

Legame cooperativo

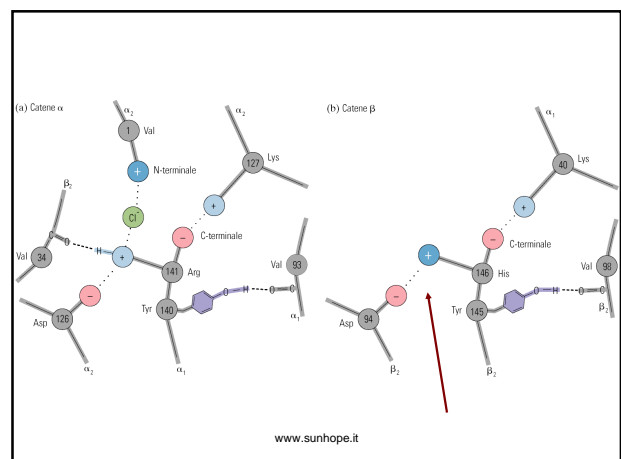
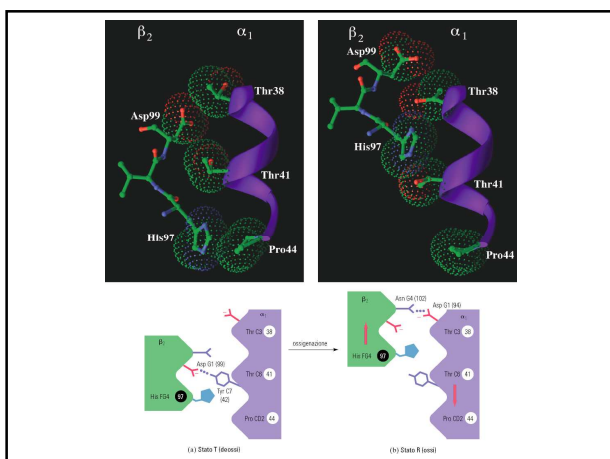
- Quando una proteina è funzionalmente attiva, può mutare la sua forma senza indurre cambi conformazionali nelle proteine vicine; (mioglobina ossigenata non influenza le mioglobine vicine).
- Invece in proteine associate come l'emoglobina: quando una catena si ossigena e cambia la sua forma tale modificazione si ripercuote sulle altre catene del tetramero.
- **le altre catene del tetramero assumono un "atteggiamento meno ostile" nei riguardi dell'ossigeno: la difficoltà con cui una catena si ossigena diminuisce man mano che le catene ad essa vicine si ossigenano a loro volta. Lo stesso discorso è valido per la deossigenazione.**

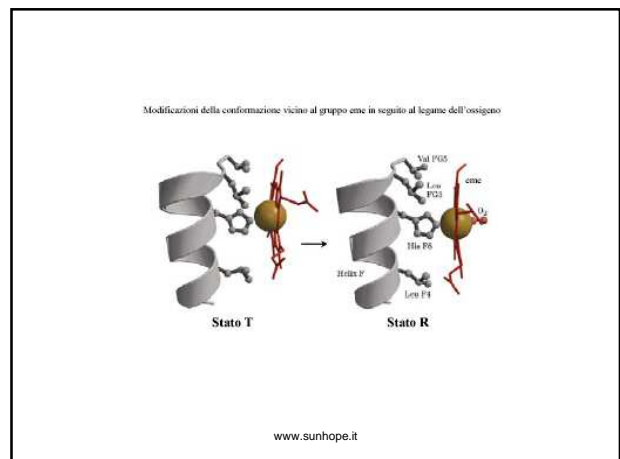
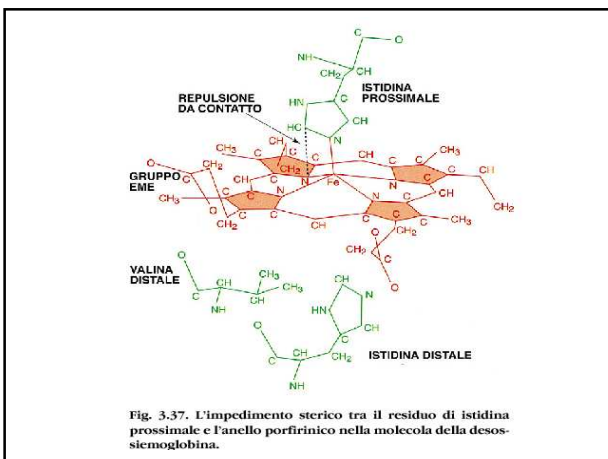
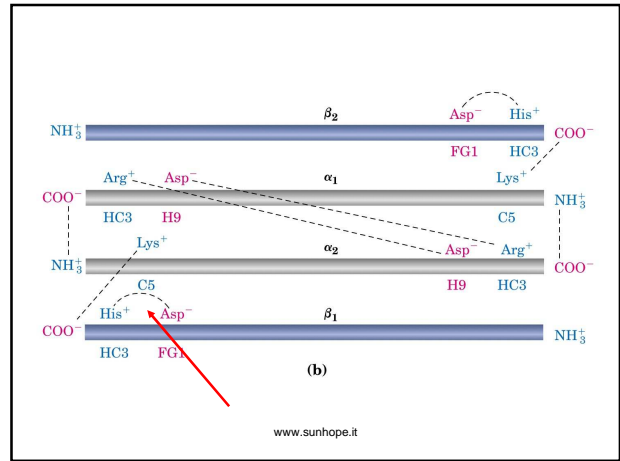
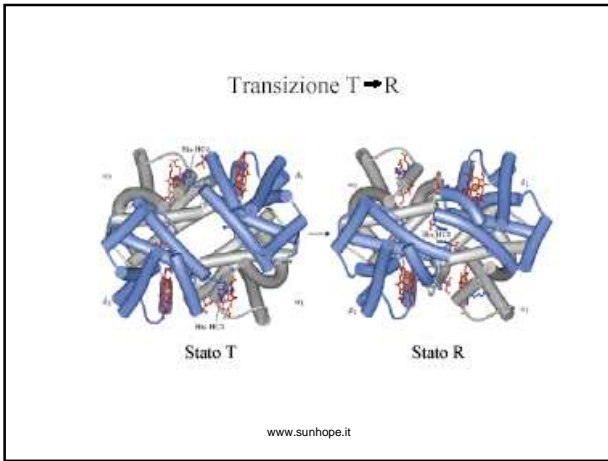
www.sunhope.it

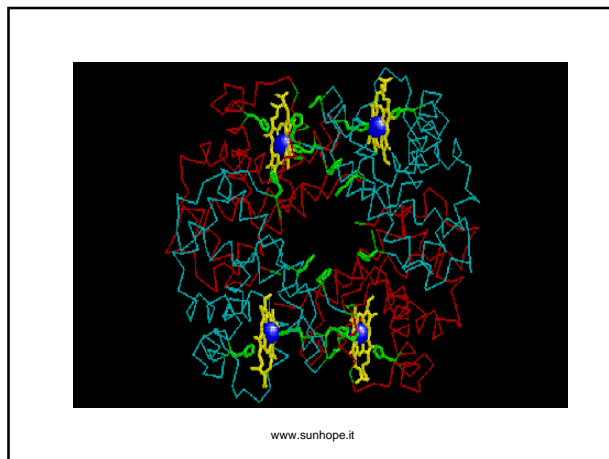
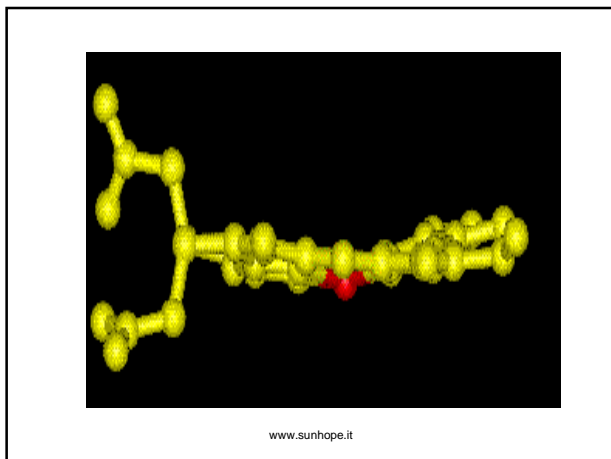
La struttura quaternaria della deossiemoglobina prende il nome di :

- **forma T (tesa)**
- mentre quella della ossiemoglobina viene chiamata forma **R (rilasciata)**;
- nello stato teso vi sono una serie di **interazioni elettrostatiche piuttosto forti tra amminoacidi acidi e amminoacidi basici che portano ad una struttura rigida della deossiemoglobina (ecco il perché del "forma tesa")**,
- mentre quando si lega l'ossigeno, l'entità di queste interazioni diminuisce (ecco il perché del "forma rilasciata").
- Inoltre, in assenza di ossigeno, la carica dell'istidina (vedi struttura) viene stabilizzata dalla carica opposta dell'acido aspartico mentre,
- in presenza di ossigeno, c'è la tendenza da parte della proteina, a perdere un protone;
- ciò comporta che l'emoglobina ossigenata sia un acido più forte dell'emoglobina deossigenata: **effetto bohr**

www.sunhope.it

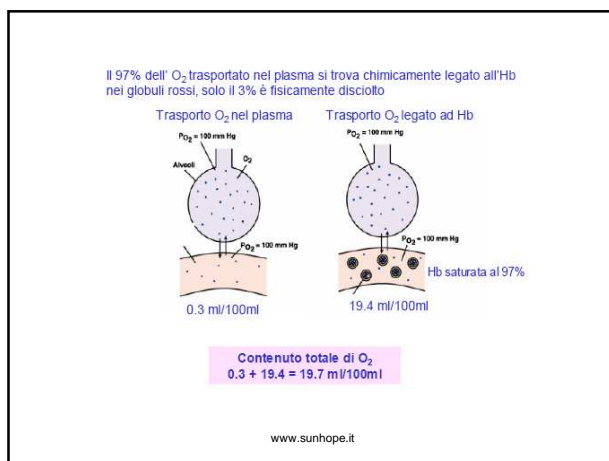






III^a Parte

www.sunhope.it



Emoglobina (cromoproteina PM = 64.500)

- 4 catene polipeptidiche: 2 α e 2 non α (β , γ , δ)
- 4 gruppi eme (protoporfirine, 4 anelli pirrolici + Fe bivalente centrale)

Adulto: 95% HbA $\alpha_2\beta_2$, 2-3% HbA₂ $\alpha_2\delta_2$
 Feto: HbF $\alpha_2\gamma_2$

Hb + 4O₂ ↔ Hb(O₂)₄

O₂ si **lega all'eme** per ossigenazione (senza cambiamenti della valenza ionica): si forma **Ossiemoglobina** (HbO₂)
 La liberazione dell'O₂ avviene per desossigenazione: si forma **Desossiemoglobina**

Concentrazione Hb = 15 gr / 100ml sangue

1 gr Hb lega 1.39 ml di O₂ (condizioni ottimali)
1 gr Hb lega 1.34 ml di O₂ (in condizioni reali, leggera presenza Methb):

Nei sangue arterioso la capacità massima di trasporto di O₂ è 20.4ml/ 100ml di sangue

La quantità di O₂ legata all'Hb cresce in rapporto alla pO₂, seguendo una curva ad andamento sigmoide:

Saturazione in O₂ = [HbO₂] / Hb totale

I componenti principali dell'aria sono:

- azoto** (nella percentuale molare del 78%)
- ossigeno** (nella percentuale molare del 20,96%)
- anidride carbonica** (nella percentuale molare dello 0,03%)
- argon** (nella percentuale molare dello 0,8%)
- Altri **gas** (nella percentuale molare dello 0,21%)

Secondo la legge di Dalton, la somma delle corrispondenti pressioni parziali deve essere uguale alla pressione atmosferica (1 atm = 101,3 kPa) e infatti:

- azoto: 79,014 kPa
- ossigeno: 21,232 kPa
- anidride carbonica: 0,0304 kPa
- argon: 0,8104 kPa
- altri gas: 0,2127 kPa
- Totale (aria): 101,3 kPa**

La normale pressione atmosferica può sostenere circa 760 mm di mercurio; quindi 1/760 di una atmosfera, o 1 mm di mercurio (mmHg), è da lungo tempo una unità di misura molto diffusa.

1 Torr. La pressione esercitata da una colonna di mercurio di 1 mm. in condizioni standard.
 1 Torr = 133,322 Pa
 1 atm = 760mm Hg = 101,3 KPa

www.sunhope.it

Curva di saturazione della Mb

Figura da: Mathews, Van Holde e Ahern "Biochimica" (2004, Casa Ed. Ambrosiana)

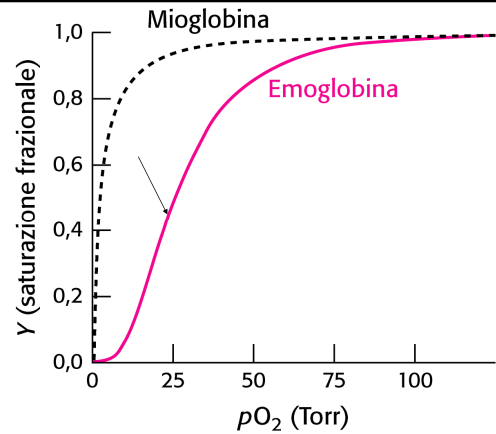
- La curva di legame dell' O₂ alla Mb ha una forma **ad iperbole**, con alti livelli di saturazione raggiunti già a basse concentrazioni di O₂
- Pressione parziale di O₂ alla quale la Mb è saturata al 50% = **P₅₀ ≈ 3 mmHg**

www.sunhope.it

Legame cooperativo dell' O₂

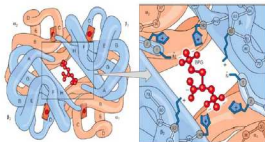
- Quando una molecola di O₂ si lega all'eme di una delle 4 subunità della Hb, aumenta l'affinità per l'O₂ delle rimanenti subunità. La prima molecola di O₂ si lega con difficoltà ma le successive molecole si legano con affinità crescente, come dimostrato dalla ripida pendenza della curva intorno a 20-30 mmHg. L'ultimo O₂ si lega con un'affinità 300 volte superiore alla prima

www.sunhope.it

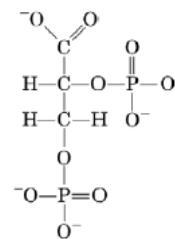


2,3 bisfosfoglicerato (BPG)

- Il legame cooperativo dell'O₂ da parte dell'Hb è regolato anche grazie ad una molecola (il BPG, sintetizzato nei GR da intermedio della glicolisi) che si lega in una cavità interna dell'Hb in contatto con tutte e 4 le sue subunità
- La concentrazione del BPG aumenta in alta montagna e nei fumatori

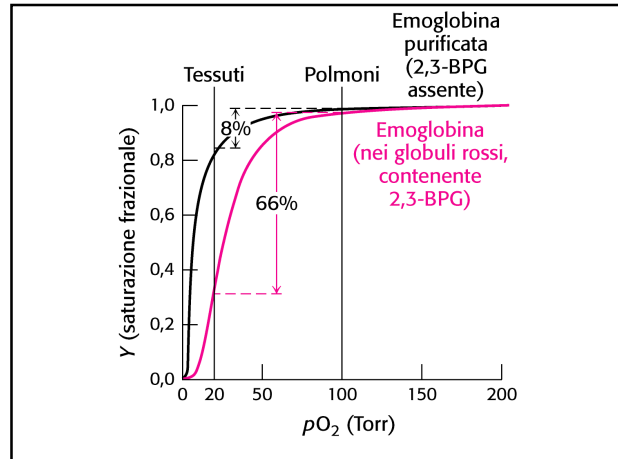
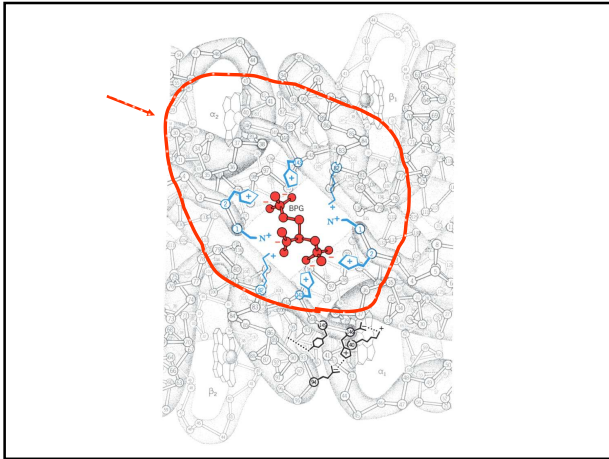


- La regolazione del BPG si estrinseca sulla liberazione dell'O₂ a livello dei tessuti dove la richiesta di O₂ è modulata dall'attività metabolica del tessuto.



2,3-bisfosfoglicerato (BPG)

www.sunhope.it



2,3-Bisfosfoglicerato

Effettore allosterico presente in concentrazioni variabili nella cellula (g. rosso) si lega con alta affinità in una nicchia prodotta da aa. con cariche +, il suo ruolo è quello di stabilizzare la forma deossi con conseguente maggior rilascio di ossigeno.

Permette inoltre, l'adattamento immediato ad alte quote, e l'utilizzo dell'ossigeno materno dal feto Hb fetale due catene α e due catene γ al posto delle β .

Le catene γ hanno Ser al posto His 143, questo elimina due cariche positive dal sito per il BPG, riducendone l'affinità, l'assenza di BPG fa aumentare l'affinità dell'Hb fetale a scapito di quella materna

www.sunhope.it

L' Hb è il trasportatore perfetto di O_2 fra i polmoni e i tessuti

- La P_{O_2} è alta negli alveoli e capillari polmonari, (100 mmHg) alla quale l' Hb è saturata al 90%
- La P_{O_2} è invece bassa nei capillari dei tessuti (20-30 mmHg) alla quale l' Hb è saturata al 50%
- Nel muscolo sotto sforzo, la P_{O_2} è ancora più bassa (fino a 5 mmHg) con l' Hb saturata al 10%
- Queste notevoli variazioni della saturazione dell' Hb indicano che l' Hb cede grosse quantità di O_2 nei tessuti.
- La Mb invece rimarrebbe quasi completamente saturata fra 100 e 20-30 mmHg, e quindi non sarebbe un buon trasportatore di O_2

www.sunhope.it

Effetto della CO₂ e del pH: Effetto Bohr

- **EFFETTO BOHR:** l'aumento della CO₂ e la riduzione del pH (che si manifestano nei tessuti metabolicamente attivi) determinano una riduzione dell'affinità dell'Hb per l'O₂, che viene così rilasciato
- Graficamente si ha uno spostamento a destra della curva di saturazione dell'Hb
- L'effetto Bohr ha lo scopo di regolare il rilascio di O₂ nei vari tessuti in base all'attività metabolica dei tessuti stessi

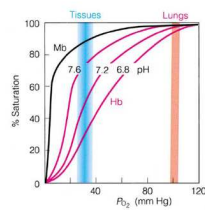


Figura da: Mathews, Van Holde e Ahern
"Biochimica" (2004, Casa Ed. Ambrosiana)

www.sunhope.it

Trasporto della CO₂

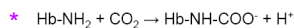
- La CO₂ prodotta dai tessuti viene trasportata ai polmoni sotto forma di:
 - CO₂ disciolta come gas nel sangue
 - **ione bicarbonato** (CO₂ + H₂O → H₂CO₃ → HCO₃⁻ + H⁺)
 - **carbammato**, legato agli amminogruppi delle proteine ematiche, inclusa l'Hb:

$$\text{Hb-NH}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{Hb-NH-COO}^- + \text{H}^+$$
- L'Hb così modificata ha una **minore affinità per l'O₂**: l'O₂ viene così rilasciato in maggiore quantità e in maniera proporzionale alla produzione di CO₂ del tessuto stesso

www.sunhope.it

Attività metabolica e pH

- Nei tessuti metabolicamente attivi il pH è più basso. Le fonti di H⁺ sono:
 - 1- CO₂ + H₂O → H₂CO₃ → HCO₃⁻ + H⁺
 - 2- CO₂ che forma carbammati (vd. precedentemente) *
 - 3- acido lattico → lattato + H⁺ (glicolisi anaerobia nel muscolo)
- Gli ioni H⁺ si legano all'Hb e hanno l'effetto di **diminuire l'affinità dell'Hb per l'O₂**
- Quindi anche una riduzione del pH causa un maggiore rilascio di O₂ nei tessuti metabolicamente attivi



www.sunhope.it

Effetto tossico del monossido di carbonio (CO)

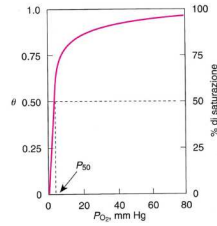
- Il CO si lega **fortemente** seppure **reversibilmente** al Fe²⁺ dell'eme. Quando il CO si lega ad una subunità dell'Hb, causa un' **aumento dell'affinità per l'O₂** delle altre subunità. La carbon-monossi-Hb (HbCO) diventa così incapace di rilasciare l'O₂ nei tessuti.
- L'affinità della Hb per il CO è 220 volte superiore a quella per l'O₂. Quindi bastano piccolissimi quantitativi di CO nell'ambiente per produrre concentrazioni tossiche di HbCO
- L'avvelenamento da CO si tratta con la ossigeno terapia (in camera iperbarica se possibile), che facilita il distacco del CO dalla Hb

www.sunhope.it

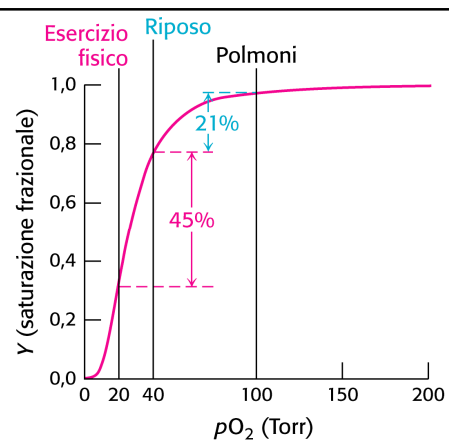
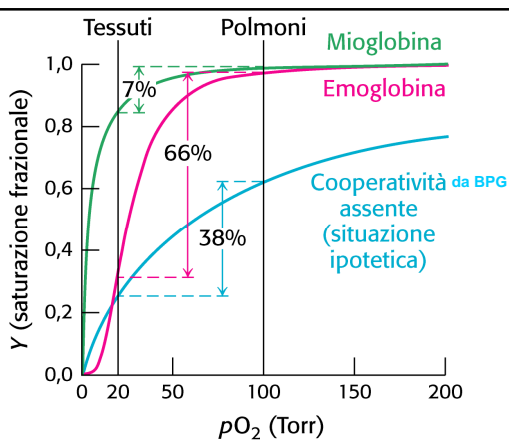
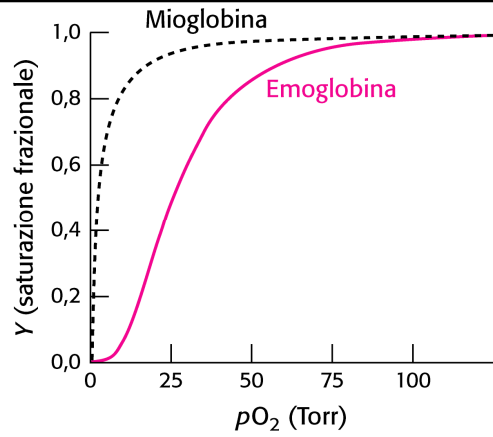
Curva di saturazione della Mb

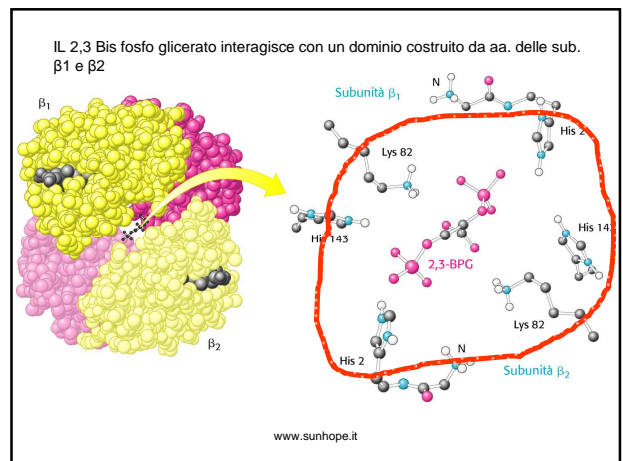
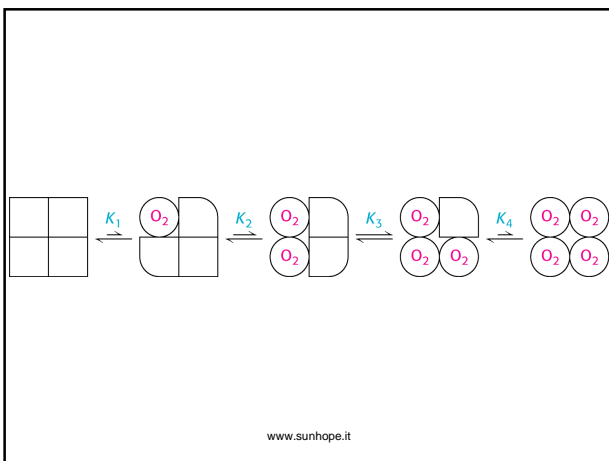
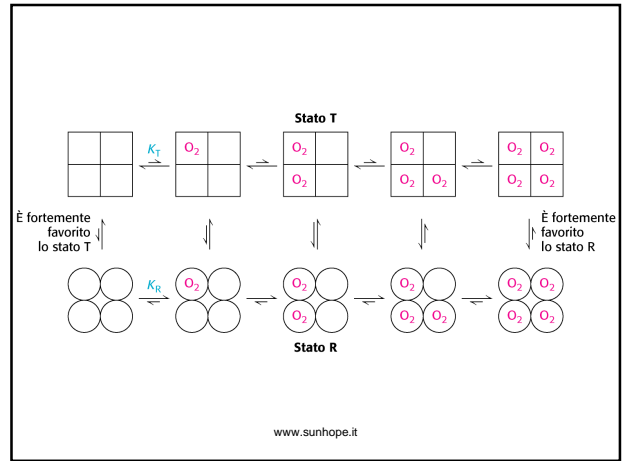
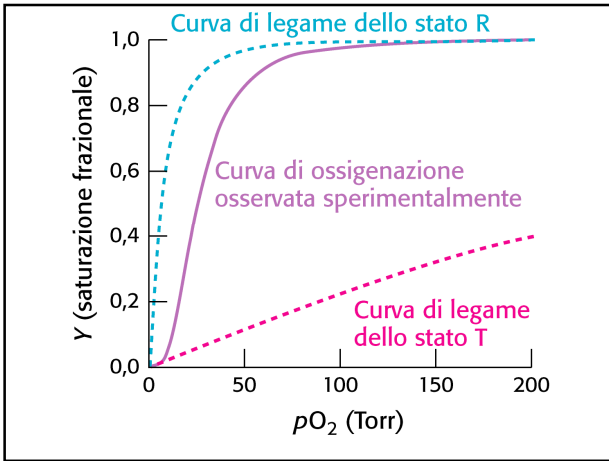
Figura da: Mathews, Van Holde e Ahern "Biochimica" (2004, Casa Ed. Ambrosiana)

- La curva di legame dell' O_2 alla Mb ha una forma **ad iperbole**, con alti livelli di saturazione raggiunti già a basse concentrazioni di O_2
- Pressione parziale di O_2 alla quale la Mb è saturata al 50% = $P_{50} \approx 3$ mmHg



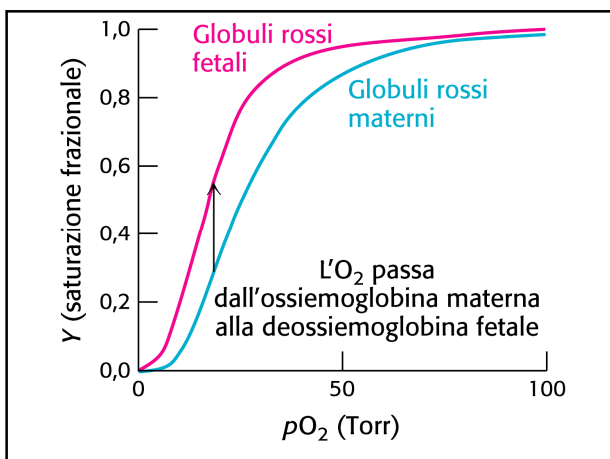
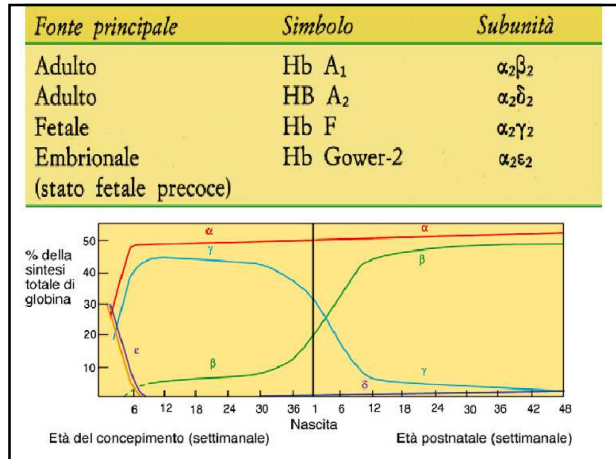
www.sunhope.it



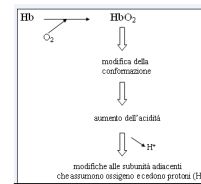


- Nello sviluppo di un essere umano vi sono dei **geni** che vengono espressi **solo per un determinato periodo di tempo**; per tale motivo si hanno emoglobine diverse: **fetali, embrionali, dell'uomo adulto.**
- Le **catene** che costituiscono queste **diverse emoglobine**, hanno delle **strutture differenti**, ma con delle **similitudini**, infatti la funzione che svolgono è più o meno la stessa.

www.sunhope.it

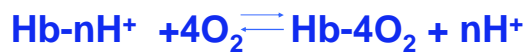


- A seconda del pH, il gruppo eme si lega più o meno facilmente all'ossigeno: **in ambiente acido l'emoglobina rilascia più facilmente l'ossigeno** (è stabile la forma tesa) mentre, in ambiente basico, il legame con l'ossigeno è più forte.



- Ogni emoglobina rilascia 0,7 protoni per mole di ossigeno (O₂) entrante. **L'effetto Bohr** permette all'emoglobina di migliorare la sua capacità di trasportare Ossigeno. L'emoglobina che compie il tragitto dai polmoni ai tessuti, deve equilibrarsi in funzione della pressione, del pH e della temperatura.

www.sunhope.it



www.sunhope.it

Effetto Bohr: pH

le **Istidine-146 C** terminali delle catene β , nella deossi- Hb formano un ponte salino con le **Asp-94**, se l'anello dell'Istidina è protonato stabilizzando la forma deossi; il ponte salino non si forma nell'Hb- 4O₂ perché l'**Ist-146** non è protonata.

Si intensifica l'**effetto Bohr per aumento di H⁺** si producono cariche negative che permettono la formazione di altri ponti salini, stabilizzando la forma deossi.

www.sunhope.it

- L'emoglobina in arrivo ad un tessuto si trova allo stato rilasciato (legato all'ossigeno), ma in prossimità del tessuto, viene carbossilata e passa allo stato teso:
- la proteina in tale stato, ha minore tendenza a legarsi con l'ossigeno, rispetto allo stato rilasciato, perciò l'emoglobina libera ossigeno al tessuto;
- inoltre, per reazione fra acqua e anidride carbonica, si ha produzione di ioni H⁺ e quindi ulteriore liberazione di ossigeno per effetto bohr.

www.sunhope.it

- L'**anidride carbonica** diffonde nell'eritrocita passando per la membrana plasmatica;
- dato che gli eritrociti costituiscono circa il 40% del sangue, dovremmo aspettarci che solo il 40% dell'anidride carbonica che diffonde dai tessuti entri in essi,
- in realtà il 90% dell'anidride carbonica entra negli eritrociti perché essi contengono un enzima che converte l'anidride carbonica in acido carbonico,
- ne risulta che la concentrazione stazionaria di anidride carbonica negli eritrociti sia bassa e perciò è elevata la velocità di ingresso.

www.sunhope.it

Effetto della CO₂:

Due meccanismi per alterare l'affinità della Hb per l'O₂:

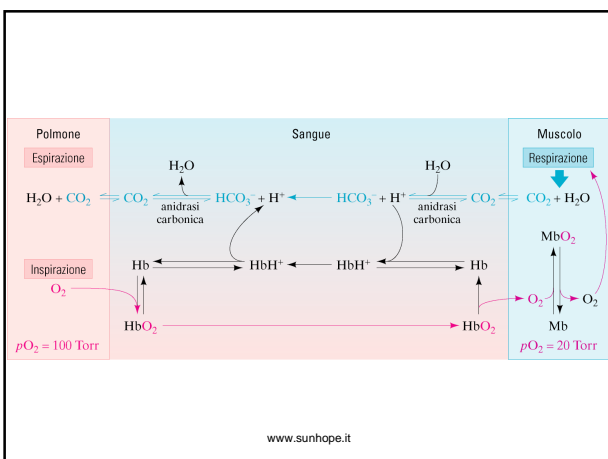
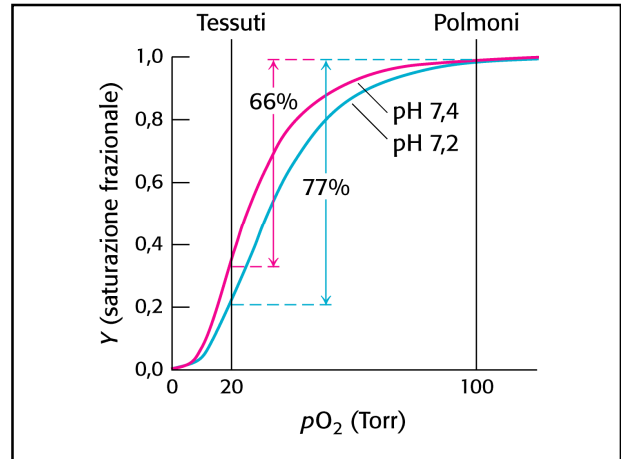
- Effetto Bohr (influenza della modifica del pH)
- Formazione dei carbammati dei gruppi N terminali delle 4 catene proteiche dell'Hb.

$$\text{R-NH}_2 + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{R-N-COO}^- + \text{H}^+$$

H

I gruppi amminoterminali sono posti alle interfacce dei dimeri alfa-beta che una volta carbossilati stabiliscono legami salini che stabilizzano la forma T.

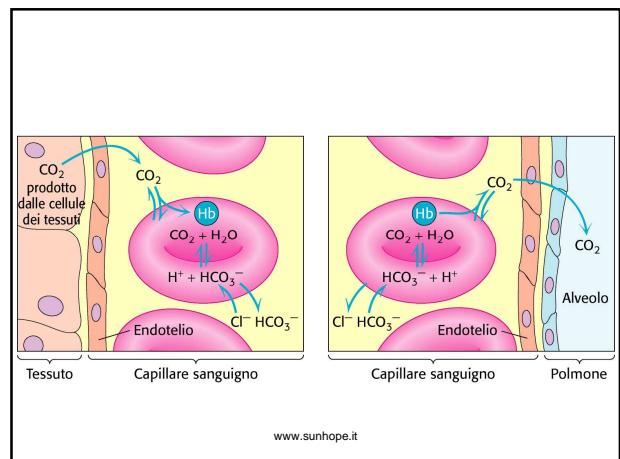
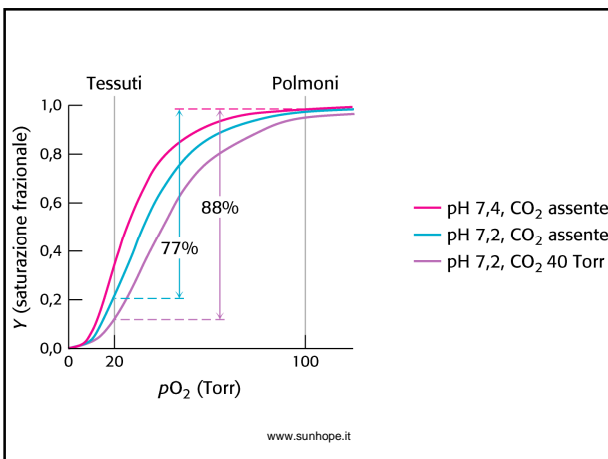
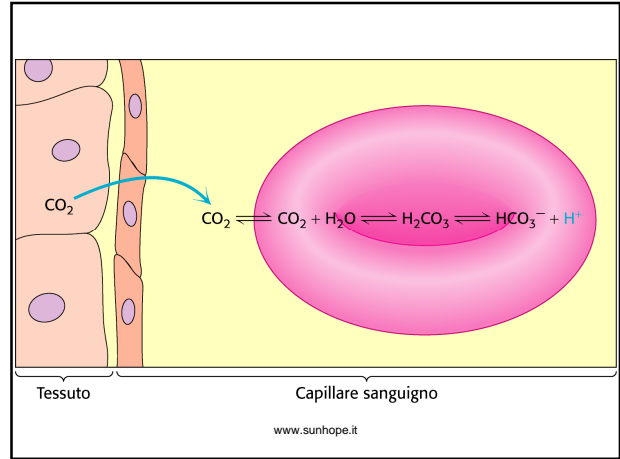
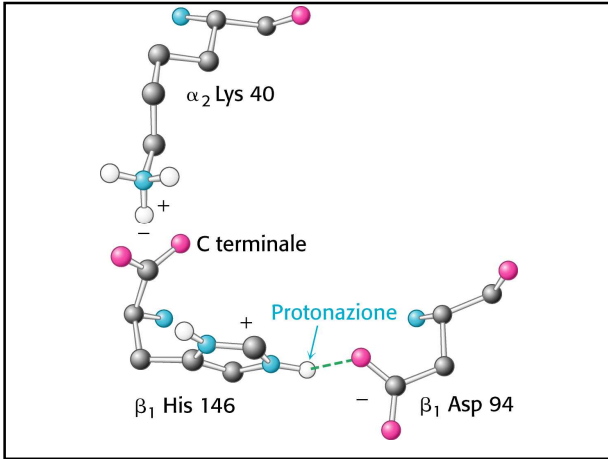
www.sunhope.it



EMOGLOBINOPATIE: 1- L' anemia falciforme

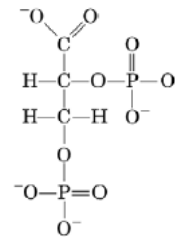
- L'emoglobina presenta 300 varianti genetiche (sostituzione di uno o più amminoacidi) che provocano solo piccoli effetti strutturali e funzionali
- Un'eccezione è l' ANEMIA FALCIFORME, in cui un glutammato (posizione 6 della catena β) è sostituito con una valina, producendo una zona idrofobica "appiccicosa" sulla superficie di tale emoglobina mutata (HbS)

www.sunhope.it



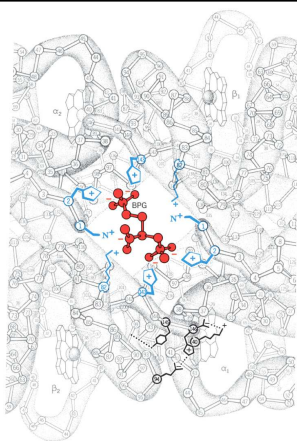
- Vi sono altri fattori che possono influire sulla capacità dell'emoglobina di legarsi all'ossigeno, uno di questi è la **concentrazione di 2,3 bisfosfoglicerato**.
- Il 2,3 bisfosfoglicerato è un metabolita presente negli eritrociti in concentrazione 4-5 mM (in nessun'altra parte dell'organismo è presente in concentrazione così elevata).
- A pH fisiologico, il 2,3 bisfosfoglicerato è deprotonato ed ha su di sé cinque cariche negative; si va ad incuneare tra le due catene beta dell'emoglobina perché tali catene presentano un'elevata concentrazione di cariche positive.
- Le interazioni elettrostatiche tra le catene beta ed il 2,3 bisfosfoglicerato conferiscono una certa rigidità al sistema: si ottiene una struttura tesa che ha scarsa affinità per l'ossigeno; durante l'ossigenazione, poi, il 2,3 bisfosfoglicerato viene espulso.
- Negli eritrociti c'è un apparato apposito che converte il 1,3 bisfosfoglicerato (prodotto dal metabolismo) in 2,3 bisfosfoglicerato in modo che esso raggiunga una concentrazione di 4-5 mM e che quindi l'emoglobina sia in grado di scambiare l'ossigeno nei tessuti.

www.sunhope.it



2,3-bisfosfoglicerato (BPG)

www.sunhope.it



2,3-Bisfosfoglicerato

Effettore allosterico presente in concentrazioni variabili nella cellula (g. rosso) si lega con alta affinità in una nicchia prodotta da aa. con cariche +, il suo ruolo è quello di stabilizzare la forma deossi con conseguente maggior rilascio di ossigeno.

Permette l'adattamento immediato ad alte quote, e l'utilizzo dell'ossigeno materno dal feto Hb fetale due catene α e due catene γ al posto delle β .

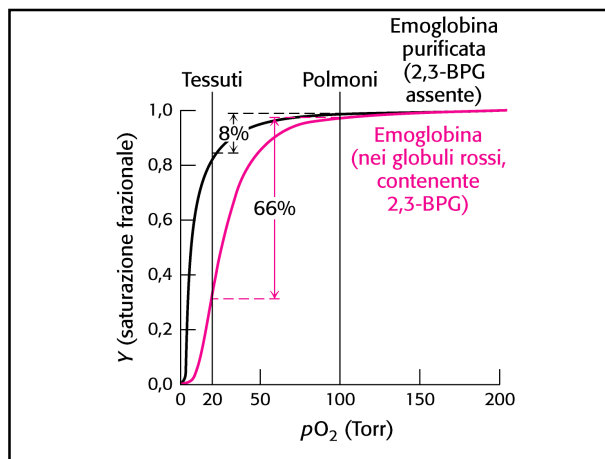
Le catene γ hanno Ser al posto His 143, questo elimina due cariche positive dal sito per il BPG, riducendone l'affinità, l'assenza di BPG fa aumentare l'affinità dell'Hb fetale a scapito di quella materna

www.sunhope.it

L'altro fenomeno che si verifica quando un eritrocita raggiunge un tessuto è il seguente:

- per gradiente, l' HCO_3^- (derivato dell'anidride carbonica) esce dall'eritrocita e, per bilanciare l'uscita di una carica negativa, si ha l'ingresso di cloruri che determina un aumento della pressione osmotica;
- per bilanciare questa variazione si verifica anche l'ingresso di acqua che causa un rigonfiamento dell'eritrocita (effetto HAMBURGER).
- Il fenomeno opposto si verifica quando un eritrocita raggiunge gli alveoli polmonari: si ha uno sgonfiamento degli eritrociti (effetto HALDANE). Quindi gli eritrociti venosi (diretti ai polmoni) sono più rotondi di quelli arteriosi.

www.sunhope.it



Hb glicosilata

- In condizioni **fisiologiche**, l'HbA viene glicosilata lentamente e in maniera non enzimatica nei suoi 120 giorni di vita
- L'Hb glicosilata più abbondante è l'HbA_{1c}, in cui molecole di glucosio si legano alle catene β
- In condizioni **patologiche** come il **DIABETE MELLITO**, l'HbA_{1c} aumenta. I livelli di Hb glicosilata sono considerati un indice preciso della gravità del diabete e vengono spesso dosati

www.sunhope.it