

LEZIONE 4 (sbobinatrici: Rosamaria Dimasi, Maria Grazia Rodinò)

ARGOMENTI PRIMA PARTE: Funzioni e caratteristiche di emoglobina e mioglobina

L'emoglobina e la mioglobina, a causa della loro struttura terziaria e della loro diversa funzione all'interno dell'organismo, possono di essere considerate il paradigma di un'altra serie di proteine: gli enzimi regolati da altri enzimi regolatori.

Rispondono al legame con vari ligandi con cinetiche di reazione confrontabili a quelle di altri enzimi regolati da regolatori, questi ultimi regolatori determineranno di fatto la velocità del metabolismo.

La funzione di molte proteine richiede un legame reversibile con altre molecole (è il caso, ad esempio, degli enzimi) che prende spesso il nome di ligando. Il ligando, che può essere diverso dal substrato specifico, ha un sito di legame all'interno della proteina e per una particolare proteina possono esistere più siti per diversi ligandi.

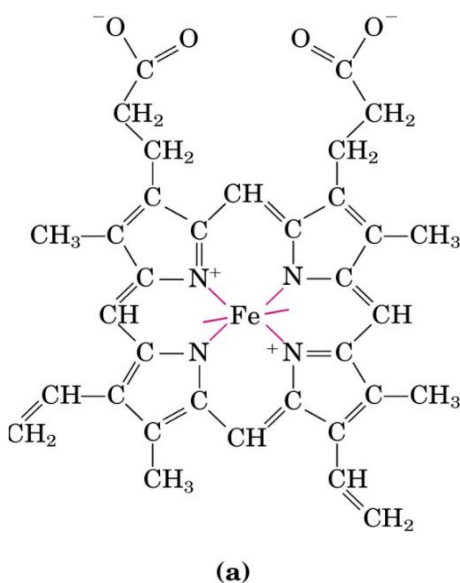
Un enzima di questo tipo è la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi che ha due siti di legame, uno per il NADH e un altro diverso per la gliceraldeide-3-fosfato. In seguito al legame dell'enzima con il substrato l'enzima va incontro a delle modificazioni conformazionali che aumentano l'affinità del sito attivo per il ligando corrispondente, si ha cioè quello che viene definito adattamento indotto.

Quando abbiamo una proteina con più subunità, il legame di un ligando con una di esse influenza anche le modificazioni conformazionali delle altre e di conseguenza il legame degli altri substrati/ligandi

Un'altra caratteristica è che l'interazione fra proteina e ligando può essere regolata.

La maggior parte delle proteine sono enzimi. Negli enzimi, il ligando viene chiamato substrato dell'enzima e il sito di legame viene chiamato preferibilmente sito catalitico perché lì avverrà la reazione enzimatica.

La mioglobina è una proteina costituita da un'unica subunità, si limita ad una struttura terziaria perché è monomerica. È costituita da circa 153 residui amminoisidici che si avvolgono formando 8 diverse alfa-eliche. All'interno della proteina è presente il cosiddetto gruppo eme, ovvero un anello protoporfirinico che lega una molecola di ferro nello stato di ossidazione Fe^{++} (ferroso).



Il gruppo eme si trova in una tasca poco accessibile ai solventi e questo evita che il ferro passi da uno stato di ossidazione a uno 3+ che non è in grado di legare l'ossigeno.

Il ferro ha sei legami di coordinazione:

4 sono tra il ferro e l'azoto dell'anello protoporfirinico, 2 sono perpendicolari al piano di questo anello protoporfirinico.

I legami perpendicolari sono di coordinazione e legano: uno un residuo di istidina detto prossimale, l'altro una molecola di ossigeno. L'istidina è detta prossimale perché subito dopo l'ossigeno ce ne sarà una distale che legherà particolari ligandi.

Per quanto riguarda le funzioni della mioglobina, questa conserva l'ossigeno a livello dei tessuti e lo rende disponibile quando è necessario. La struttura della mioglobina è vitale affinché essa possa svolgere la sua funzione mediante un legame di tipo reversibile.

La proteina più il ligando sono in equilibrio con il complesso proteina-ligando. Essendo questo un equilibrio chimico è possibile misurare la costante di associazione come:

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad K_a \text{ costante di associazione o costante di affinità fra P ed L}$$

L'inverso di questa equazione è la costante di dissociazione che è possibile misurare come:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad K_d \text{ costante di dissociazione di PL}$$

In tutti gli enzimi, più è piccolo il valore della costante di dissociazione, più sarà affine il substrato per l'enzima quindi: l'affinità del substrato per l'enzima è inversamente proporzionale al valore della costante di dissociazione.

Possiamo inoltre misurare la quantità di saturazione del ligando rispetto all'enzima considerando la reazione all'equilibrio e facendo il rapporto tra i siti di legame che sono occupati e il totale dei siti di legame. Questo rapporto viene indicato con theta (Θ).

Consideriamo un'equazione generica proteina più ligando in equilibrio con il complesso proteina-ligando: $P + L \leftrightarrow PL$; in questo caso i siti di legame occupati corrispondono al complesso PL mentre il totale dei siti corrisponde a $P + PL$.

Sostituendo nella formula della misura della saturazione avremo:

$$\Theta = \frac{\text{siti di legame occupati}}{\text{totale dei siti di legame}} = \frac{[PL]}{[PL] + [P]}$$

Per trovare un modo per misurare la concentrazione del complesso proteina-ligando possiamo sfruttare il valore della costante di associazione e avremo:

$$\Theta = \frac{K_a [P][L]}{K_a [P][L] + [P]} \quad \text{dopo aver sostituito: } [PL] = K_a [P][L] \quad K_a = \frac{[PL]}{[P][L]}$$

Mettendo poi in evidenza la concentrazione della proteina libera sia al numeratore che al

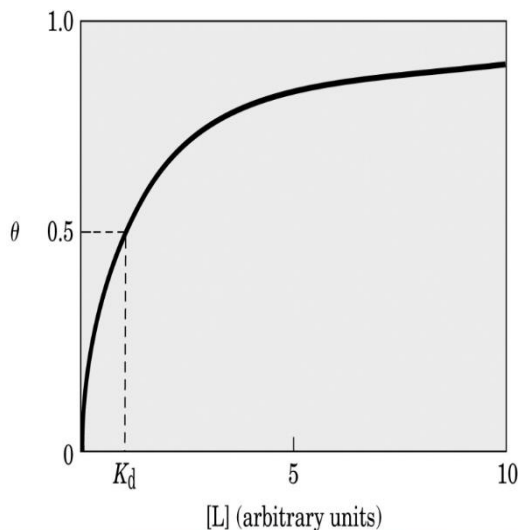
denominatore otteniamo:
$$\Theta = \frac{K_a [L]}{K_a [L] + 1}$$

Dividiamo poi per K_a sia il numeratore che il denominatore e otteniamo:
$$\Theta = \frac{[L]}{[L] + \frac{1}{K_a}}$$

L'inverso di $\frac{1}{K_a}$ equivale a K_d quindi molte volte è più intuitivo esprimere K_a come costante di

dissociazione K_d ovvero come reciproco di K_a :
$$\Theta = \frac{[L]}{[L] + K_d}$$

Quando la metà dei siti della proteina sono occupati:



Otteniamo infine l'equazione di un'iperbole equilatera. Sull'asse delle ordinate sono rappresentati i valori di saturazione e vanno da un minimo di 0 ad un massimo di 1 (100%).

A concentrazione di saturazione pari al 50%, la concentrazione del ligando è pari alla costante di dissociazione (K_d). Sull'asse delle ascisse invece troviamo la concentrazione del ligando.

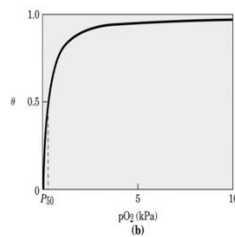
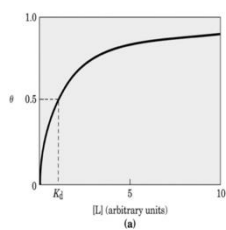
K_d è uguale alla concentrazione del ligando, la concentrazione di proteina libera è uguale alla concentrazione del complesso proteina-ligando (quindi $K_d = [L]$).

Più è piccola la K_d maggiore è l'affinità del substrato per la proteina.

ARGOMENTI SECONDA PARTE: Mioglobina, Emoglobina, Equazione di Hill

$$\theta = \frac{[L]}{[L] + K_d}$$

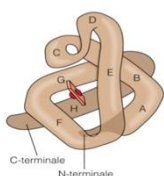
$$\theta = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}}$$



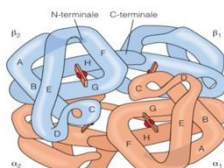
Poiché l'ossigeno è un gas è più facile misurare la sua pressione come pressione parziale, indicandola come P_{50} ???

Quindi indichiamo le concentrazioni del ligando come pressione parziale dell'ossigeno e la costante di dissociazione come fratto la pressione parziale dell'ossigeno + P_{50} . Non cambia nulla rispetto alla formula precedente e il grafico rimane sempre un'iperbole, solo che questo è un altro modo per misurare le pressioni dei gas. Dove θ è pari a 0,50, quindi alla metà dei siti saturati, la pressione parziale corrisponde a P_{50}

MIOGLOBINA



EMOGLOBINA

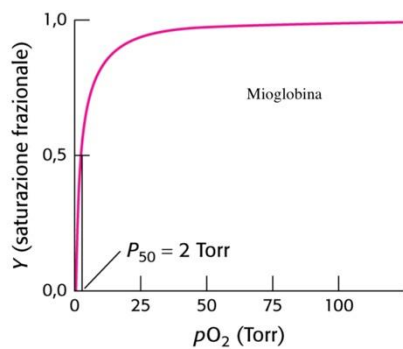


In questo lucido viene messa a confronto la struttura della mioglobina con la struttura delle subunità dell'emoglobina, è evidente che le strutture siano praticamente identiche, eppure le due proteine funzionano in maniera assolutamente diversa.

Com'è fatta la struttura dell'emoglobina e qual è la sua funzione?

L'emoglobina è formata da quattro subunità, due alfa e due beta. Ciascuna delle quattro subunità presenta il piano protoporfirinico con l'anello dell'eme e lega un atomo di ferro.

Le 4 subunità sono tutte strutturalmente uguali alla mioglobina, eppure le due proteine assolvono a funzioni completamente diverse, pur legando lo stesso tipo di substrato. Entrambe le proteine devono essere in grado di legare l'ossigeno e di rilasciarlo ma lo fanno con modalità diverse. Sostanzialmente l'emoglobina prende l'ossigeno a livello dei polmoni per rilasciarlo a livello dei tessuti dove questo, se non viene utilizzato, viene inglobato nella mioglobina. A livello dei tessuti, l'emoglobina ha anche la funzione di prendere l'anidride carbonica e portarla ai polmoni dove sarà espulsa tramite la respirazione. Quindi due proteine che hanno apparentemente lo stesso tipo di struttura si comportano in maniera diversa rispetto allo stesso substrato che, in questo caso, è l'ossigeno.



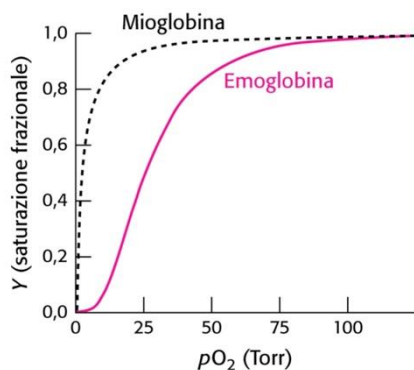
Questa, che è quella vista prima, è sempre la funzione di saturazione della mioglobina, ma se questa fosse la curva dell'emoglobina potrebbe quest'ultima svolgere il suo ruolo?

Se l'emoglobina avesse questo andamento, non potrebbe assolvere alla sua funzione.

Analizzando il grafico notiamo come la pressione parziale dell'ossigeno a livello del polmone corrisponda a 100 Torr con saturazione pari a 1. La pressione parziale dell'ossigeno a livello dei tessuti è invece circa 20 Torr con saturazione pari a

circa l'80%, ciò significa che se l'emoglobina avesse questo andamento cinetico, è vero che prenderebbe ossigeno a livello dei polmoni, ma poi ne rilascerebbe solo una quota pari al 20% a livello dei tessuti perché a livello dei tessuti manterrebbe un'alta affinità per l'ossigeno. Quindi questo andamento iperbolico non sarebbe compatibile con la funzione che essa deve svolgere.

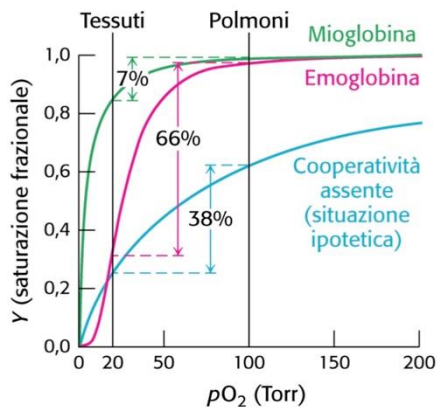
Le funzioni a cui assolve l'emoglobina sono: trasporto dell'ossigeno tra polmoni e tessuti, caricamento e trasporto della CO_2 , tampone per il sangue grazie alla capacità di legare protoni (H^+) mantenendo il pH inalterato per piccole modificazioni ed è anche in grado di trasportare NO (monossido di azoto) che è un vasodilatatore. A tutti questi compiti l'emoglobina riesce ad assolvere grazie alla sua struttura quaternaria formata da 4 subunità proteiche.



Grazie a questa struttura, la curva di dissociazione e di affinità dell'emoglobina per l'ossigeno si modifica rispetto a quella della mioglobina nel seguente modo: l'emoglobina ha un andamento sigmoidale o sigmoide, quindi a livello dei polmoni la sua saturazione dell'ossigeno è sempre altissima, mentre a livello dei tessuti è circa un 20%, quindi l'emoglobina qui perde la sua affinità per l'ossigeno e lo rilascia ai tessuti dove trova la mioglobina che invece ha un'affinità altissima per mantenerlo nei tessuti stessi. Quando ci si trova davanti a questo andamento cinetico sigmoidale e a questo tipo di legame reversibile del

substrato con la proteina, si è di fronte al fenomeno della cooperatività, ovvero: una volta che il primo ossigeno si è legato alla prima subunità, questo determina un cambio conformazionale anche delle altre subunità che le rende più affini verso il substrato stesso. Questo tipo di effetto di modificazione conformazionale delle subunità viene chiamato "legame cooperativo".

Quindi, ogni volta che ci troviamo davanti a una struttura proteica, dobbiamo considerare la sua funzione. Nel caso di ossigeno, emoglobina e mioglobina dobbiamo tener presente che tra polmoni e tessuti c'è una diversa pressione parziale e quindi una diversa concentrazione di ossigeno.



In questo grafico sono mostrate la curva di saturazione dell'emoglobina e quella della mioglobina, la curva azzurra sarebbe l'andamento iperbolico che si avrebbe se l'emoglobina non avesse il fenomeno di cooperatività. Se confrontiamo la curva dell'emoglobina (rossa) con quella della mioglobina, a livello dei polmoni entrambe le proteine hanno un'alta affinità per l'ossigeno, ma quando si scende a livello dei tessuti, la percentuale di ossigeno che l'emoglobina riesce a legare è solo del 20%, quindi rilascia una quota tra il 70% e l'80% di ossigeno, mentre a livello dei tessuti la mioglobina continua a mantenere un'elevata affinità

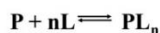
per l'ossigeno, ciò significa che la sua affinità per l'ossigeno si abbassa di poco.

Un modo utile per descrivere questo fenomeno di cooperatività è il Grafico di Hill.

E' necessario considerare sempre l'equilibrio tra proteina e ligando ed è anche fondamentale considerare in questo equilibrio il valore n (che può assumere valori interi o frazionari) ed è una misura del grado di cooperatività del legame tra il ligando e la proteina.

Un modo utile per descrivere quantitativamente il legame di tipo cooperativo, com'è quello dell'emoglobina, è stato sviluppato da Archibald Hill nel 1913. **Grafico di Hill**

Consideriamo l'equilibrio fra proteina e ligando



dove n è un parametro che può assumere valori interi o frazionari ed è una misura del grado di cooperatività del legame del Ligando (L)

Il valore massimo di n che si potrebbe raggiungere nell'emoglobina è 4, perché 4 sono le subunità dell'emoglobina e questo valore si raggiungerebbe se il legame tra emoglobina e substrato fosse totalmente cooperativo, se invece il legame con il substrato fosse totalmente NON cooperativo, il valore di n dovrebbe essere pari a 1.

utilizzando lo stesso ragionamento fatto per la mioglobina possiamo dire che



E' uguale a

$$\theta = \frac{pO_2^n}{pO_2^n + P_{50}^n}$$

Quindi il theta, cioè la percentuale di saturazione dell'emoglobina, sarà sempre uguale alla concentrazione dell'ossigeno, ma questa volta si deve elevare ad n che è il valore di cooperatività, fratto la concentrazione dell'ossigeno elevato ad $n + P_{50}$ che è la K_d dell'equazione vista all'inizio. L'equazione è la stessa però bisogna elevare i termini al numeratore e denominatore per n (il grado di cooperatività).

Attraverso dei passaggi matematici si può trasformare l'equazione precedente nell'equazione di Hill.

$$\frac{\theta}{1-\theta} = \frac{pO_2^n}{P_{50}^n}$$

n sperimentalmente non corrisponde al numero di siti legame, ma al grado di interazione tra loro.

Riportando questa equazione in termini di logaritmo si ottiene l'equazione di Hill

$$\log \left(\frac{\theta}{1-\theta} \right) = n \log pO_2 - n \log P_{50}$$

$$\theta = \frac{pO_2^n}{pO_2^n + P_{50}^n}$$

$$\theta pO_2^n + \theta P_{50}^n = pO_2^n$$

dividendo per $[pO_2]^n$ otteniamo

$$\theta + \theta \frac{P_{50}^n}{pO_2^n} = 1$$

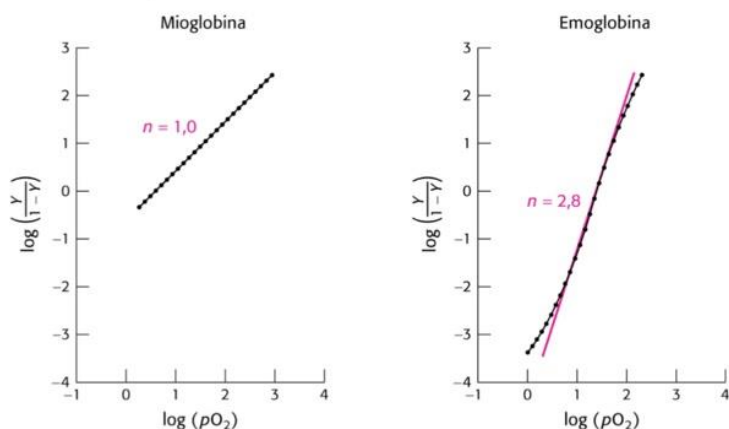
$$\theta + \theta \frac{P_{50}^n}{pO_2^n} = 1$$

$$\theta \frac{P_{50}^n}{pO_2^n} = 1 - \theta \quad \frac{P_{50}^n}{pO_2^n} = \frac{1-\theta}{\theta}$$

$$\frac{\theta}{1-\theta} = \frac{pO_2^n}{P_{50}^n}$$

Quello che si ottiene è l'equazione di una retta, dove n è la pendenza della retta stessa. Quindi la pendenza della retta è uguale al coefficiente di Hill, ovvero al grado di cooperatività della proteina.

se si mette in grafico $\log \left(\frac{\theta}{1-\theta} \right)$ in funzione di $\log pO_2$ si ottiene una retta
 Che rappresenta il grafico di Hill ed n prende il nome di coefficiente di Hill (n_H)
 Ed è data dalla pendenza della retta



L'equazione di Hill si può applicare a qualsiasi tipo di proteina, ovviamente anche ad emoglobina e mioglobina.

La mioglobina che grado di cooperatività avrà? n è 1, quindi né basso e né alto.

Se si riporta il grafico di Hill della mioglobina, il grafico corrisponde esattamente alla $n = 1$, quindi non ci saranno variazioni. Invece se si riporta, secondo il grafico di Hill, l'equazione dell'emoglobina, la tangente a questa retta che ha $n = 2,8$, ci dà il grado della sua cooperatività. Essa ha una cooperatività per l'ossigeno, ma non è massima e ciò è necessario per la funzionalità della proteina stessa, dato che se la cooperatività fosse massima non riuscirebbe a rilasciarlo.

Se $n = 1$ la proteina non ha cooperatività, n può assumere anche valori positivi e negativi. Qualunque proteina composta da un'unica unità non avrà fenomeni di cooperatività e ciò significa che n sarà uguale ad 1.

Per una proteina costituita da più subunità, come nel caso dell'emoglobina, può assumere valori positivi e negativi.

Quando $n > 1$ si è in presenza di fenomeni di cooperatività positivi, cioè agevolano il legame con il substrato.

Quando $n < 1$ si è in presenza di fenomeni di cooperatività negativi, ciò determina una scarsa affinità per quel substrato.