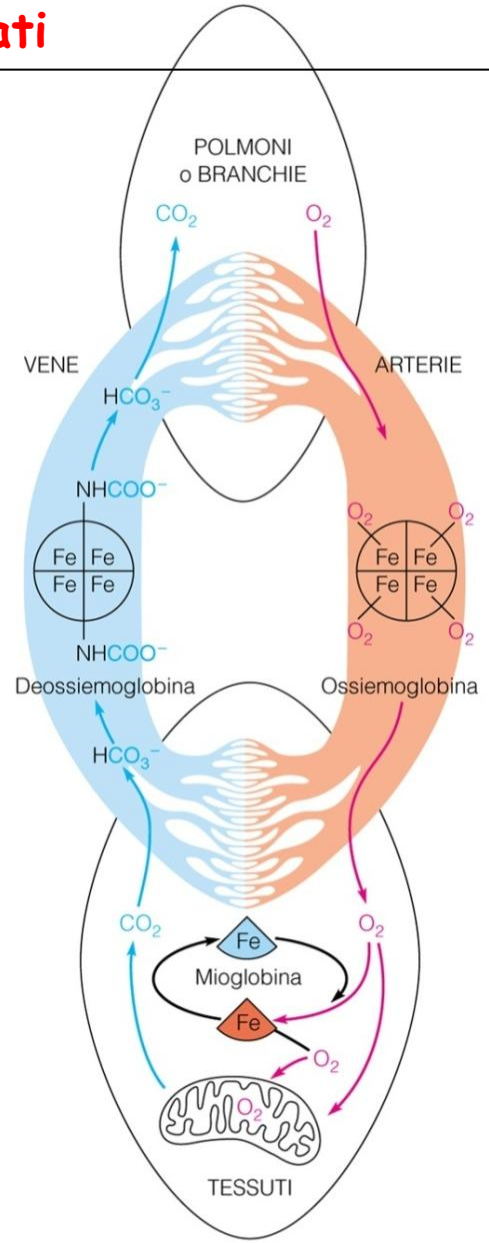
EMOGLOBINA (Hb)

1) Trasporta l'O_2 in tutti i vertebrati e in alcuni invertebrati

2) Gioca un ruolo nella rimozione della CO_2 dai tessuti (prodotto dell'ossidazione dei metaboliti) --→ rimossa ed espirata

Ogni eritrocita contiene circa 300 milioni di molecole di emoglobina

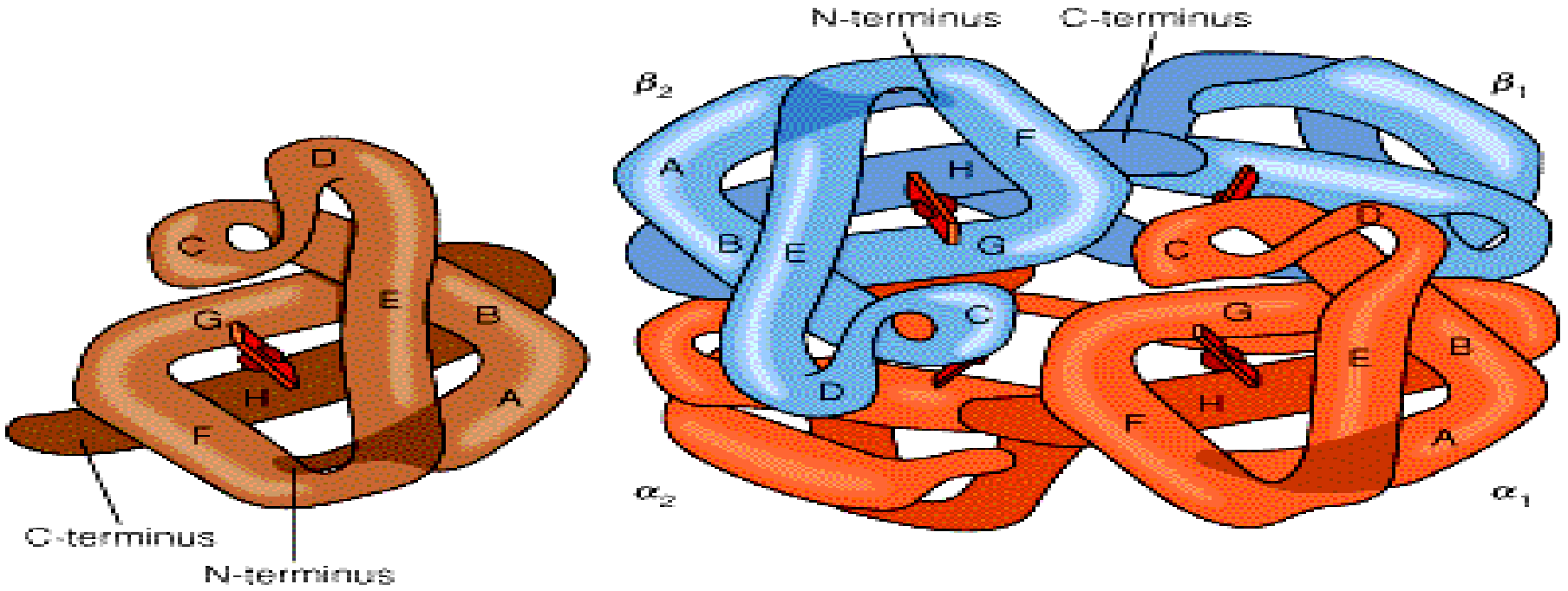




EMOGLOBINA & MIOGLOBINA

Proteine globulari complesse

(contengono un **gruppo prostetico**)



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

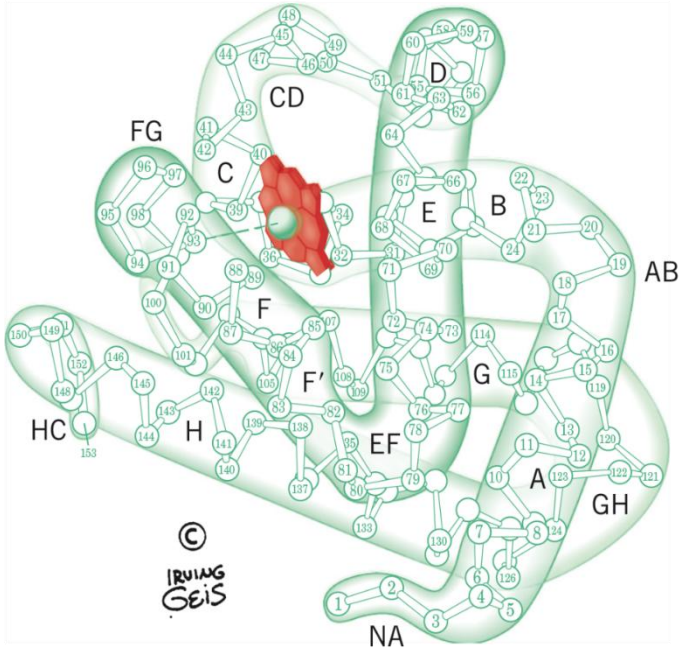
Porzione proteica + gruppo prostetico -→ oloproteina

Mioglobina (lega l'O_2 e si trova nel tessuto muscolare)

- Proteina monomerica (153 AA)

- Facilita la diffusione dell'O_2 nel muscolo

- 80% degli AA sono disposti ad α-elica





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

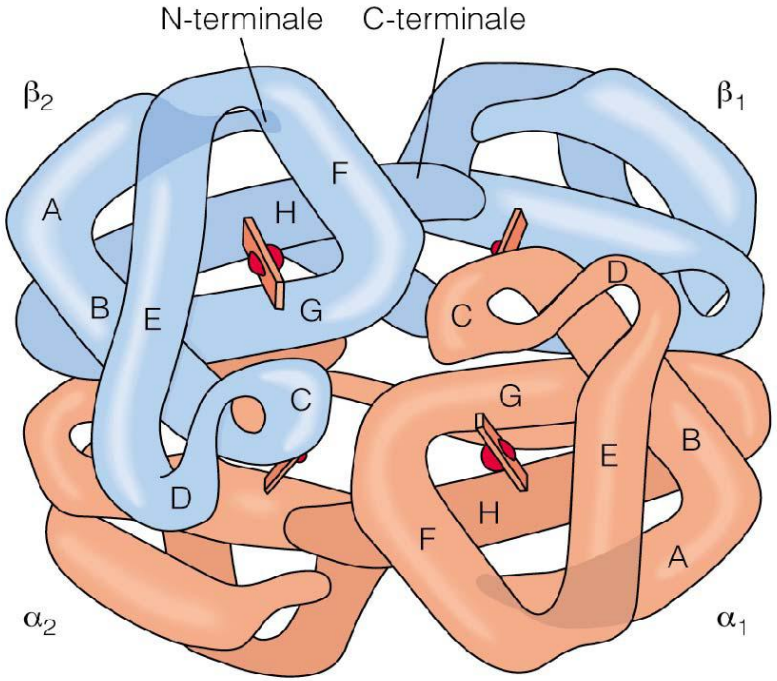
PM= ~ 17000 Da

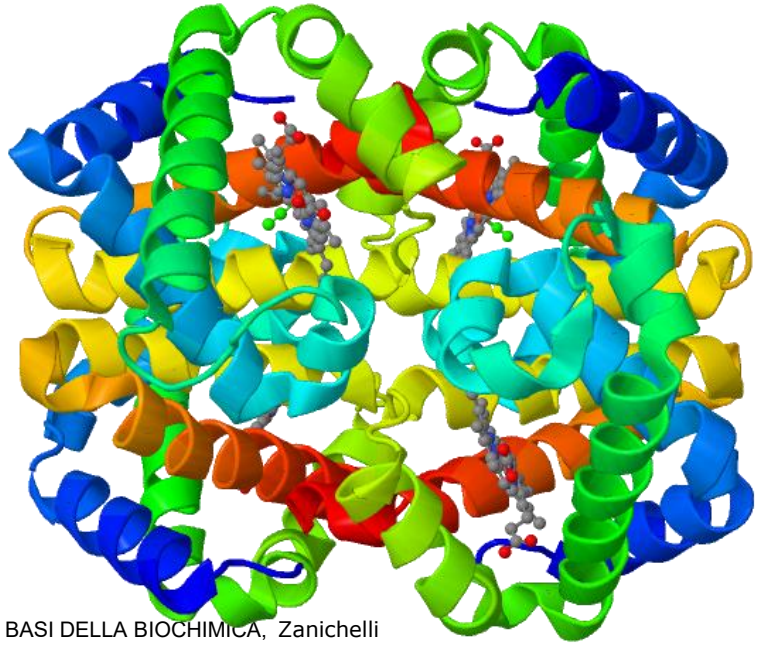
Emoglobina

- Proteina tetramerica 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





P. Champe, R. Harvey, D. R. Ferrier, LE BASI DELLA BIOCHIMICA, Zanichelli

Editore S.p.A. Copyright © 2006

Emoglobina (adulto)

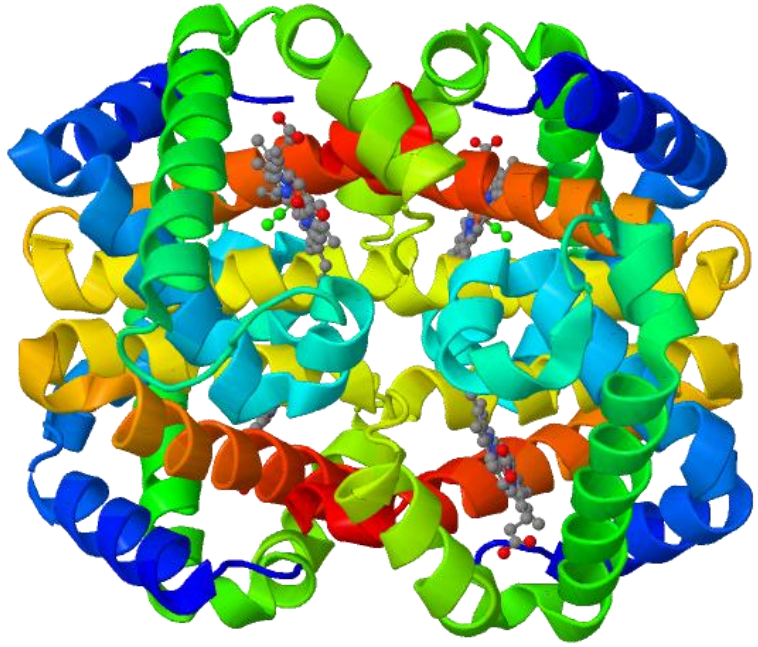
HbA $(\alpha_2\beta_2)$ 99%
HbA_2 $(\alpha_2\delta_2)$ 0,5%
HbF $(\alpha_2\gamma_2)$ 0,5%

Emoglobina (fetale)

HbF $(\alpha_2\gamma_2)$

α -→ 141 AA

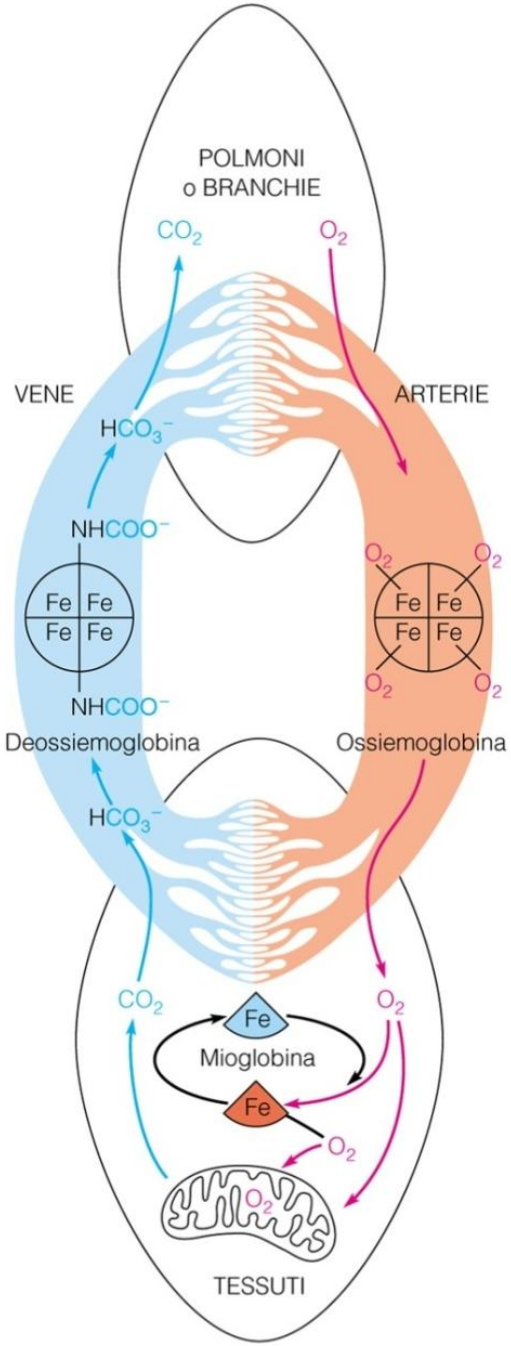
β -> 146 AA
δ -> 146 AA
γ -> 146 AA



P. Champe, R. Harvey, D. R. Ferrier, LE BASI DELLA BIOCHIMICA, Zanichelli Editore S.p.A. Copyright © 2006

L'**emoglobina**
trasporta l'O_2 dai
polmoni ai tessuti

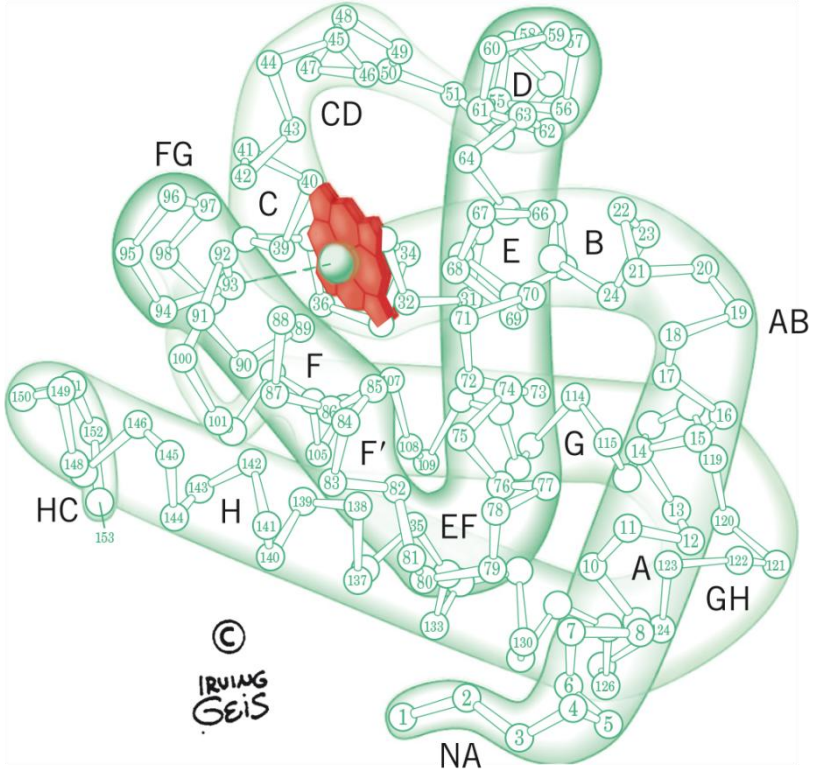
La **Mb** è in grado di legare l'ossigeno rilasciato dall'emoglobina nel circolo sanguigno ai tessuti e trasportarlo ai vari organuli cellulari che lo utilizzano (es. mitocondri)



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

-proteica (globina)

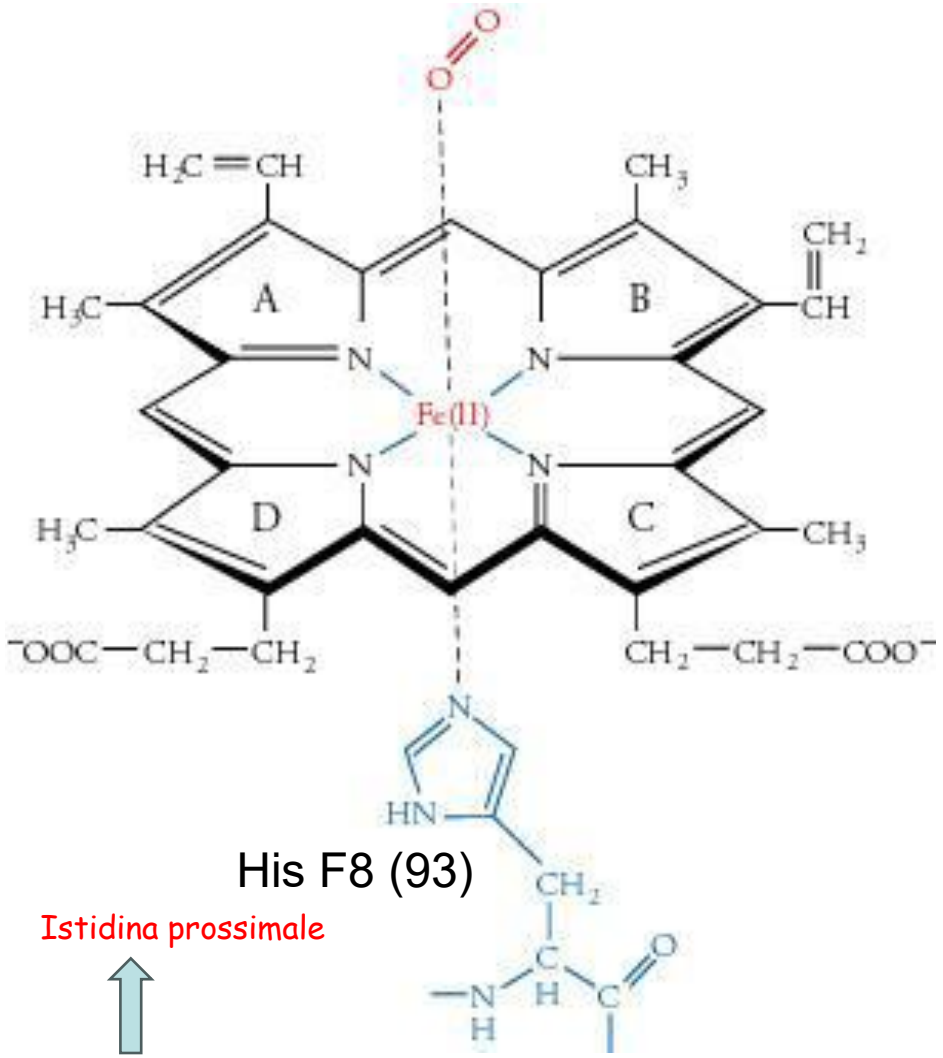
-porzione non proteica (eme)



P. Champe, R. Harvey, D. R. Ferrier, LE BASI DELLA BIOCHIMICA, Zanichelli

Editore S.p.A. Copyright © 2006

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

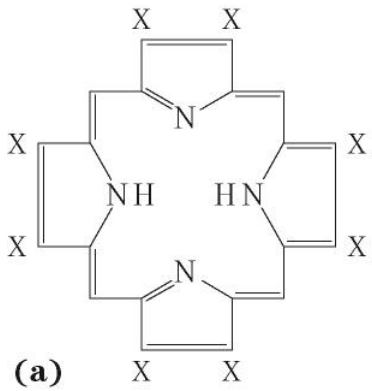


EME:

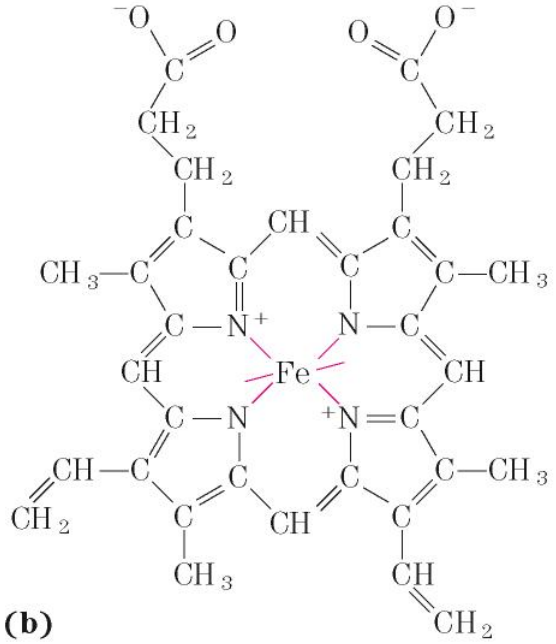
- 4 anelli pirrolici= protoporfirina IX
- Fe^{2+} al centro del gruppo eme
- (il Fe^{3+} non è in grado di legare ossigeno)

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

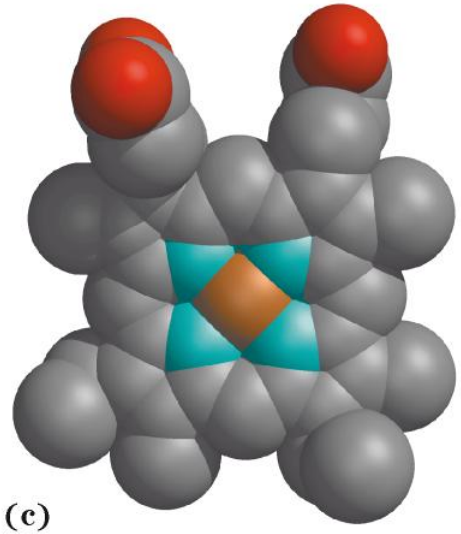
porfirina



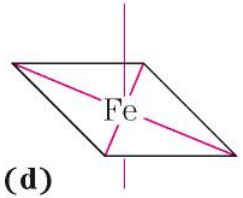
(a)



(b)



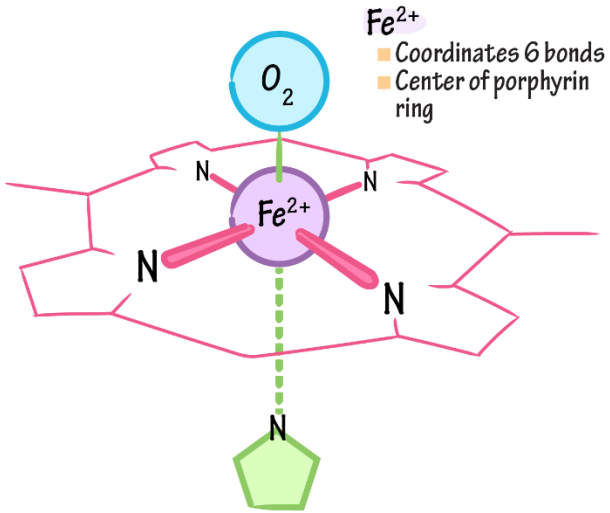
(c)

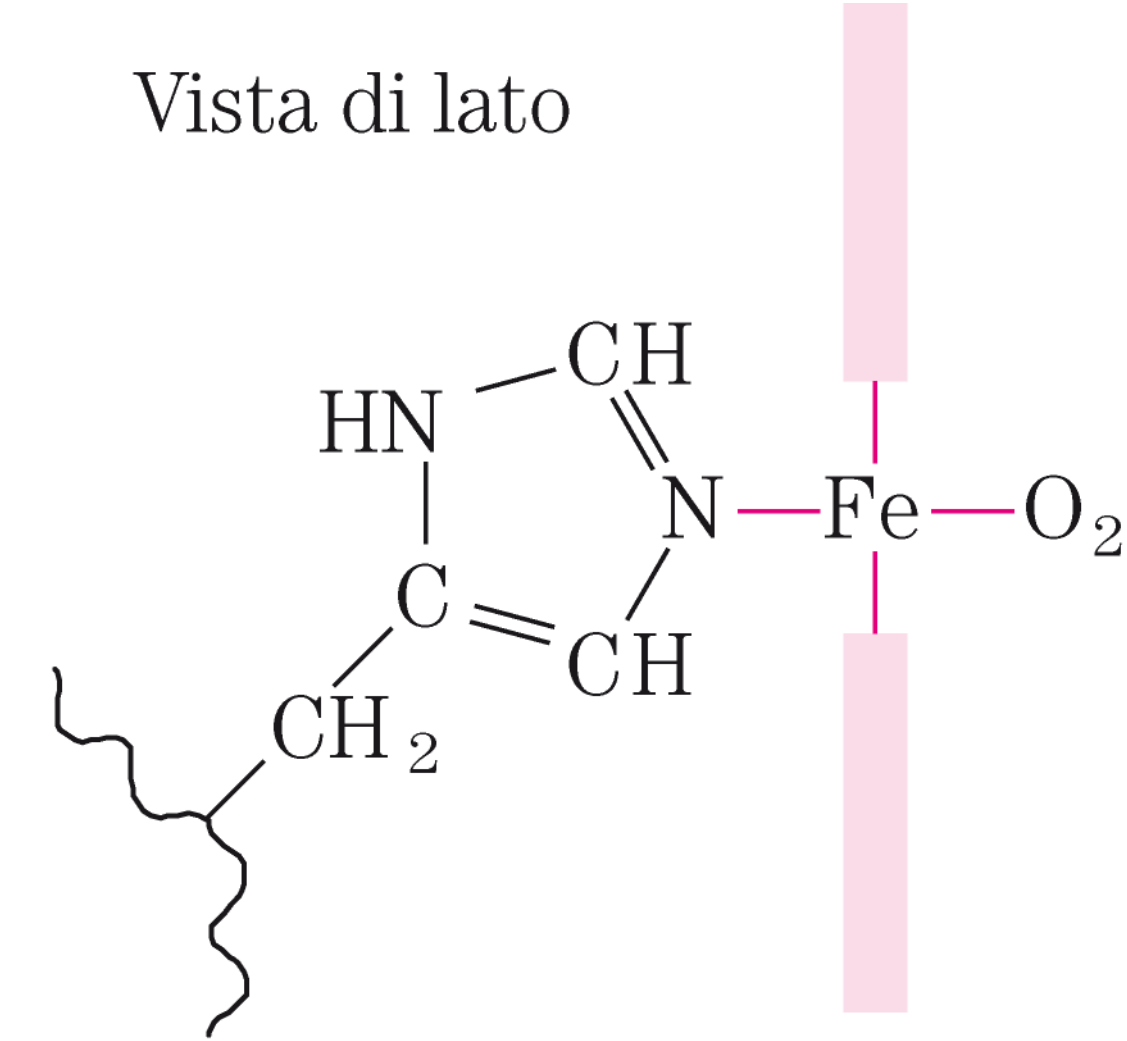


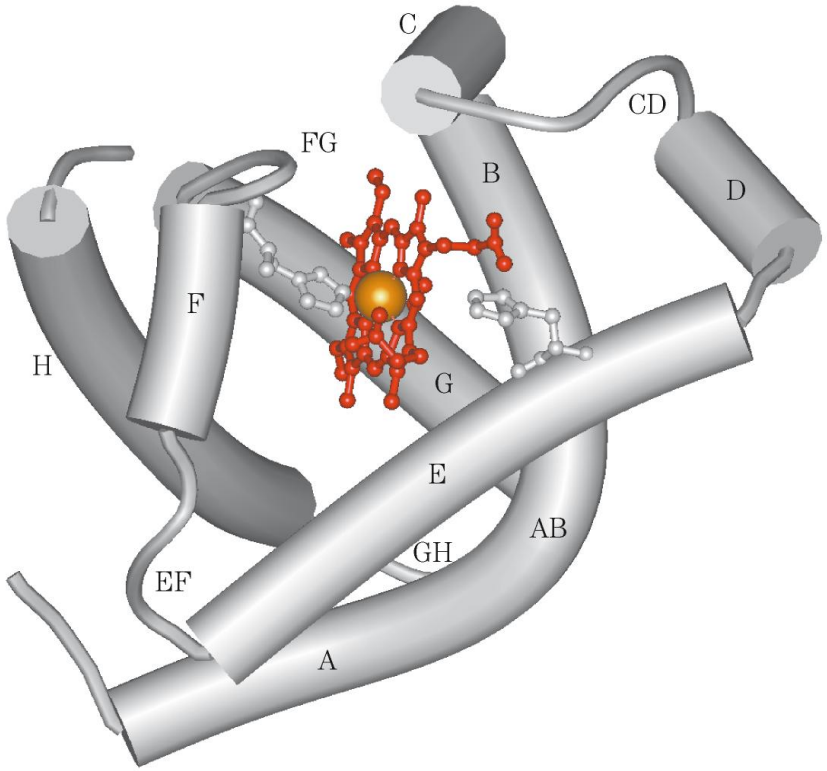
(d)

Heme Group

Protoporfirina IX

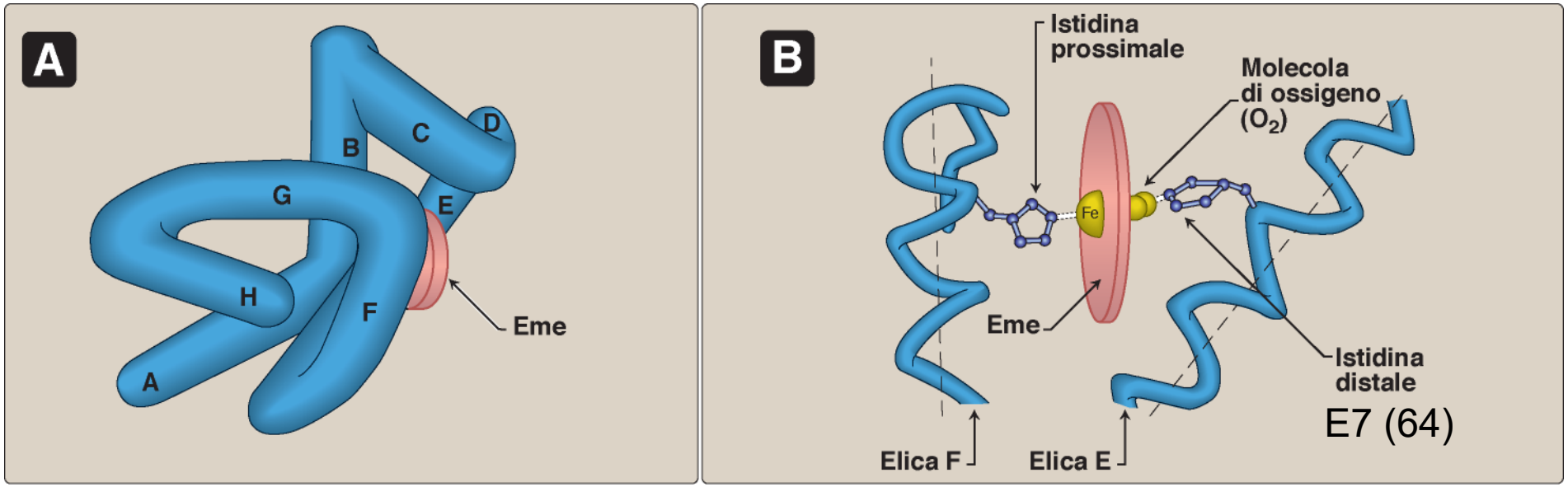


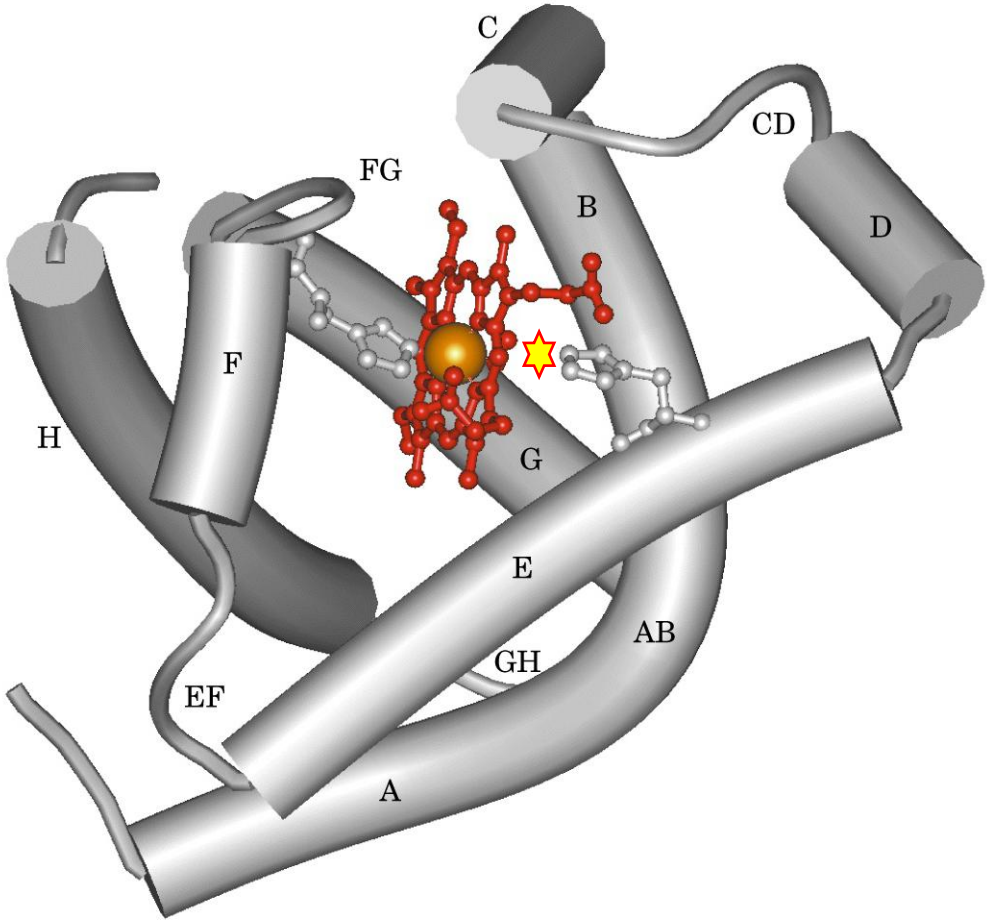

Vista di lato
CH
HN
N
Fe
O2
C
CH
CH2
Residuo
di istidina
Piano
dell'anello
porfirinico



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'ossiemoglobina;
2. il *CO* nella carbossiemoglobina;
3. l'H_2O nella metaemoglobina,

↓

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.

(<u>non</u> **CO_2**!!!)

Il legame con il CO è circa 300 volte più stabile di quello con l'O_2.

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

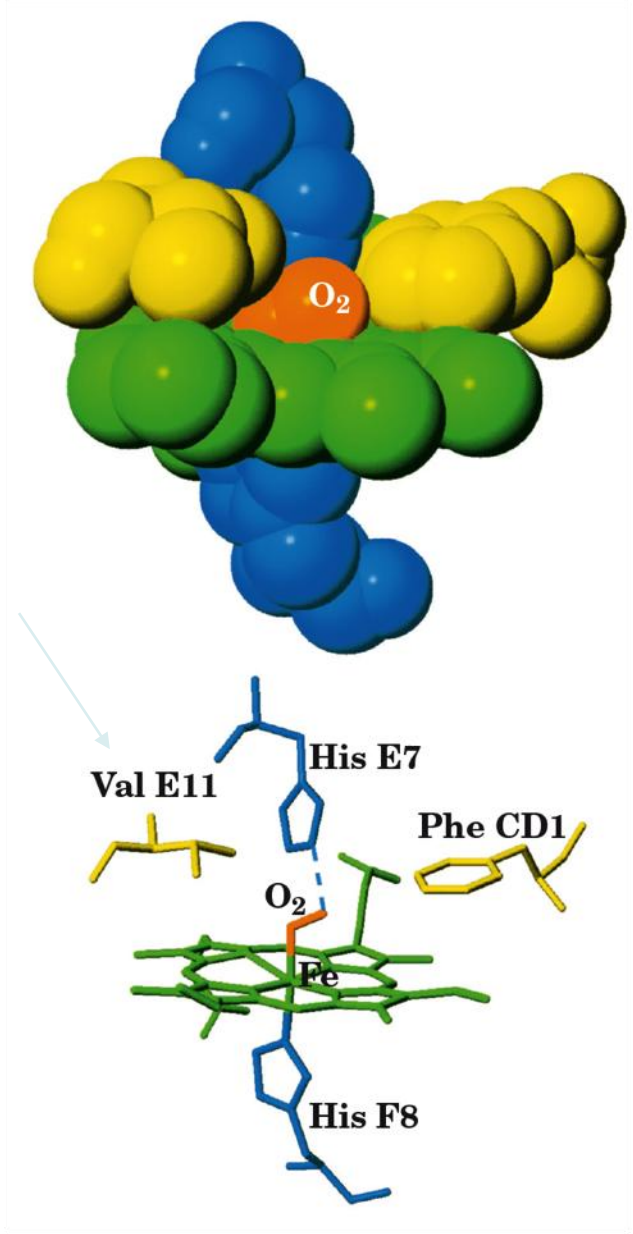
Le **globine** che circondano l'**eme** nella **Mb** ed nella **Hb** hanno funzioni di estrema importanza:

- impediscono al ferro dell'eme di ossidarsi da Fe^{2+} ferroso a Fe^{3+} ferrico;

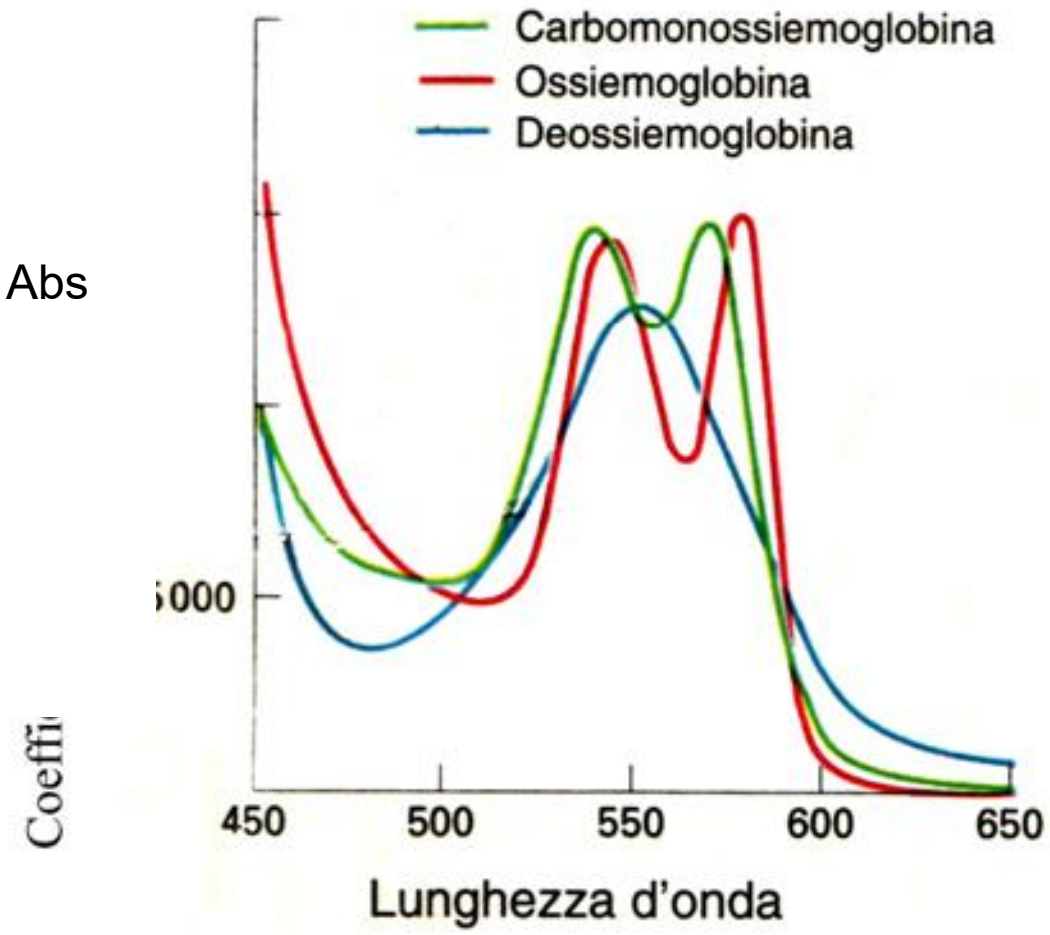
- creano un **sito attivo idrofobico**, in cui si lega O_2

- proteggono l'**eme** da ligandi indesiderabili (esempio *CO* monossido di carbonio).

.

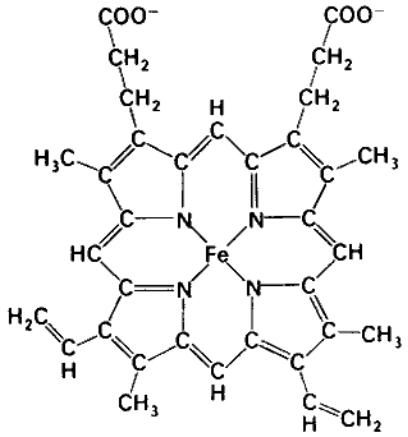


Spettro di assorbimento dell'Hb

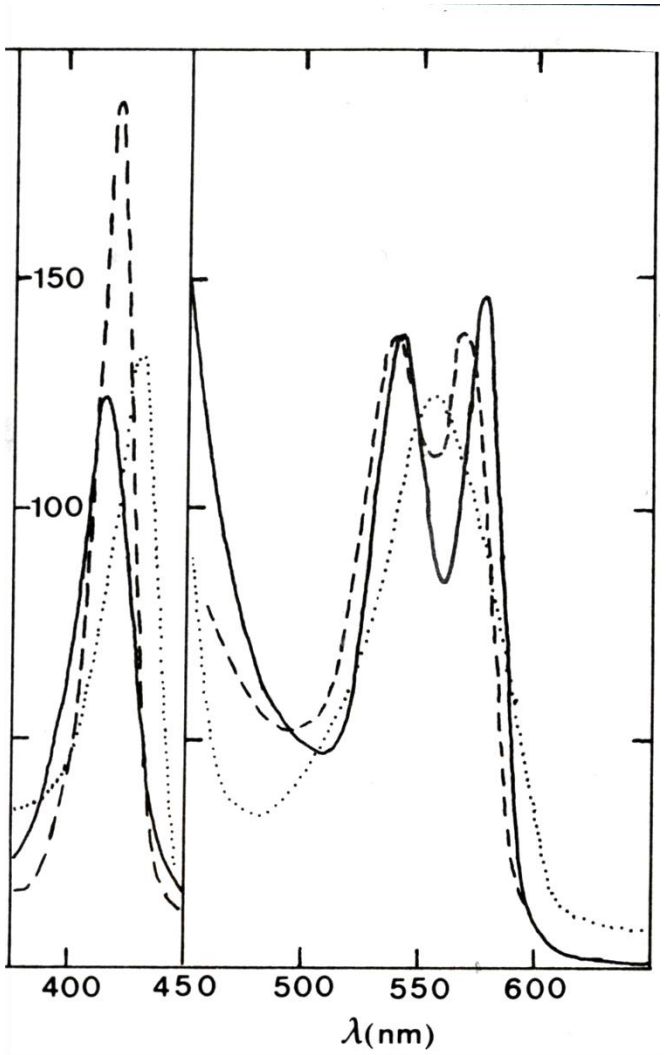


•Gruppi prostetici (proteine coniugate): p.es gruppo eme 410-415 nm,

Proteina coniugata: Hb



Heme
(Fe-protoporphyrin IX)



Oxy-$\overline{\text{Hb}}$ ( )

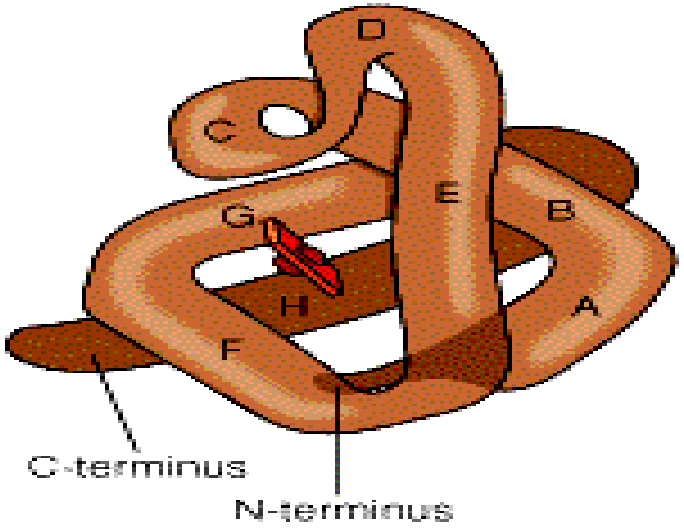
Deoxy-Hb (.....)

Carboxy-Hb (.....)

MIOGLOBINA EMOGLOBINA

1 **gruppo prostetico**

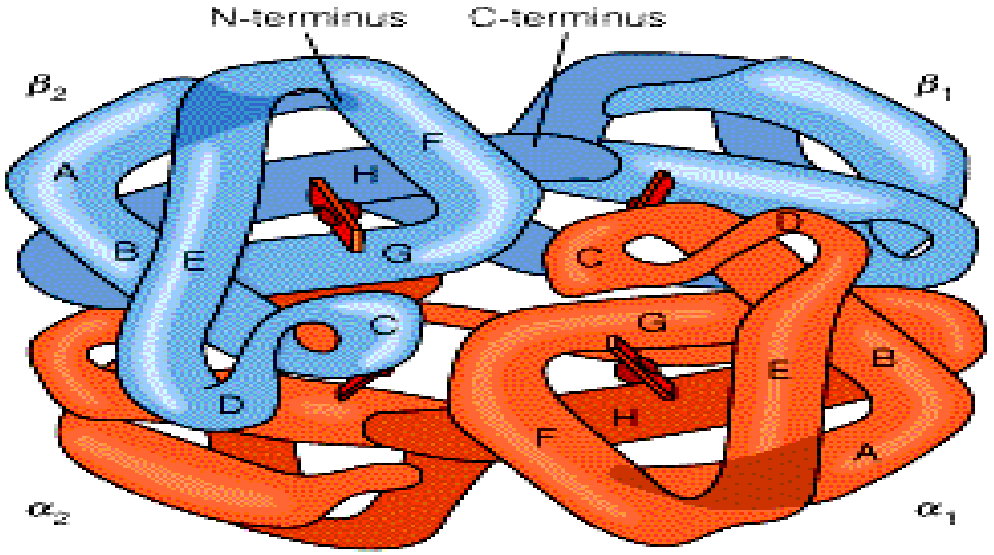
1 molecola di ossigeno



Il legame con l'ossigeno NON è cooperativo

4 **gruppo prostetici**

4 molecole di ossigeno



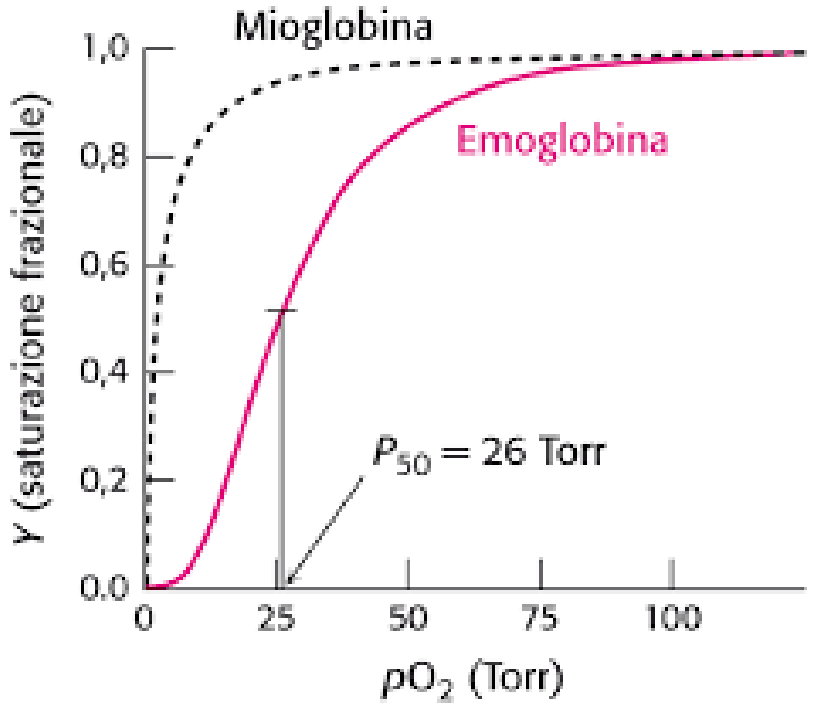
Il legame con l'ossigeno è cooperativo

P. Champe, R. Harvey, D. R. Ferrier, LE BASI DELLA BIOCHIMICA, Zanichelli

Editore S.p.A. Copyright © 2006

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

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



P. Champe, R. Harvey, D. R. Ferrier, LE BASI DELLA BIOCHIMICA, Zanichelli Editore S.p.A. Copyright © 2006

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

Proteina (**P**) + Ligando (**L**)↔**PL**

$Mb + O_2 \underset{K_{diss}}{\overset{Kass}{\rightleftharpoons}} MbO_2$

$MbO_2 \overset{Kdiss}{\rightleftharpoons} Mb + O_2$

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

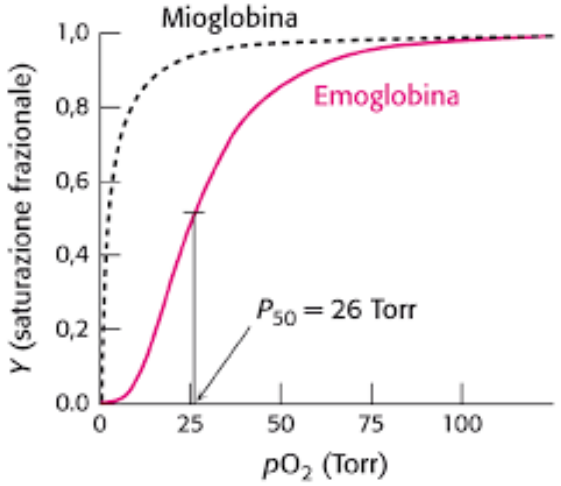
Il legame di un ligando dipende dalla sua concentrazione nell'ambiente circostante

Se la Kdiss è piccola l'affinità proteina/ligando è elevata

FRAZIONE DI SATURAZIONE

Y= Siti occupati / Totale siti disponibili

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



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 [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

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

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}

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

$$MbO_2 \rightarrow Mb + O_2$$

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

$$[MbO_2] = \frac{[Mb]\;[O_2]}{K\,diss}$$

$$Y = \frac{\dfrac{[Mb]\;[O_2]}{K\,diss}}{\dfrac{[Mb]\;[O_2]}{K\,diss} + [Mb]}$$

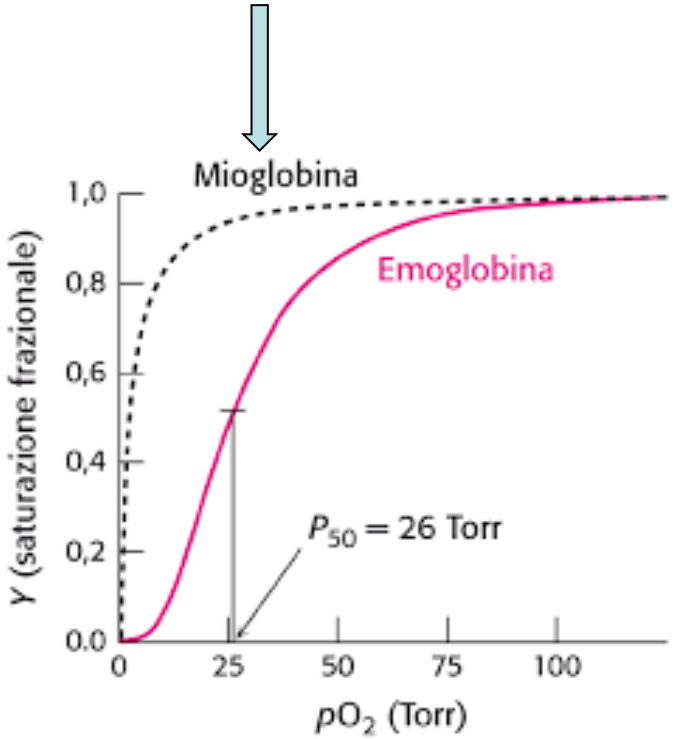
$$Y = \frac{\dfrac{[Mb]\;[O_2]}{K\,diss}}{\dfrac{[Mb]\;[O_2] + [Mb]\;Kdiss}{K\,diss}} = \frac{\dfrac{[Mb]\;[O_2]}{K\,diss}}{\dfrac{[Mb]\;([O_2]+Kdiss)}{K\,diss}} = \frac{[O_2]}{K\,diss + [O_2]}$$

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

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

Equazione di Hill

Equazione che descrive una
IPERBOLE RETTANGOLARE



1 atmosfera = 760 Torr = 133.32 pascal

La frazione di saturazione 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

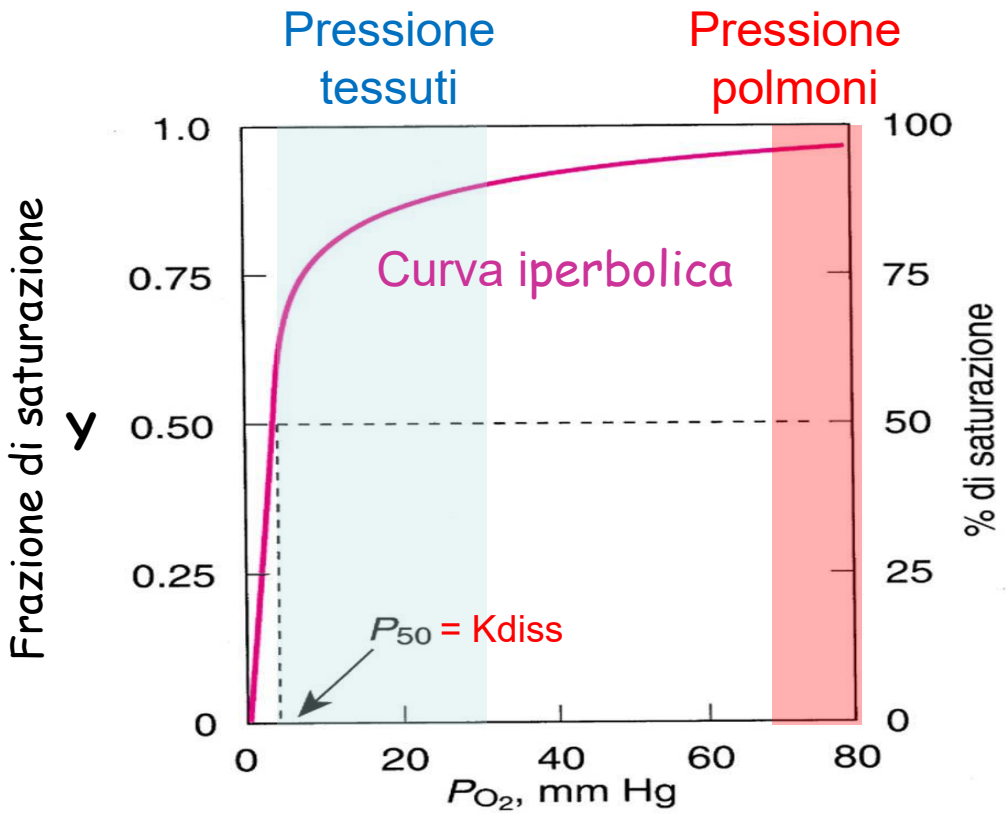
La p50 è la pressione parziale di ossigeno alla quale la Mb è saturata al 50%

Legame O_2-Mb

$$Mb + O_2 = MbO_2$$

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

CURVA di Legame dell'ossigeno alla Mb



Numero di molecole che hanno legato l'O2 rispetto al totale

p50 = affinità per l'O_2

La pressione di O_2 al quale è saturato il 50% delle molecole

La p50 della Mb è molto bassa (3-4 mmHg) (Kdiss molto bassa) e quindi l'affinità dell'emoproteina per l'O2 è molto alta.

Mb

↓

p50 molto piccola

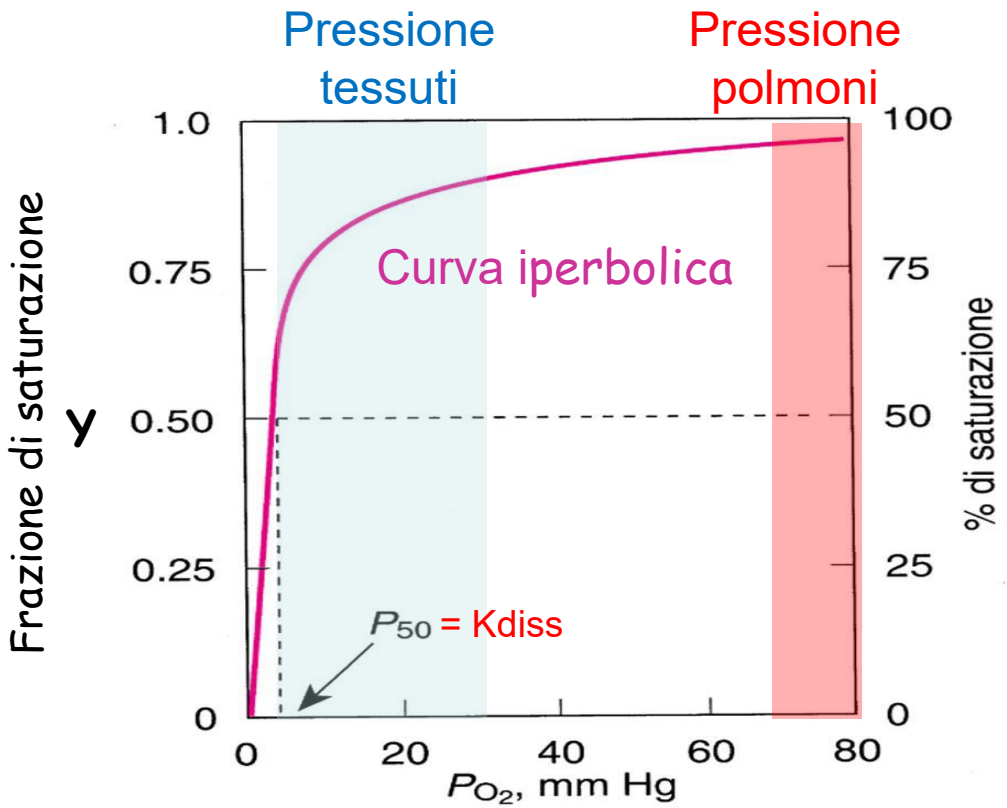
↓

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 Kdiss e quindi maggiore sarà l'affinità dell'emoproteina per l'O2



Più è grande il valore della p50 più è grande la Kdiss 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:

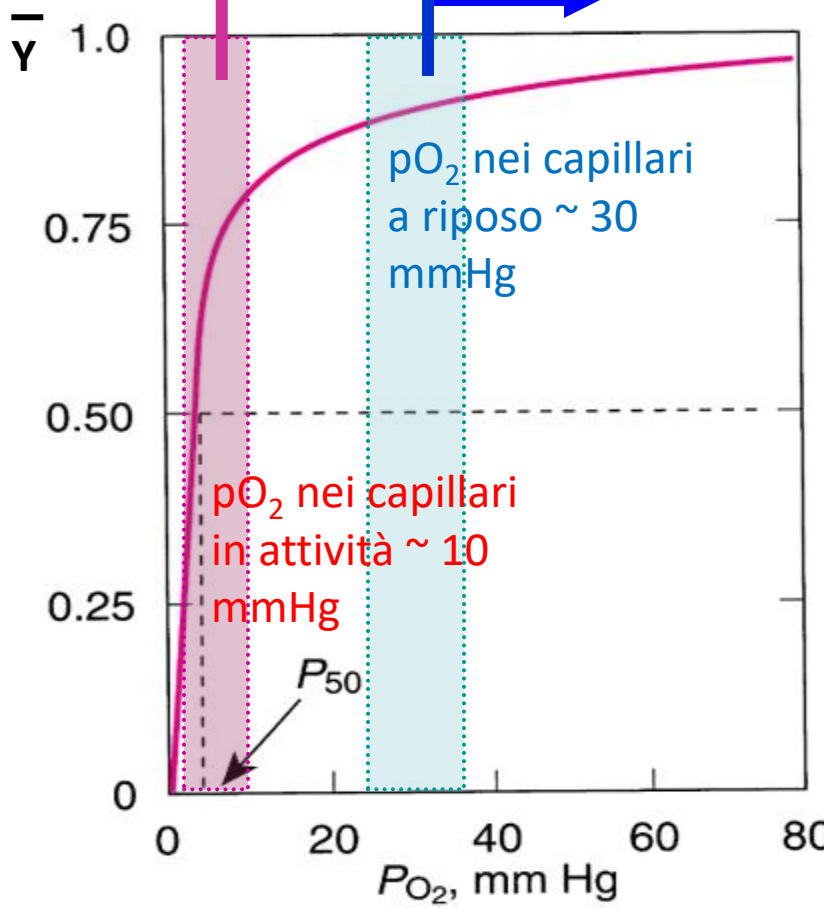
↓

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

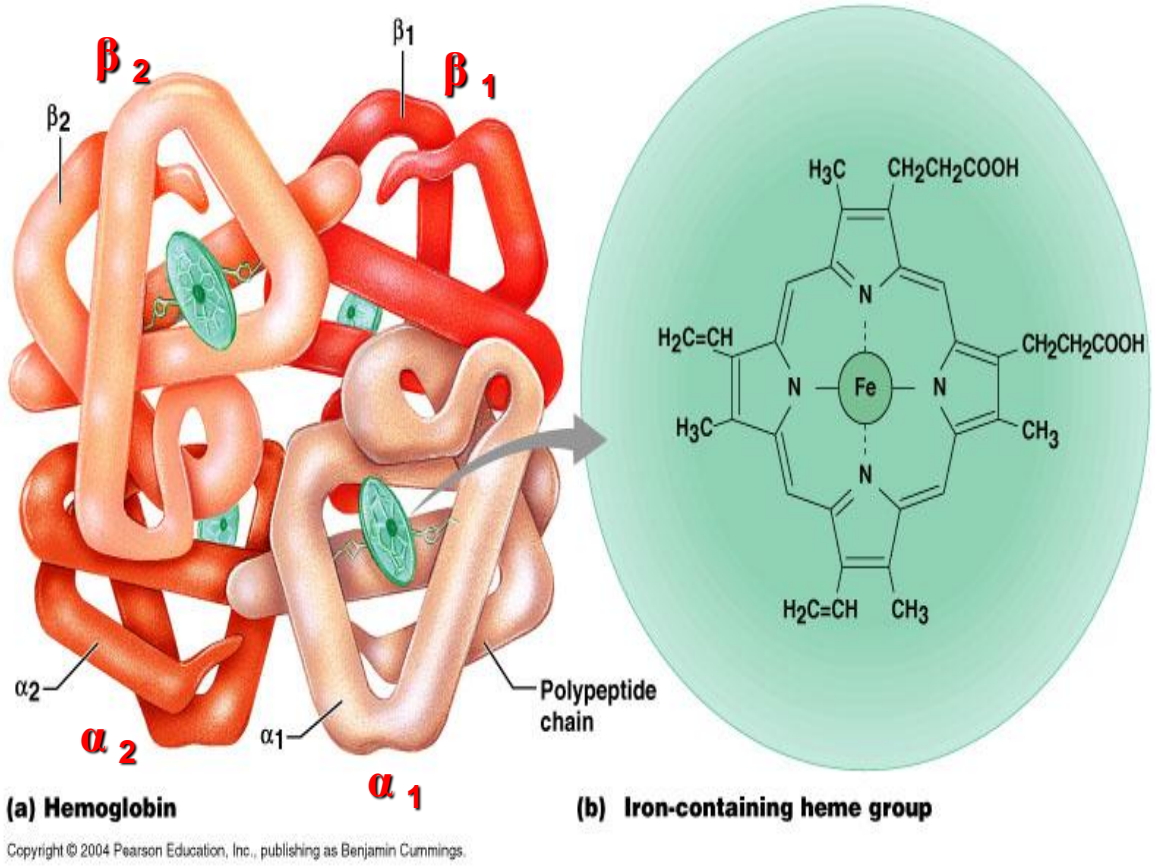
↓

Fase di ossigenazione

EMOGLOBINA (Hb)

Trasporto reversibile di O_2 dai polmoni ai tessuti

Trasporta reversibile di anidride carbonica CO_2.



Hb ha 4 catene polipetiditiche 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.

α2 β2

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

α2 γ2

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%

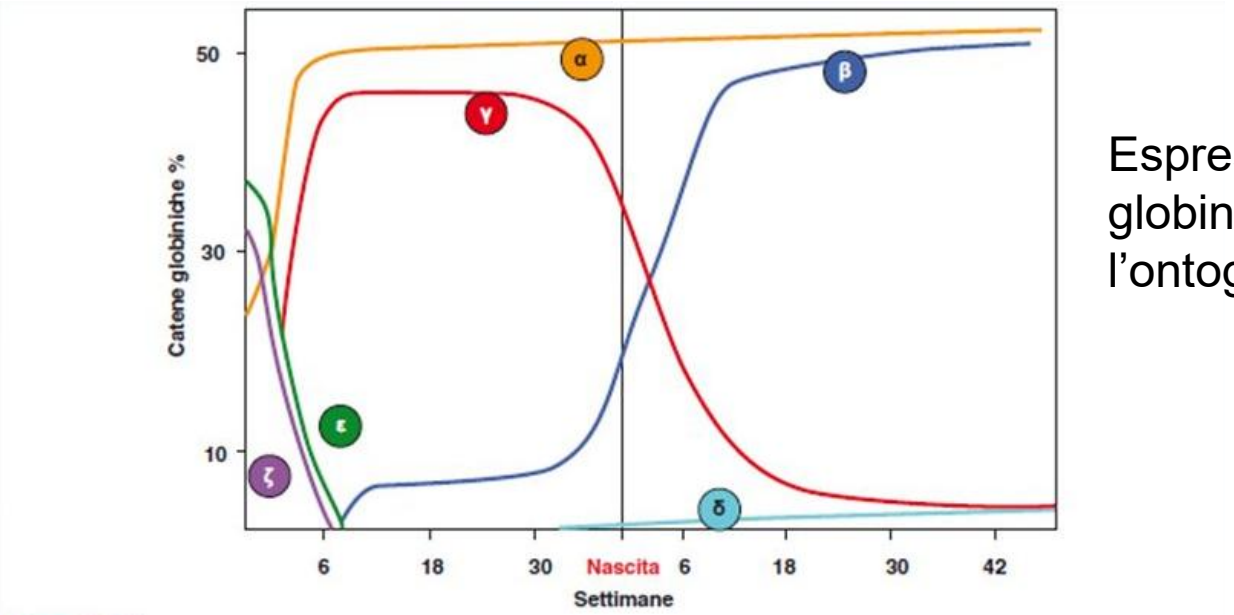
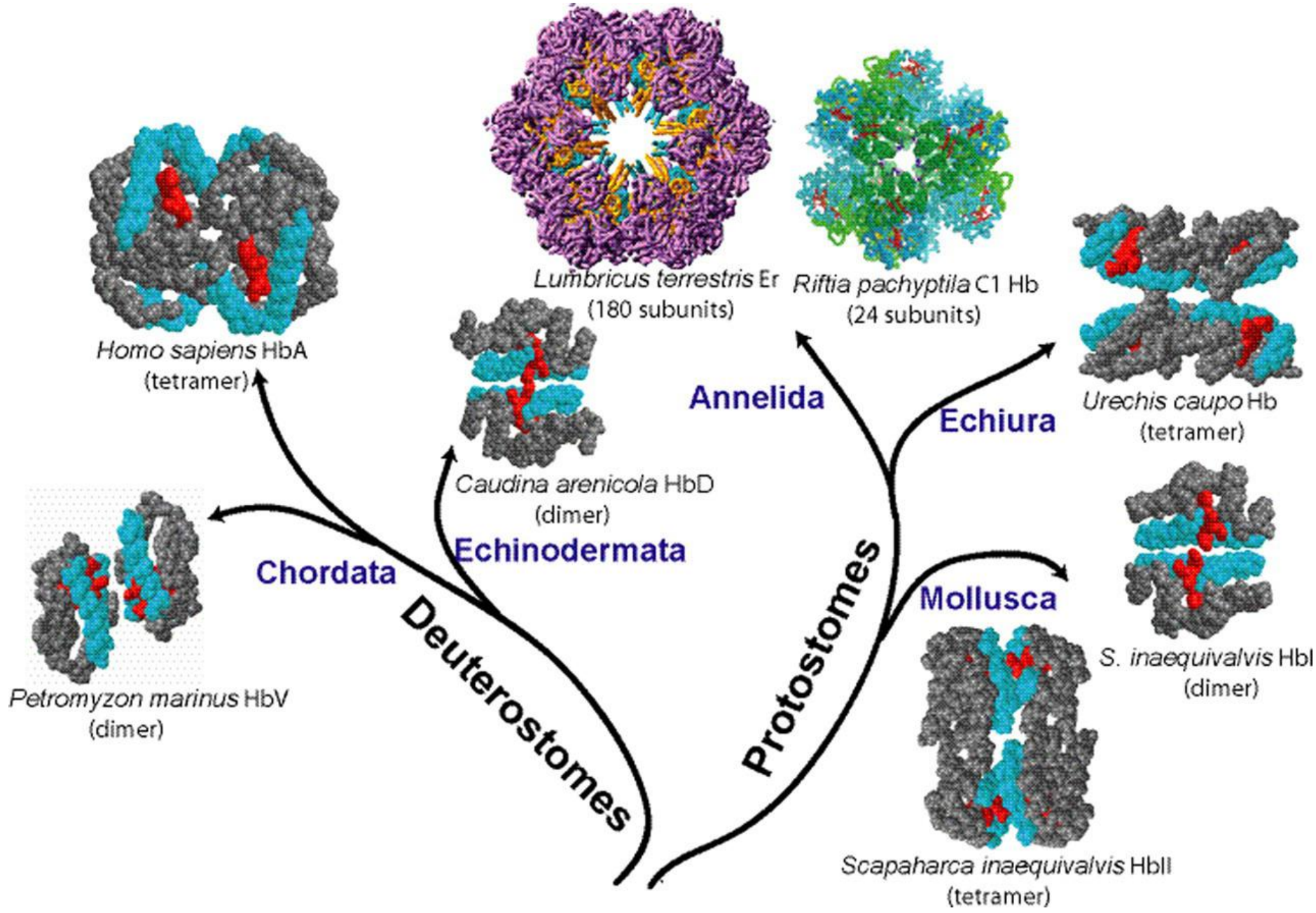


Figura 25.35
Entità percentuale della produzione delle diverse catene emoglobiniche nel corso della gravidanza e nel primo anno di vita.

Espressione dei geni globinici durante l'ontogenesi

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 $Hb(O_2)_4$.

$$Hb + 4[O_2] \underset{K_{diss}}{\overset{Kass}{\rightleftharpoons}} Hb[O_2]_4$$

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)

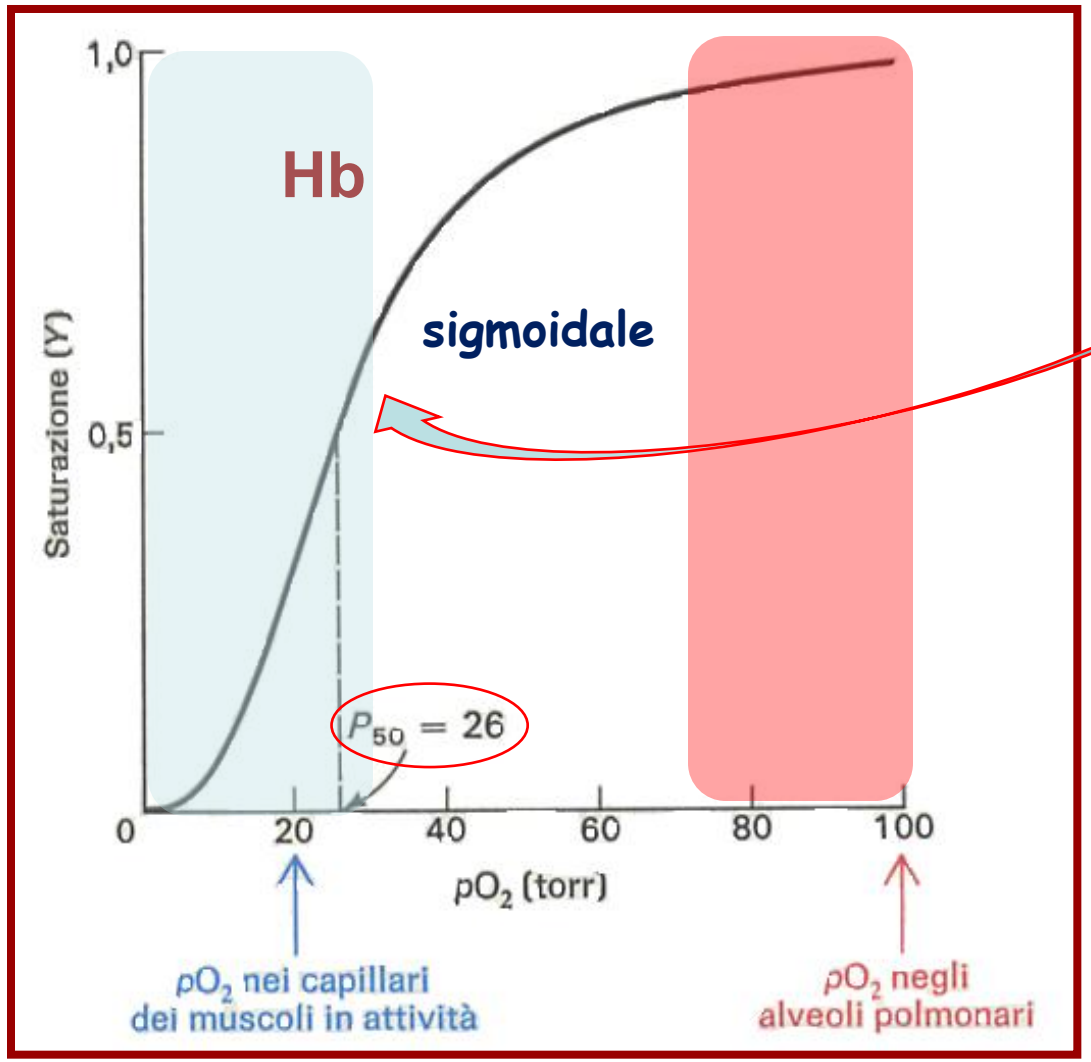
$$\bar{Y} = \frac{pO_2}{K_{diss} + pO_2}$$

$$\bar{Y} = \frac{pO_2^{\,4}}{K_{diss} + pO_2^{\,4}}$$

n INDICA IL GRADO DI COOPERATIVITà TRA LE SUBUNITA'

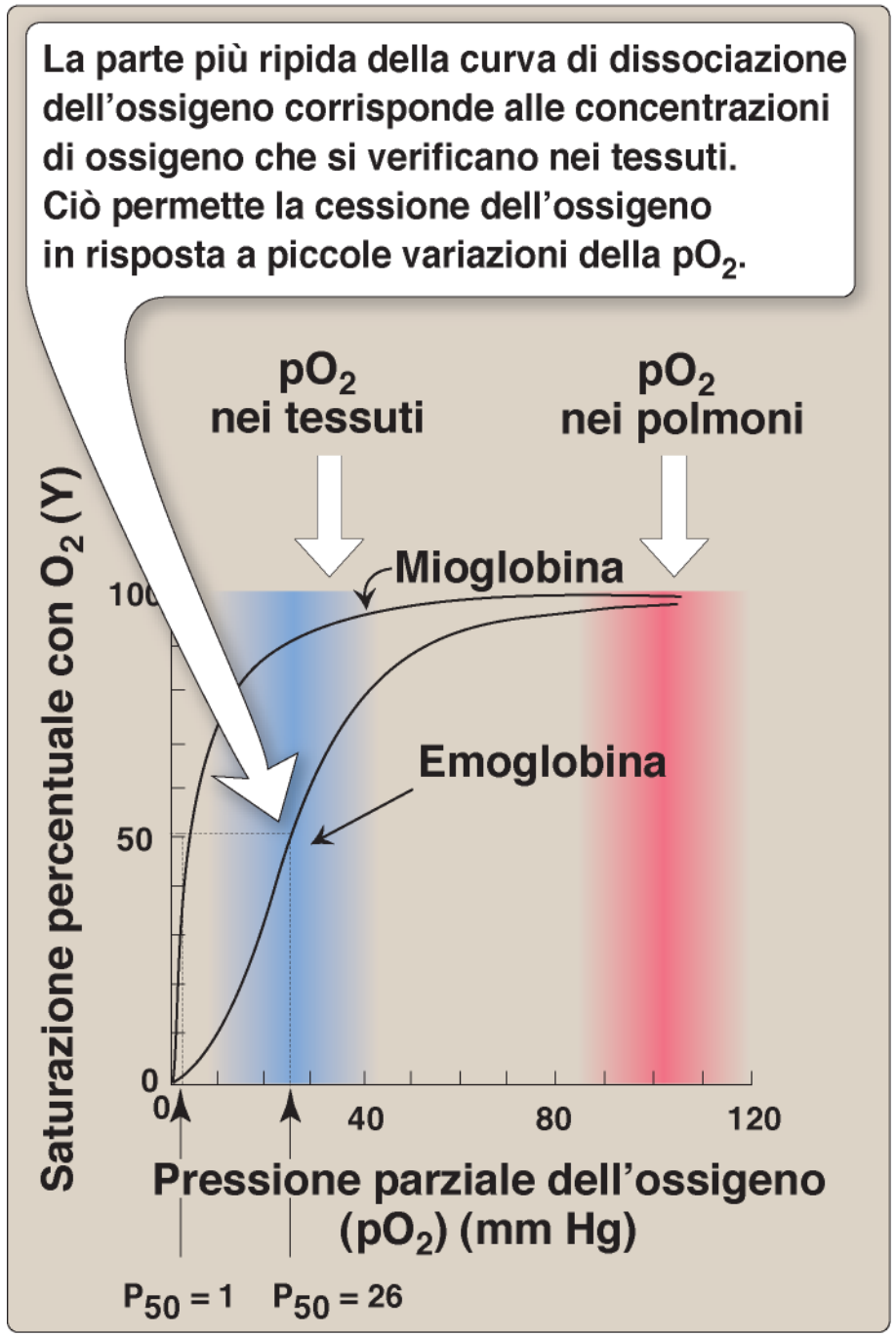
Curva di dissociazione dell'O_2 per l'emoglobina

$$Hb + 4O_2 = Hb(O_2)_4$$



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

L'emoglobina lega l'O_2 quando la pressione parziale del gas (pO_2) è elevata (polmoni) e lo rilascia quando la pressione è bassa (tessuti).



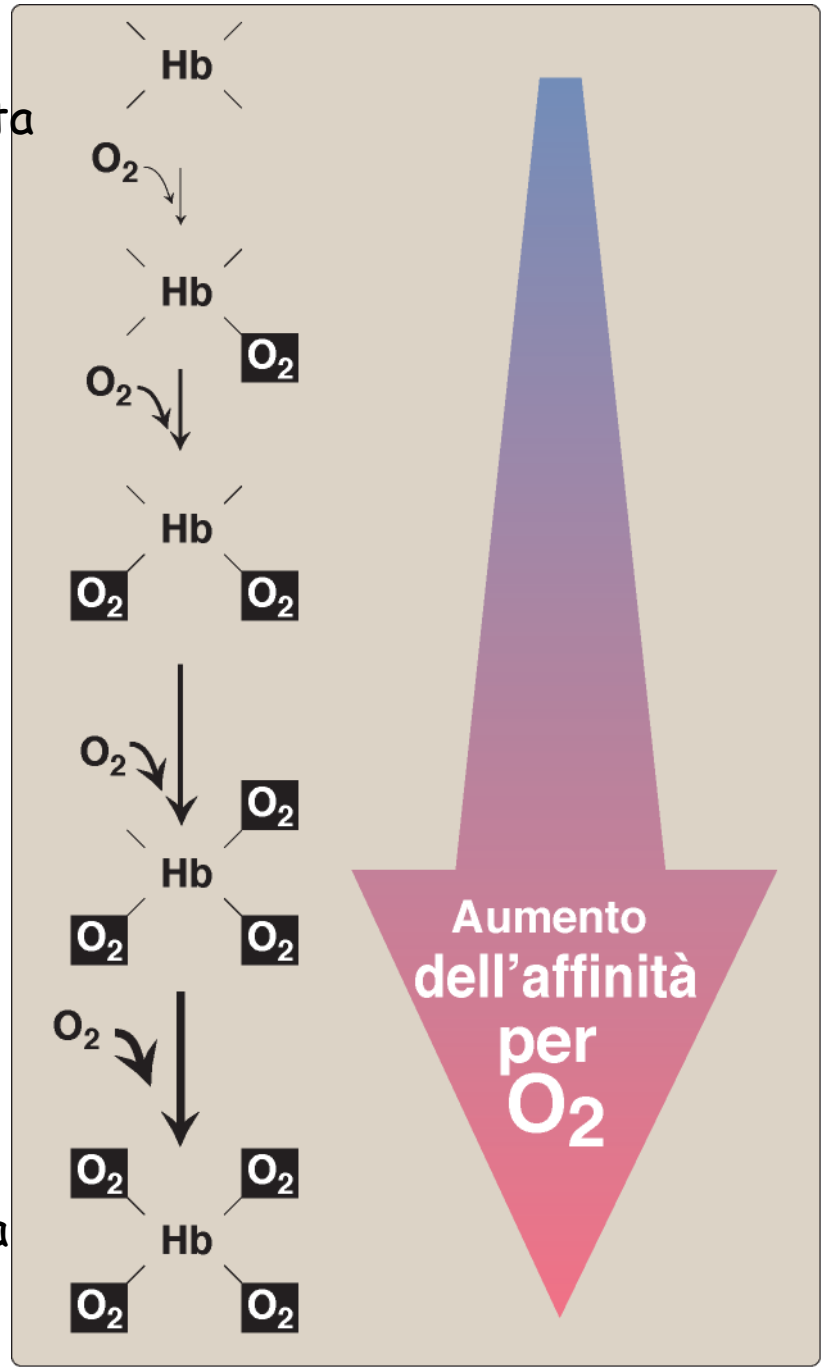
La mioglobina è un ottimo sistema per immagazzinare O_2:
-si lega all'O_2 anche a basse pO_2 e lo lega strettamente.

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

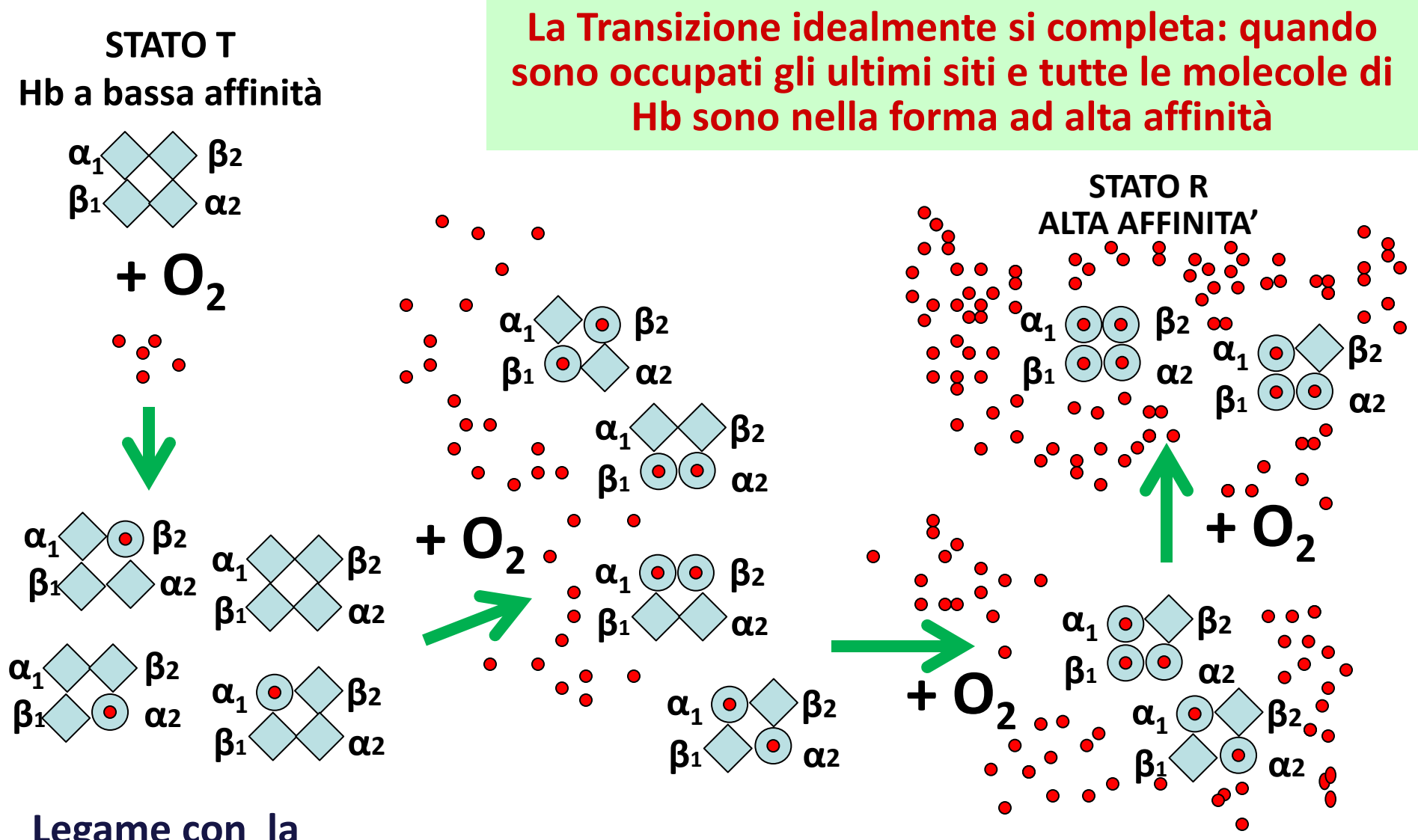
CURVA SIGMOIDALE = LEGAME COOPERATIVO

Il legame dell'ossigeno è <u>cooperativo</u>

EMOGLOBINA si lega all'O2 con affinità crescente

$Hb + 4\ O_2 = Hb\ (O_2)_4$

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



Legame con la molecola di O_2 >> cambia la struttura 3^{aria} della subunità legata

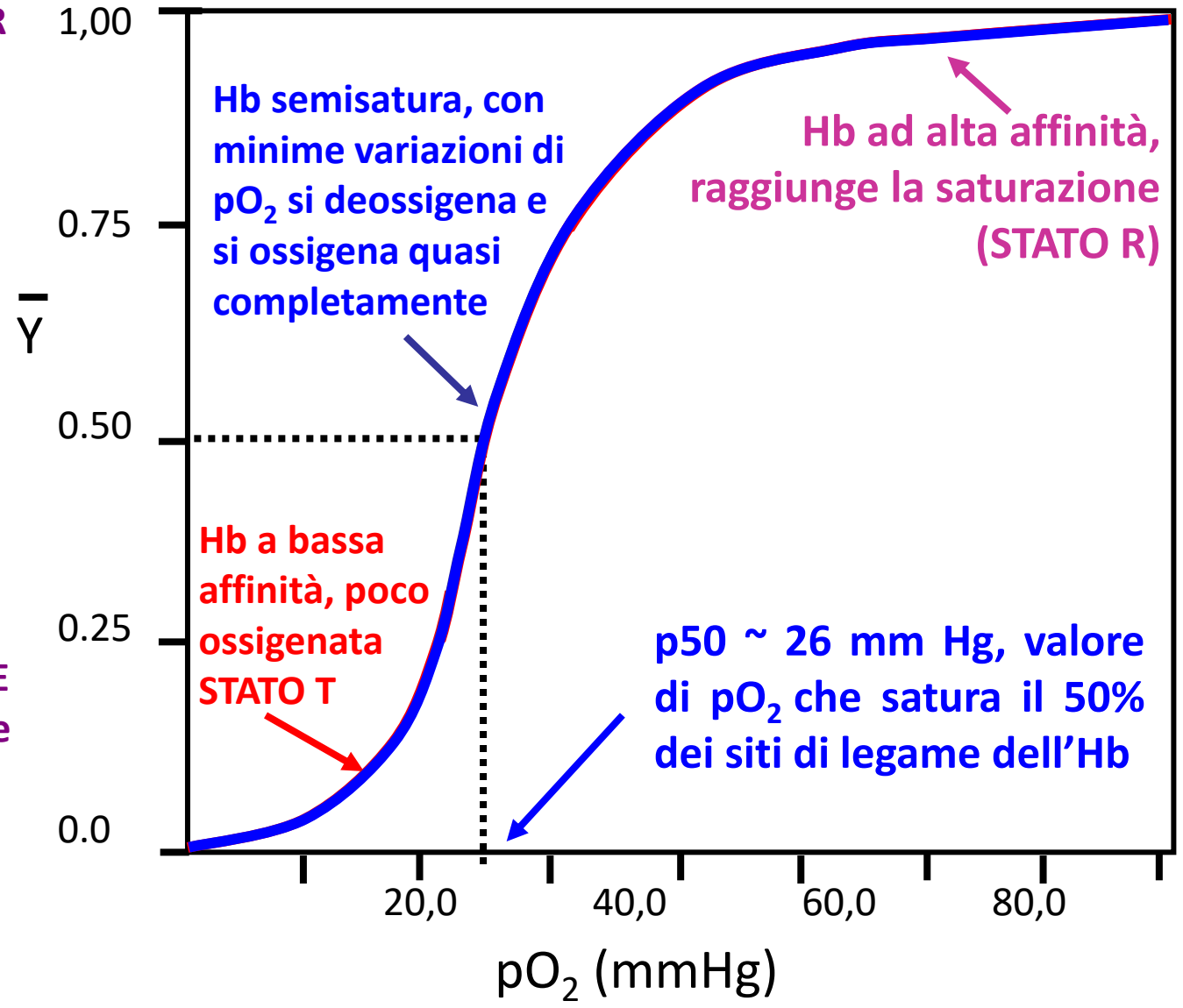
CON LA PARZIALE OSSIGENAZIONE (almeno un sito occupato dall'O_2 in ciascuno dei 2 dimeri αβ) l'intera proteina modifica la sua struttura 4^{aria} assumendo una struttura piu' disponibile ad accettare altre molecole di O_2 .

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**



Deoxy-Hb (stato T) Oxy-Hb (stato R)

L'Hb passa da una struttura a bassa affinità per l'O_2 (T) ad una struttura ad alta affinità (R) in funzione della concentrazione di O_2 (pO_2).

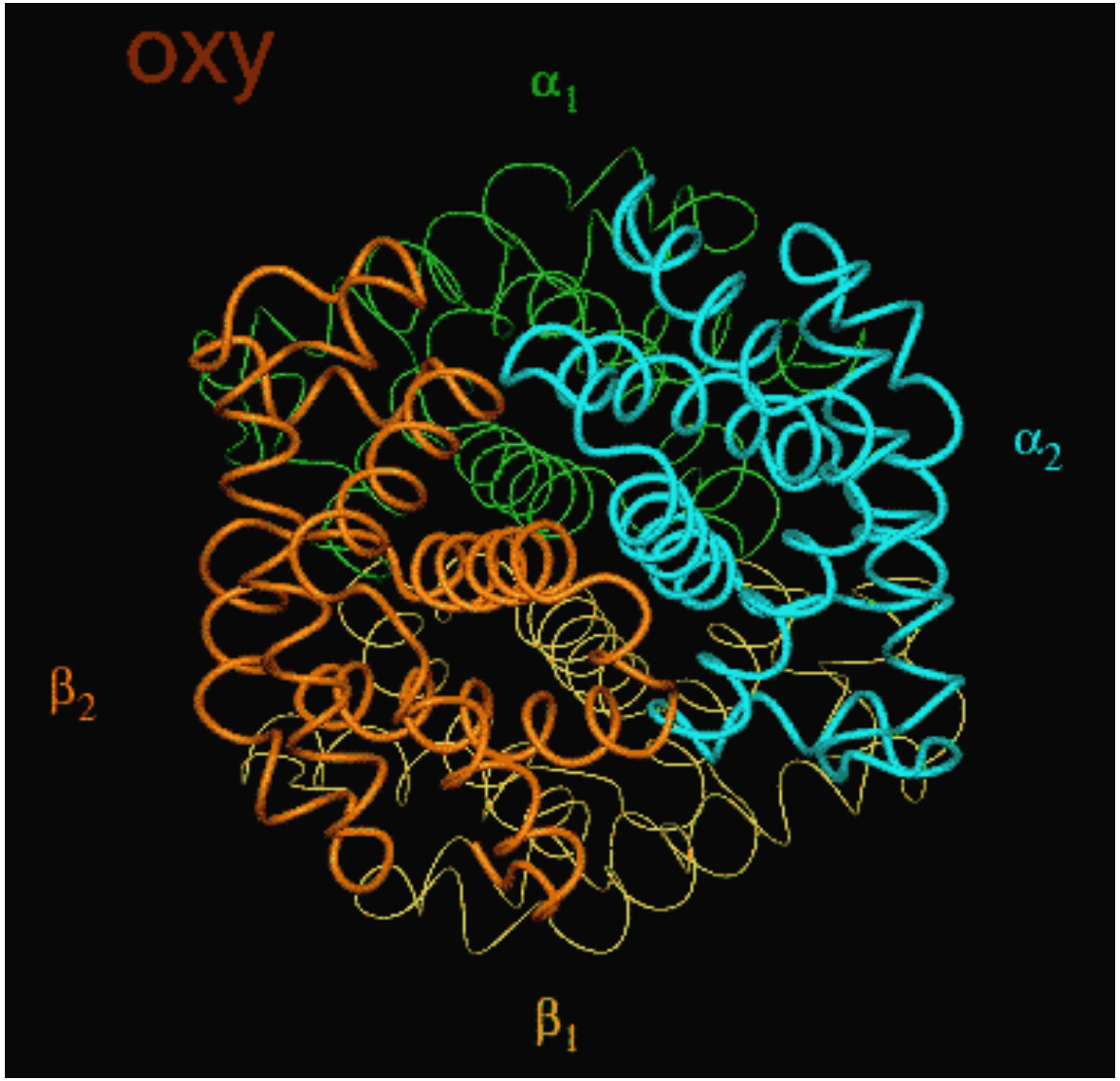
IL LEGAME CON L'O_2 MODIFICA LA STRUTTURA DELLA PROTEINA

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)

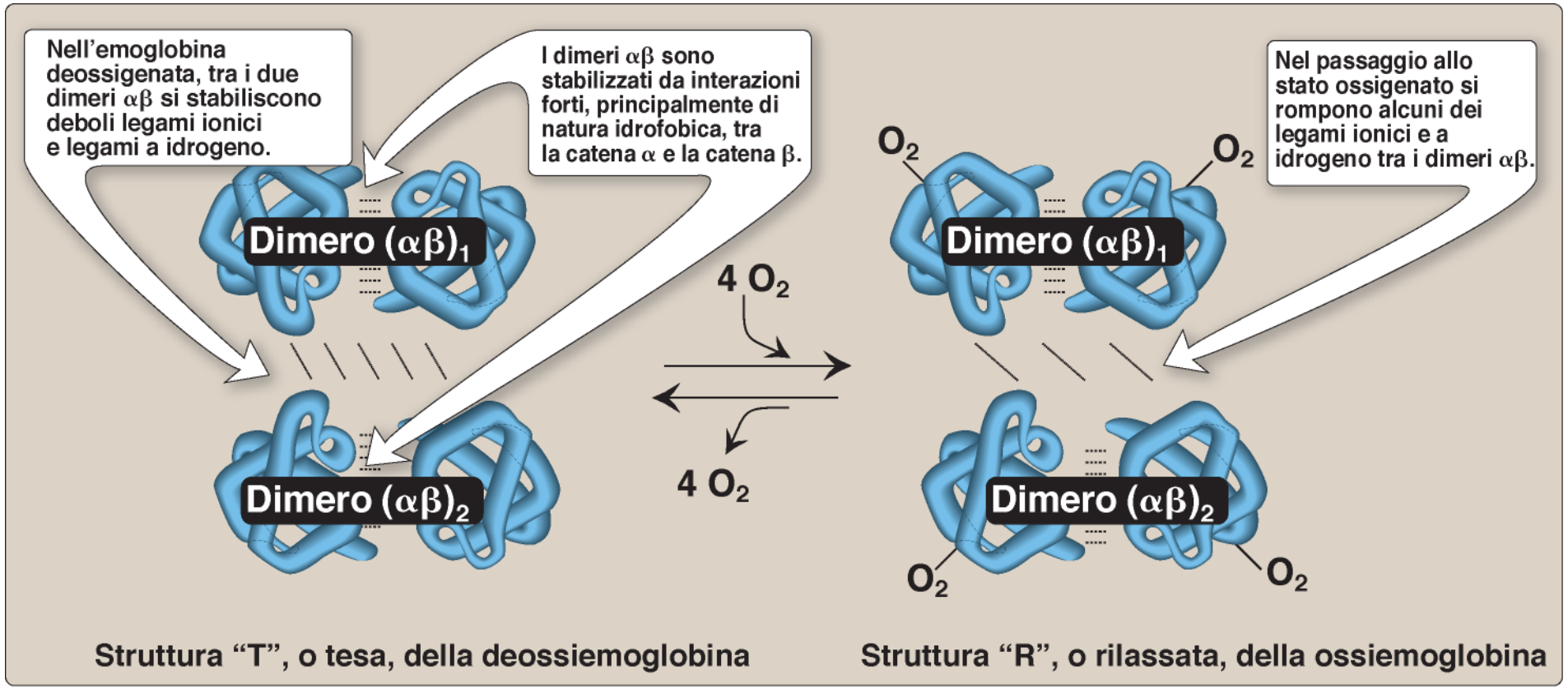
E' un fenomeno per cui le proteine con struttura quaternaria (emoglobina e moltissimi enzimi) possono essere modificate nella disposizione spaziale delle sub-unità costituenti.

L'**emoglobina allosterica** è una proteina 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;



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↔ R?

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

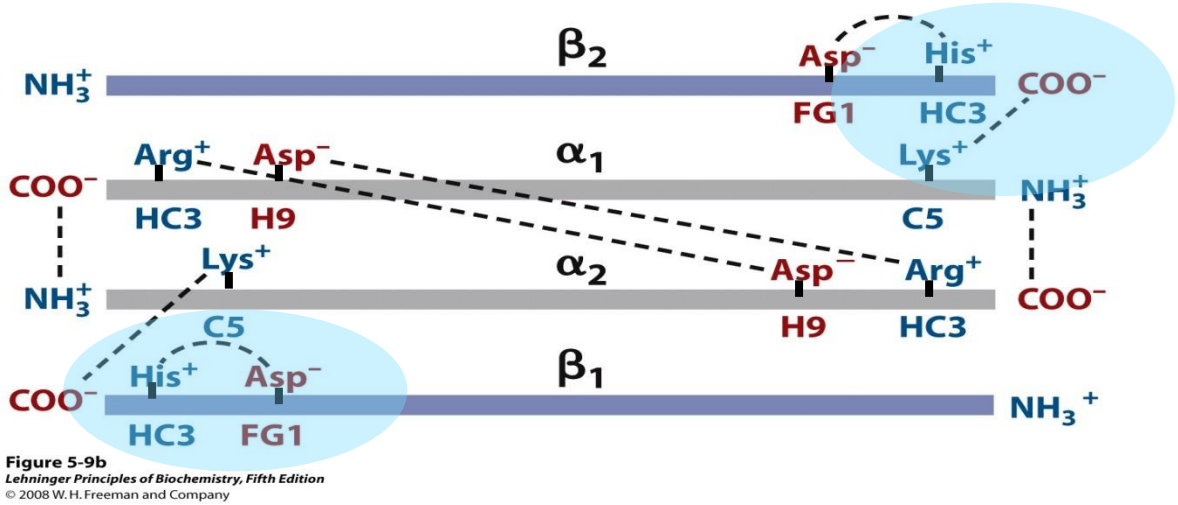
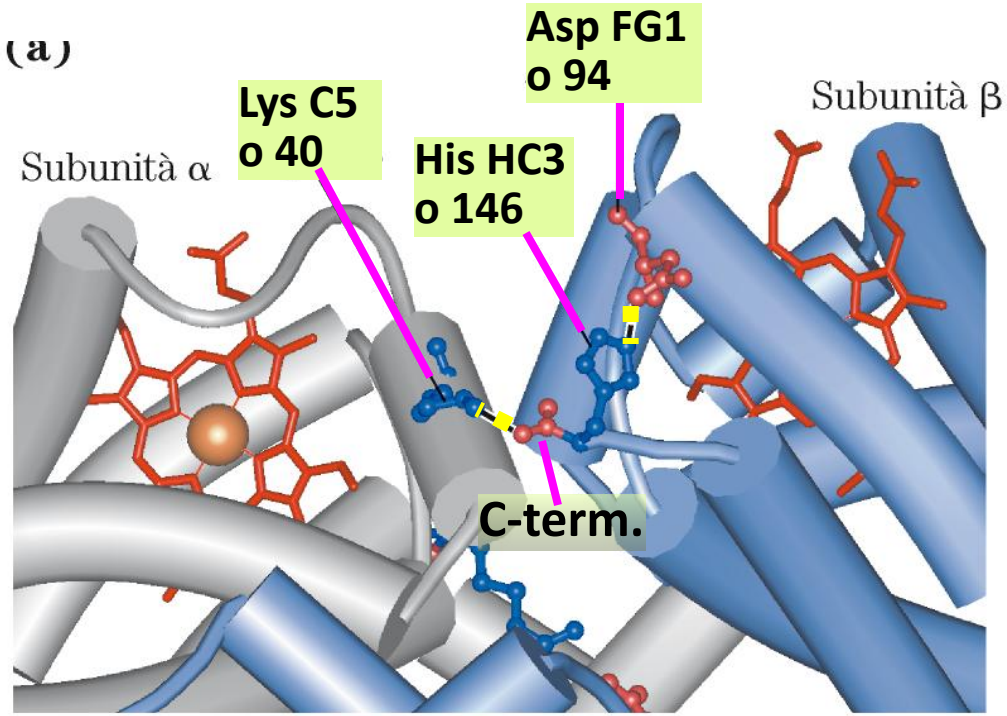


Figure 5-9b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

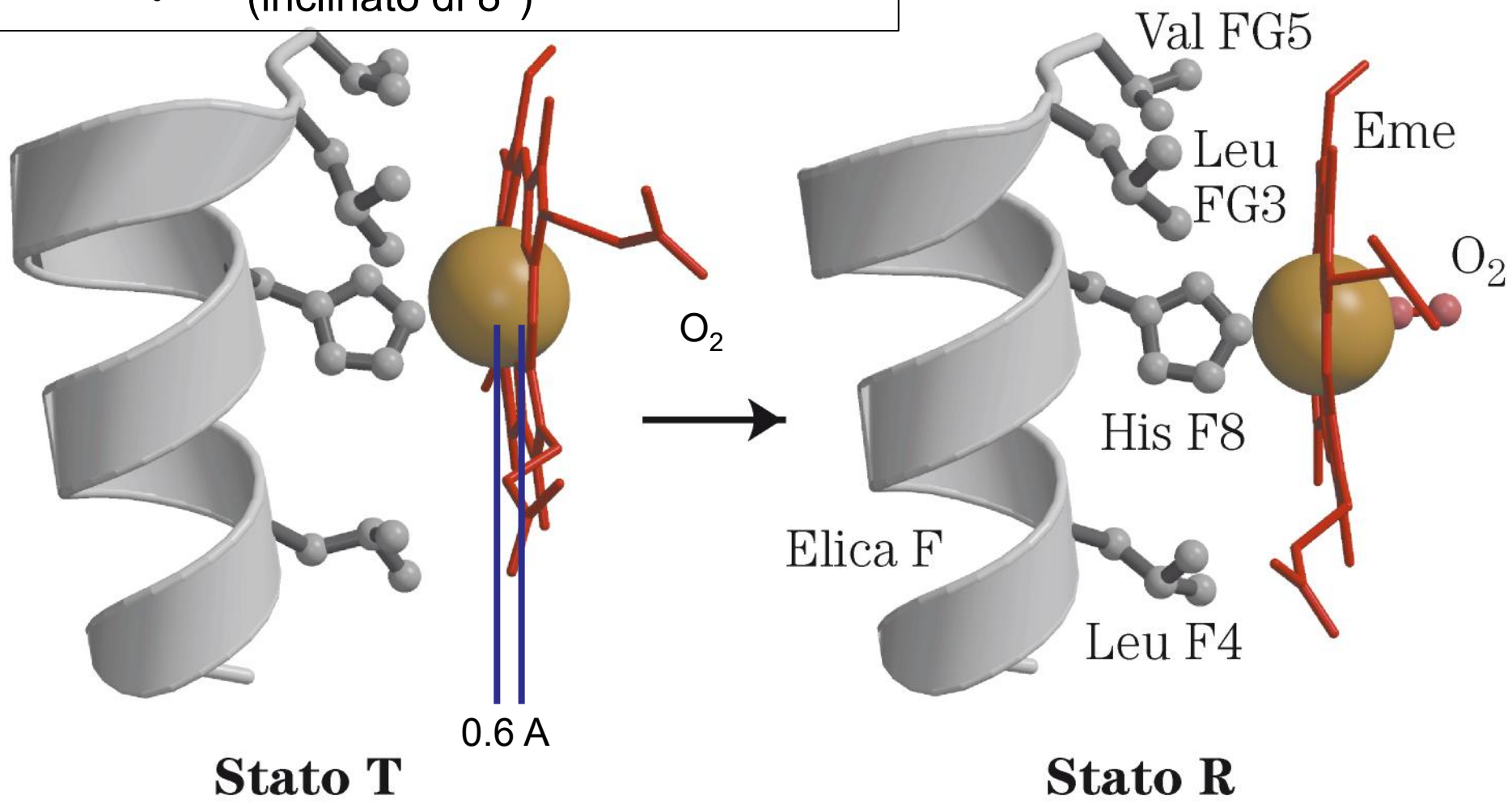
DURANTE LA TRANSIZIONE T>R SI ROMPONO ALCUNI LEGAMI nell'interfaccia α1/β2 e α2/β1:

- **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



Perutz MF

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 e anche della struttura 4 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 O_2 è fortemente influenzato dal **pH e dalla pCO_2**.

Nei tessuti---→ pH è basso (aumentano gli H^+) e la pCO_2 è elevata,

l'affinità di Hb per O_2 diminuisce, -> O_2 viene liberato

H^+ e CO_2 si legano all'**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:

$$Hb(O_2)_4 + H^+ = HbH^+ + 4O_2$$

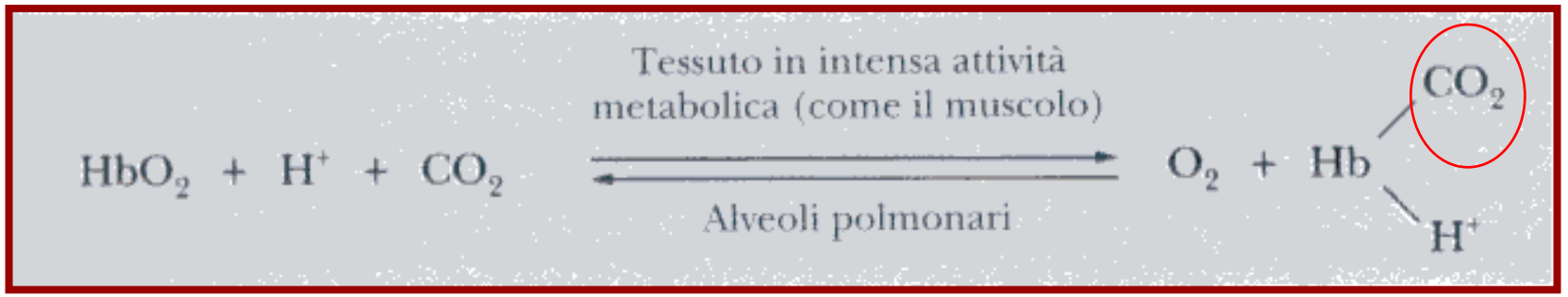
L'effetto del pH e della CO_2 sull'affinità di Hb per O_2 è denominato

Effetto Bohr:

$$Hb(O_2)_4 + H^+ = HbH^+ + 4O_2$$

Nei tessuti l'Hb rilascia O_2,
-basse pO_2
- 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 CO_2, l'Hb cede più facilmente l'O_2 e lega gli H^+ e la CO_2.

Nei polmoni avviene esattamente il contrario.

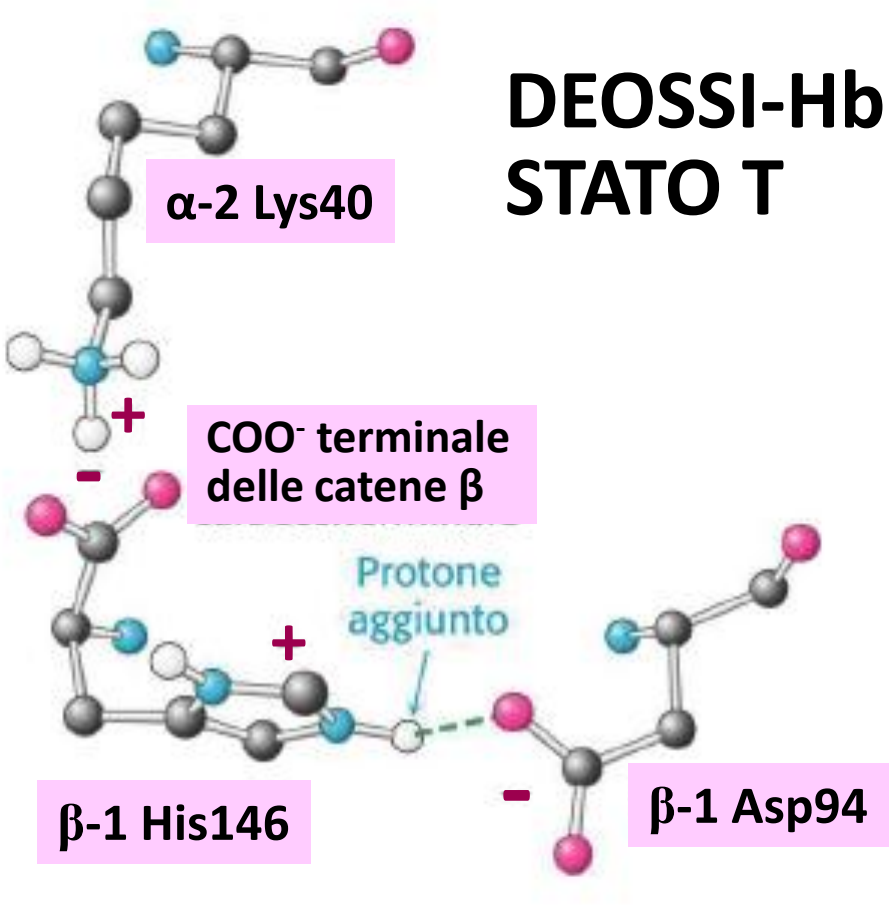
COME SPIEGARE IL MECCANISMO DELL'EFFETTO BOHR?

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.



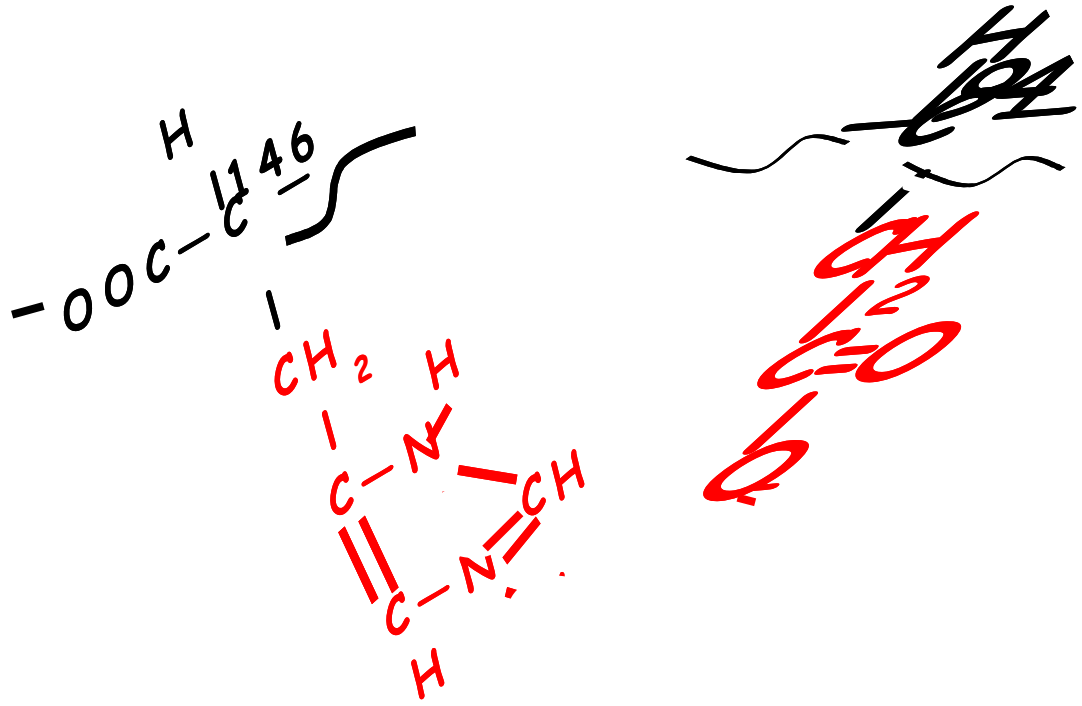
DEOSSI-Hb STATO T

Quando l'Hb inzia 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)

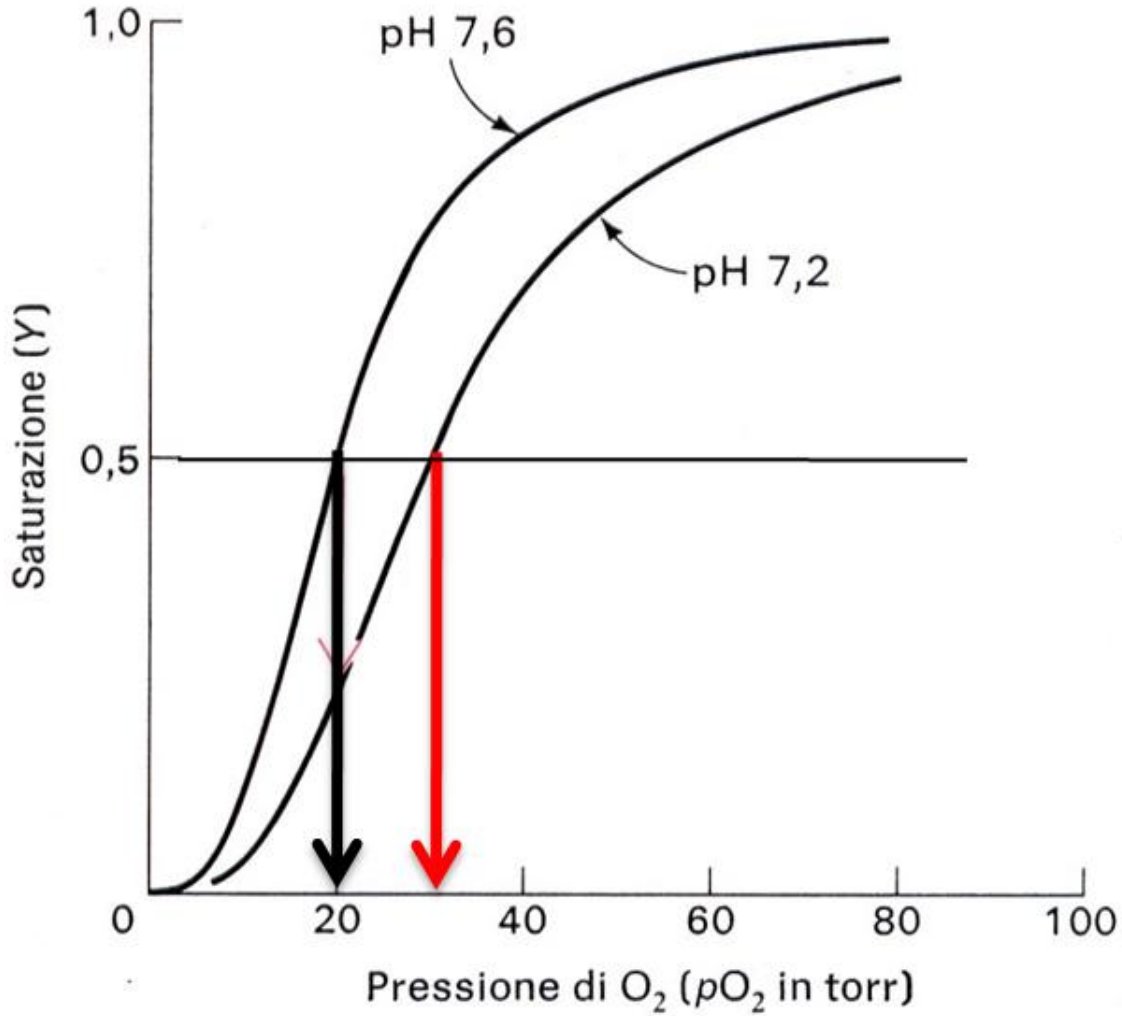
A livello polmonare l'Hb inizia a legare O_2: inizia la transizione allosterica (T > R), l'His-146 delle catene β diventa più acida, il suo pK_R diminuisce (~6.5)

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)


1,0
0,5
0
pH 7,6
pH 7,2
Saturazione (Y)
20
40
60
80
100
Pressione di O_2 (pO_2 in torr)

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

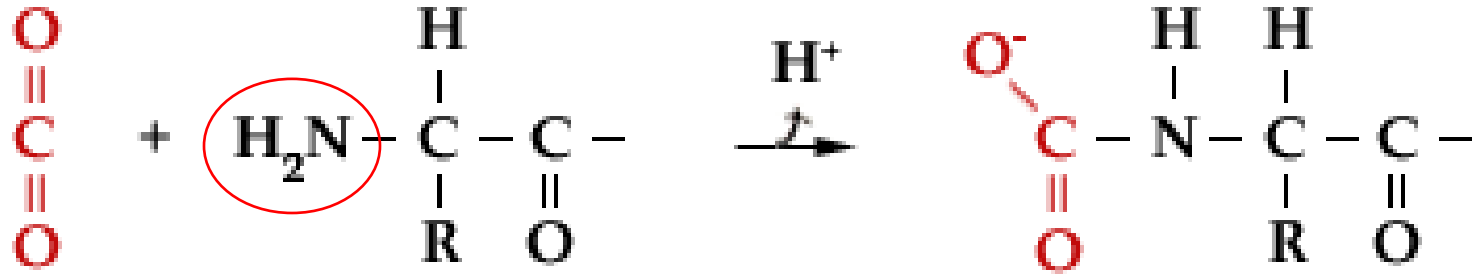
1) disciolta: segue la Legge di Henry come l'O_2 ma è 20 volte più solubile di questo. In questa forma costituisce il 10% del gas liberato dal sangue venoso nel polmone.

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

P. Champe, R. Harvey, D. R. Ferrier, LE BASI DELLA BIOCHIMICA, Zanichelli
Editore S.p.A. Copyright © 2006

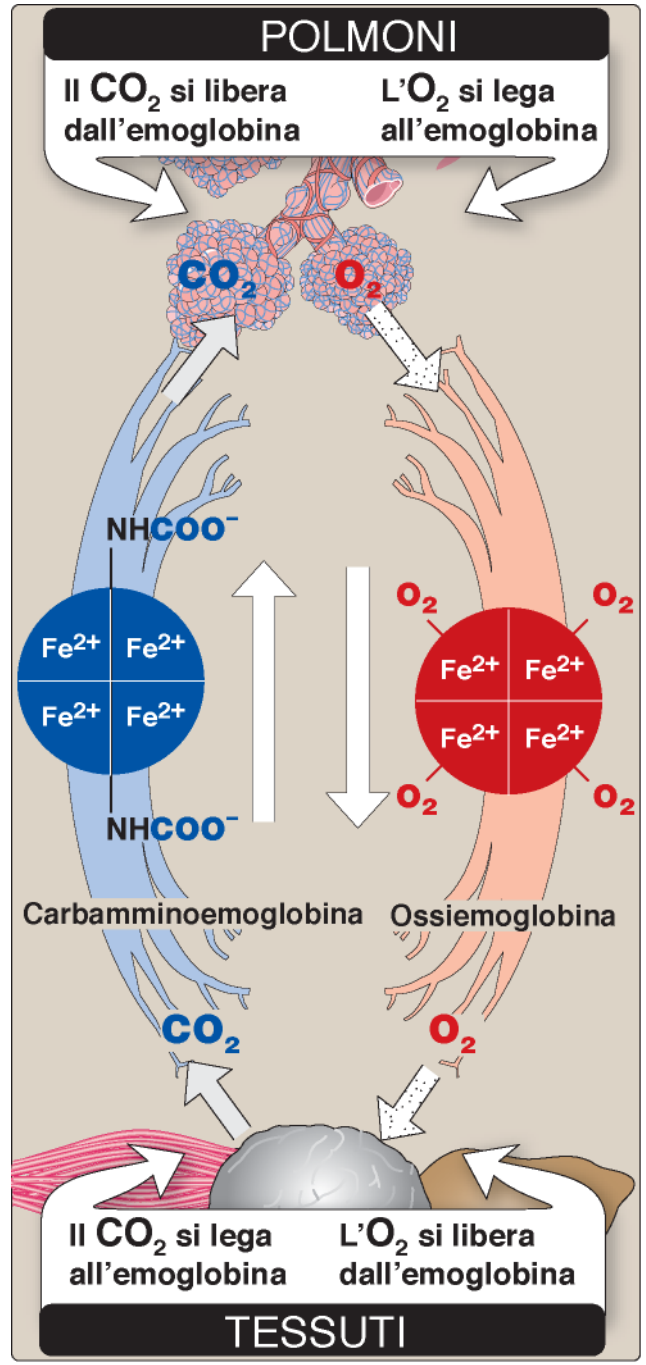
2) Parte della CO_2 si lega all'Hb nelle estremità N-terminali libere delle catene globiniche formando CARBAMMATI

gruppi carichi negativamente che stabiliscono interazioni elettrostatiche con i residui carichi positivamente stabilizzando la forma T



P. Champe, R. Harvey, D. R. Ferrier, LE BASI DELLA BIOCHIMICA, Zanichelli

Editore S.p.A. Copyright © 2006


POLMONI
Il CO_2 si libera dall'emoglobina
L'O_2 si lega all'emoglobina
CO_2
O_2
$NHCOO^-$
Fe^{2+}
$NHCOO^-$
O_2
Carbamminoemoglobina
Ossiemoglobina
CO_2
O_2
Il CO_2 si lega all'emoglobina
L'O_2 si libera dall'emoglobina
TESSUTI

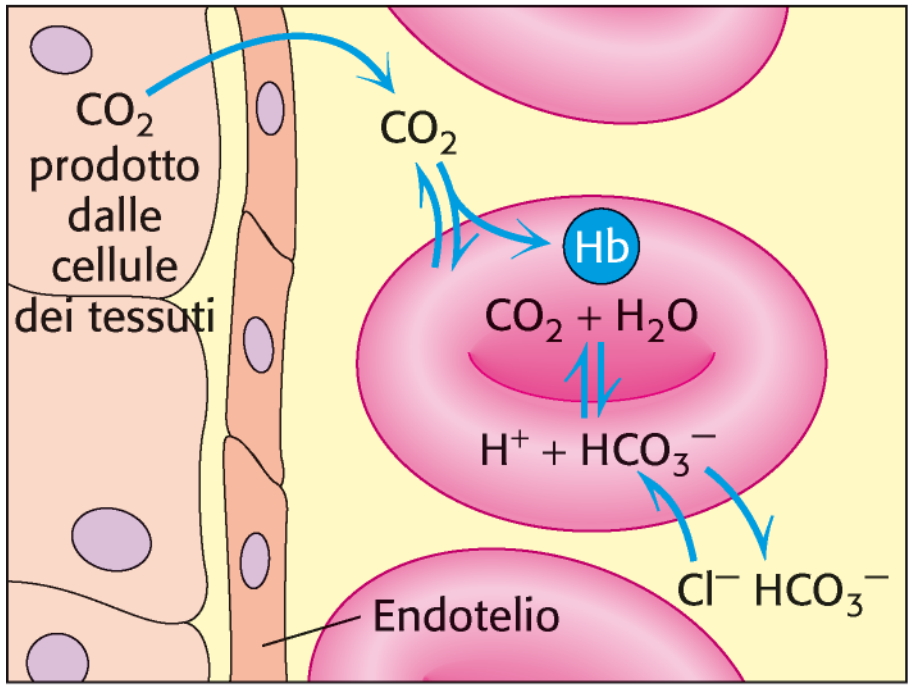
La maggior parte della CO_2 che diffonde nelle emazie reagisce con l'H_2O formando H_2CO_3, grazie alla presenza di un enzima, l'anidrasi carbonica (P.M. 30000, contiene Zn)

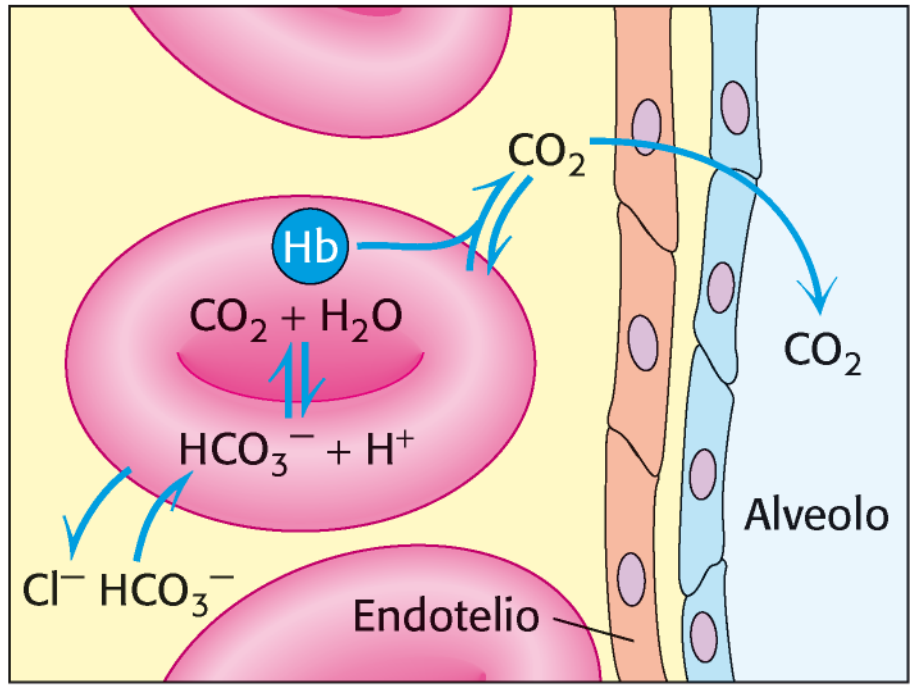
$$CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow H^+ + HCO_3^-$$

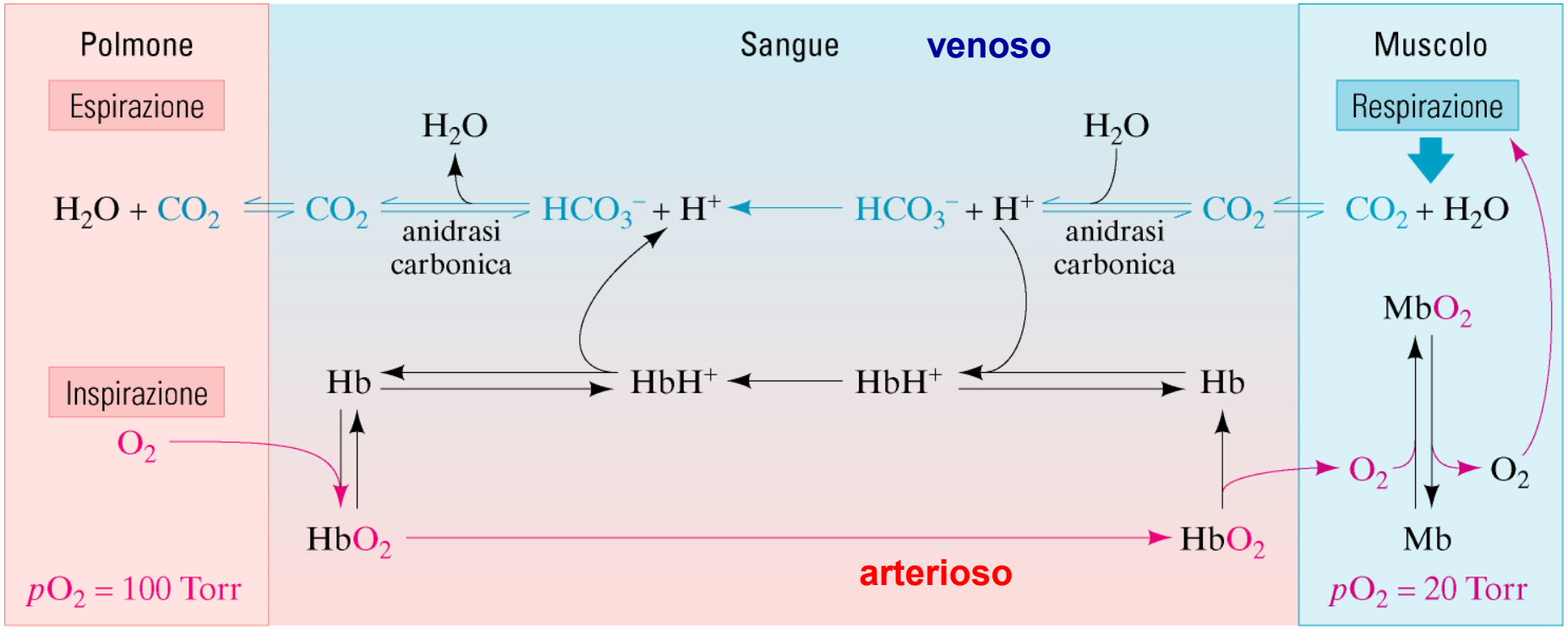
H^+ HCO_3^-

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

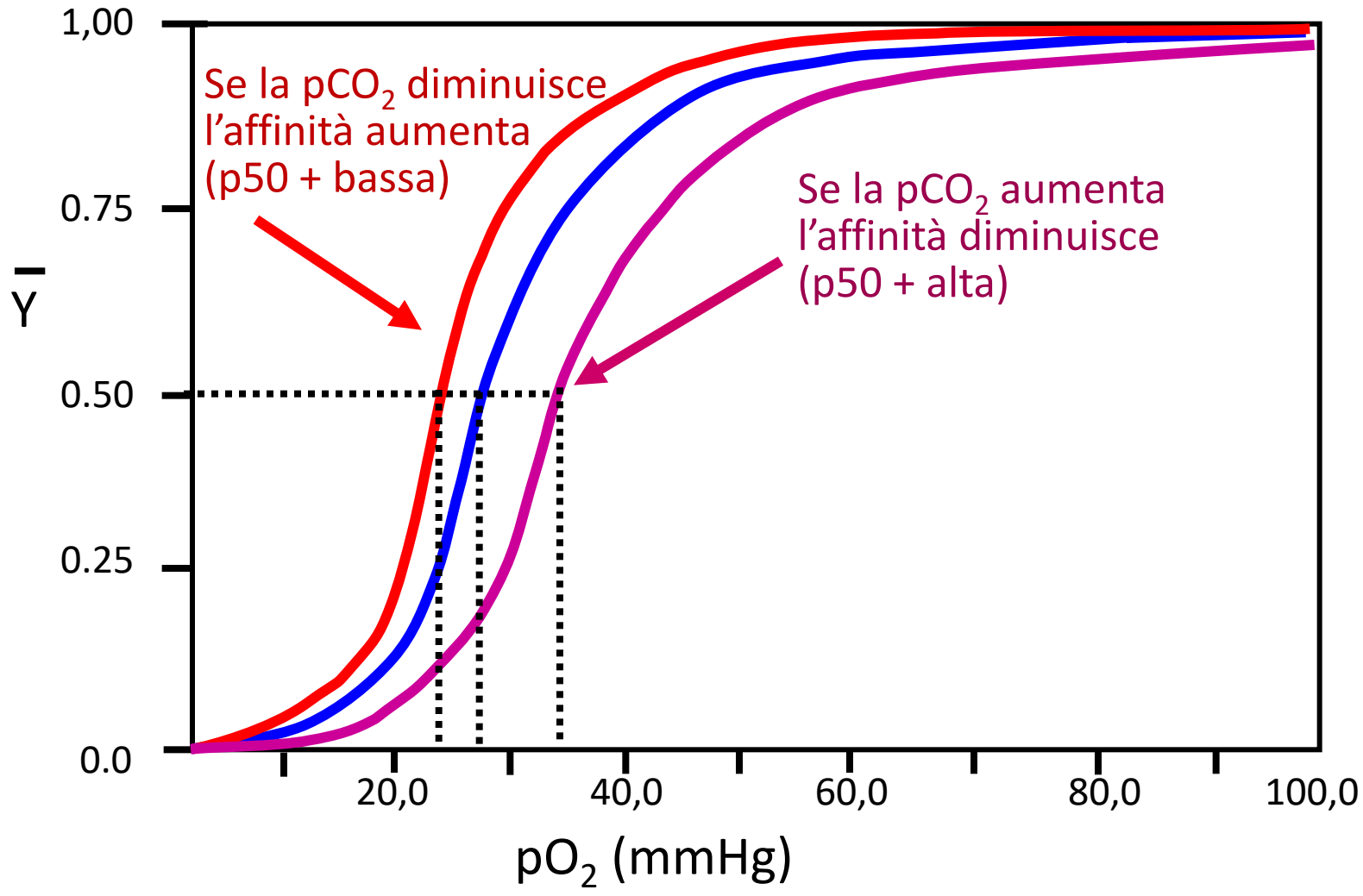
passano dal globulo rosso al plasma attraverso una proteina di membrana

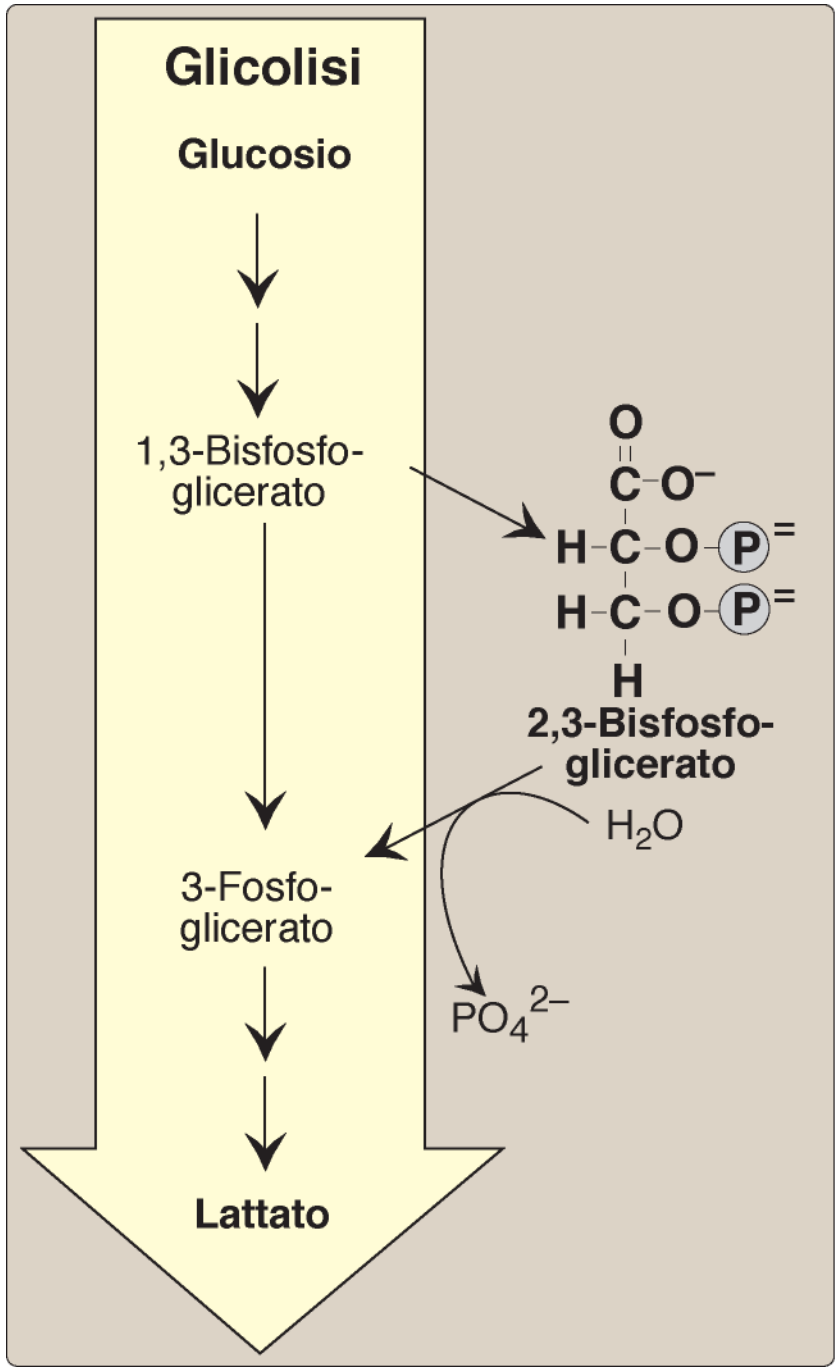

CO_2 prodotto dalle cellule dei tessuti
CO_2
Hb
$CO_2 + H_2O$
$H^+ + HCO_3^-$
Cl^- HCO_3^-
Endotelio
Tessuto
Capillare sanguigno


CO_2
Hb
$CO_2 + H_2O$
$HCO_3^- + H^+$
Cl^- HCO_3^-
Endotelio
CO_2
Alveolo
Capillare sanguigno
Polmone


Polmone
Espirazione
Inspirazione
O_2
$pO_2 = 100$ Torr
Sangue
venoso
arterioso
$H_2O + CO_2$
CO_2
H_2O
anidrasi carbonica
$HCO_3^- + H^+$
Hb
HbH^+
HbO_2
Muscolo
Respirazione
$CO_2 + H_2O$
MbO_2
Mb
$pO_2 = 20$ Torr

CO_2 → 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

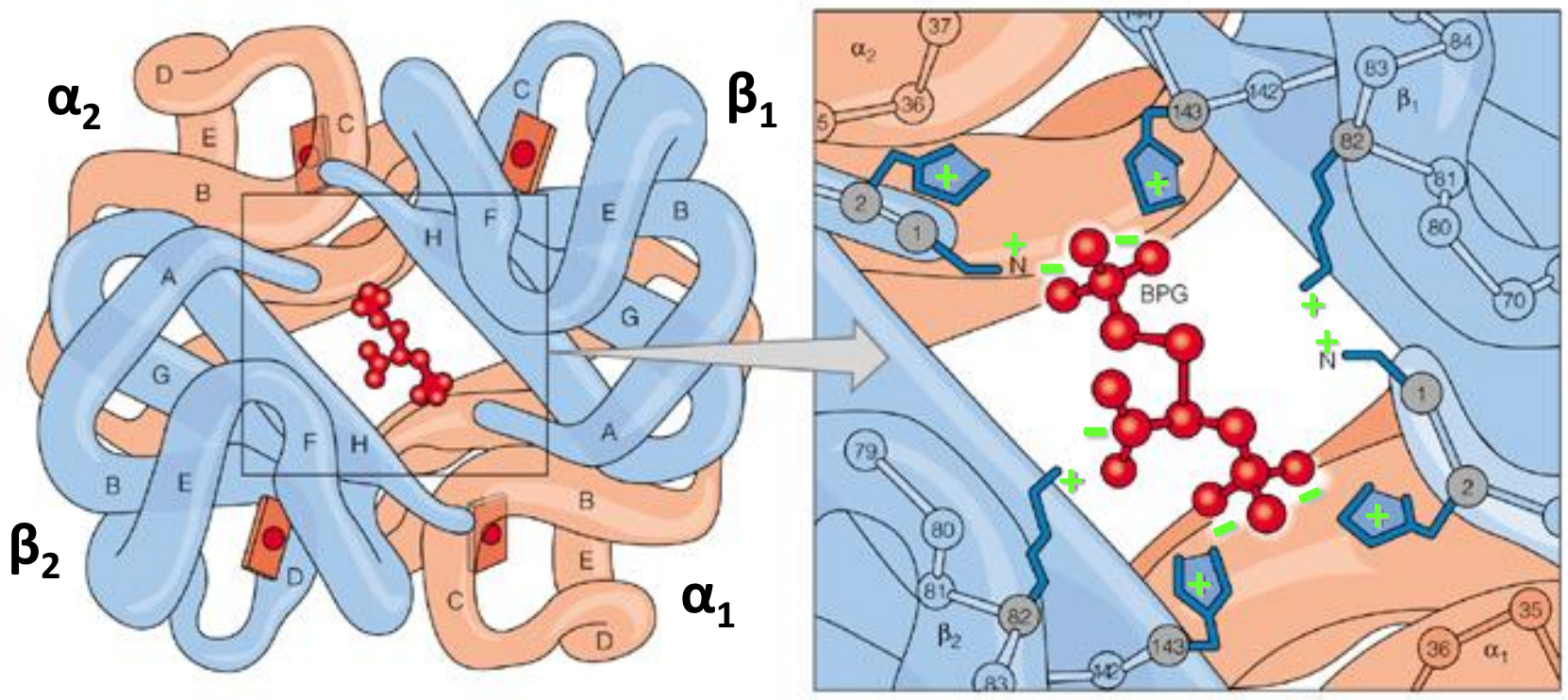
Il 2,3-BPG ha interazioni elettrostatiche con gruppi carichi positivamente che sporgono nella cavità centrale della DEOSSI-Hb:

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

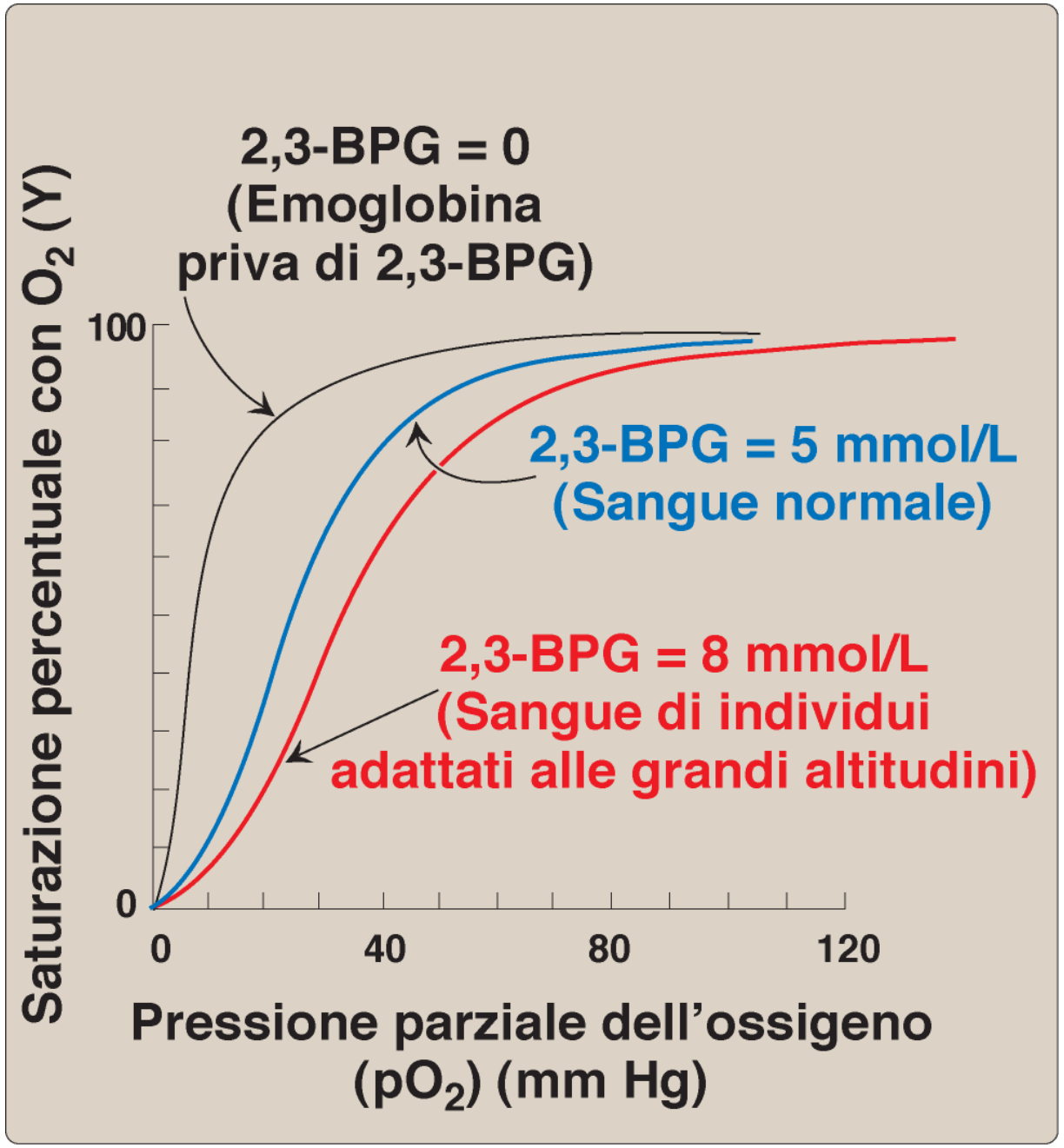
} **delle 2 catene β**

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

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

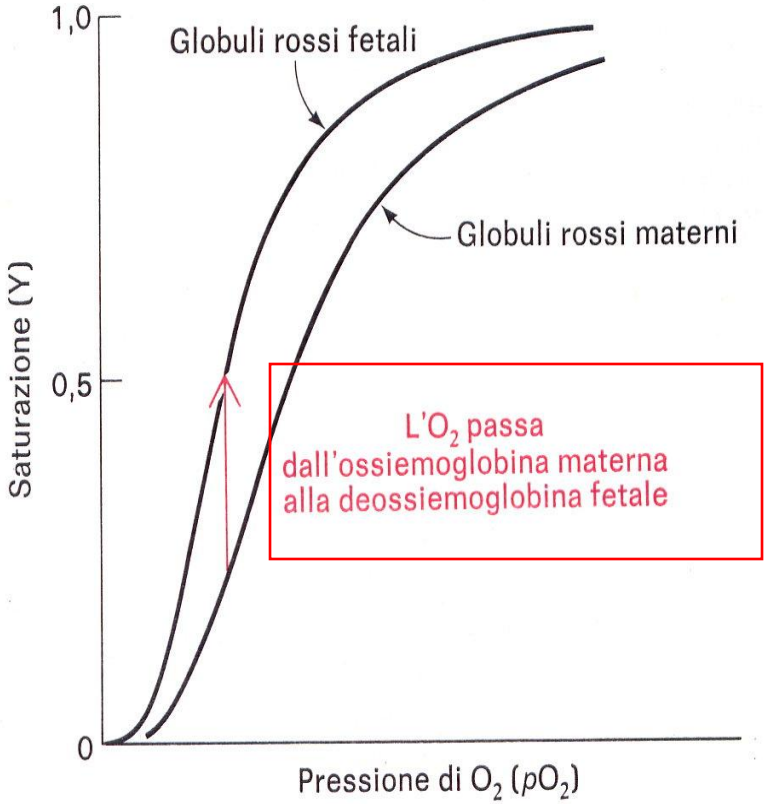


Quando l'Hb lega la prima molecola di O_2 si innesca il cambiamento conformazionale che distrugge i ponti salini, la cavità centrale si restringe e il 2,3-BPG viene espulso.



P. Champe, R. Harvey, D. R. Ferrier, LE BASI DELLA
BIOCHIMICA, Zanichelli Editore S.p.A. Copyright © 2006

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.

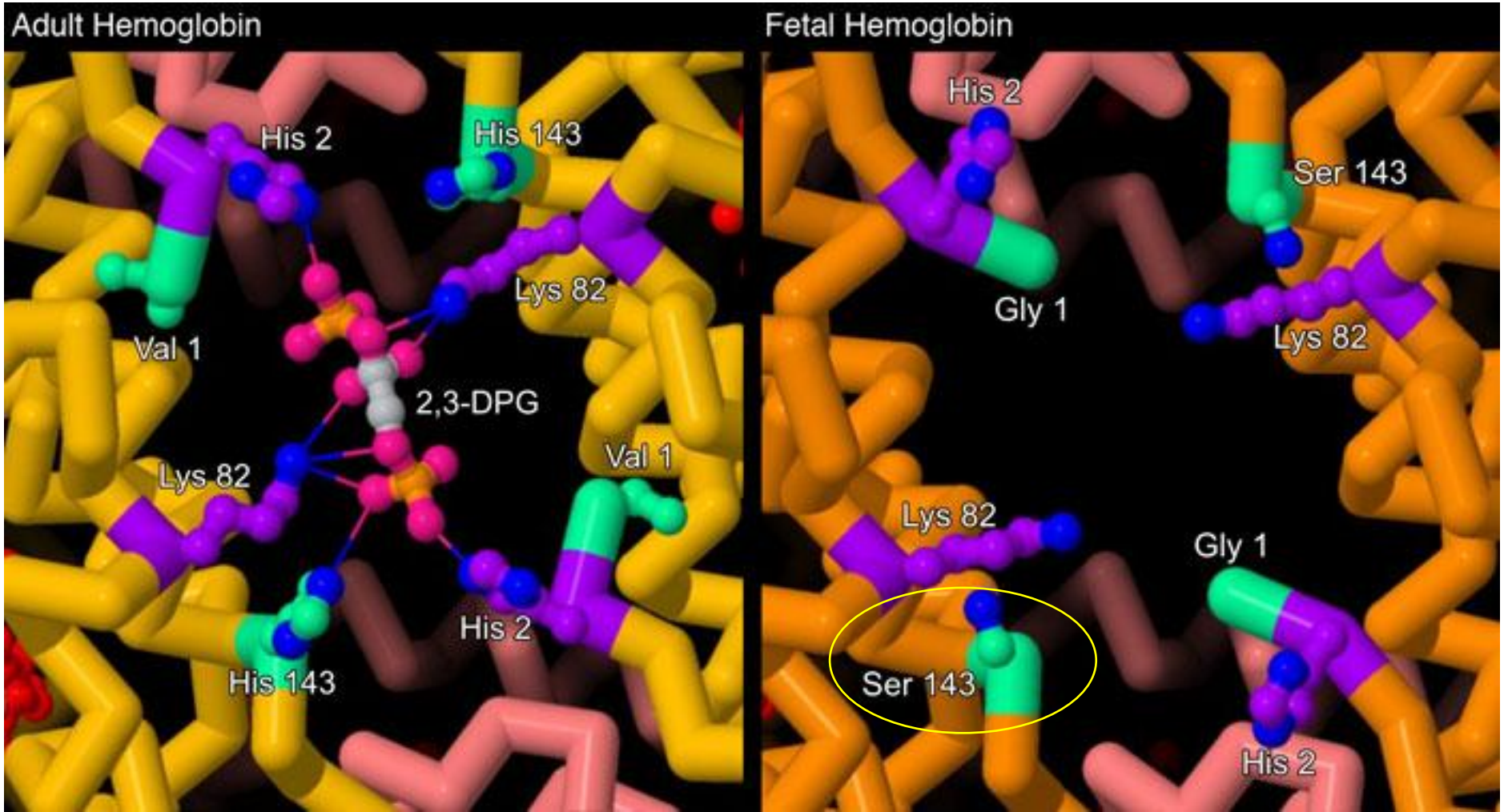
Il sangue fetale contiene un'emoglobina con struttura quaternaria **α2 γ2**

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 la 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	CATENE GAMMA
➢ NH_3^+ N-terminale Val-1	NH_3^+ N-terminale Gly-1
➢ Lys-82	Lys-82
➢ His-143	Ser-143
➢ His-2	His-2



Adattamento alle elevate altitudini

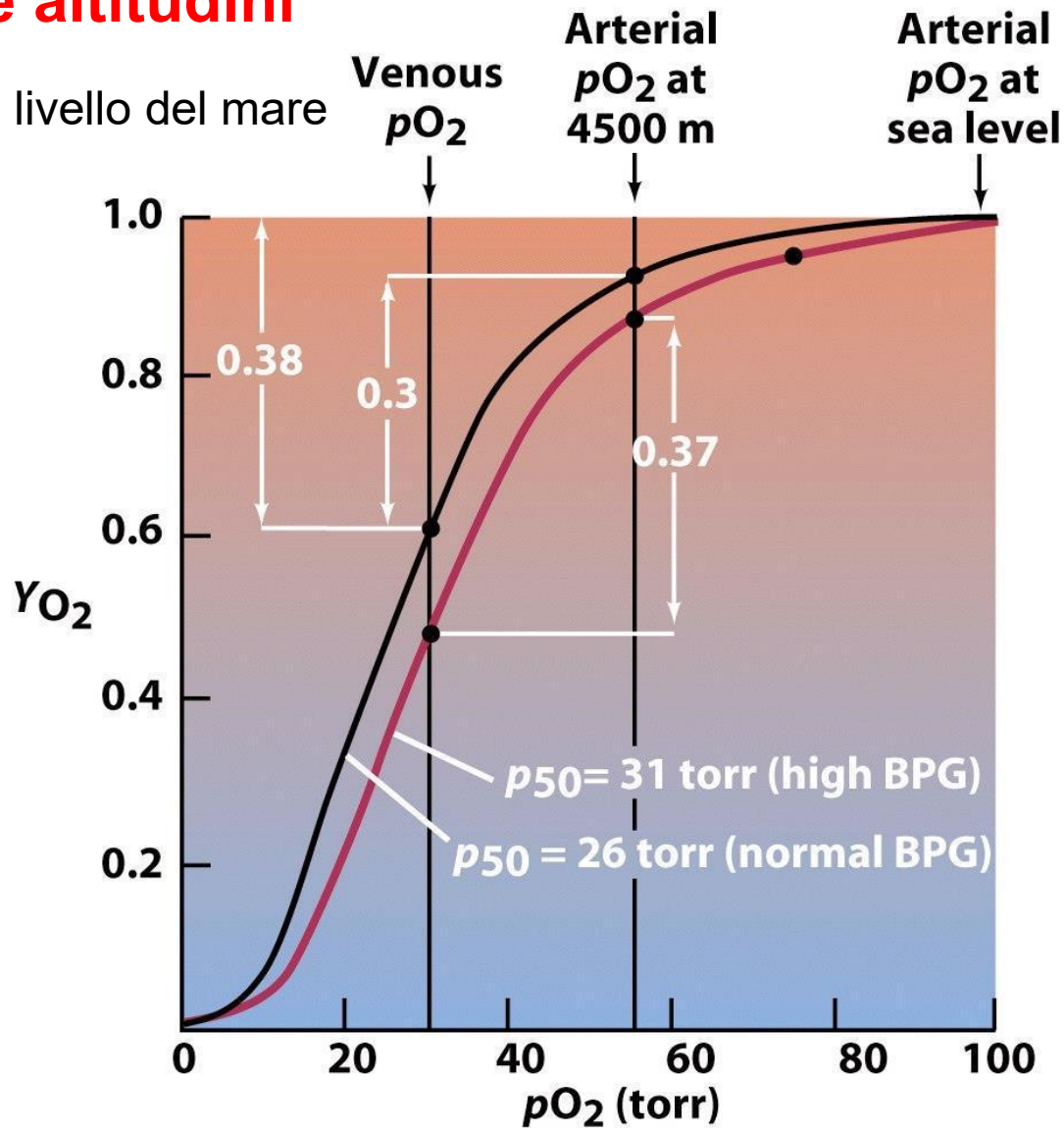
A 3000m pO2 solo 70 % rispetto al livello del mare

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'O_2 (aumenta la p50)

>> aumenta il rilascio di O_2 ai tessuti che altrimenti non sarebbero sufficientemente ossigenati



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

P. Champe, R. Harvey, D. R. Ferrier, LE BASI DELLA BIOCHIMICA, Zanichelli

Editore S.p.A. Copyright © 2006

Emoglobinopatie

- Alterazioni strutturali

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

Difetti quantitativi

(α- e β-talassemie)

P. Champe, R. Harvey, D. R. Ferrier, LE BASI DELLA BIOCHIMICA, Zanichelli Editore S.p.A. Copyright © 2006

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

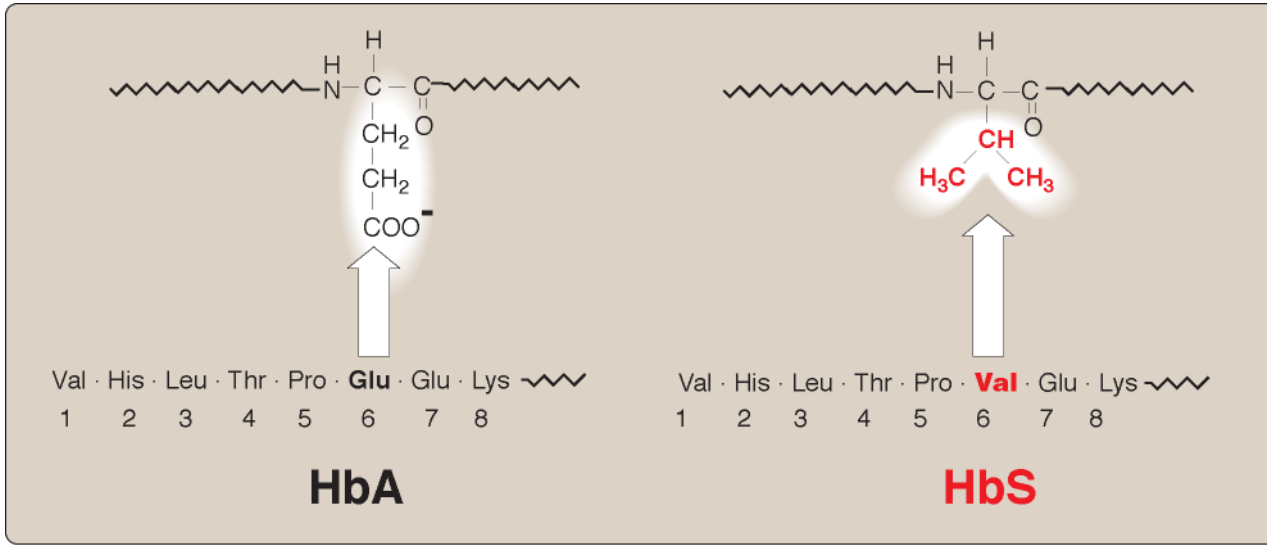
ca il 5% della popolazione mondiale possiede almeno una variante emoglobinica

HbS

- alta incidenza nelle zone tropicali

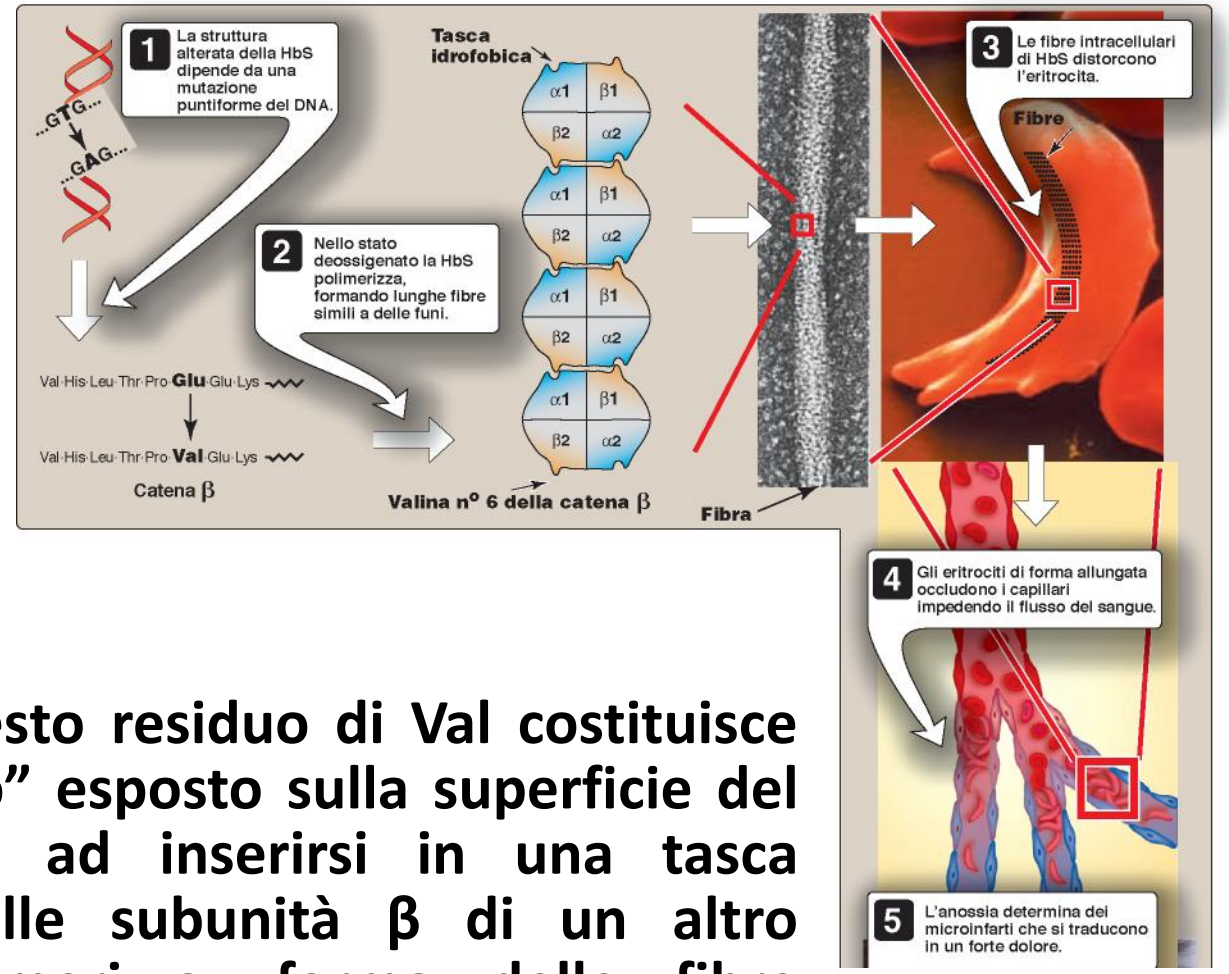
ANEMIA FALCIFORME ("SICKLE CELLS DISEASE"): Anemia falciforme

Mutazione puntiforme nel gene della catena β



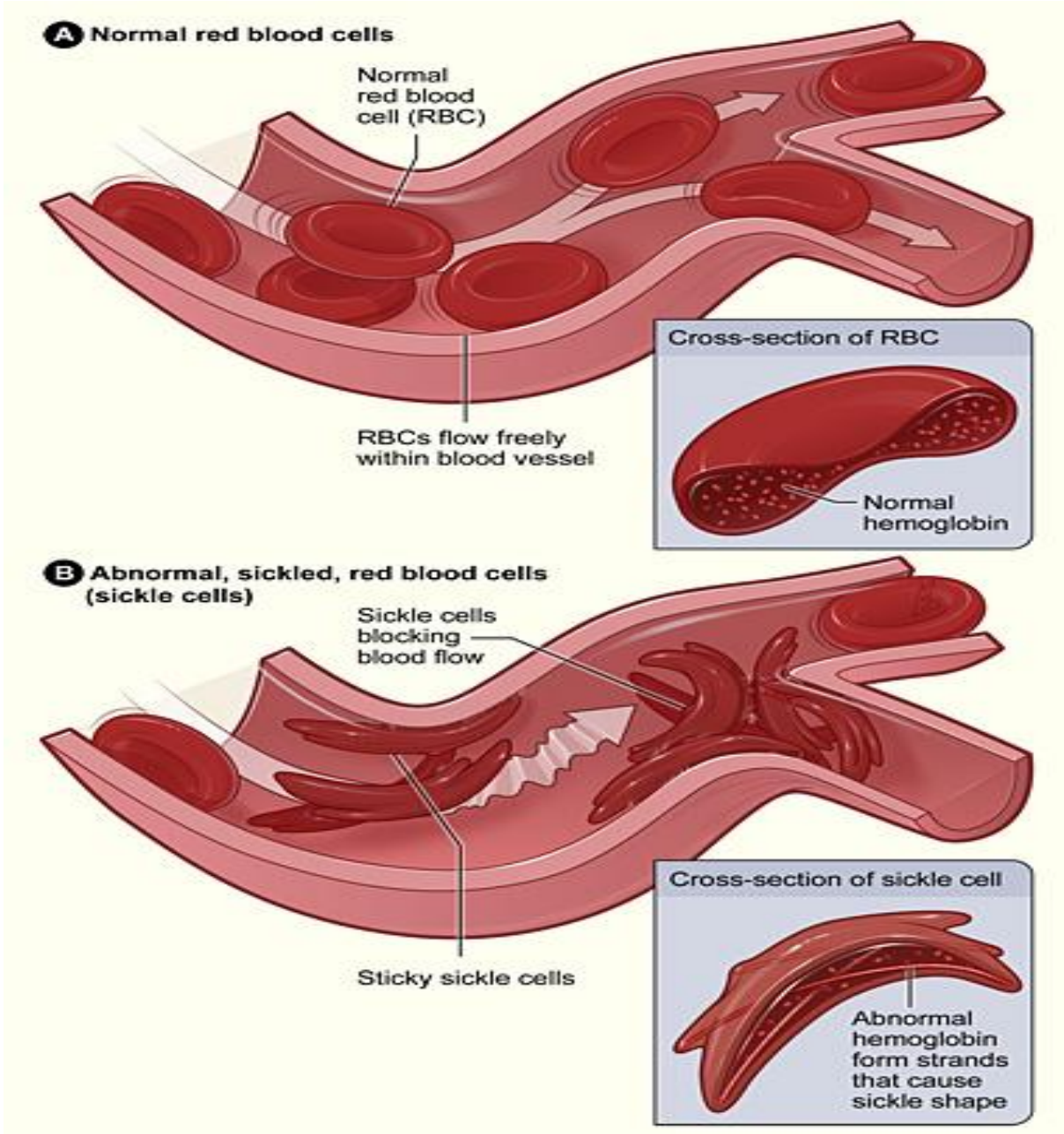


Nell'anemia falciforme viene prodotta una variante emoglobinica chiamata Hb-S nella quale il residuo di Glu in posizione 6 delle catene β è sostituito da un residuo di Val.

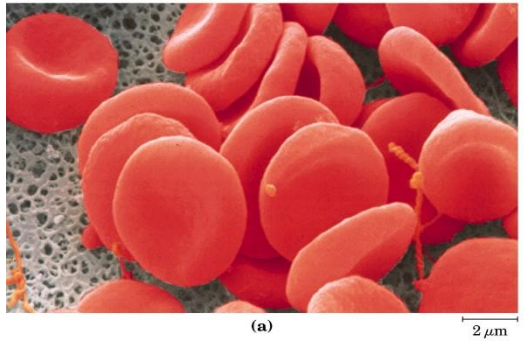


Nella Deossi-Hb-S questo residuo di Val costituisce un "punto appiccicoso" esposto sulla superficie del tetramero, infatti va ad inserirsi in una tasca idrofobica situata nelle subunità β di un altro tetramero: l'Hb polimerizza, forma delle fibre insolubili




A Normal red blood cells
Normal red blood cell (RBC)
RBCs flow freely within blood vessel
Cross-section of RBC
Normal hemoglobin
B Abnormal, sickled, red blood cells (sickle cells)
Sickle cells blocking blood flow
Sticky sickle cells
Cross-section of sickle cell
Abnormal hemoglobin form strands that cause sickle shape

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 an che con un'alta incidenza di una malattia parassitaria (malaria) trasmessa da una zanzara tropicale (Anopheles).

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)

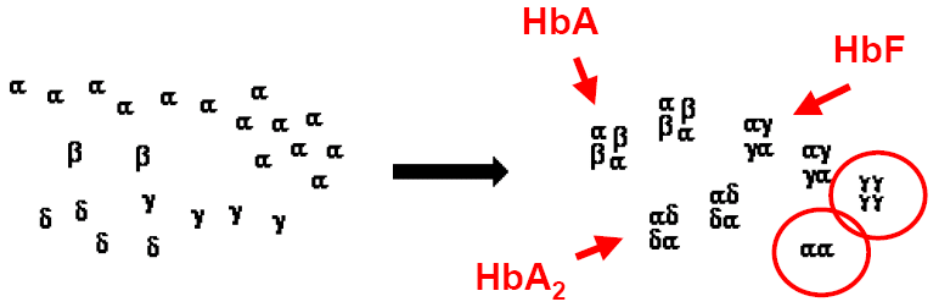
- Nessuna sintesi delle catene globiniche β

2) Talassemia intermedia

- ridotta sintesi delle catene globiniche β

Mancata sintesi dell'HbA

Le catene α in eccesso precipitano



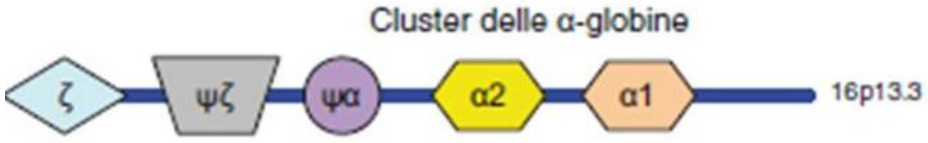
P. Champe, R.
DELLA BIOC

S.p.A. Copyright © 2006

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



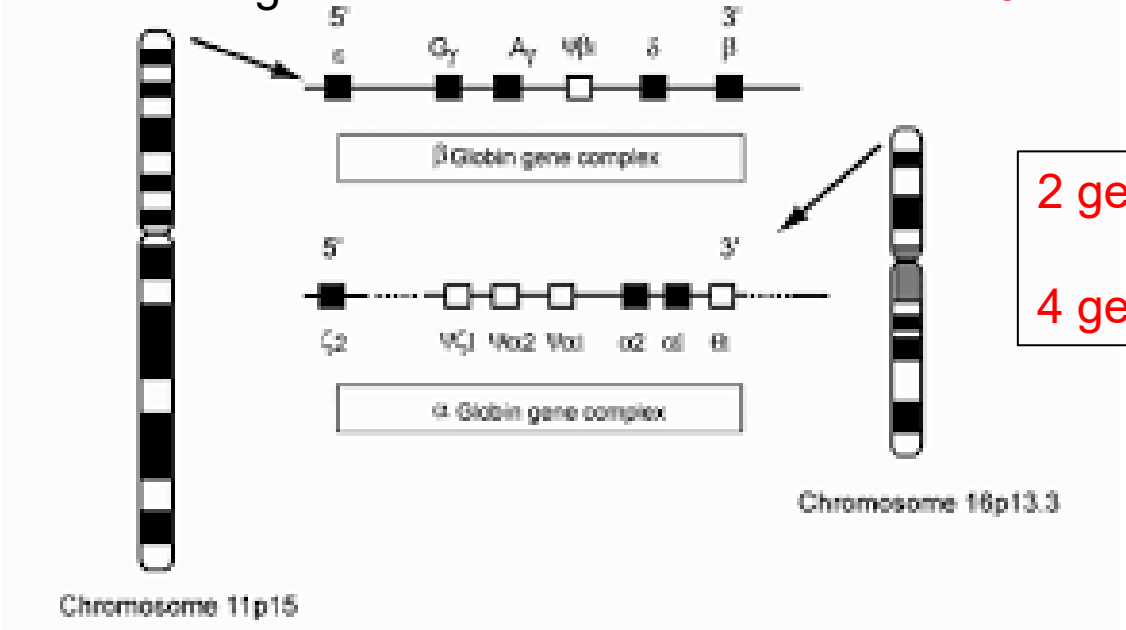
1 gene per le beta



2 geni per le alfa

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)



2 gene per le beta

4 geni per le alfa

P. Champe, R. Harvey, D. R. Ferrier, LE BASI DELLA BIOCHIMICA, Zanichelli Editore S.p.A. Copyright © 2006

P. Champe, R. Harvey, D. R. Ferrier, LE BASI DELLA BIOCHIMICA, Zanichelli Editore S.p.A. Copyright © 2006

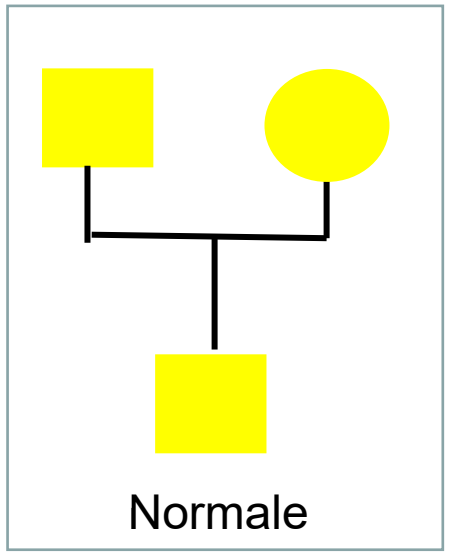
Gene per le beta globine

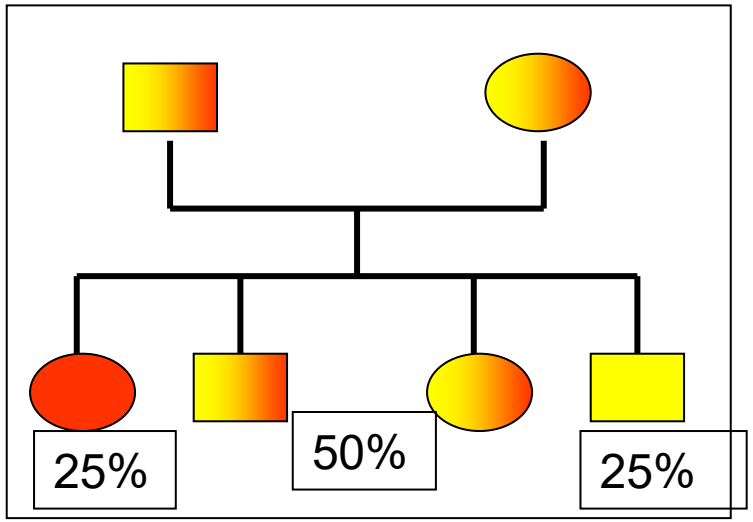
- β -→ **normale**
- β' -→ **variante**

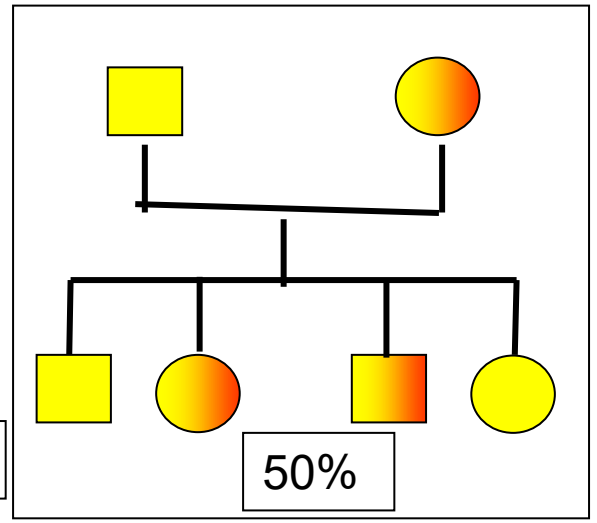
-> omozigote (β + β) → **Emoglobina «normale» HbA**

-> eterozigote (β + β') → **HbA + Hb variante**

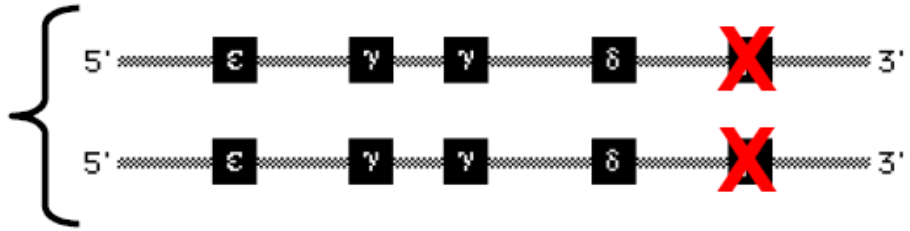
-> omozigote per la variante (β' + β') → **Hb variante**



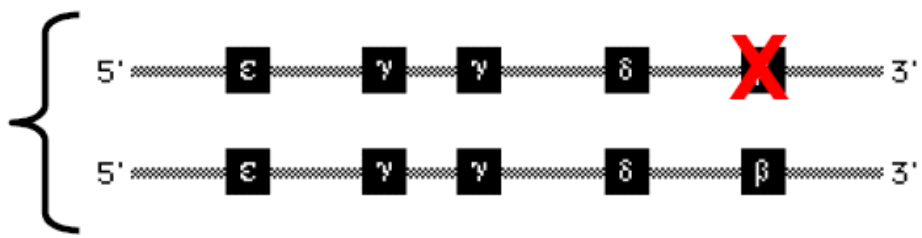




β -talassemia major



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



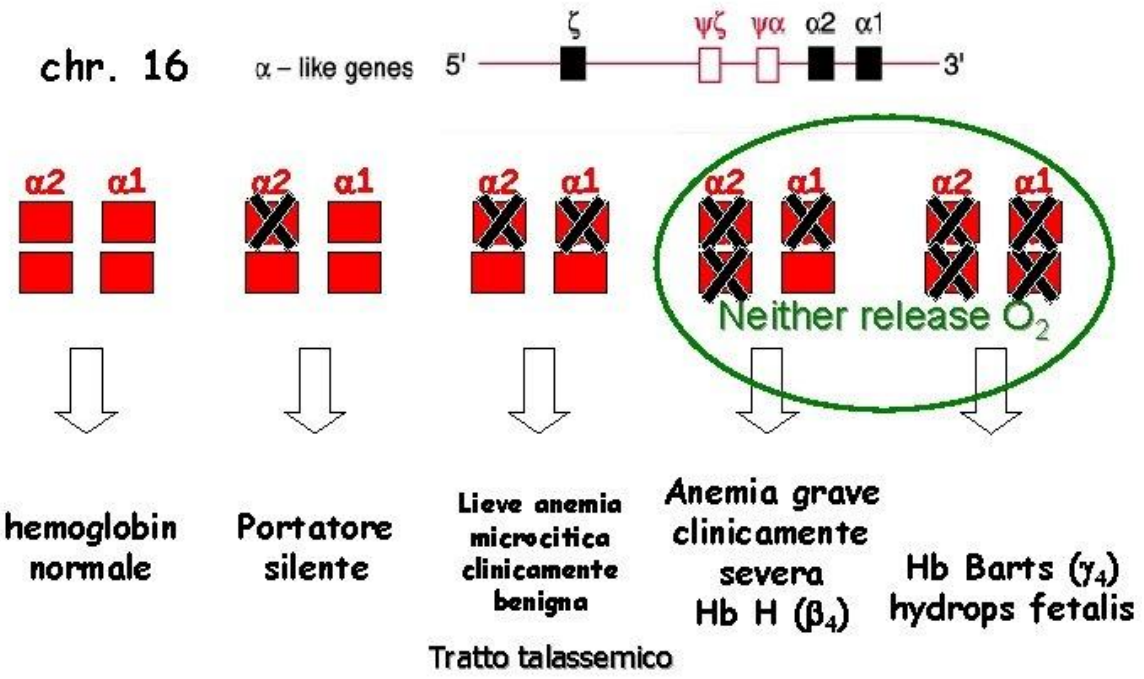
CLINICA DEL MORBO DI COOLEY

- 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

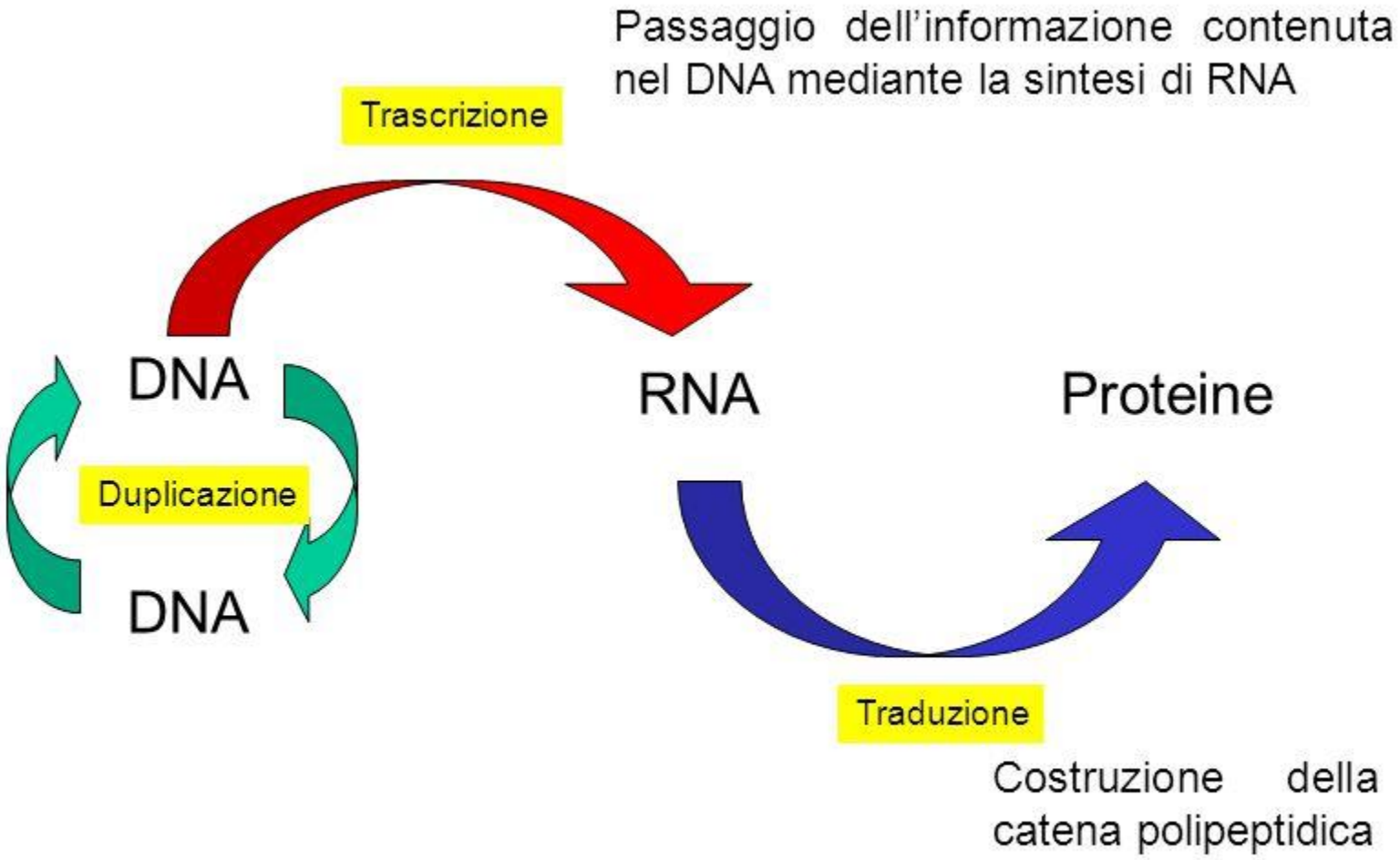
- 4 geni alpha

Base genetica di α thalassemia:
• sopratutto delezioni



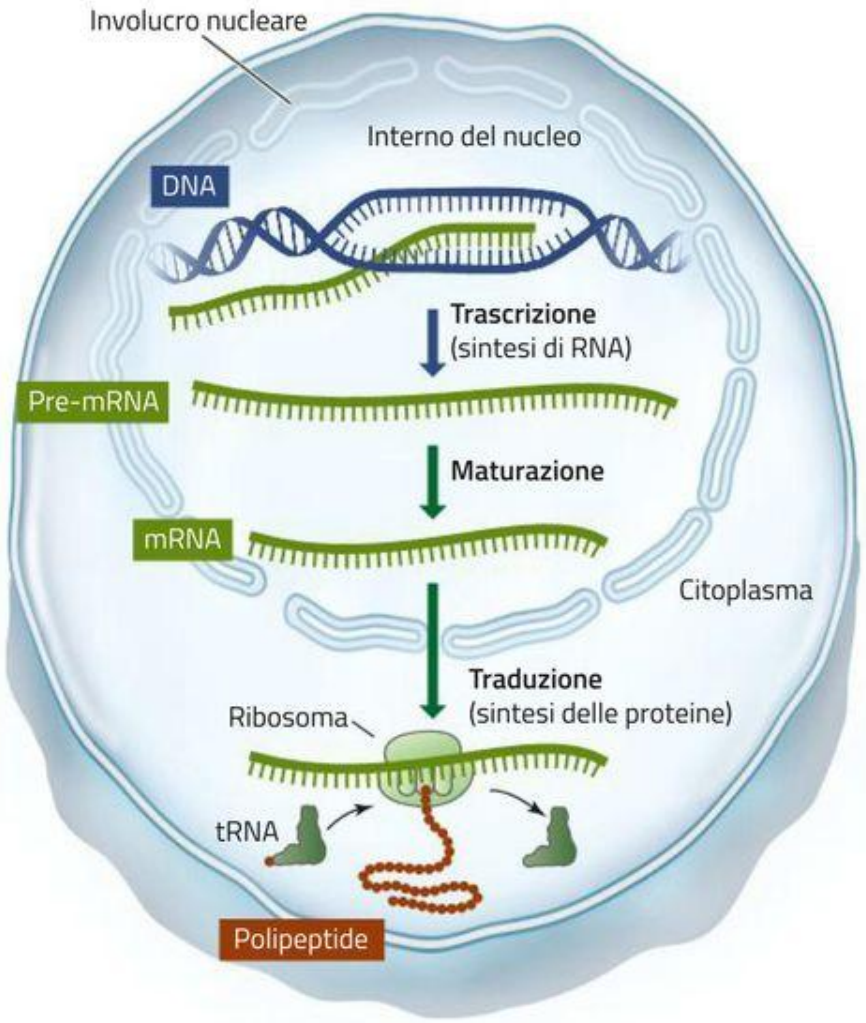
P. Champe, R. Harvey, D. R. Ferrier, LE BASI DELLA BIOCHIMICA, Zanichelli Editore S.p.A. Copyright © 2006

Dal DNA alla Proteina



S.p.A. Copyright © 2006

Dai geni alle proteine

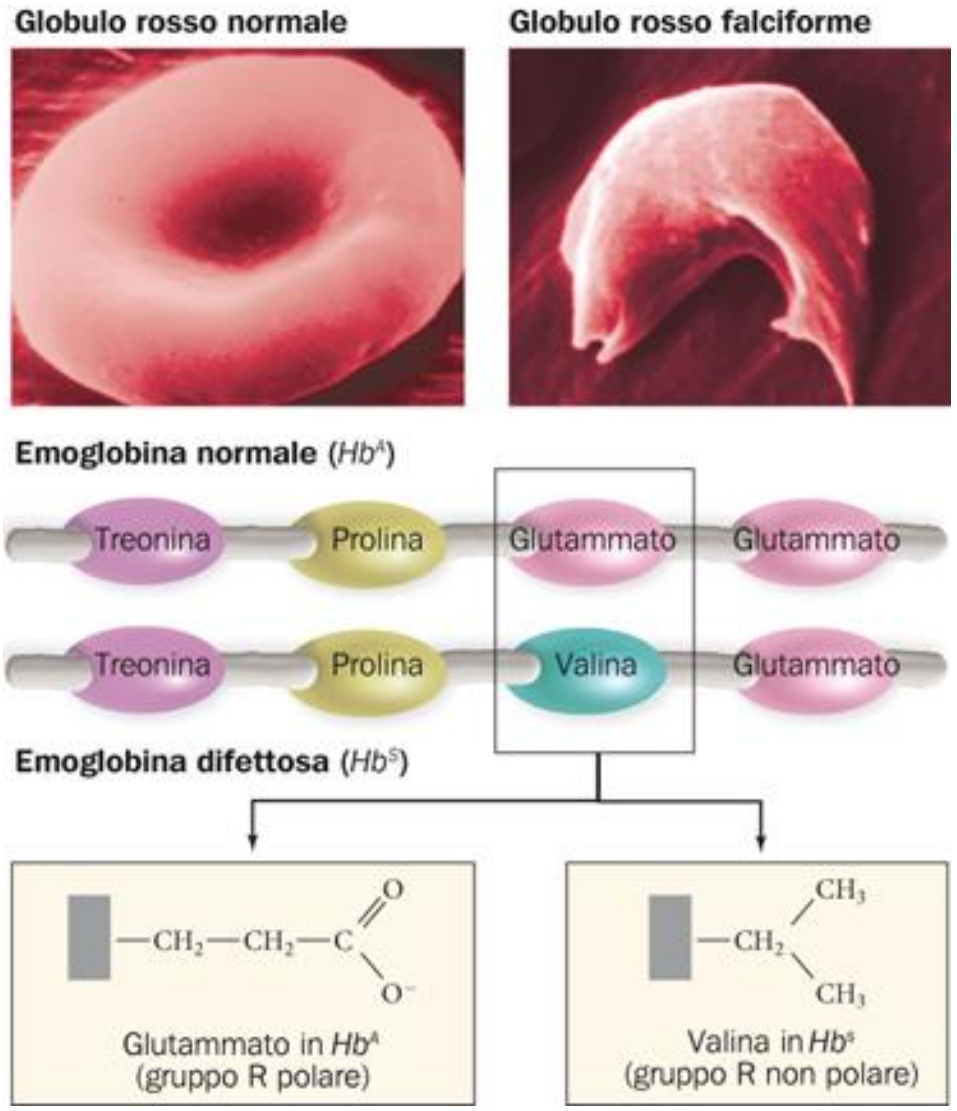


Il **gene** è un tratto di DNA che contiene le informazioni per la produzione di una **catena polipeptidica**.

ZANICHELLI

Sadava et al. *La nuova biologia.blu* © Zanichelli 2016

I geni dirigono la sintesi delle proteine



I geni sono espressi nelle proteine.

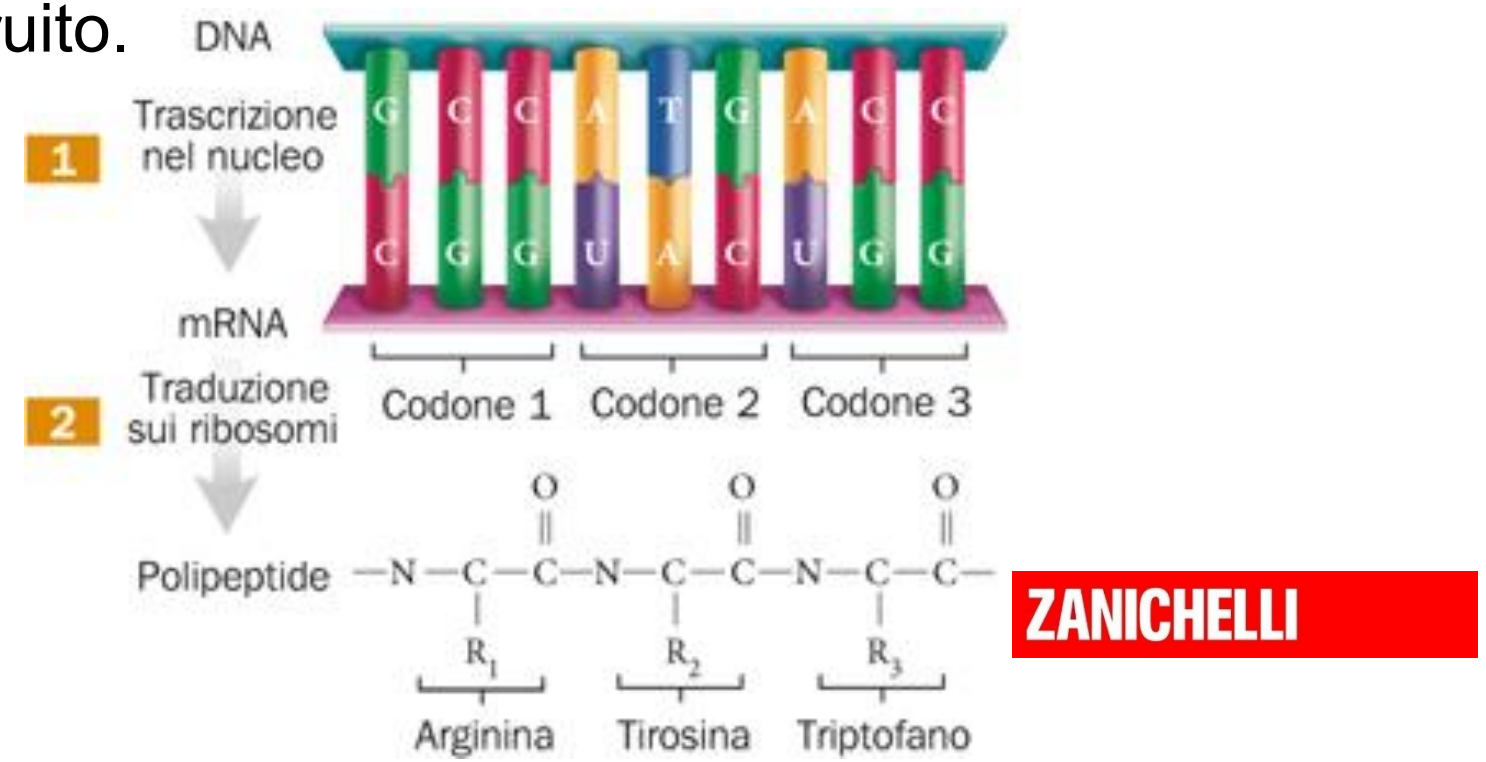
L'ipotesi **«un gene, un enzima»** è basata sull'osservazione che un gene difettoso dà origine a un enzima esso stesso difettoso.

ZANICHELLI

Sylvia S. Mader *Immagini e concetti della biologia* © Zanichelli editore, 2012

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.



Sylvia S. Mader *Immagini e concetti della biologia* © Zanichelli editore, 2012

Prima base	Seconda base U	Seconda base C	Seconda base A	Seconda base G	Terza base
U	UUU fenilanina	UCU serina	UAU tirosina	UGU cisteina	U
	UUC fenilanina	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.

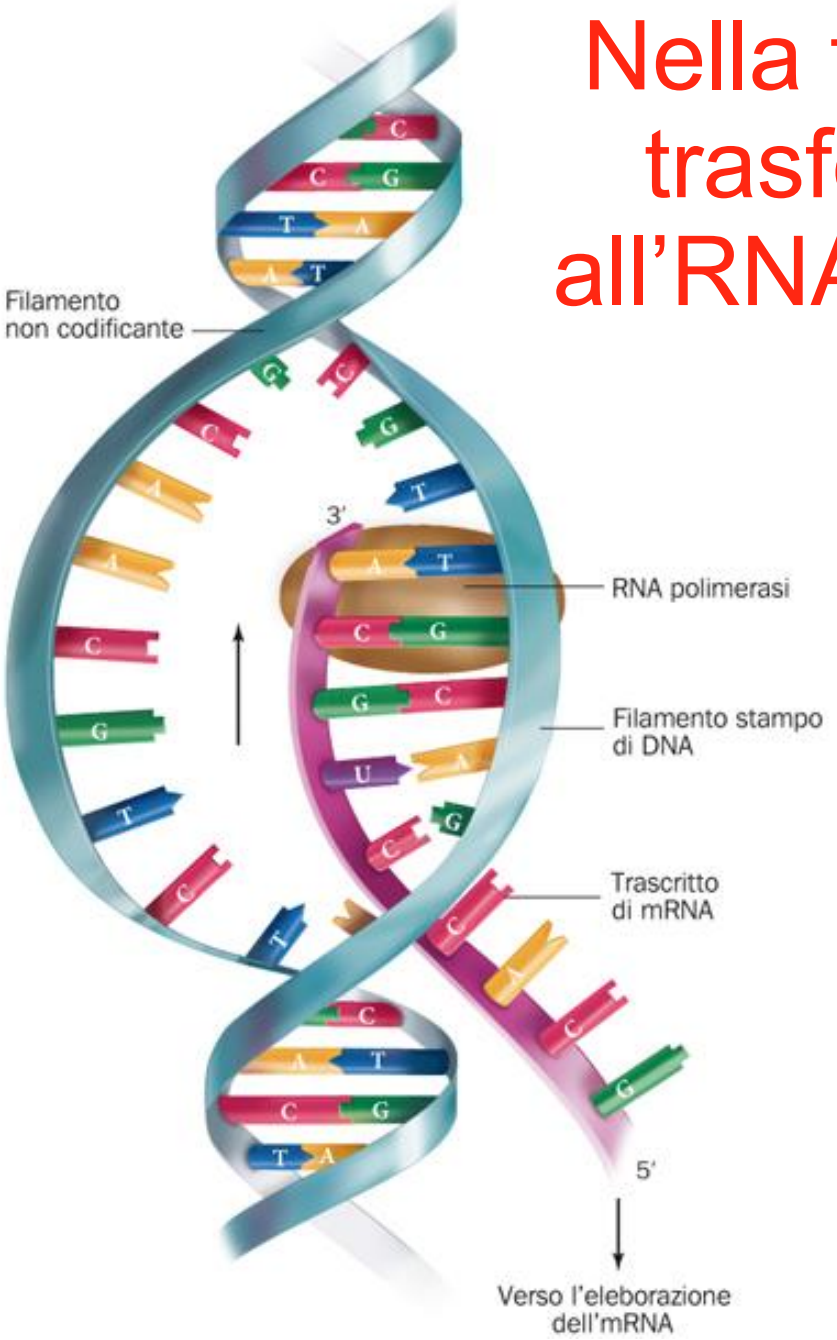
Il codice genetico è basato su una tripletta di basi, ossia un **codone**, che è una sequenza precisa di tre basi nucleotidiche indicate da tre lettere, per esempio AUC, e corrisponde a un amminoacido.

Il codice genetico è **universale**.

ZANICHELLI

Sylvia S. Mader *Immagini e concetti della biologia* © Zanichelli editore, 2012

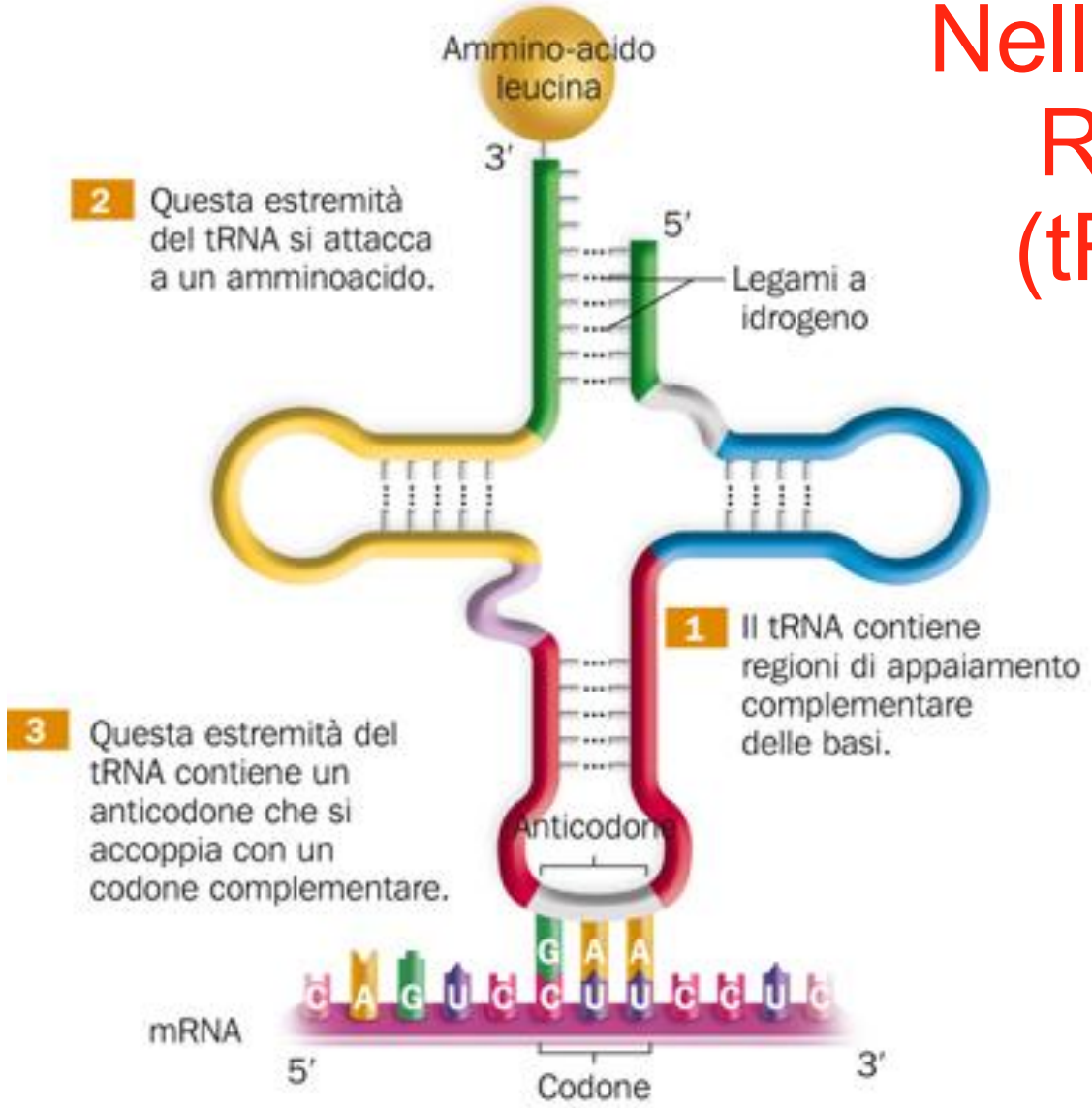
Nella trascrizione ogni gene trasferisce l'informazione all'RNA messaggero (mRNA)



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

Sylvia S. Mader *Immagini e concetti della biologia* © Zanichelli editore, 2012



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

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

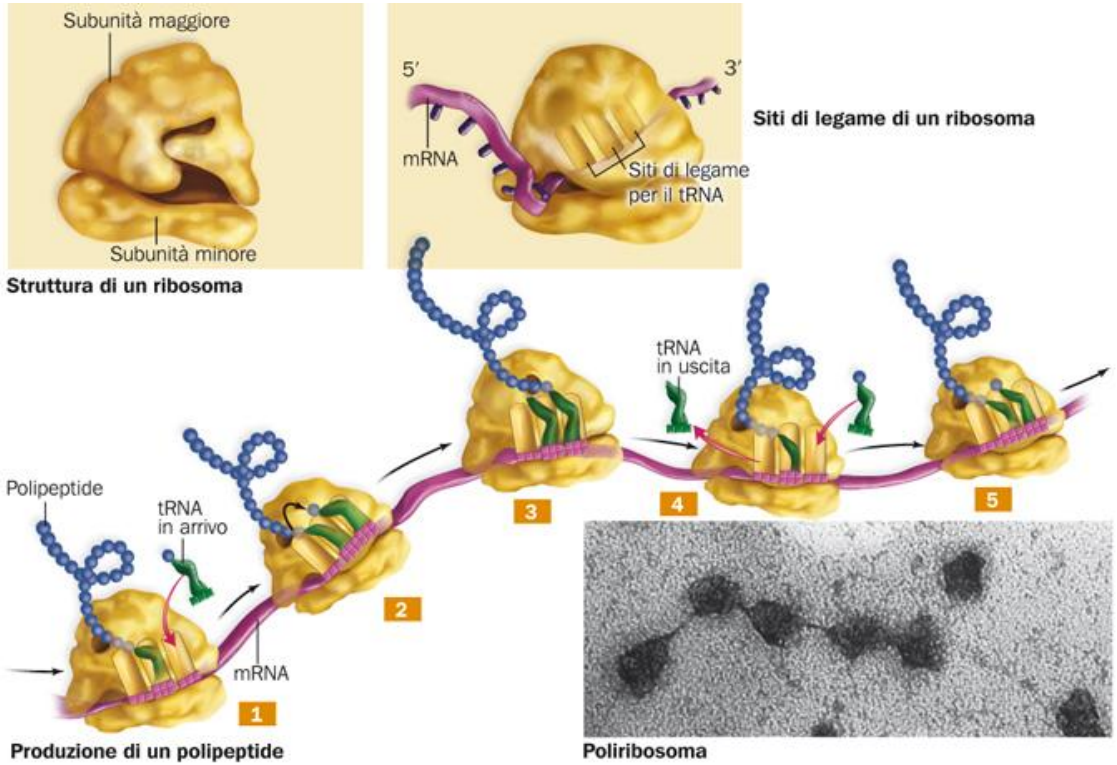
Gli **anticodoni** del tRNA si accoppiano con i **codoni** complementari dell'mRNA.

ZANICHELLI

Sylvia S. Mader *Immagini e concetti della biologia* © Zanichelli editore, 2012

La traduzione ha luogo presso i ribosomi presenti nel citoplasma

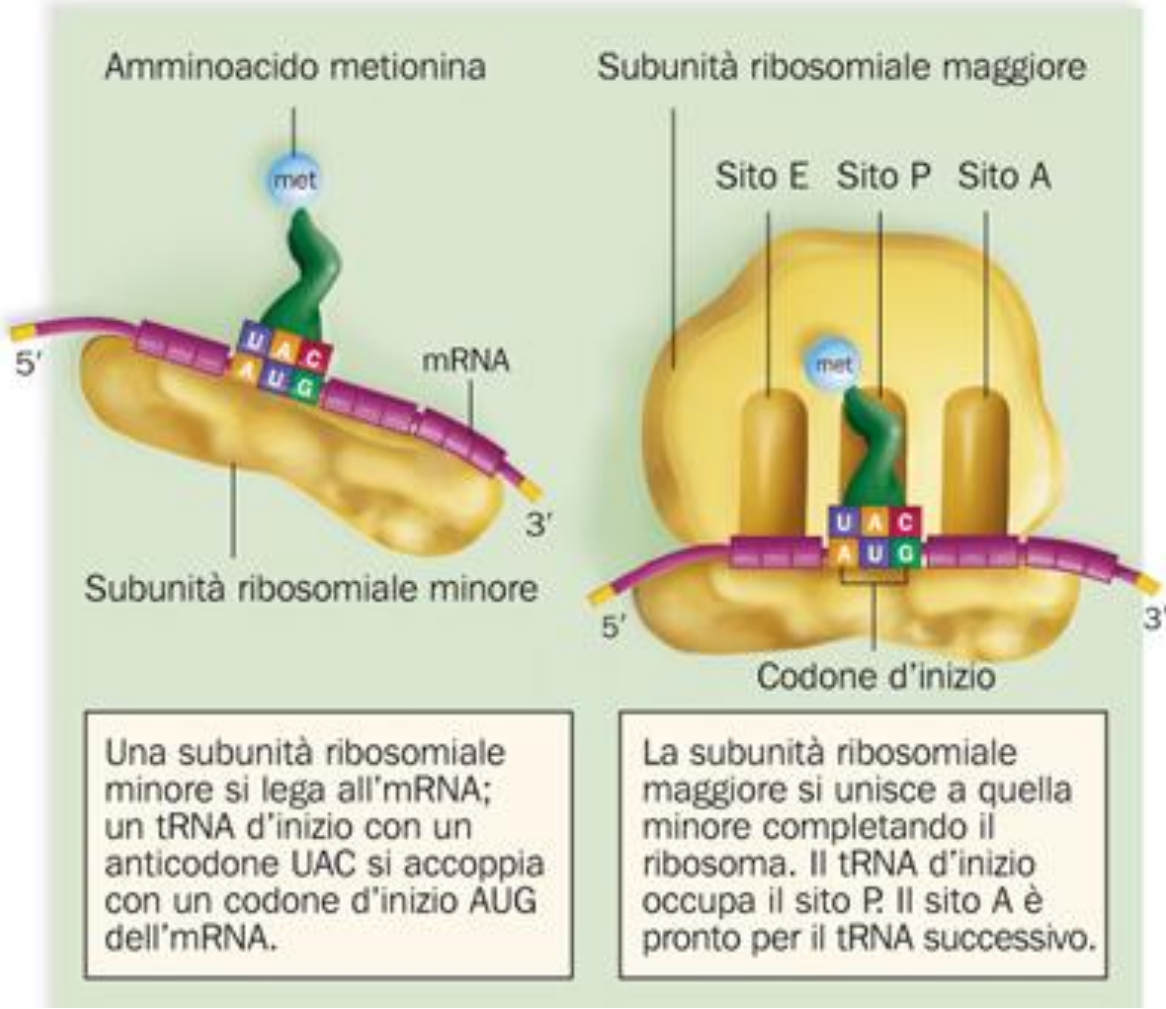
I **ribosomi** hanno un sito di legame per l'**mRNA** e tre siti di legame per il **tRNA**. Quando un ribosoma si sposta lungo una molecola di mRNA, il polipeptide in formazione si allunga di un amminoacido alla volta. Spesso molti ribosomi sono associati e in fase di traduzione dello stesso mRNA. L'intero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



ZANICHELLI

Sylvia S. Mader *Immagini e concetti della biologia* © Zanichelli editore, 2012

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

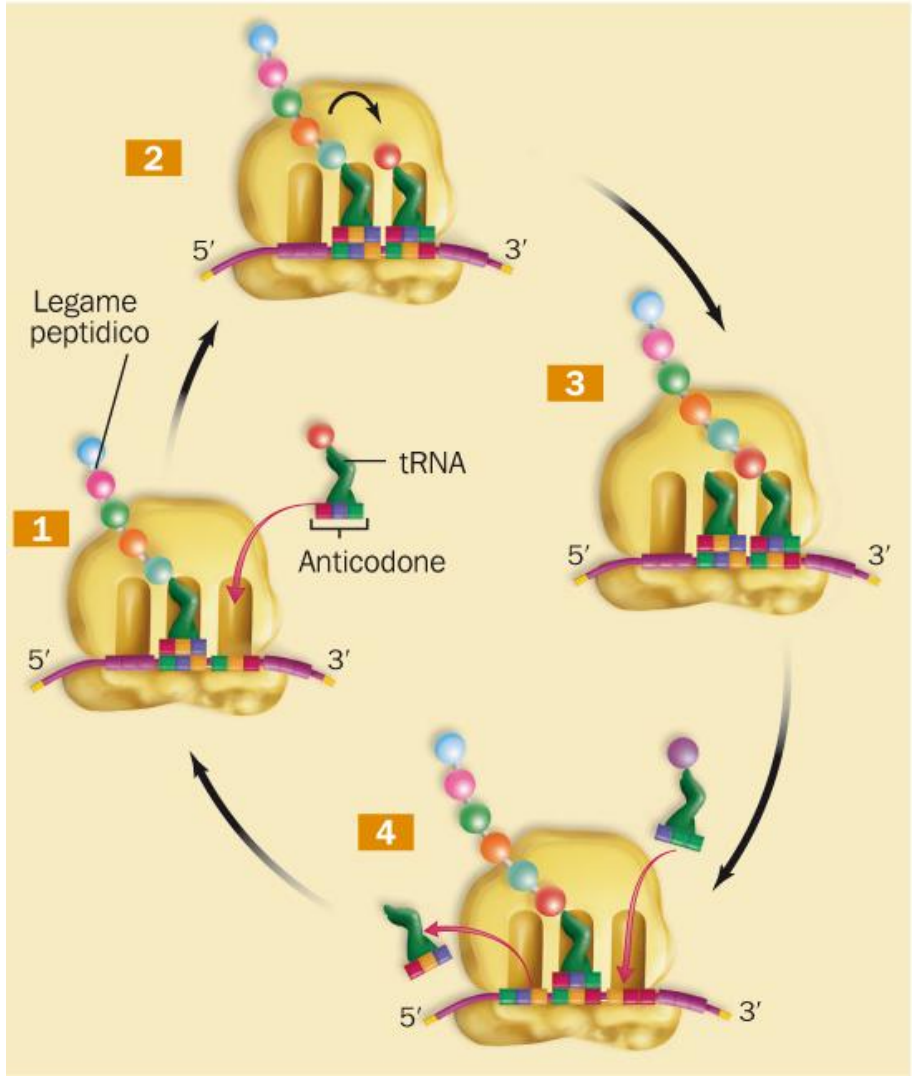


L'**inizio** è la fase che mette insieme tutti i componenti necessari alla traduzione. Il **codone di inizio** è AUG.
Ogni ribosoma ha 3 siti di attacco per i tRNA: **sito E** (da *exit*), **sito P** (da *peptide*) e **sito A** (da *amminoacido*).

ZANICHELLI

Sylvia S. Mader *Immagini e concetti della biologia* © Zanichelli editore, 2012

La 2a 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

Sylvia S. Mader *Immagini e concetti della biologia* © Zanichelli editore, 2012