

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA VETERINARIA

CORSO INTEGRATO: FISICA, CHIMICA
E PROPEDEUTICA BIOCHIMICA (10 CFU)

MODULO:
PROPEDEUTICA BIOCHIMICA ED ELEMENTI DI
BIOLOGIA MOLECOLARE (4 CFU)

Roberto Giacomini Stuffer

IL MODULO

"PROPEDEUTICA BIOCHIMICA ED ELEMENTI DI
BIOLOGIA MOLECOLARE" (4 CFU)

È SUDDIVISO IN DUE UNITÀ DIDATTICHE:

A) UNITÀ DIDATTICA

"PROPEDEUTICA ALLA BIOCHIMICA" (2 CFU)

B) UNITÀ DIDATTICA

"BIOLOGIA MOLECOLARE" (2 CFU)

L'UNITÀ DIDATTICA "PROPEDEUTICA ALLA BIOCHIMICA" COMPRENDE:

- 1) I LIPIDI
- 2) I CARBOIDRATI
- 3) GLI AMMINOACIDI E LE PROTEINE
- 4) LE PROTEINE DEL CONNETTIVO
- 5) LA MIOGLOBINA E L'EMOGLOBINA

L'UNITÀ DIDATTICA "BIOLOGIA MOLECOLARE" COMPRENDE:

- 6) LE MEMBRANE BIOLOGICHE
- 7) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEI PROCARIOTI (A)
- 8) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEI PROCARIOTI (B)
- 9) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEGLI EUCARIOTI
- 10) LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

UNITÀ DIDATTICA
"PROPEDEUTICA ALLA BIOCHIMICA" (2 CFU)

VET.
UNITÀ DIDATTICA "PROPEDEUTICA ALLA BIOCHIMICA"

LA MIOGLOBINA e L'EMOGLOBINA

Roberto Giacomini Stuffer

LA MIOGLOBINA E L'EMOGLOBINA

I vertebrati hanno selezionato due meccanismi principali per rifornire le loro cellule di ossigeno:

1) il sistema circolatorio

2) le molecole che legano l'ossigeno:

A) L'EMOGLOBINA (Hb),

B) LA MIOGLOBINA (Mb).

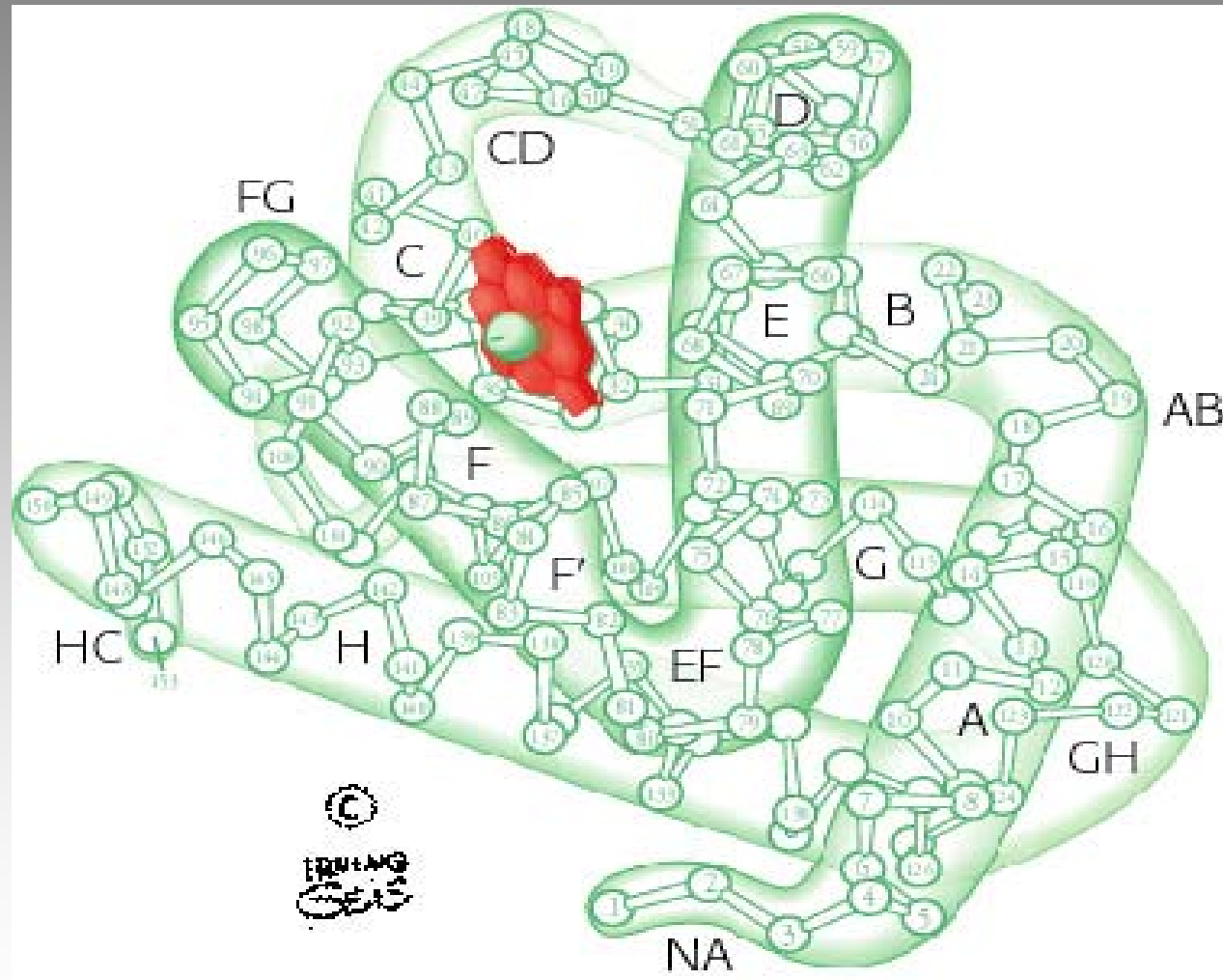
LA MIOGLOBINA E L'EMOGLOBINA

Esse appartengono alla famiglia delle "globine",

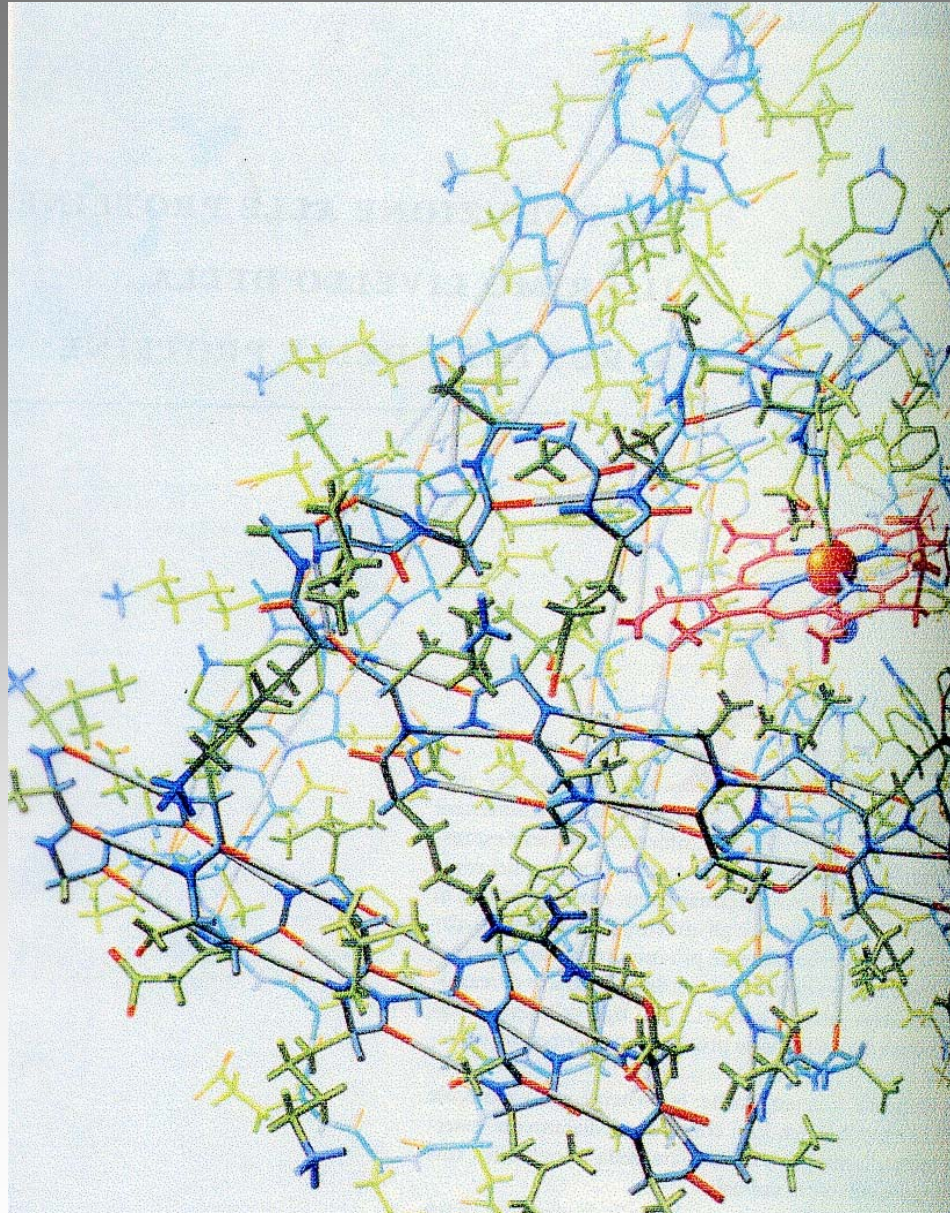
la **mioglobina** è la proteina di immagazzinamento dell' O_2 in tutte le specie animali,

l'**emoglobina** trasporta l' O_2 in tutti i vertebrati ed in alcuni invertebrati; essa rimuove anche la CO_2 dai tessuti.

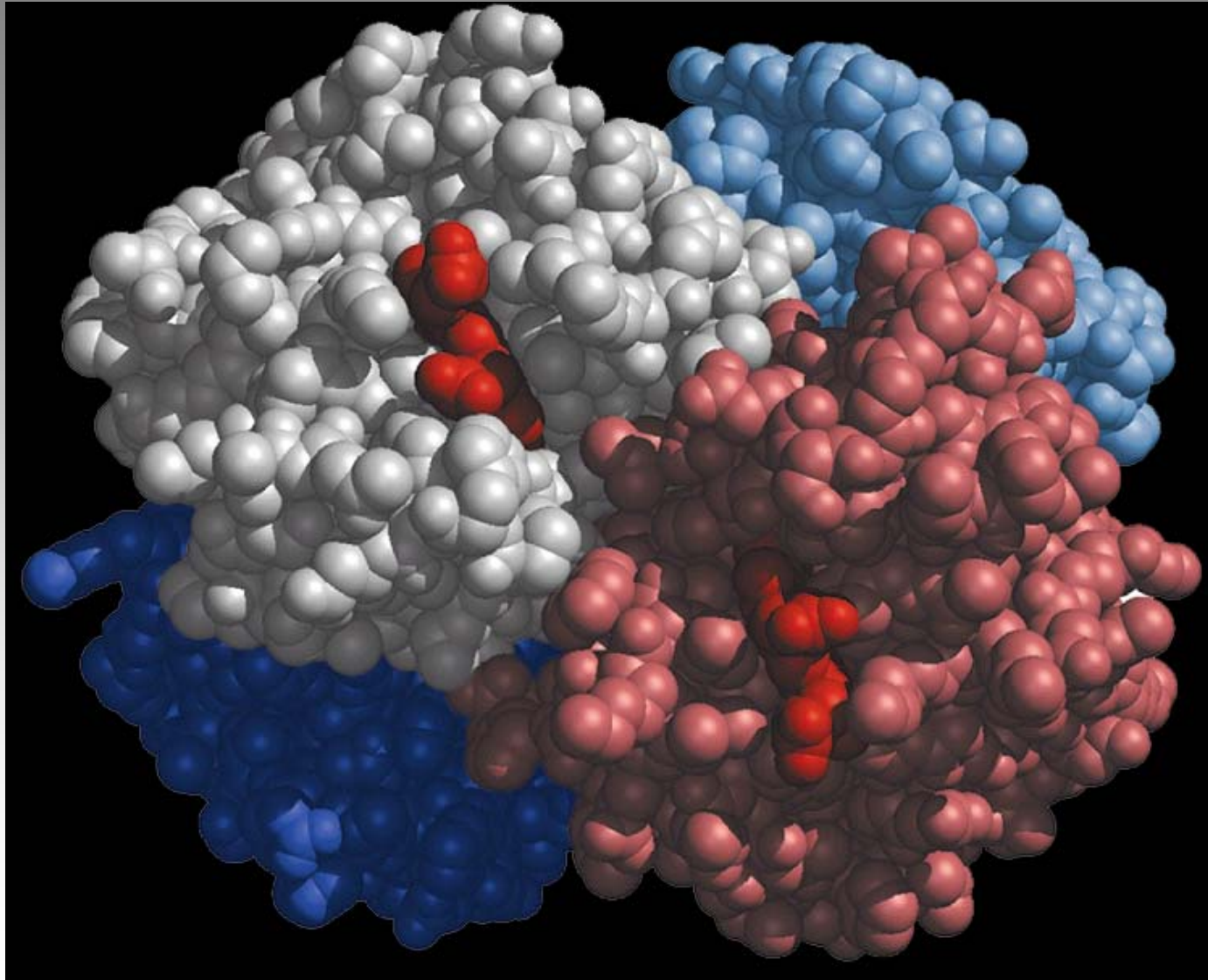
LA MIOGLOBINA



**LA STRUTTURA
TRIDIMENSIONALE
DELLA MIOGLOBINA**

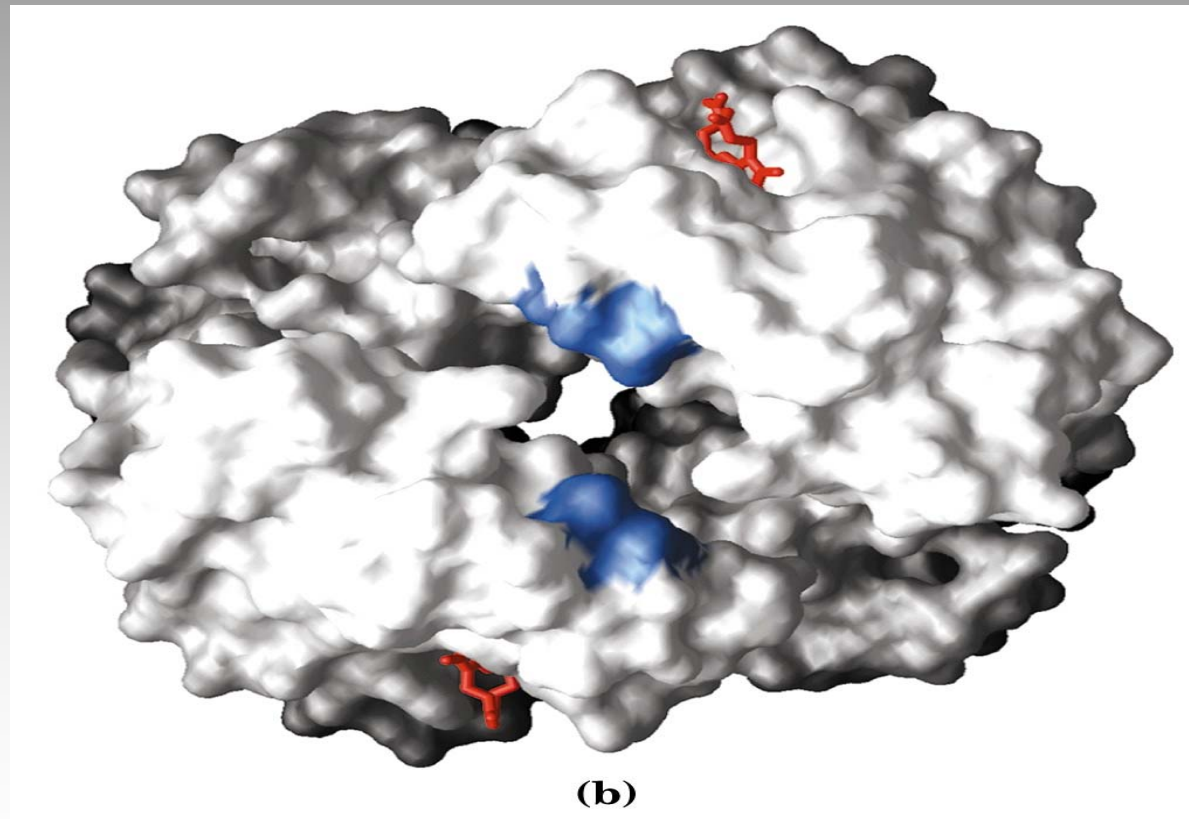


L'EMOGLOBINA

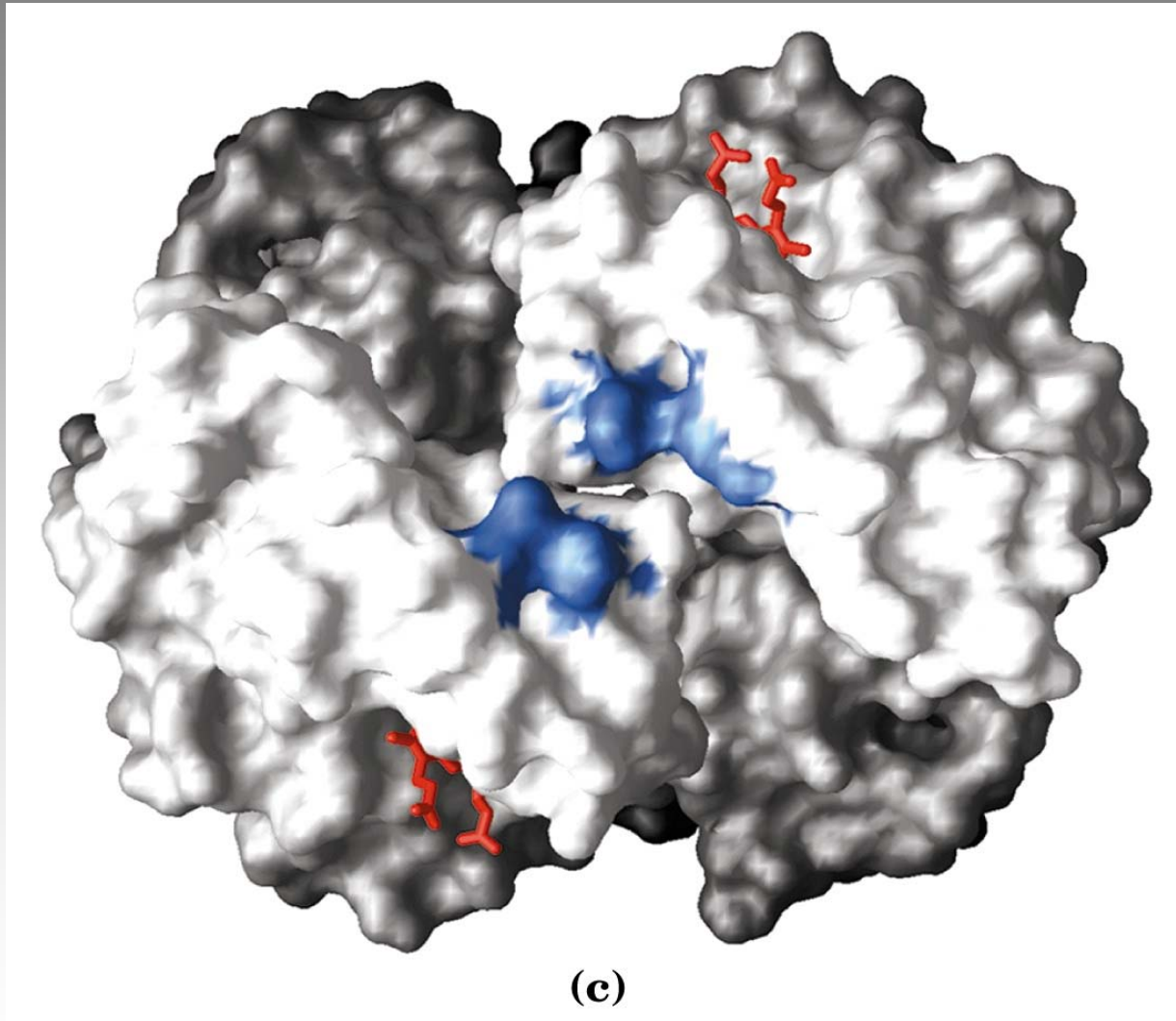


L'EMOGLOBINA

L'emoglobina é una proteina tetramérica, costituita da quattro subunità, ciascuna delle quali somiglia fortemente alla mioglobina.



L'EMOGLOBINA



LA MIOGLOBINA E L'EMOGLOBINA

Esse devono essere in grado di:

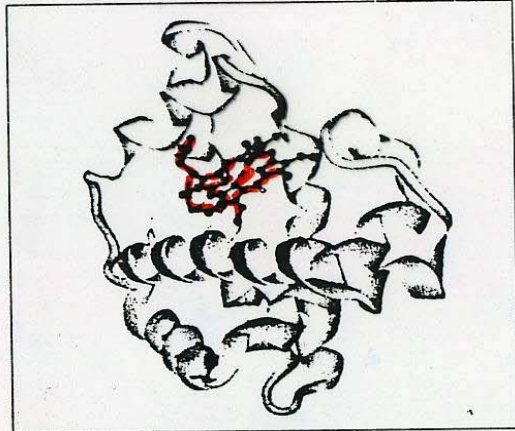
- 1) legare l'O₂,
- 2) impedire che esso ossidi altre sostanze
(che ridurrebbero l'O₂),
- 3) rilasciarlo in risposta a specifiche richieste.

LA MIOGLOBINA E L'EMOGLOBINA

Alcuni metalli di transizione, nei loro stati di ossidazione più bassi (es. Fe^{2+} , Cu^+), hanno la tendenza a legare l'ossigeno,

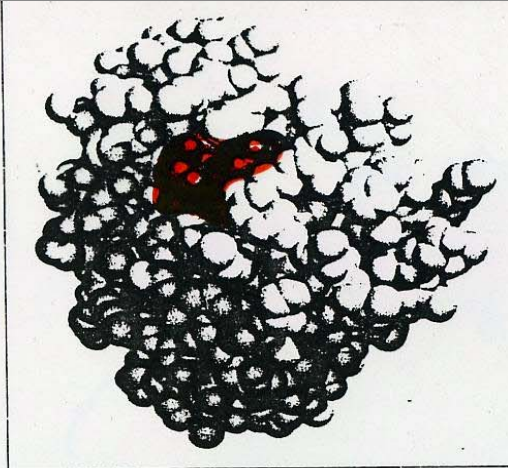
l'evoluzione ha prodotto una modalità con cui il Fe^{2+} (ione ferroso) può essere legato alle proteine (Mb e Hb), per creare siti di legame per l' O_2 .

LA STRUTTURA TERZIARIA DELLA MIOGLOBINA DI CAPODOGLIO

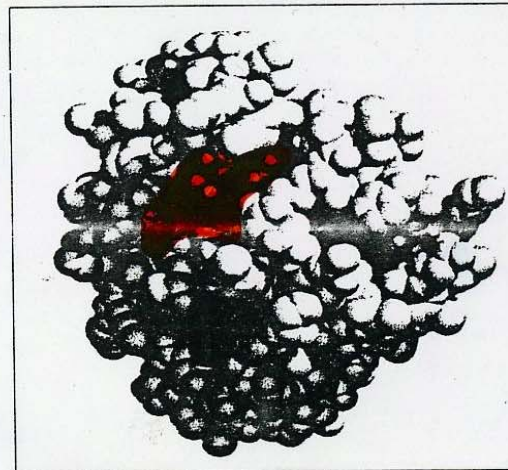


(a)

SCELETRO DEL POLIPEPTIDE
SOTTO FORMA DI NASTRO
(ZONE IN α ELICA)

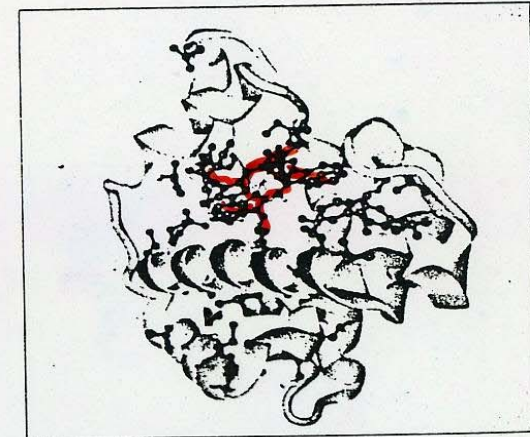


CATENE LATERALI DEGLI AA.



MOD. SPAZIALE

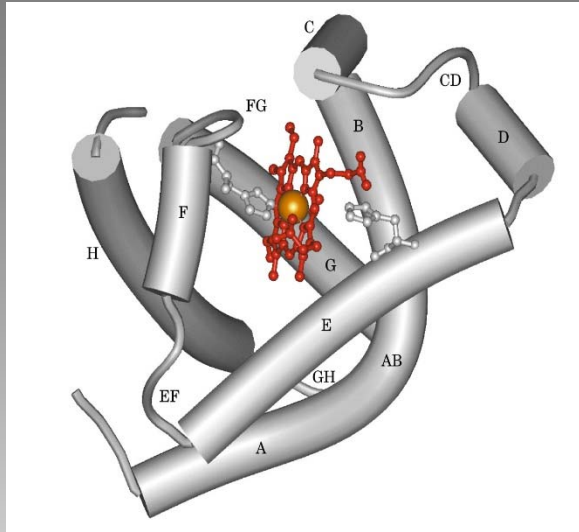
(d)



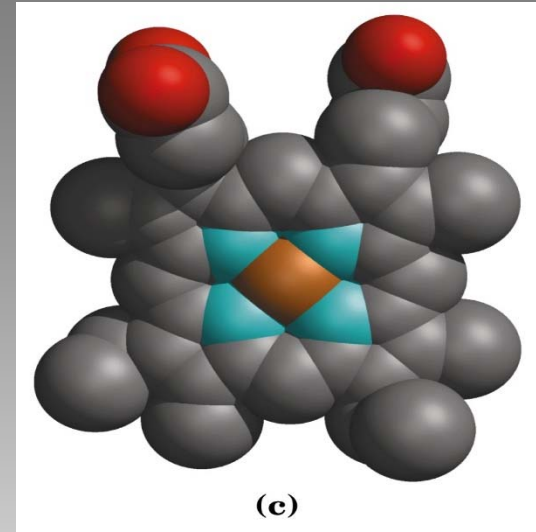
(c)

2- CATENE LATERALI DEI
RESIDUI IDROFOBICI: LEU-ILE-
VAL-PHE.

LA MIOGLOBINA



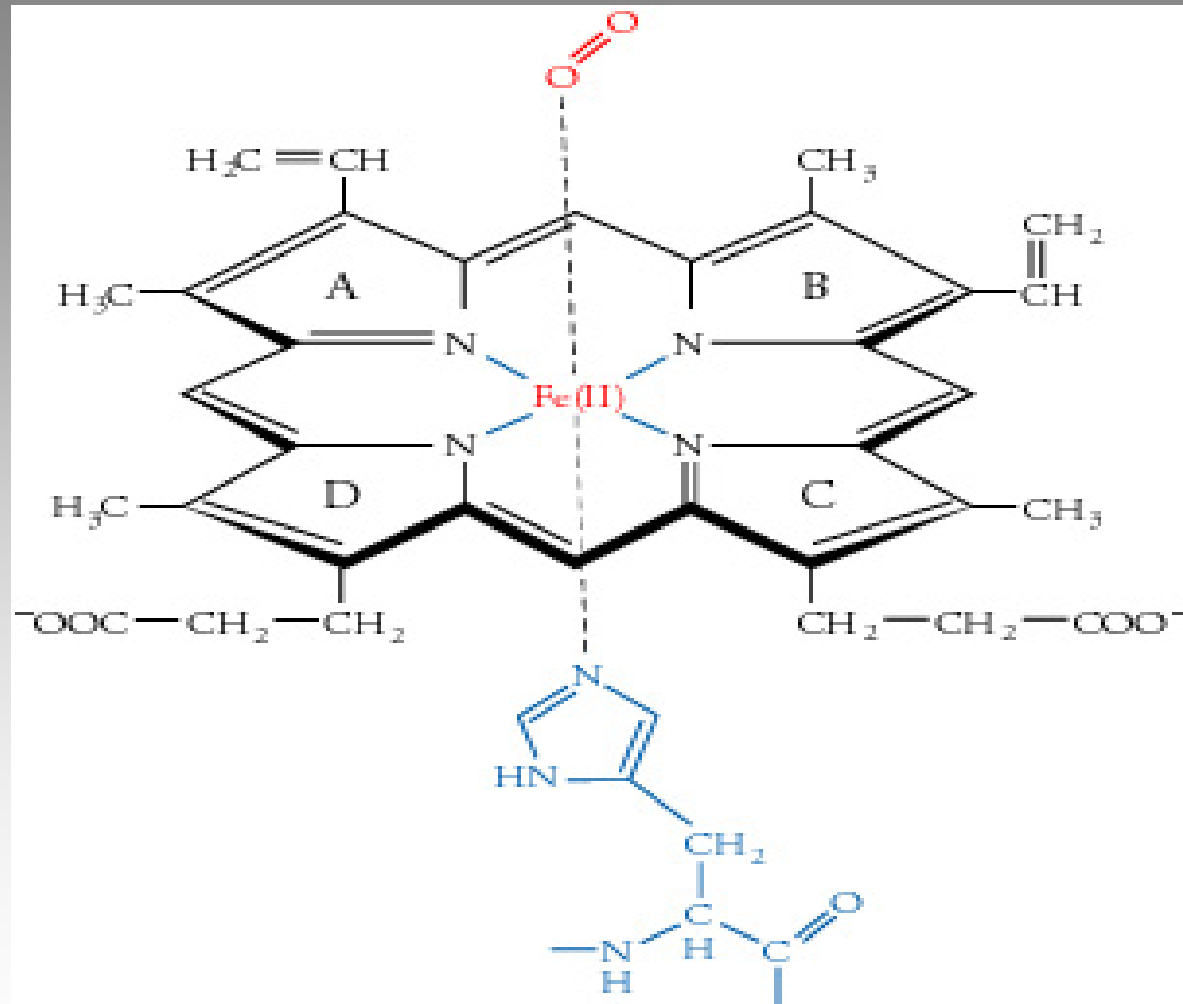
La struttura della
mioglobina e del suo
gruppo eme.



La mioglobina comprende una parte polipeptidica (globina)
ed un gruppo prostetico:
il gruppo eme.

Il gruppo eme è formato da:
una parte organica **la protoporfirina IX**
ed un atomo di **ferro.**

IL GRUPPO EME



IL GRUPPO EME

La protoporfirina IX è formata da **4** anelli pirrolici, legati tra di loro a formare un **anello tetrapirrolico**, con legati 4 gruppi metilici, 2 gruppi vinilici e 2 gruppi propionici;

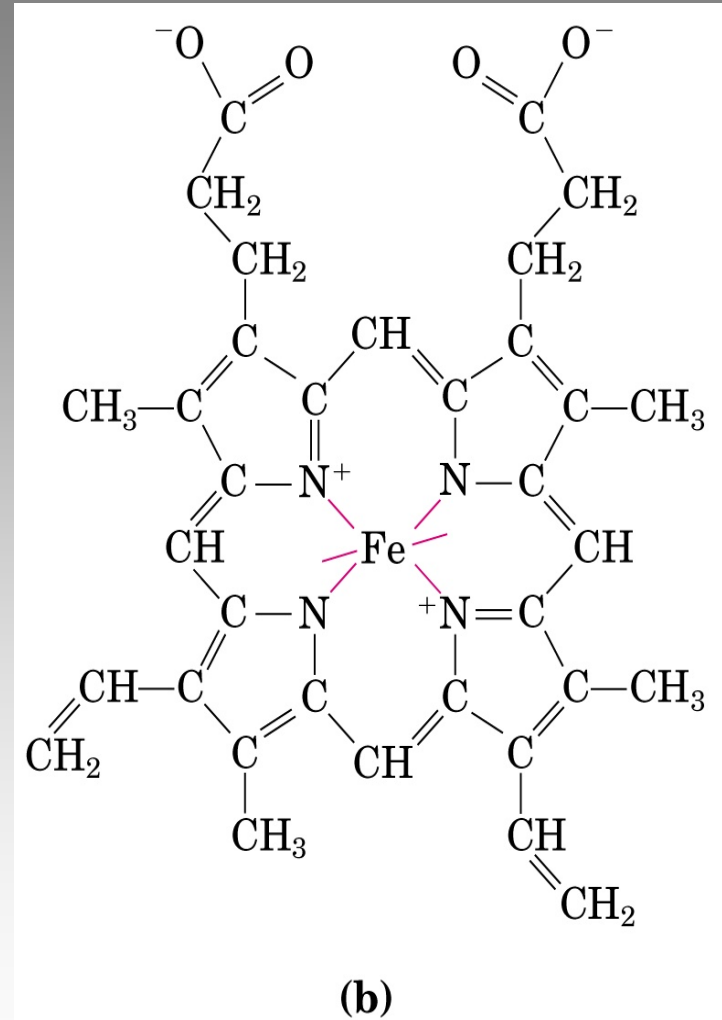
l'atomo di ferro forma **6** legami di coordinazione:

i primi **4** con gli atomi di azoto dell'anello tetrapirrolico,

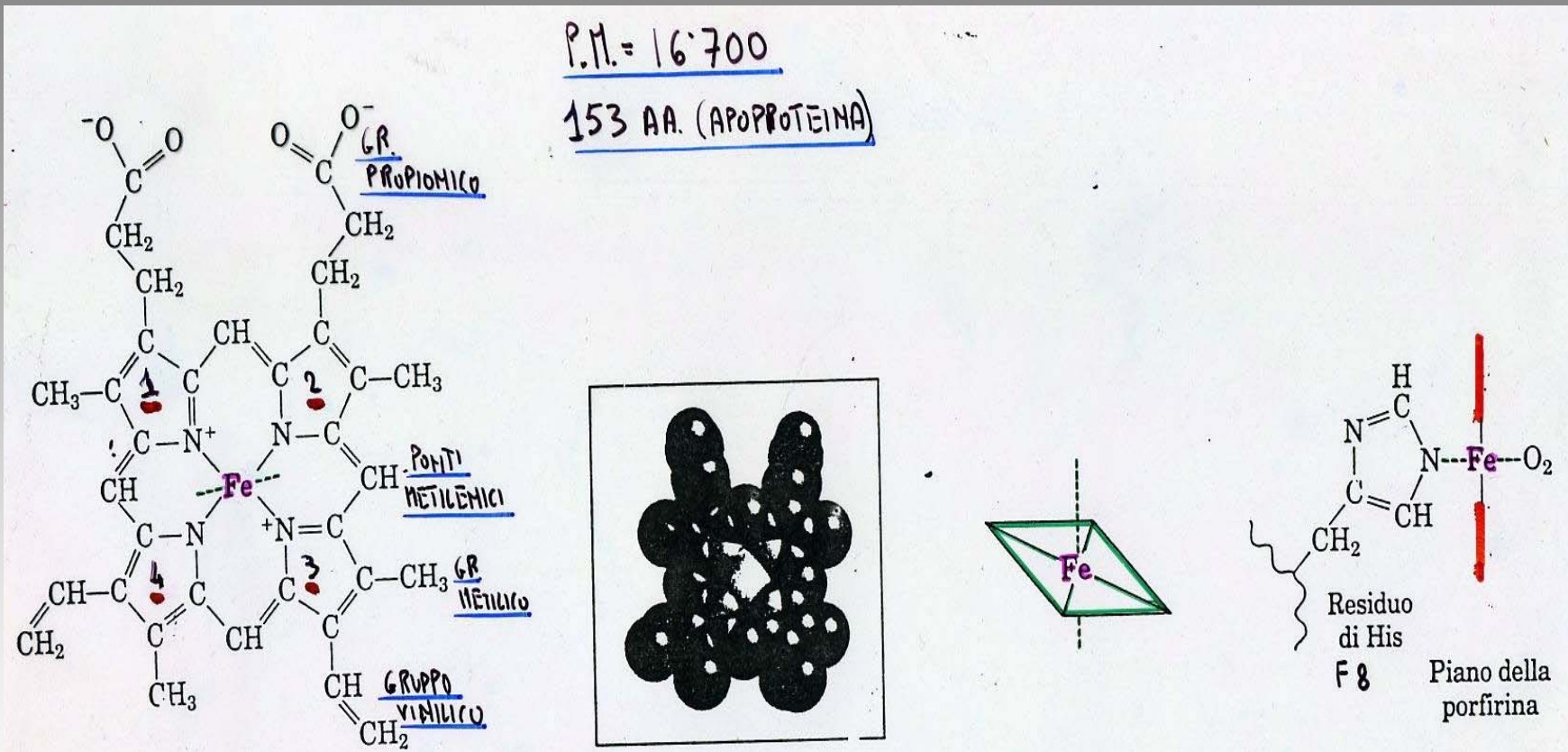
gli altri **2**, addizionali, su ciascun lato del piano dell'eme, sono

il **5°** con l'His prossimale (F8),

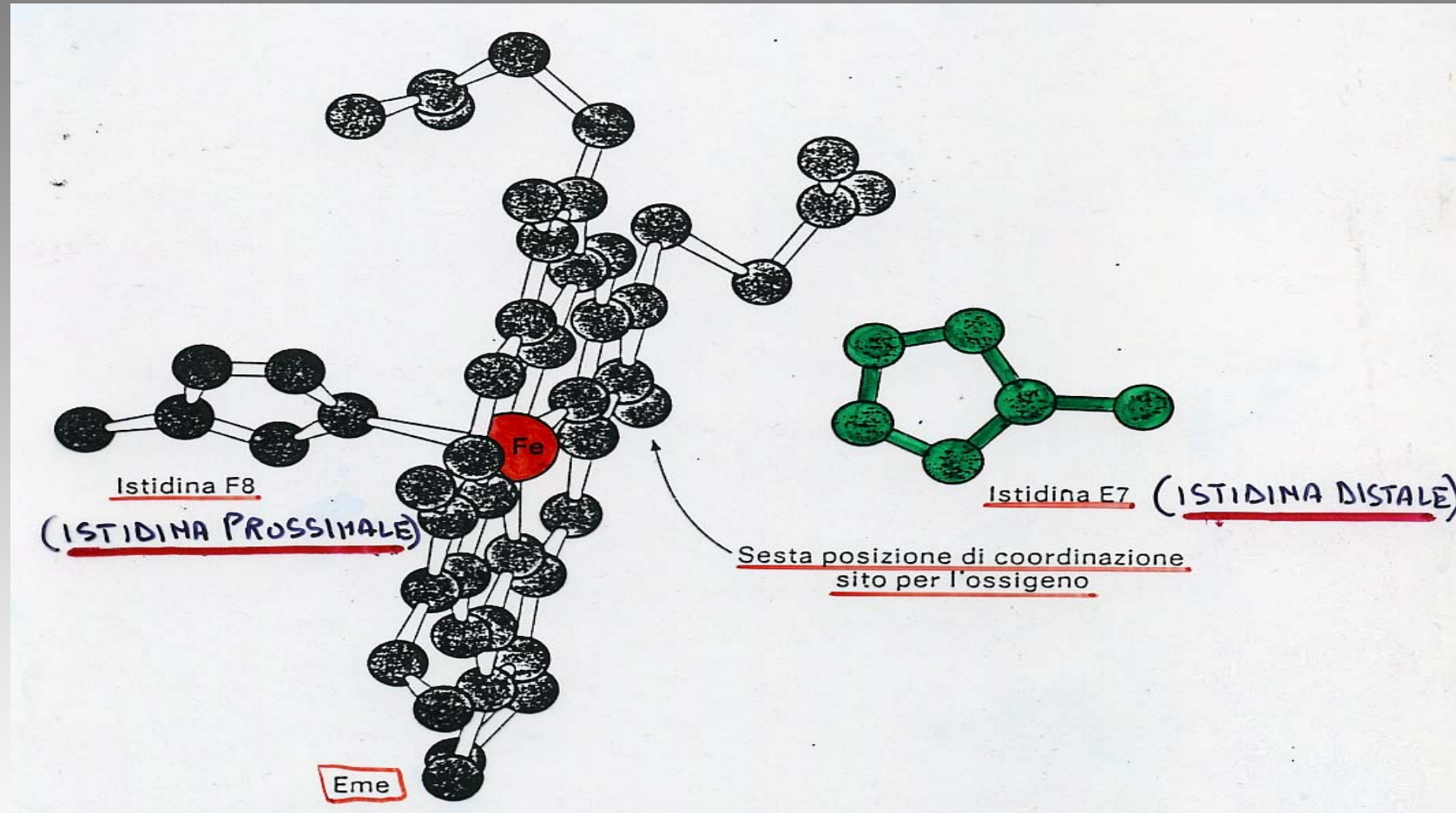
il **6°** con l'O₂, oppure con altre molecole.



IL GRUPPO EME DELLA Mb ED Hb

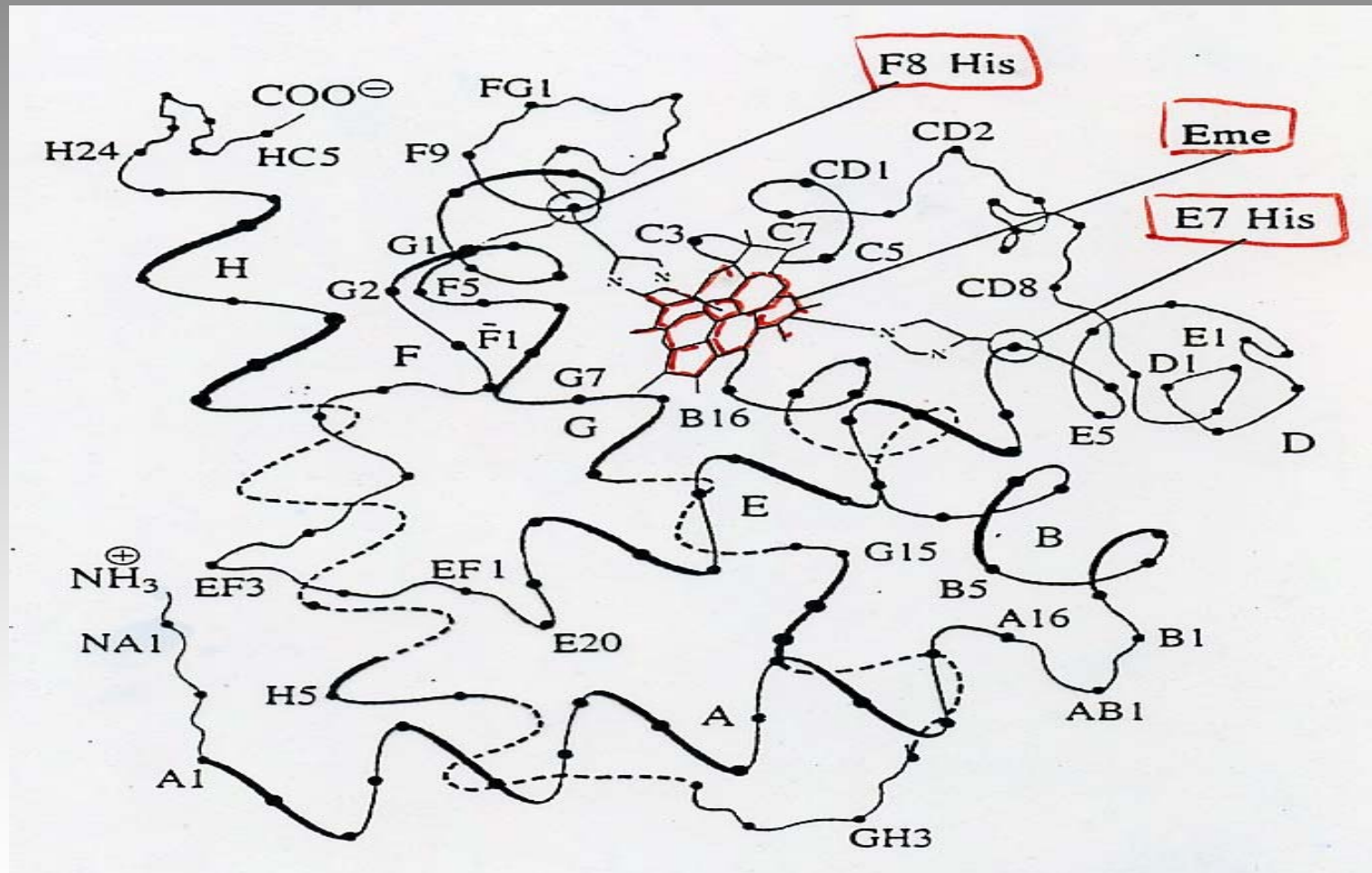


IL GRUPPO EME

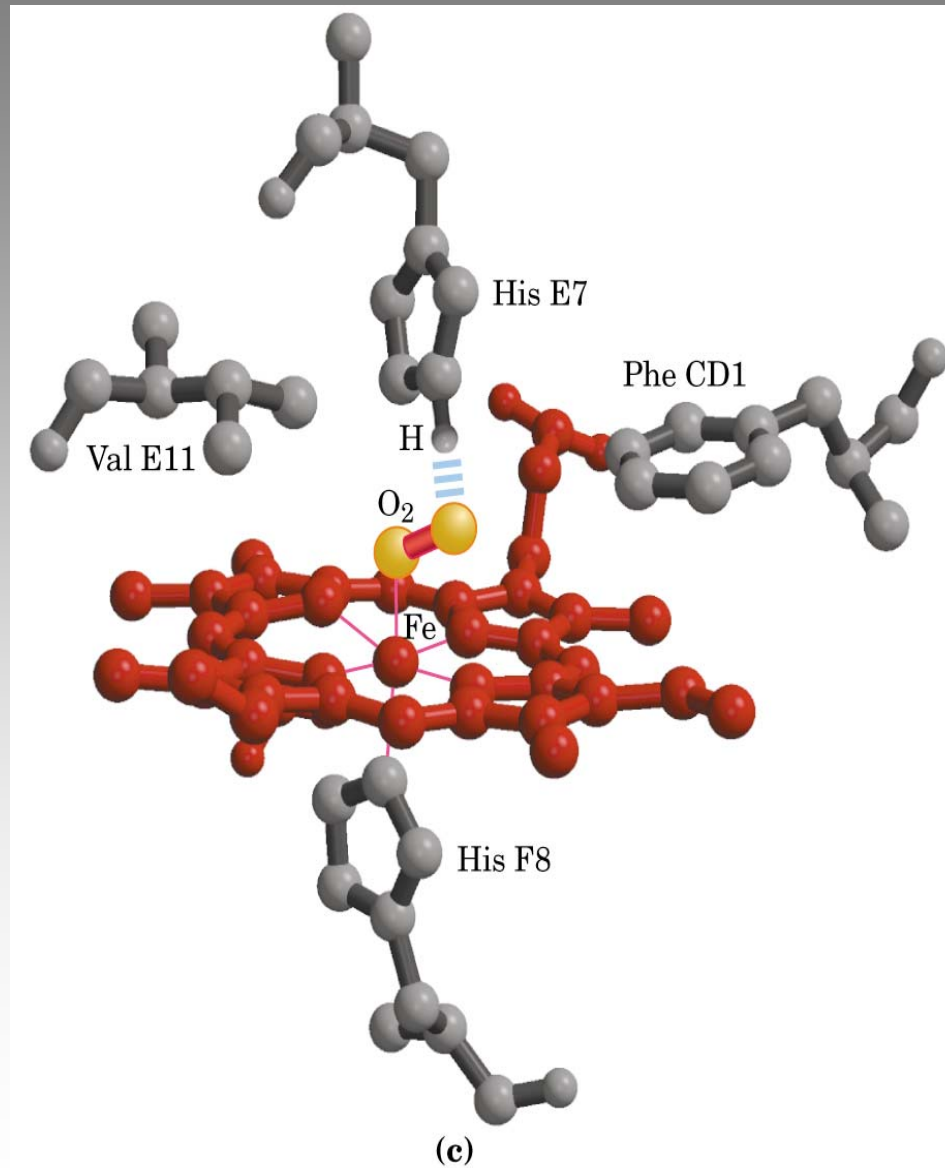


L'atomo di ferro é di 0.03 nm al di fuori del piano della porfirina, quando la **sesta** posizione di coordinazione é vuota.

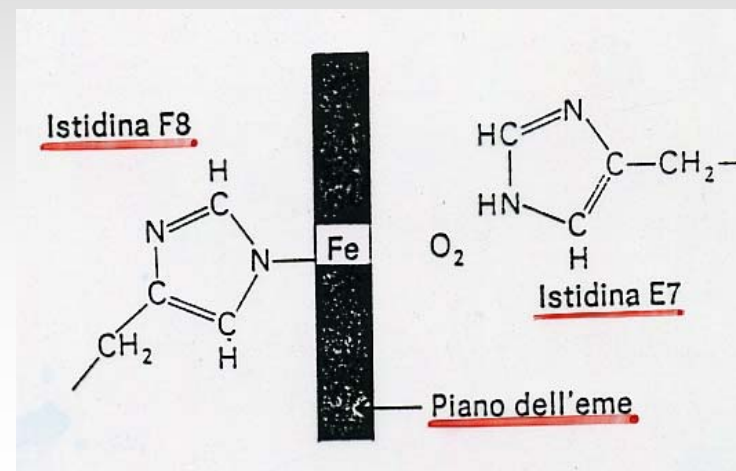
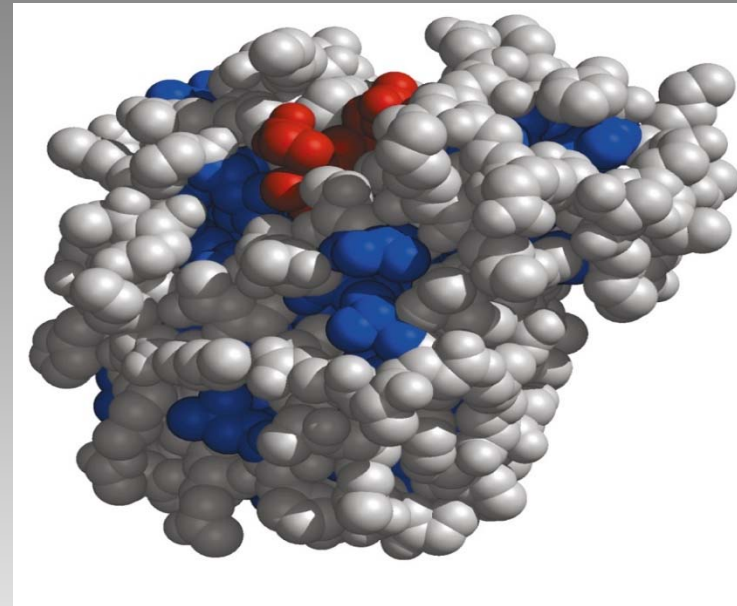
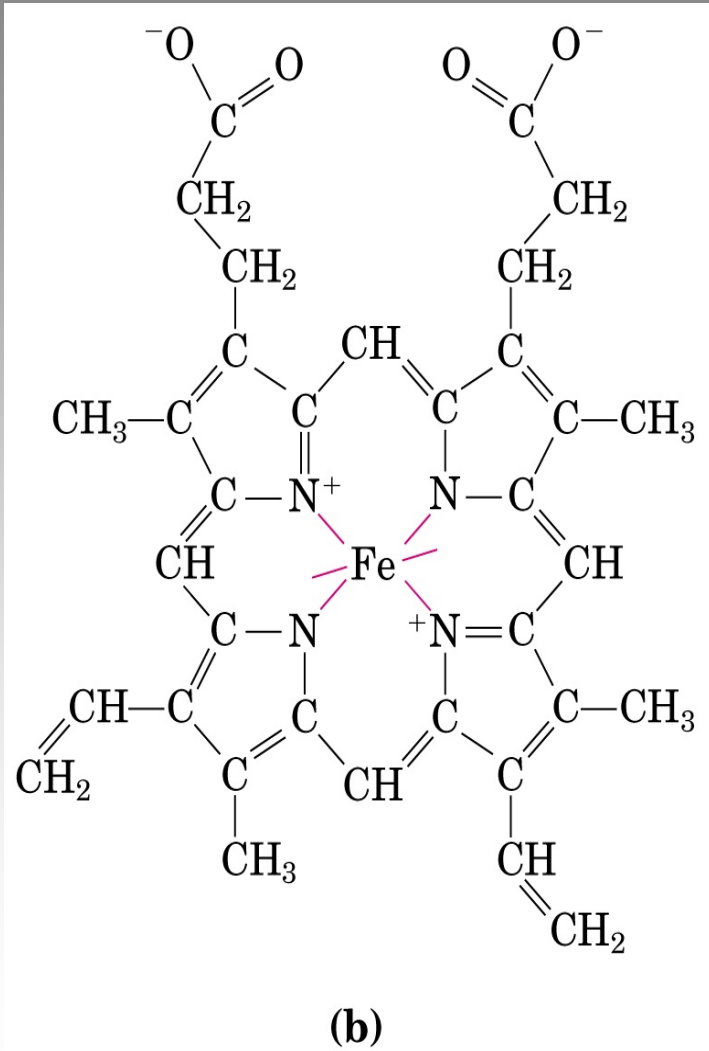
IL GRUPPO EME É LOCALIZZATO IN UNA CAVITÀ PRESENTE NELLA MOLECOLA DELLA Mb



IL GRUPPO EME DELLA Mb ED Hb

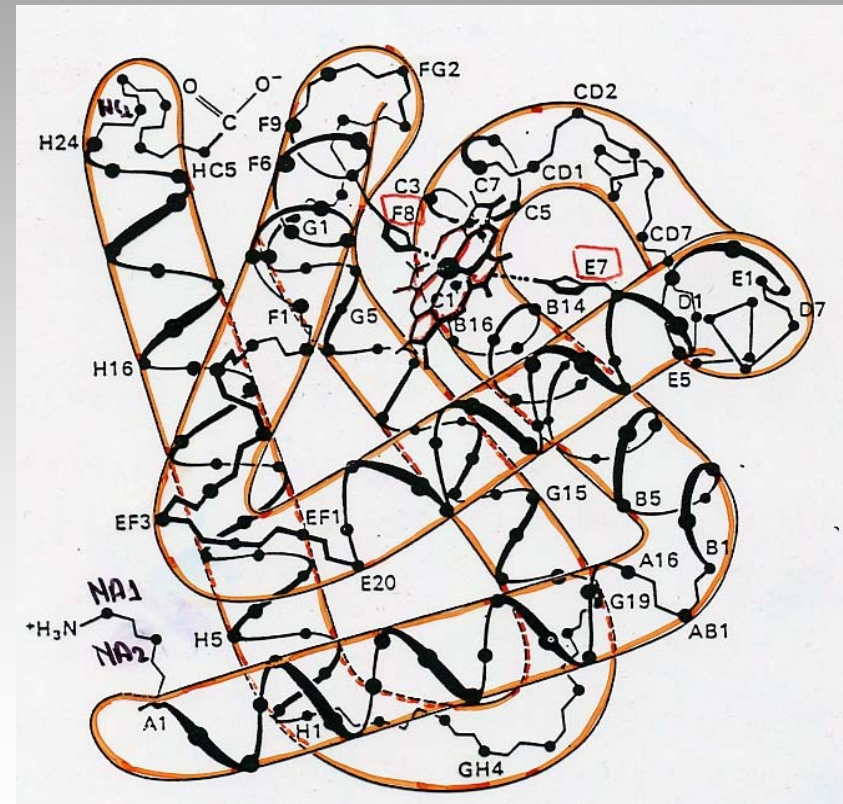
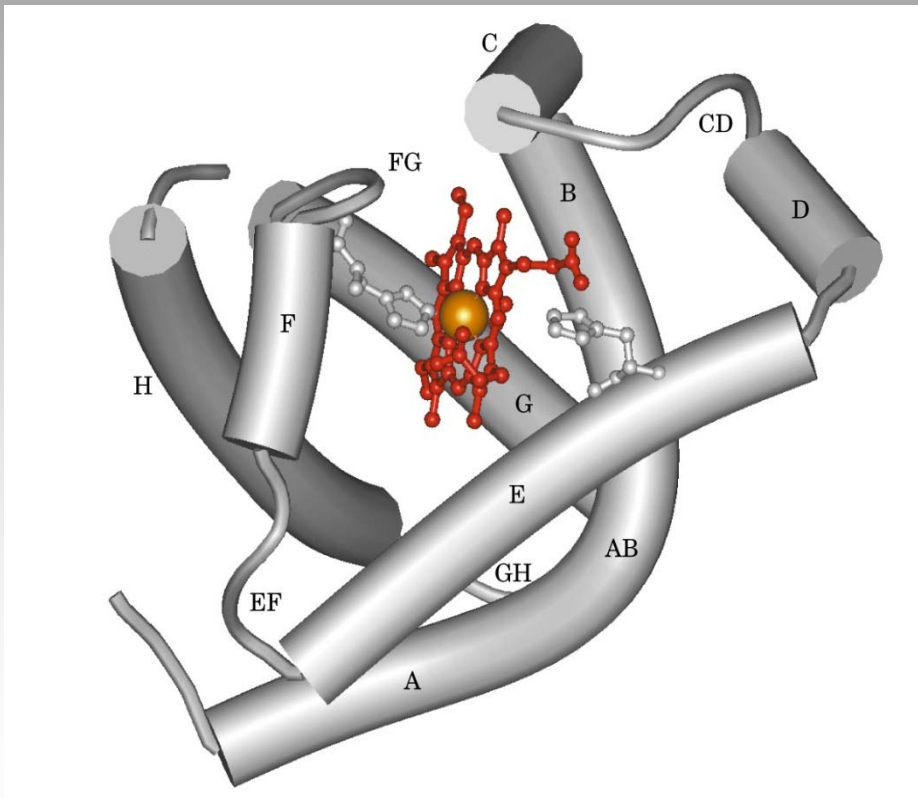


I GRUPPI PROPIONICI DELL'EME SONO ALLA SUPERFICIE DELLA Mb



LA MIOGLOBINA (4,5×3,5×2,5nm)

Il 75% della catena (globina) é in conformazione ad α -elica.
Ci sono **8** segmenti elicoidali maggiori (da **A** ad **H**) e **5** segmenti non elicoidali (**AB**, **CD**, **EF**, **FG**, **GH**) raccordano le varie eliche.



LE FORME PIÙ IMPORTANTI DELLA MIOGLOBINA

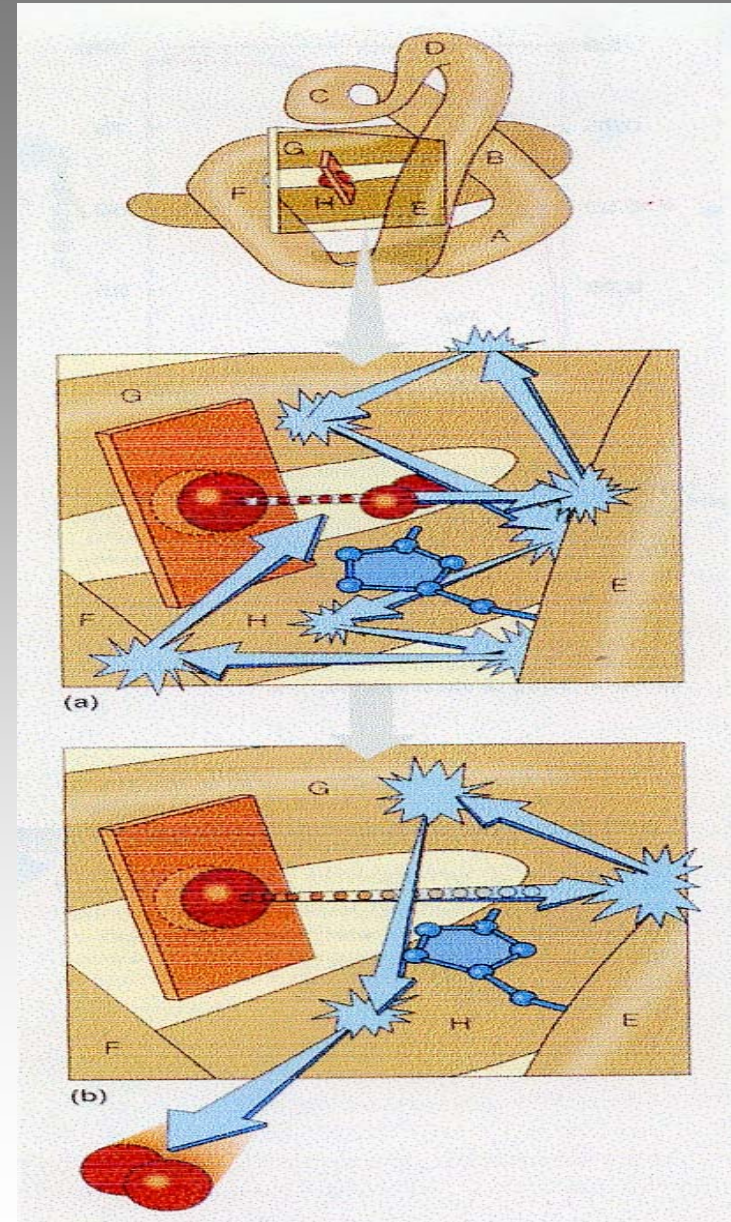
Forma	Stato di ossidazione del ferro	V posizione di coordinazione	VI posizione di coordinazione
Deossimioglobina	2 ⁺	His F8	Vuota
Ossimioglobina	2 ⁺	His F8	O ₂
Ferrimioglobina	3 ⁺	His F8	H ₂ O

Fe²⁺ (ione ferroso)

Fe³⁺ (ione ferrico)

LA DINAMICA DEL RILASCIO DELL'OSSIGENO DA PARTE DELLA MIOGLOBINA

L'ossigeno rilasciato sfugge all'esterno, se le fluttuazioni della struttura proteica determinano l'apertura di un varco.



LA MIOGLOBINA

Se la Mb (o l'Hb) è conservata a contatto con l'aria, al di fuori dell'ambiente cellulare, il ferro si ossida a formare la **metamioglobina** (ferrimioglobina) o la **metemoglobina**,

il sito di legame viene inattivato e si lega una molecola d'**acqua** al posto dell'**O₂**.

LA MIOGLOBINA

Un gruppo eme libero lega l' O_2 per un periodo molto breve, poiché l' O_2 ossida molto rapidamente il Fe^{2+} (ione ferroso) a Fe^{3+} (ione ferrico), che non è più in grado di legare O_2 .

In questa reazione si ha l'intermedio:



Il gruppo **eme** presente nella mioglobina è molto meno ossidabile, perché difficilmente **due molecole di Mb** si potranno avvicinare tanto da permettere la formazione del complesso **eme- O_2 -eme**.

LA MIOGLOBINA

Quindi, la ragione funzionale dell'esistenza della componente proteica della Mb e dell'Hb è

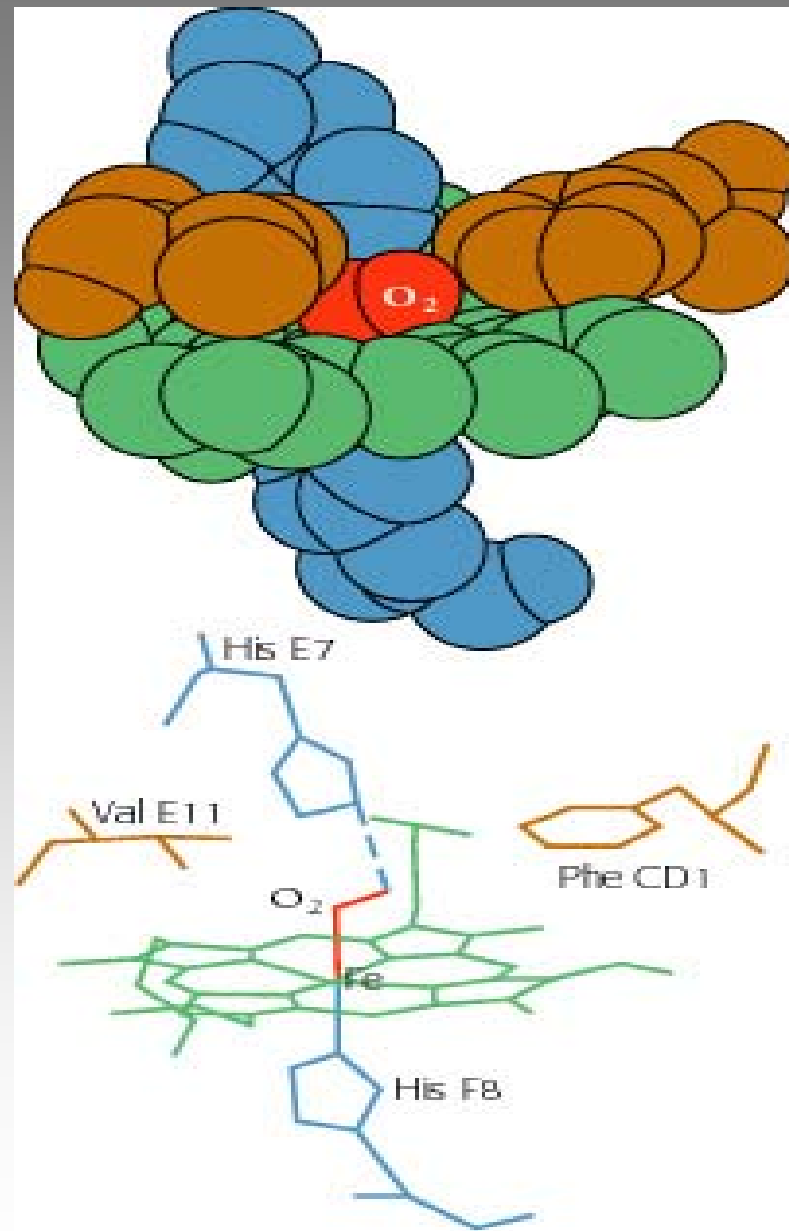
la protezione del ferro dall'ossidazione irreversibile;

Mb ed Hb creano ambienti in cui è permesso il primo passaggio di una reazione di ossidazione (il legame dell'ossigeno), ma è impedito il passaggio finale (l'ossidazione).

LA MIOGLOBINA

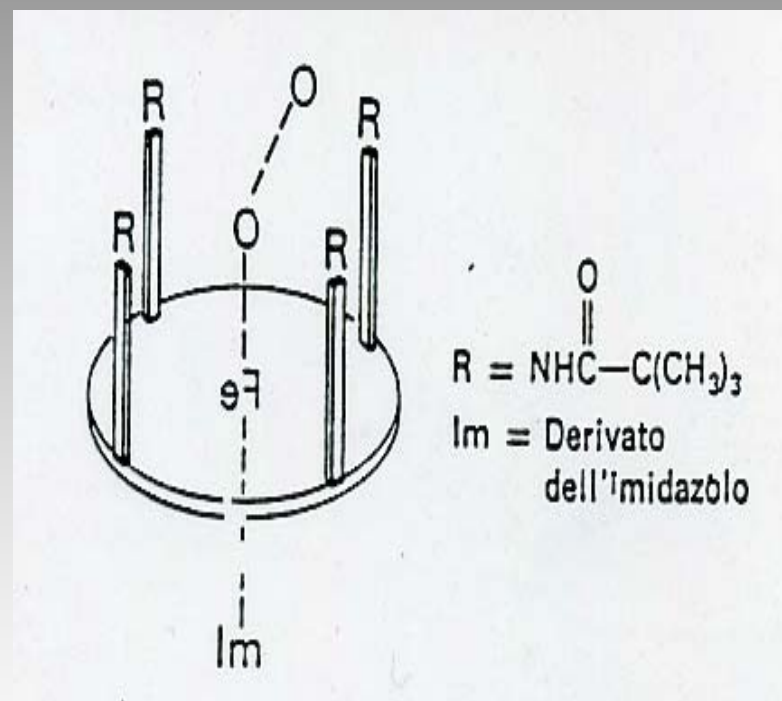
L'ossidazione è infatti **impossibilitata** dall'impedimento sterico che presenta l'ambiente attorno al complesso ferroporfirinico,

l'eme libero, invece, può facilmente **ossidarsi**, perché non esiste in questo caso alcuna protezione sterica.



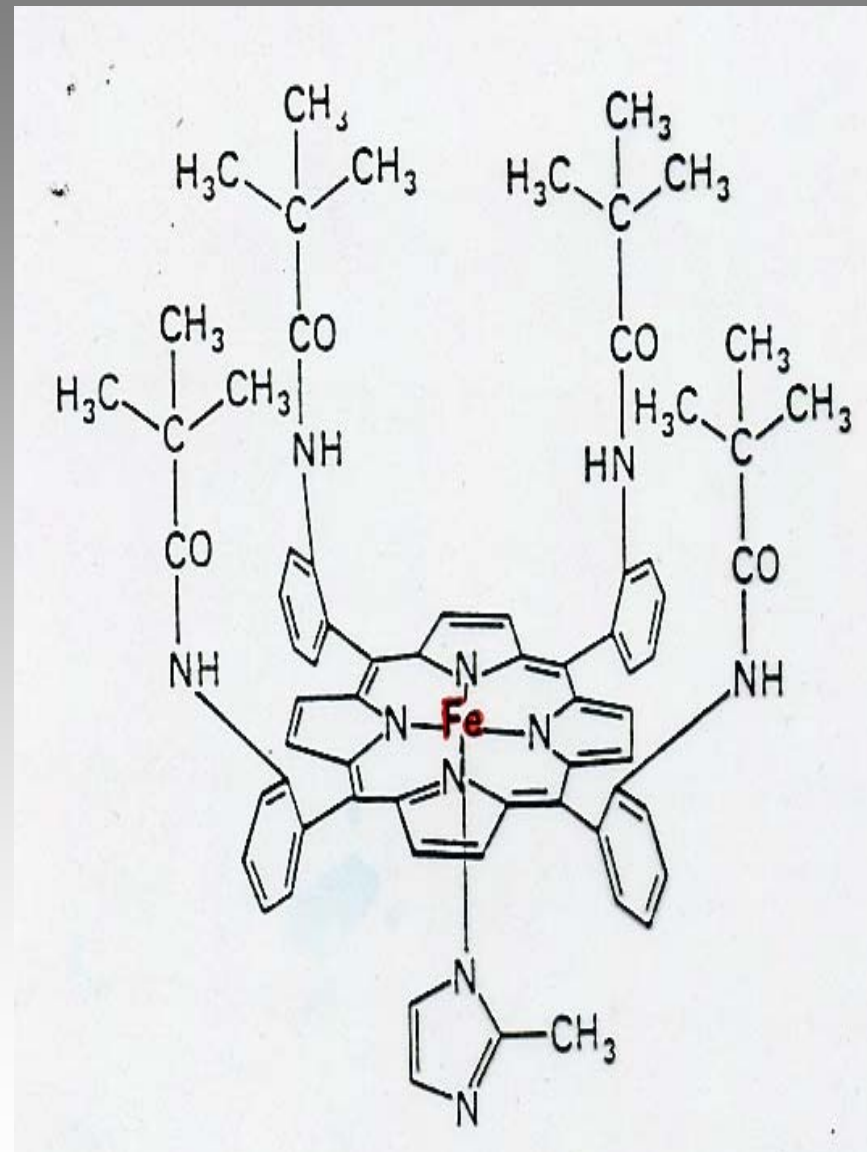
I COMPOSTI SINTETICI

I fattori sterici sono molto importanti nel **complesso ferro-porfirina**, infatti i picchetti (ostacoli) impediscono la formazione del dimero **eme-O₂-eme**.



**FORMULA DI STRUTTURA
DI UNA FERRO-PORFIRINA
CON PICCHETTI DI
RECINZIONE**

Si crea un microambiente che
permette l'ossigenazione.

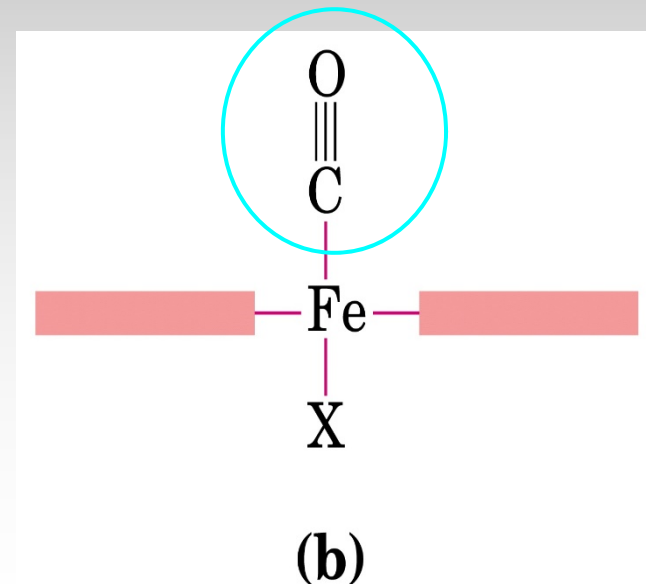
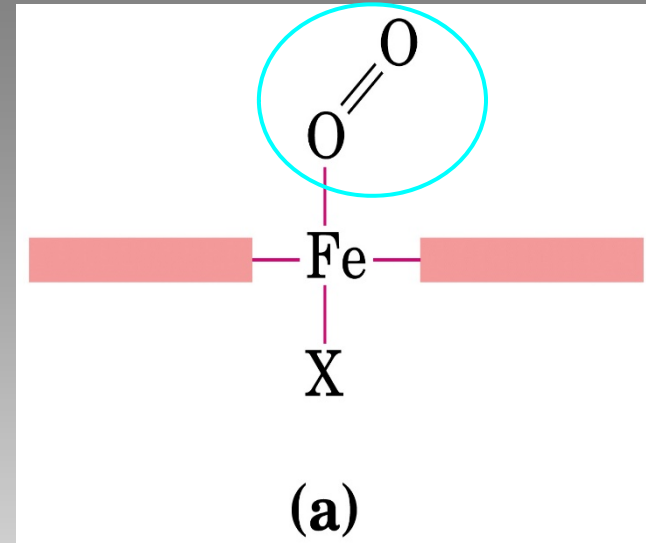


LA TOSSICITA' DEL MONOSSIDO DI CARBONIO (CO)

La tasca dell'eme può accogliere sia l' O_2 sia il CO , che ha dimensioni analoghe.

Il CO ha un'affinità di legame per la Mb (e l'Hb) **maggiore** dell' O_2 ed il legame non è facilmente reversibile. Per questo motivo il **CO è molto tossico**.

Nel gruppo eme isolato, **l'asse dell' O_2** presenta un angolo con **l'asse del legame $Fe-O$** , creando un legame più debole rispetto a quello del **CO** , in cui gli **atomi $Fe-C-O$** sono disposti in modo **lineare**.

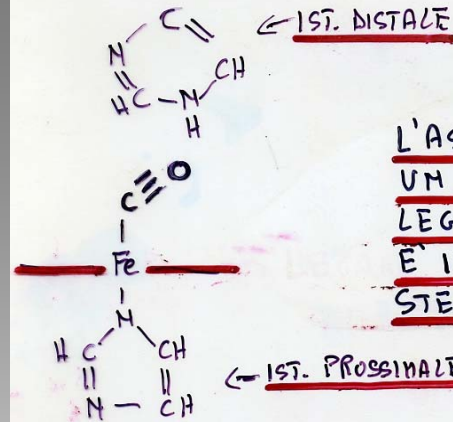


LA TOSSICITA' DEL MONOSSIDO DI CARBONIO (CO)

Quando l'eme é all'interno della tasca della globina, il legame del **CO** è diminuito dalla presenza dell'istidina distale, mentre l'**O₂** si lega allo stesso modo, sia alla Hb, sia alle ferro-porfirine isolate.

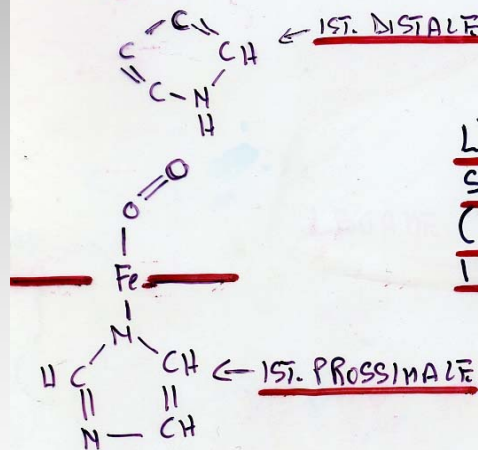
Questo é un vantaggio per l'**O₂**, che é in competizione con il **CO** per il legame con il ferro.

GRUPPO EME CON GLOBINA



L'ASSE DEL LEGAME CO FORMA UN ANGOLO CON L'ASSE DEL LEGAME Fe-C. IL LEGAME LINEARE È IMPEDITO DALL'INTERFERENZA STERICA DELL'ISTIDINA DISTALE

IL LEGAME È INDEBOLITO



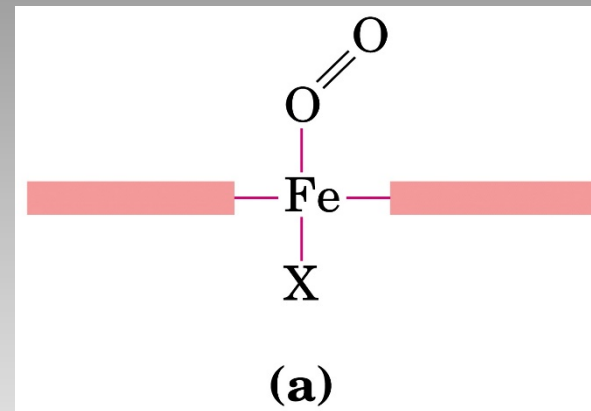
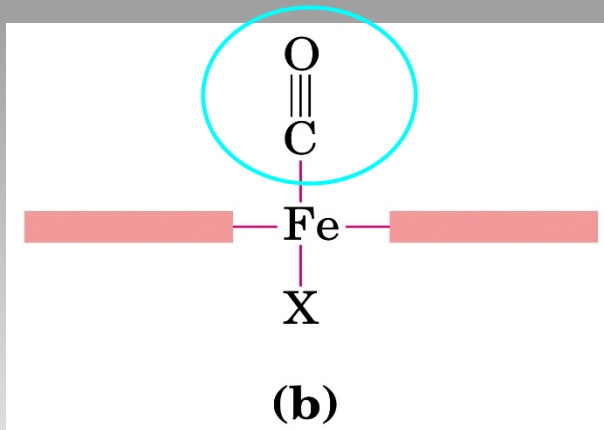
L'OSSIGENO SI LEGA ALLO STESSO MODO SIA ALLA Mb (Hb), SIA ALLE FERRO-PORFIRINE ISOLATE.

NELLE Mb e Hb IL LEGAME DEL CO È DIMINUITO (NELLA FORZA) RISPETTO ALL'EME LIBERO.

QUESTO È A VANTAGGIO DELL'O₂ (È IN COMPETIZIONE CON IL CO PER IL LEGAME CON IL Fe⁺²)

LA TOSSICITA' DEL MONOSSIDO DI CARBONIO (CO)

In conclusione,
mentre il gruppo eme isolato forma un legame con il CO **25000**
volte più forte rispetto a quello con l'O₂,



Mb e Hb formano un legame con il CO solo **200** volte più forte
rispetto a quello con l'O₂.

In una cellula, il CO blocca **l'1%** dei siti della Mb ed Hb.

IL GENE DELLA Mb

Il gene della mioglobina è costituito da tre esoni:

l'esone I codifica gli aminoacidi da 1 a 30,

l'esone II codifica gli aminoacidi da 31 a 105,

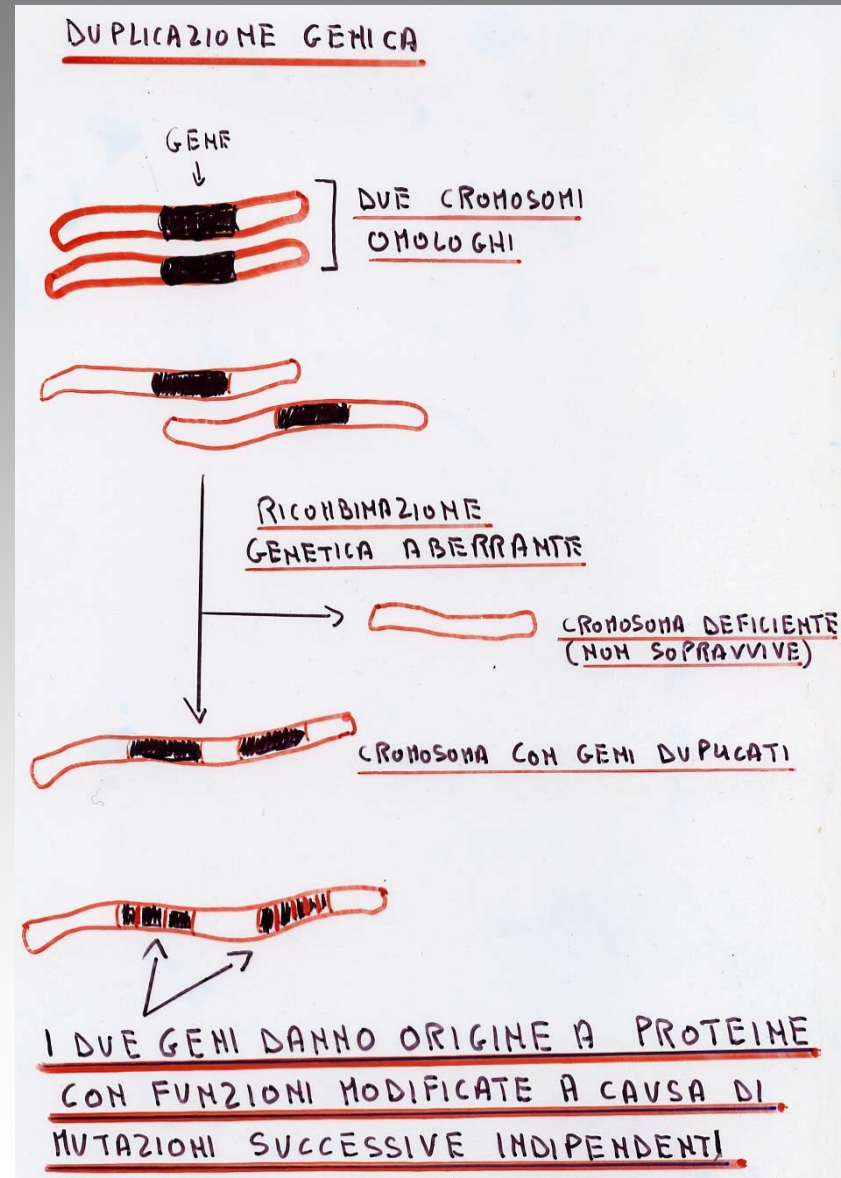
l'esone III codifica gli aminoacidi da 106 a 153.

La **minimioglobina**, ottenuta con l'enzima proteolitico **clostripaina**, è costituita da 107 aminoacidi (da 32 a 139) ed ha un comportamento simile a quello della mioglobina.

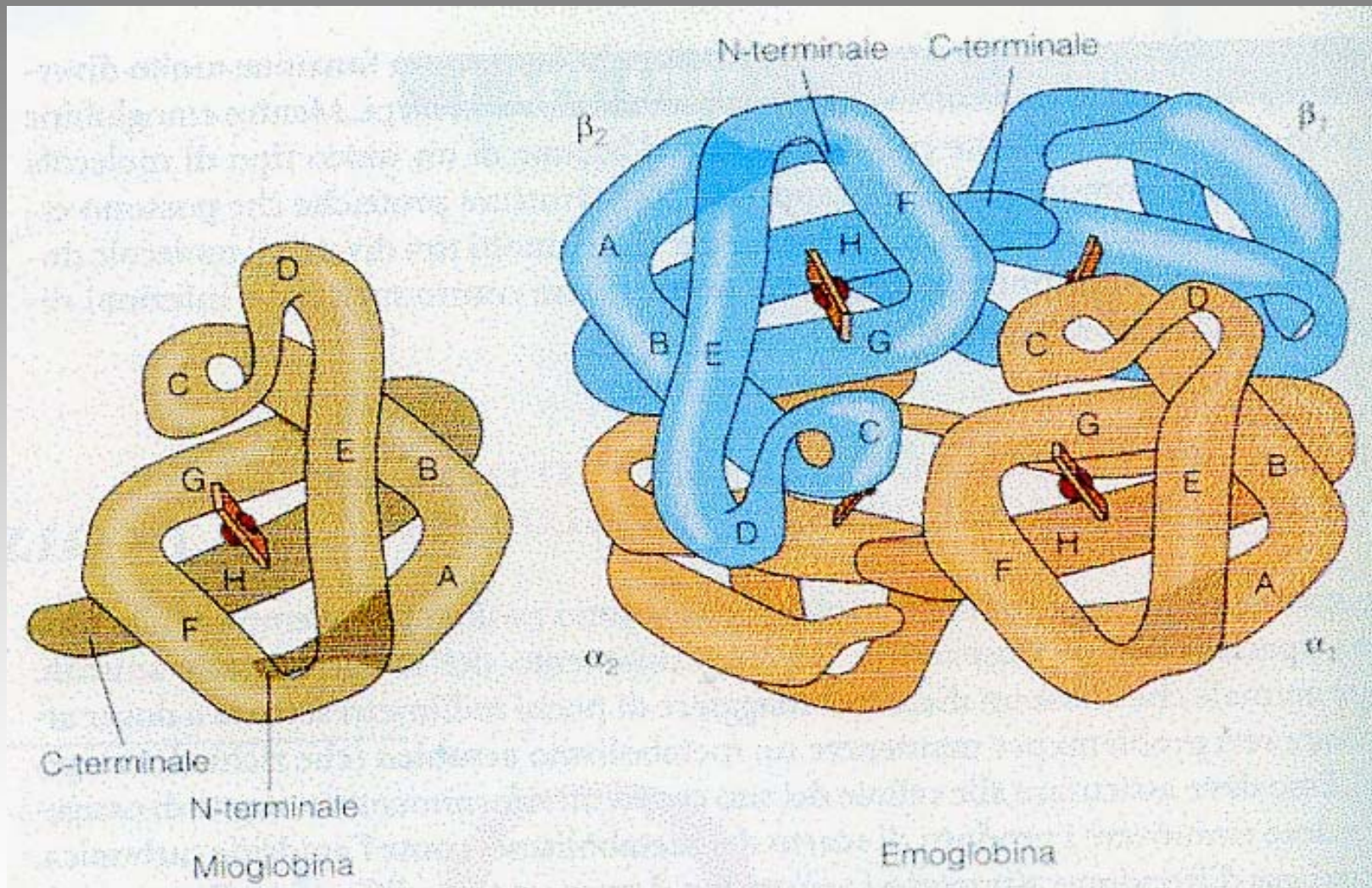
L'EVOLUZIONE DI Mb ED Hb

L'emoglobina e la mioglobina sono evolute da una stessa **proteina ancestrale**,

probabilmente, un errato appaiamento dei **cromosomi omologhi** portò alla formazione di un cromosoma contenente i due geni identici, che hanno subito **mutazioni ed evoluzioni indipendenti** l'uno dall'altro.

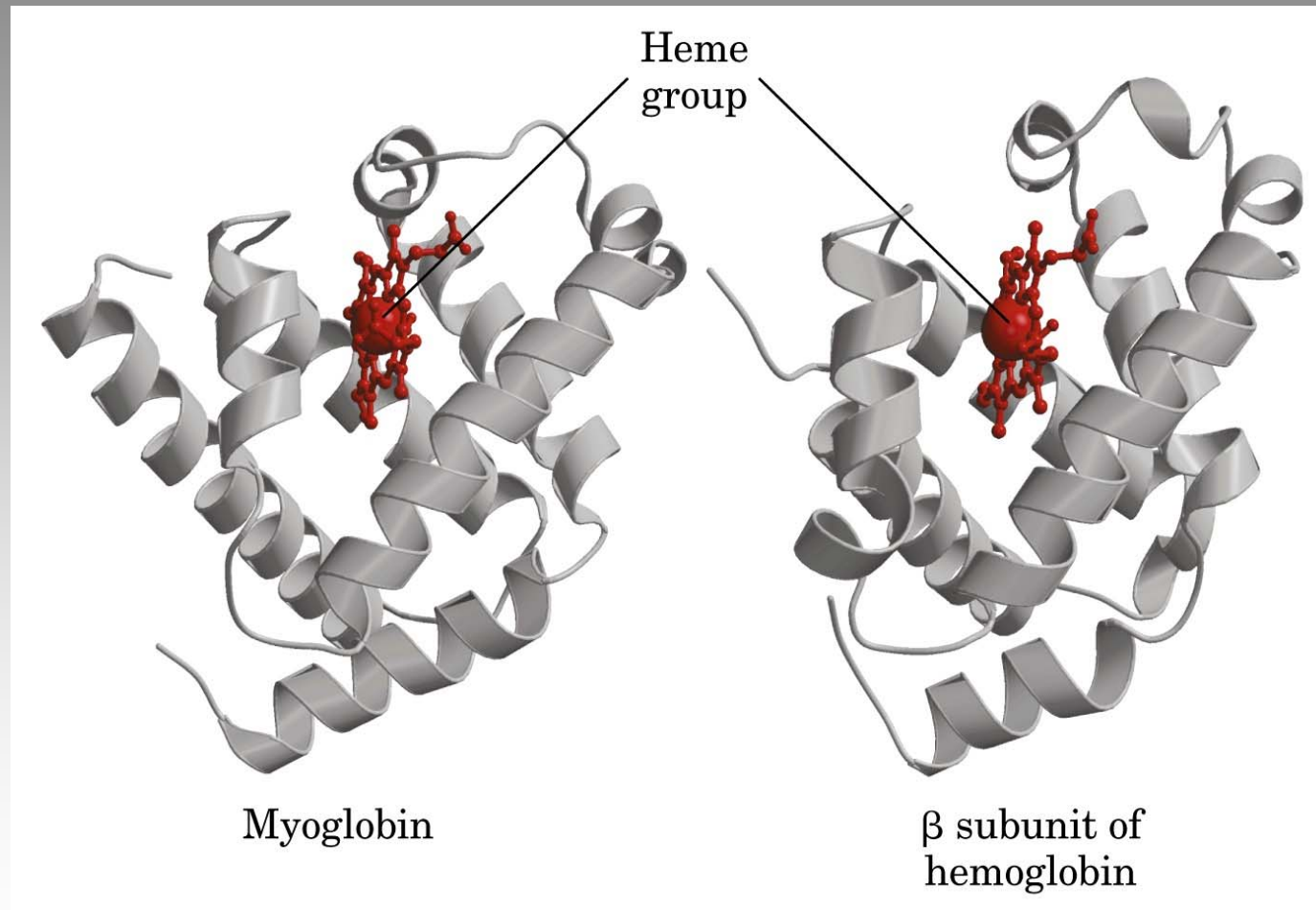


CONFRONTO TRA Mb ED Hb



L'Hb ha un'organizzazione approssimativamente tetraedrica

MIOGLOBINA ED EMOGLOBINA



LE EMOGLOBINE PIU' IMPORTANTI

Sono stati identificati vari tipi di catene che danno origine ad emoglobine diverse.

Hb embrionale	Hb Gower 1	$\zeta_2\varepsilon_2$
	Hb Gower 2	$\alpha_2\varepsilon_2$
	Hb Portland	$\zeta_2\gamma_2$
Hb fetale	Hb F	$\alpha_2\gamma_2$
Hb adulto	Hb A	$\alpha_2\beta_2$
	Hb A ₂	$\alpha_2\delta_2$

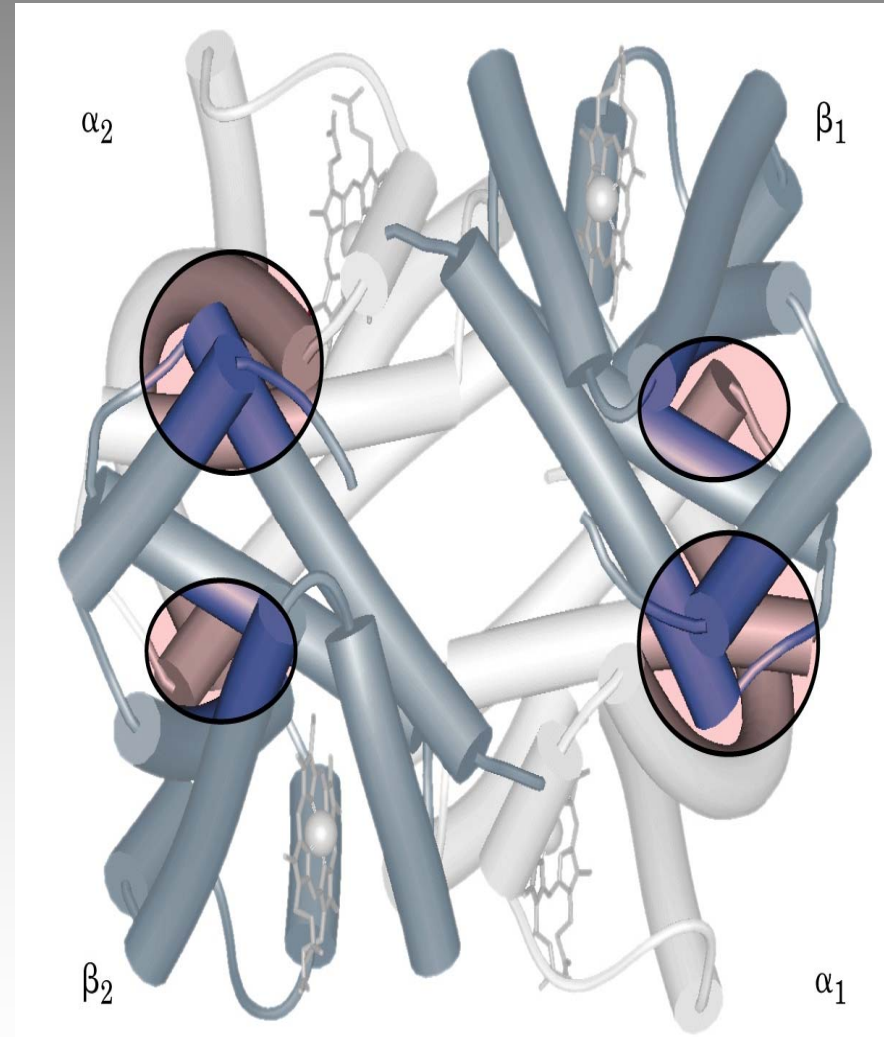
Ultimi 2-3 mesi della vita fetale

±2%

L'EMOGLOBINA A (P.M. 64500)

L'emoglobina è una proteina tetramerică, costituita da due subunità α e due subunità β , ognuna delle quali presenta un gruppo prostetico *eme* (Fe^{2+}), ed una catena polipeptidica.

La globina (la componente proteica) é formata da:
2 catene α (141 residui),
2 catene β (146 residui).



LE SEQUENZE AMMINOACIDICHE DELLA MIOGLOBINA DI CAPODOGLIO E DELLE CATENE α E β DELL'EMOGLOBINA UMANA

La struttura terziaria della **Mb** e delle 2 subunità α e β della **Hb** sono molto simili, nonostante solo il **18%** dei corrispondenti residui siano identici.

	Mb	Hb α	Hb β		Mb	Hb α	Hb β		Mb	Hb α	Hb β	
NA1	-1 V	1 V	1 V		E	-	P		L	F	F	
	-	-	H		A	-	D		E	K	R	
	L	L	L		E	-	A		F	100L	L	
A1	---S	S	T---		M	-	V		I	L	L	
	E	P	P		K	-	M		S	S	G	
	G	A	E	D7	---S	G	G---		E	H	N	
	E	D	E	E1	---S	S	N---		A	C	V	
	W	K	K		E	A	P		I	L	L	
	Q	T	S		60D	Q	K		I	L	V	
	L	N	A		L	V	60V		H	V	C	
	V	V	V		K	K	K		V	T	V	
	L	K	T		K	G	A		L	L	L	
	H	A	A	Distal His	E7	H	H	H	H	A	A	
	V	A	L		G	G	G		S	A	H	
	W	W	W		V	60K	K		G19	---R	H	H---
	A	G	G		T	K	K		H	L	F	
	K	K	K		V	V	V		120P	P	G	
	V	V	V		L	A	L		G	A	120K	
A16	---E	G	---		T	D	G		D	E	E	
	A	A	-		A	A	A		F	F	F	
B1	--20D	20H	N---		L	L	F		H1	---G	T	T---
	V	A	20V		G	T	S		A	P	P	
	A	G	D		A	N	D		D	120A	P	
	G	E	E		I	A	G		A	V	V	
	H	Y	V	E19	---L	V	L---		Q	H	Q	
	G	G	G		K	A	A		G	A	A	
	Q	A	G		K	H	H		A	S	A	
	D	E	E		K	V	L		M	L	Y	
	I	A	A		80G	D	D		N	D	Q	
	L	L	L		H	D	80N		K	K	K	
	I	E	G		H	M	L		A	F	V	
	R	R	R		E	P	K		L	L	V	
	L	M	L		A	N	G		E	A	A	
	F	F	L		E	A	T		L	S	G	
	K	L	V	F1	---L	80L	F---		F	V	V	
B16	---S	S	V---		K	S	A		R	S	A	
C1	---H	F	Y---		P	A	T		140K	T	N	
	P	P	P		L	L	L		D	V	140A	
	E	T	W		A	S	S		I	L	L	
	T	T	T		Q	D	E		A	T	A	
	40L	40K	Q		S	L	L		H21	---A	S	H---
	E	T	40R	Proximal His	F8	H	H	H	K	K	K	---HC1
C7	---K	Y	F---		F9	A	A	C---	Y	140Y	Y	---HC2
	F	F	F		T	H	D		K	141R	146H	---HC3
	D	P	E		K	K	K		E			
	R	H	S		H	L	L		H26	---L	-----	
	F	F	F		K	R	H		G			
	K	-	G		I	V	V		Y			
	H	D	D		G1	-100P	D	D---	Q			
	L	L	L		I	P	100P		153G			
	K	S	S		K	V	E					
D1	---T	H	T---		Y	N	N					



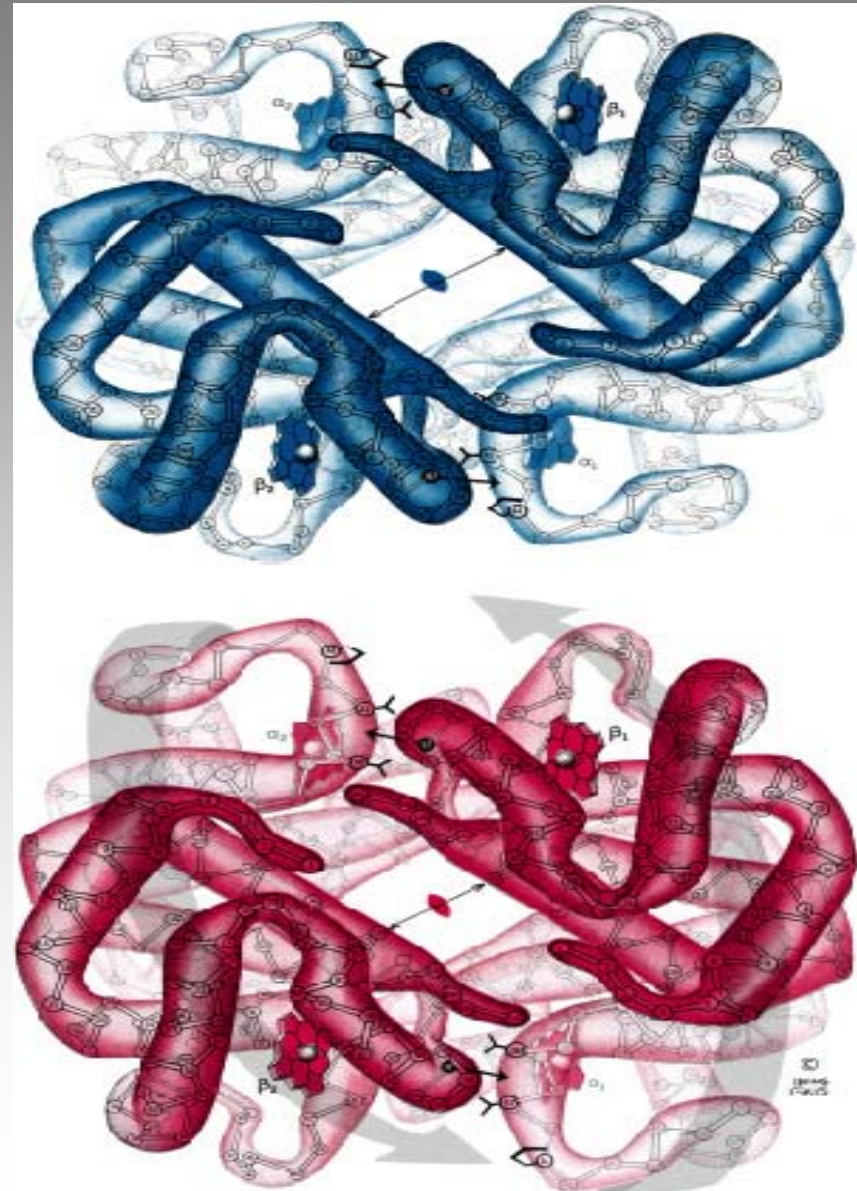
L'AVVOLGIMENTO GLOBINICO (Hb ed Mb)

È l'intricato ripiegamento della catena polipeptidica, che consente di porre il gruppo eme in un ambiente da permettere il legame reversibile dell'ossigeno.

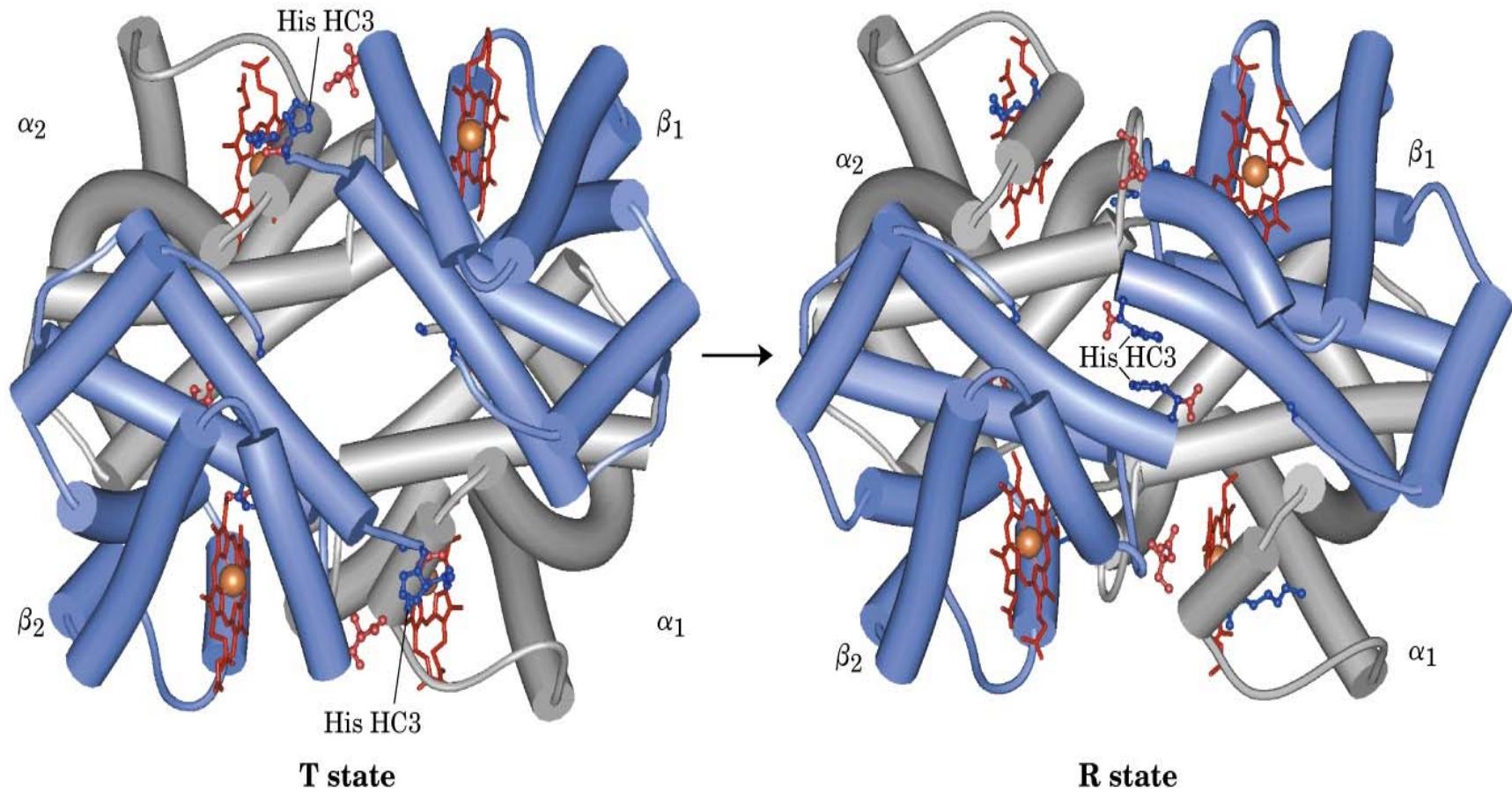
Esistono due forme di emoglobina:

forma T (deossiHb)
ha scarsa affinità per l'O₂

forma R (ossiHb)
ha elevata affinità per l'O₂
(cooperatività di legame)



L'EMOGLOBINA



L'EMOGLOBINA

I residui invariati sono particolarmente importanti per la funzione dell'emoglobina:

ecco i principali residui invariati in più di 60 specie

F8	Istidina	His prossimale legata all'eme
E7	Istidina	His distale vicina all'eme
CD1	Fenilalanina	Contatti con il gruppo eme
F4	Leucina	Contatti con il gruppo eme
B6	Glicina	Permette una stretta vicinanza tra le eliche B ed E
C2	Prolina	Termine dell'elica
H2	Tirosina	Legami crociati tra le eliche H ed F
C4	Treonina	Incerto
H10	Lisina	Incerto

IL LEGAME DELL'OSSIGENO DA PARTE DELLA Mb

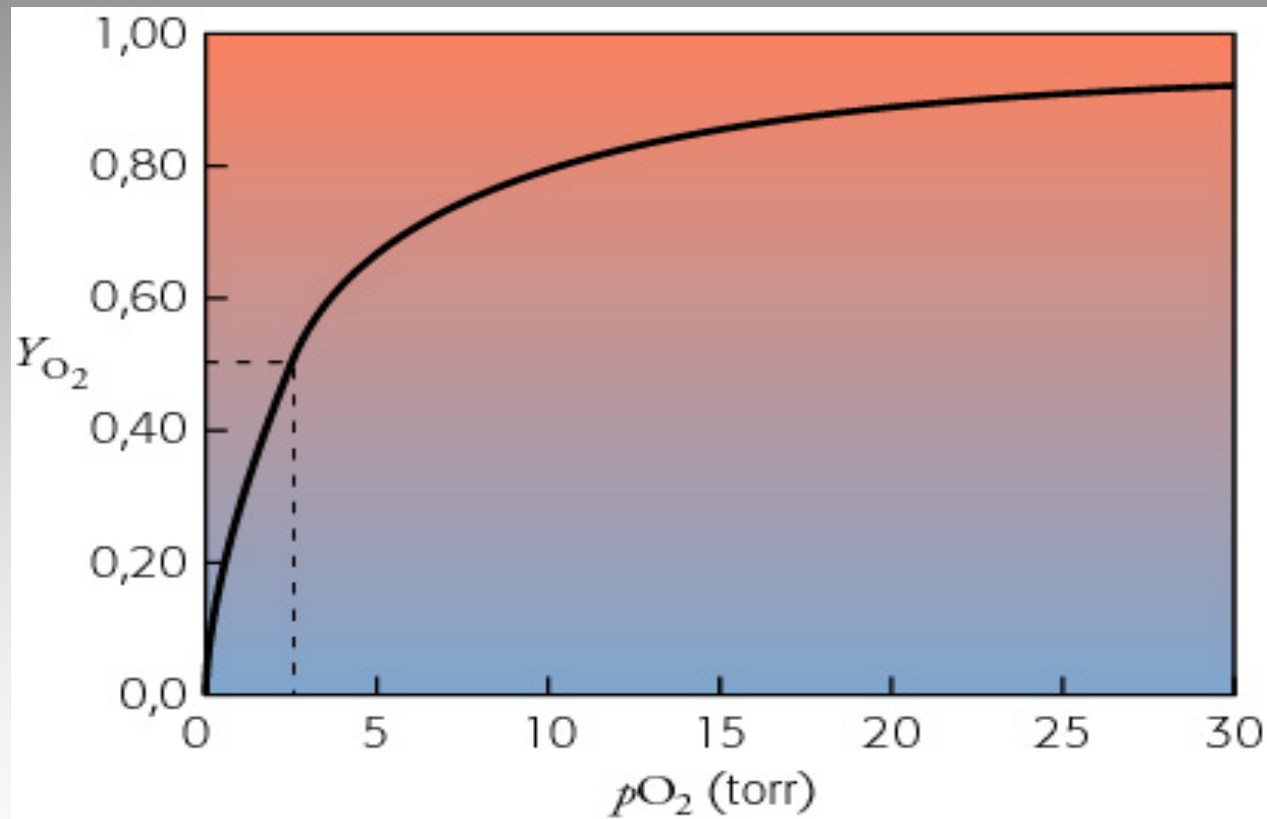
IL LEGAME DELL'OSSIGENO DA PARTE DELLA Mb

Nei tessuti (muscolo), la **Mb** lega l'ossigeno rilasciato dalla **Hb** presente nel circolo arterioso ed a sua volta lo cede agli organuli cellulari (i mitocondri).



LA MIOGLOBINA

Il legame di un ligando (O_2) ad un sito singolo di una proteina (Mb) può essere descritto da una **curva di legame iperbolica**.

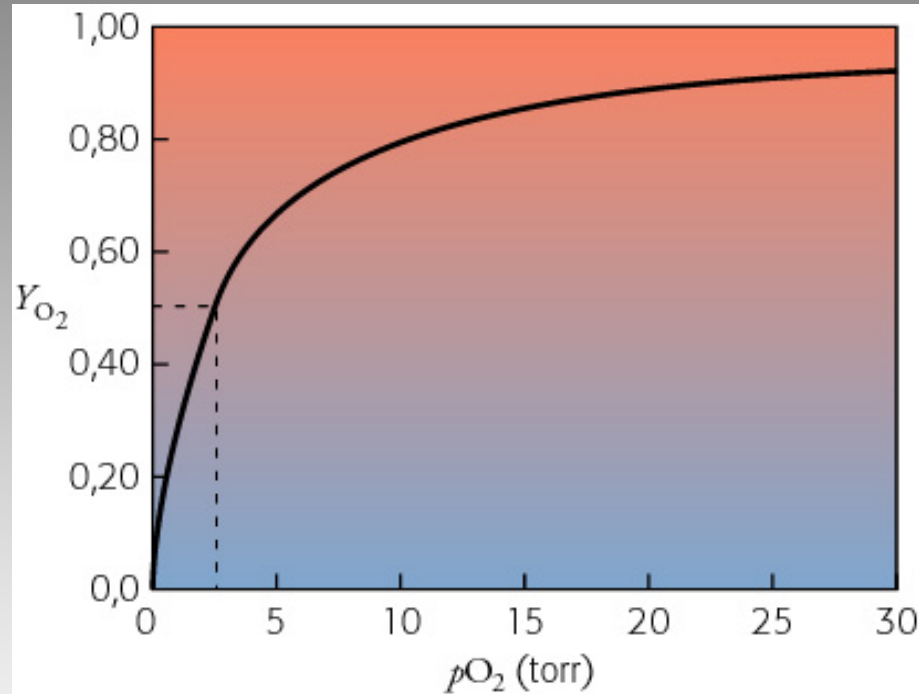


LA CURVA DI LEGAME DELL'O₂ ALLA Mb

La curva iperbolica è espressa dall'equazione:

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

a 100 torr la Y_{O_2} è 0.97,
a 20 torr la Y_{O_2} è 0.88.



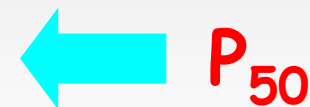
La pressione parziale di O₂ è espressa in torr,
l'O₂ si lega saldamente alla Mb con una P_{50} di soli 2,8 torr.

SATURAZIONE (Y)



È la frazione di siti occupati dall'ossigeno e corrisponde alla percentuale di Mb ossigenata. Il valore di y può variare da 0 a 1.

È il termine che esprime la pressione parziale di ossigeno in cui il 50% dei siti sono occupati ($y=0,5$). Indica l'affinità per l'ossigeno della Mb.



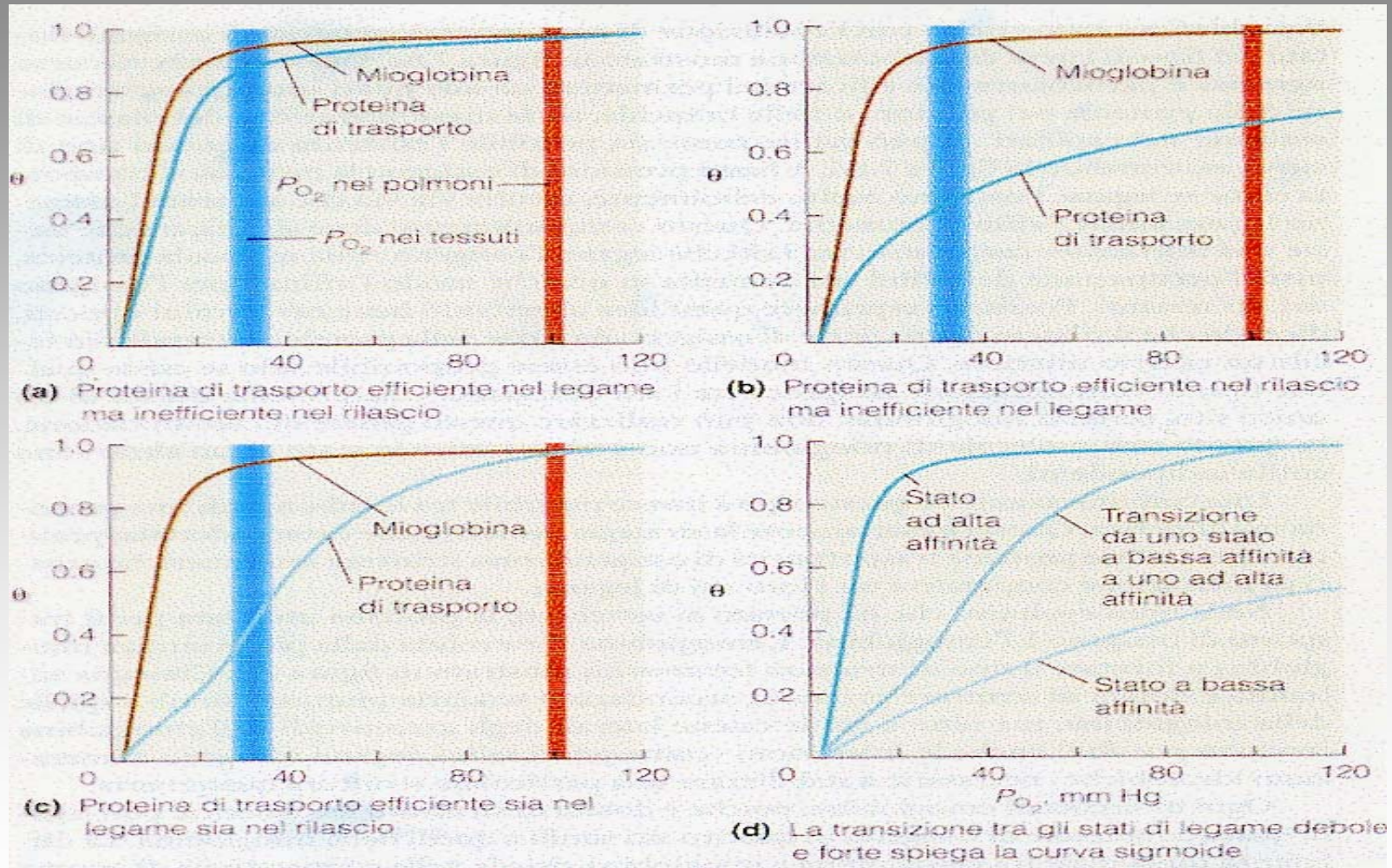


TORR

È l'unità di misura della pressione, equivalente alla pressione esercitata da una colonna di Hg di 1 mm, a 0°C ed a gravità normale.

IL LEGAME DELL'OSSIGENO DA PARTE DELLA Hb

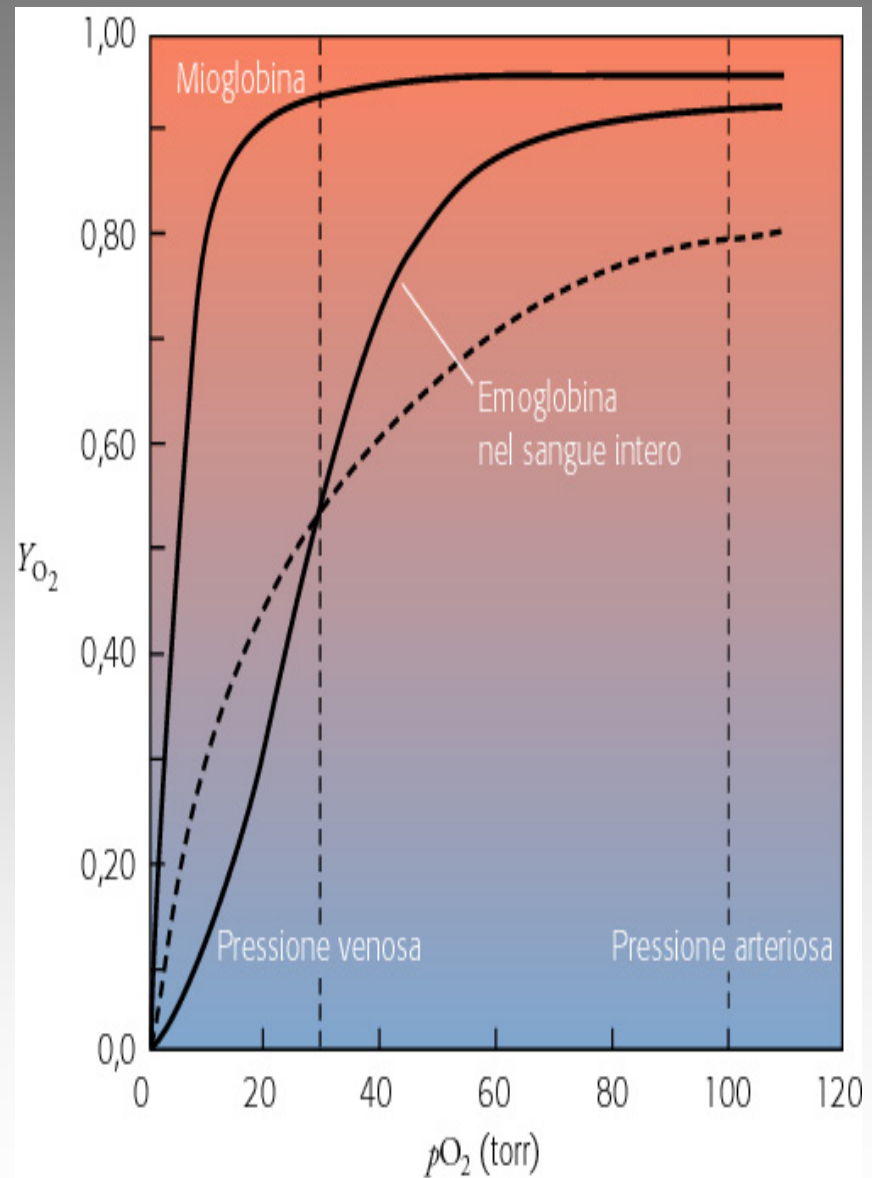
LE CURVE DI LEGAME RICHIESTE DA UNA PROTEINA DA TRASPORTO



L'EMOGLOBINA

L'efficienza nel trasporto di ossigeno è ottenuta attraverso il **legame cooperativo** da parte di proteine dotate di più siti, descritto da una curva di **legame sigmoide**;

nella linea evolutiva che ha portato ai vertebrati, la proteina utilizzata per il trasporto di O_2 è **l'emoglobina**.



L'EMOGLOBINA

L'Hb è il trasportatore di ossigeno molecolare,

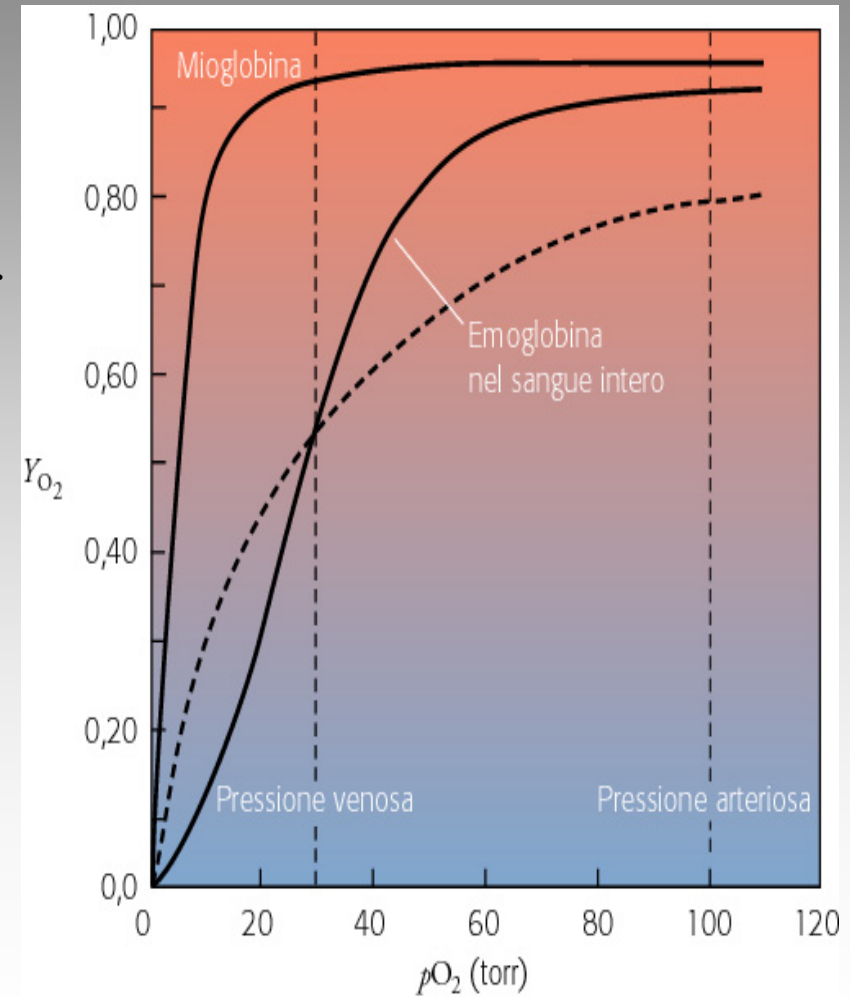
una proteina trasportatrice di O_2 ideale dovrebbe essere quasi completamente saturata a **100 mmHg** (pressione parziale di O_2 nei polmoni o nelle branchie) e trovarsi quasi totalmente in forma dissociata a circa **20-40 mmHg** (pressione parziale dei tessuti).

LA CURVA DI SATURAZIONE DELLA Hb CON L'OSSIGENO È SIGMOIDE

Una curva di legame di **tipo sigmoide** può essere considerata come una **curva ibrida**, che riflette la presenza di forme a **bassa** affinità e ad **alta** affinità.

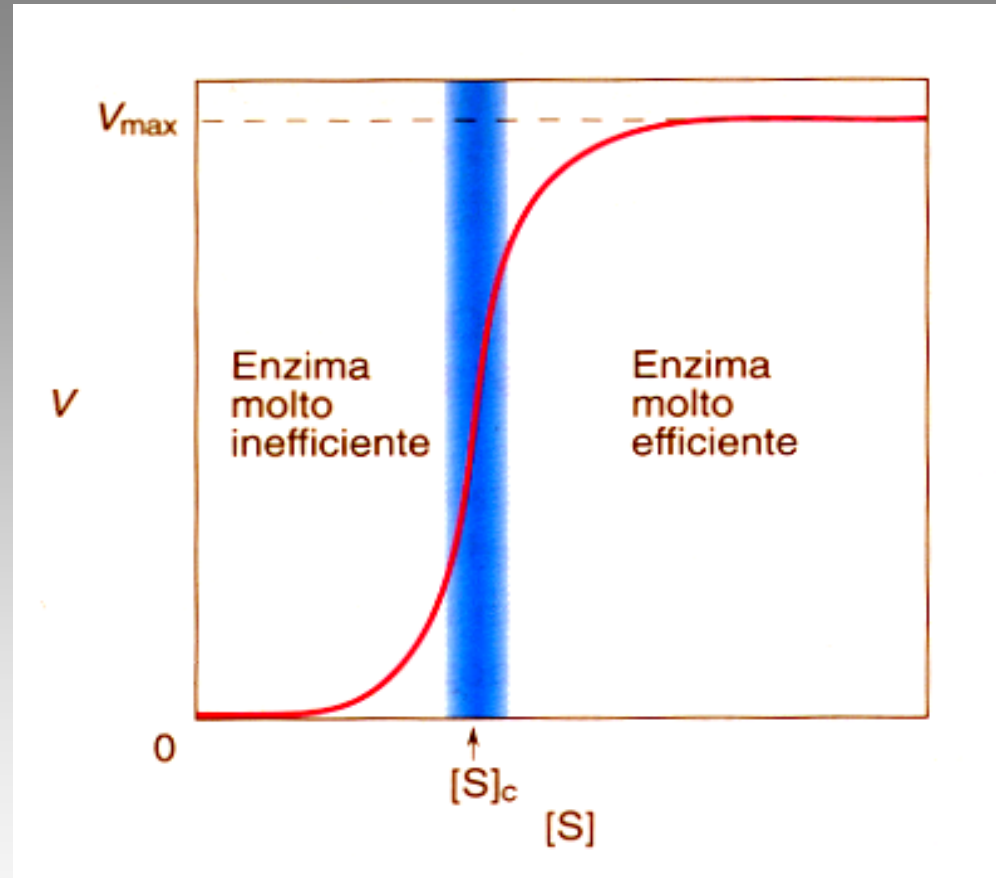
Per la Hb
il valore di P_{50} è circa **26 torr**,

a 100 torr la Y_{O_2} è **0.97**,
a 20 torr la Y_{O_2} è **0.32**.



Le proteine che legano il substrato (ligando) in modo cooperativo danno **curve di tipo sigmoide** e sono chiamate **proteine allosteriche**.

A basse concentrazioni di **[S]**, la molecola si comporta come se avesse una debole capacità di legame ($K_{0.5}$ elevata); all'aumentare di **[S]** viene indotto un aumento della quantità di ligando legato e quindi di efficienza della molecola.



Le proprietà cinetiche delle proteine allosteriche **non** seguono le cinetiche di Michaelis-Menten (che danno le curve di legame iperboliche).

LE PROTEINE ALLOSTERICHE

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

il termine **allosterico** deriva dal greco (**állos** = **altro**; **stereós** = **forma**).
Le proteine così definite possono assumere altre conformazioni indotte dal legame di opportuni modulatori;

in una **proteina allosterica**, il legame di un **ligando** ad un sito modifica le proprietà di un **altro sito** sulla stessa molecola,

le **molecole allosteriche** sono **proteine oligomeriche**, costituite da due o più **subunità** e con diversi siti attivi,

le **interazioni allosteriche (cooperative)** avvengono quando il legame di un **ligando** ad un sito specifico viene influenzato dal legame di un **altro ligando**, detto **effettore o modulatore**, a livello di siti diversi, nella proteina.

L'Hb É UNA PROTEINA ALLOSTERICA

Quando più subunità si uniscono, emergono nuove proprietà di fondamentale importanza biologica,

l'Hb è più **complicata e sensibile** della Mb,

ogni molecola di Hb può legare **4** molecole di O_2 , perché sono presenti 4 siti di legame.

L'Hb É UNA PROTEINA ALLOSTERICA

Nella Hb esiste una **cooperatività** di legame,

essa è possibile perché lo stato di ossigenazione di un sito può essere **comunicato** agli altri siti,

questo é un esempio di "**effetto allosterico**", dove l'occupazione di uno dei siti da parte del ligando (O_2) influisce sull'affinità di quelli rimasti liberi;

le molecole che legano il substrato in modo **cooperativo** danno curve di tipo **sigmoide**.

L'Hb É UNA PROTEINA ALLOSTERICA

Quando il **normale ligando** (O_2 nel caso della Hb) di una proteina allosterica è anche un modulatore, l'interazione viene detta **omotropica**,

se invece il **modulatore** è una molecola **diversa** dal ligando normale, l'interazione viene detta **eterotropica**,

questi effetti possono essere sia **positivi** sia **negativi**, a seconda che il ligando aumenti o diminuisca l'affinità della proteina per il ligando stesso.

L'Hb HA UNA COOPERATIVITA' OMOTROPICA POSITIVA

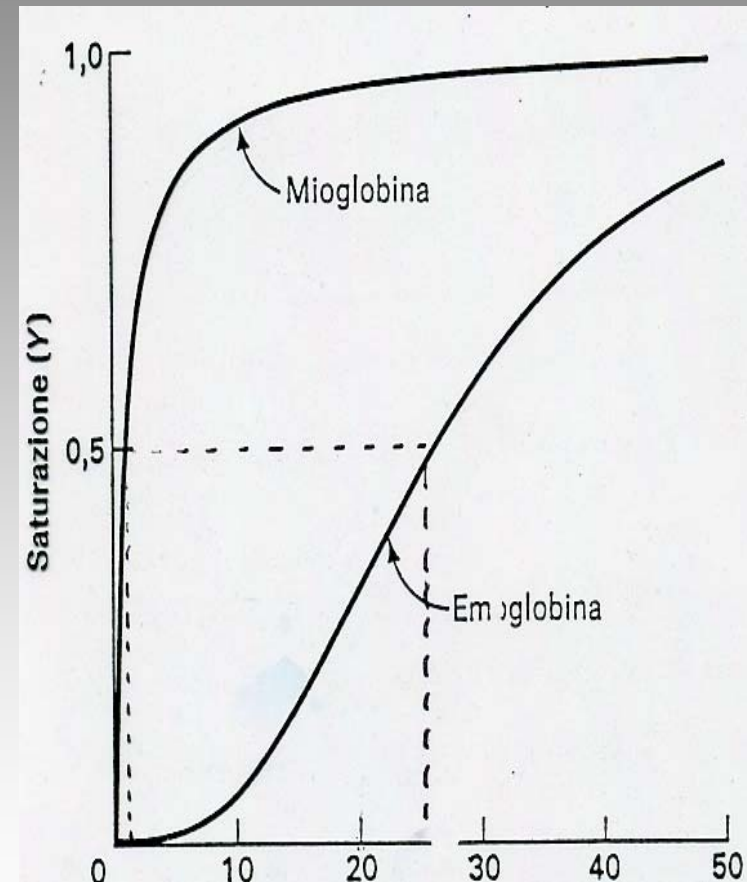
La sua **cooperatività positiva** deriva dalle modificazioni che il legame di un ligando (O_2 , **effettore omotropico positivo**) ad un gruppo eme può indurre sull'affinità di legame per il ligando in un altro gruppo eme dell'Hb.

LA Mb HA UN'AFFINITÀ PER L'O₂ MAGGIORE DI QUELLA DELLA Hb

Curva iperbolica per la Mb,

curva sigmoide per la Hb.

La quarta molecola di O₂ si lega all'Hb con una affinità **100 volte** superiore a quella della prima molecola di O₂ (**effetto della globina**).



LE PROPRIETA' ALLOSTERICHE DELL'EMOGLOBINA

- 1) Il legame dell' O_2 alla Hb favorisce il legame di altro O_2 alla stessa molecola: **cooperatività positiva**,
- 2) l'affinità della Hb per l' O_2 dipende anche dal **pH** e dalla **CO_2** , che sono **effettori eterotropici negativi**,
- 3) l'affinità della Hb per l' O_2 é inoltre regolata dal 2,3 bisfosfoglicerato (**BPG**), un **effettore eterotropico negativo**.

IL COEFFICIENTE DI HILL

Il coefficiente di Hill (n) è un parametro correlato al grado di cooperatività tra le subunità di una proteina;

in una proteina costituita da subunità, ognuna in grado di legare una molecola di substrato (ligando),

n aumenta con il grado di cooperatività:

se

$n=1$ non c'è cooperatività (ramo di iperbole),

se

$n>1$ c'è cooperatività positiva (curva sigmoide),

se

$n<1$ c'è cooperatività negativa.

QUANDO $n=1$, NON C'É COOPERATIVITÀ

In questo caso, i siti di legame per l'ossigeno sono **completamente indipendenti** nel loro comportamento,

questa situazione é anche di una proteina con un singolo sito di legame (es. **la mioglobina**).

QUANDO $n > 1$, C'É COOPERATIVITÀ POSITIVA

La cooperatività diventa **infinita** (situazione ipotetica), quando la proteina ha tutti i siti (o nessun sito) di legame per il ligando occupati **contemporaneamente**,

in questo caso, **n** tende ad essere uguale al n° dei siti di legame per il ligande presenti nella proteina e la molecola è **completamente cooperativa**.

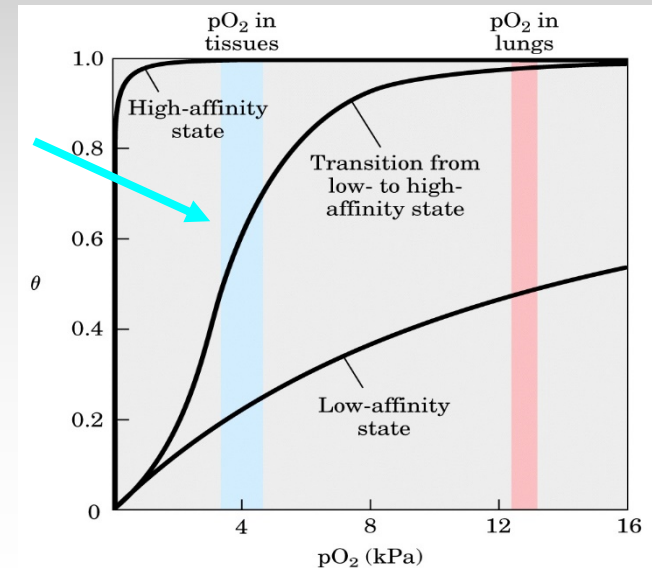
IL COEFFICIENTE DI HILL

Nel caso dell'emoglobina n è 2,8.

La curva sigmoide dell'**Hb** indica il legame cooperativo dell'ossigeno alla proteina, rendendo più efficace il trasporto dell'ossigeno.

La curva può essere espressa dall'equazione:

$$y = \frac{(pO_2)^n}{(pO_2)^n + (P_{50})^n}$$



LA FUNZIONE DEL COEFFICIENTE DI HILL

La saturazione della Hb varia **più rapidamente** in seguito a variazioni della **pO₂** di quello che potrebbe, se i siti di legame avessero un comportamento **indipendente** gli uni dagli altri.

LA FUNZIONE DEL COEFFICIENTE DI HILL

La pO_2 alveolare = 100 torr

La pO_2 dei capillari di muscolo in attività = 20 torr

La P_{50} Hb = 26 torr

Il coefficiente di Hill (n) = 2,8

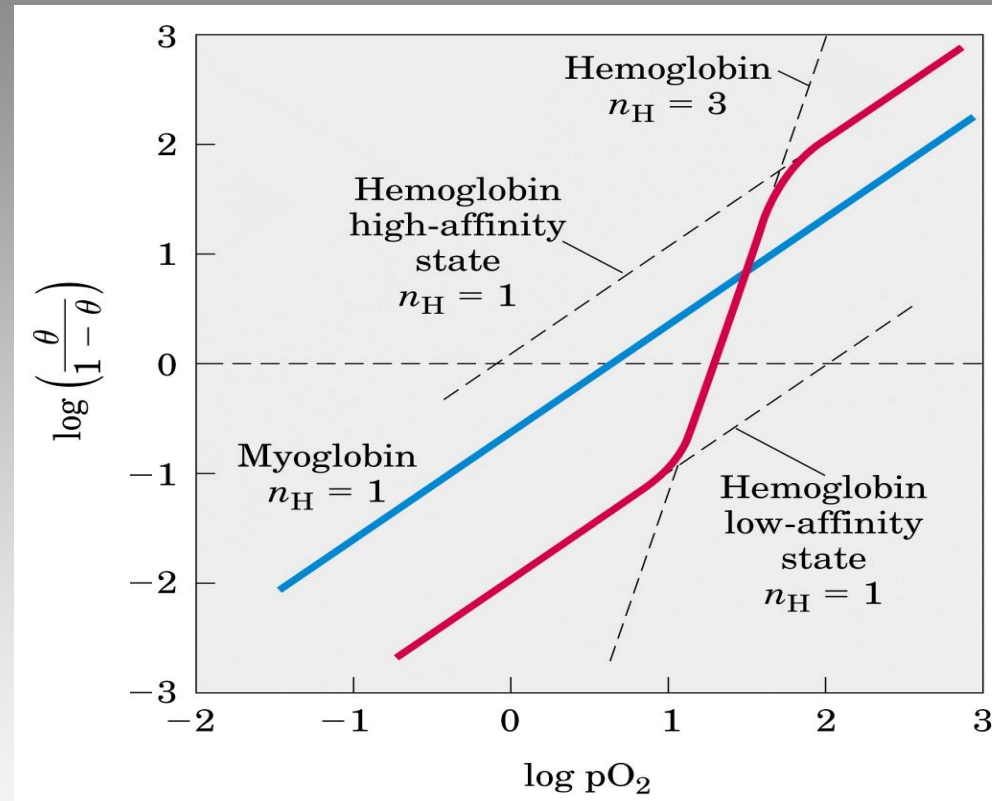
Y alveoli = 0.97

Y muscolo in attività = 0.32

Valori ottenuti utilizzando
la seguente equazione:

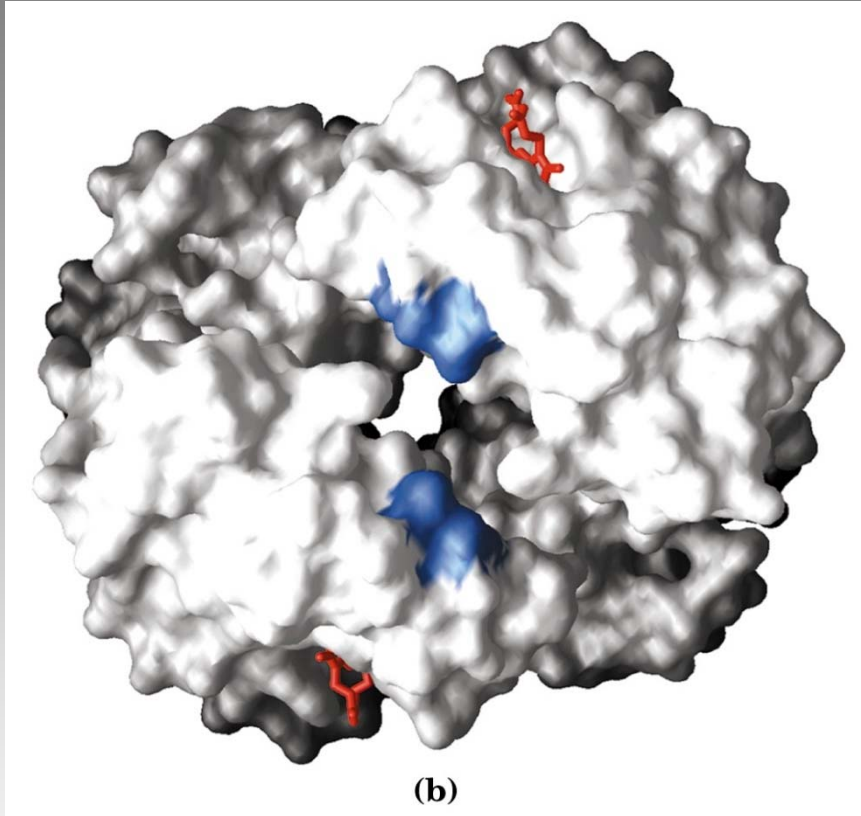
$$y = \frac{(pO_2)^n}{(pO_2)^n + (P_{50})^n}$$

IL COEFFICIENTE DI HILL

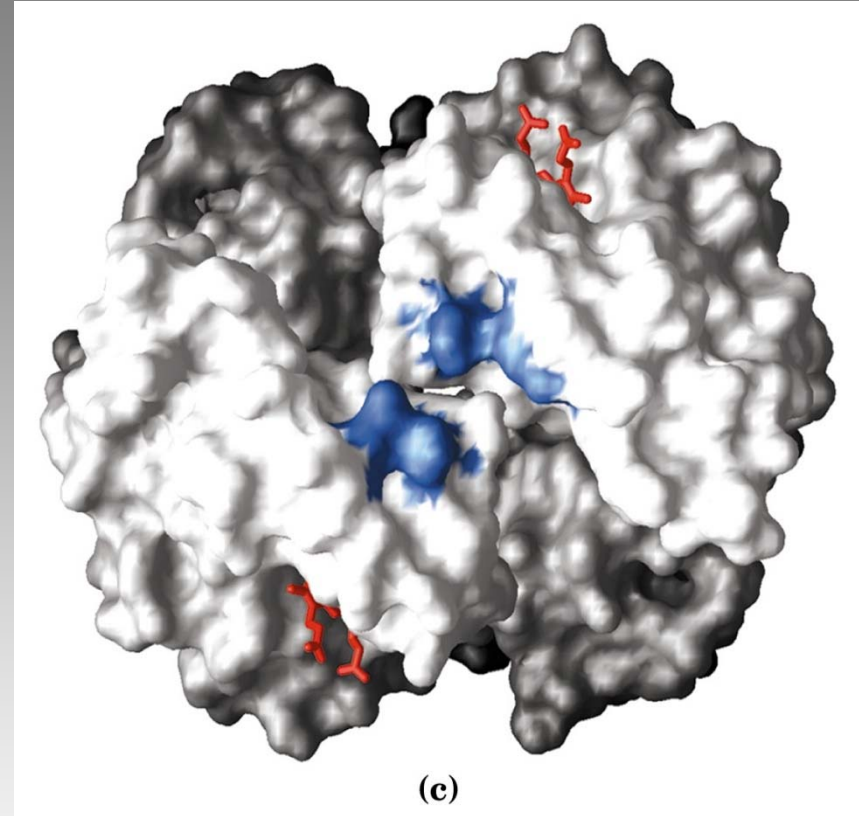


Il grafico di Hill per il legame dell'ossigeno alla mioglobina (blu) ed all'emoglobina (rosso).

L'EMOGLOBINA



DeossiHb



OssiHb (più compatta)

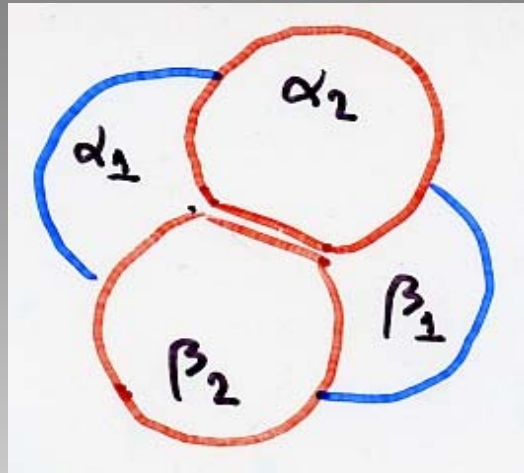
LE PROPRIETA' ALLOSTERICHE DELL'EMOGLOBINA

Le proprietà allosteriche dell'Hb derivano dalle interazioni tra le sue subunità,

le catene α isolate si comportano come la Mb,

le catene β isolate formano un tetramero mancante di proprietà allosteriche (HbH).

LE INTERAZIONI FRA LE SUBUNITA' DELL'Hb



Le subunità sono disposte ai vertici di un tetraedro, esistono notevoli interazioni tra le subunità di tipo diverso:

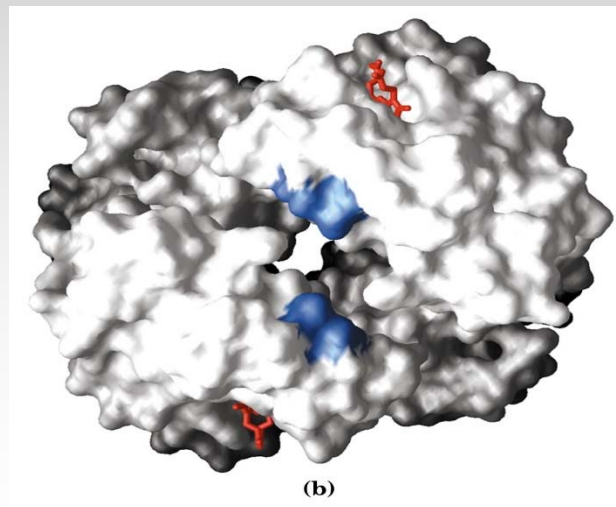
le interfacce $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ comprendono 35 residui,

le interfacce $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ comprendono 19 residui.

LE INTERAZIONI FRA LE SUBUNITA' DELL'Hb

Esse sono principalmente interazioni di carattere **idrofobico**,
sono presenti anche **leg.H** ed alcune **coppie ioniche**,

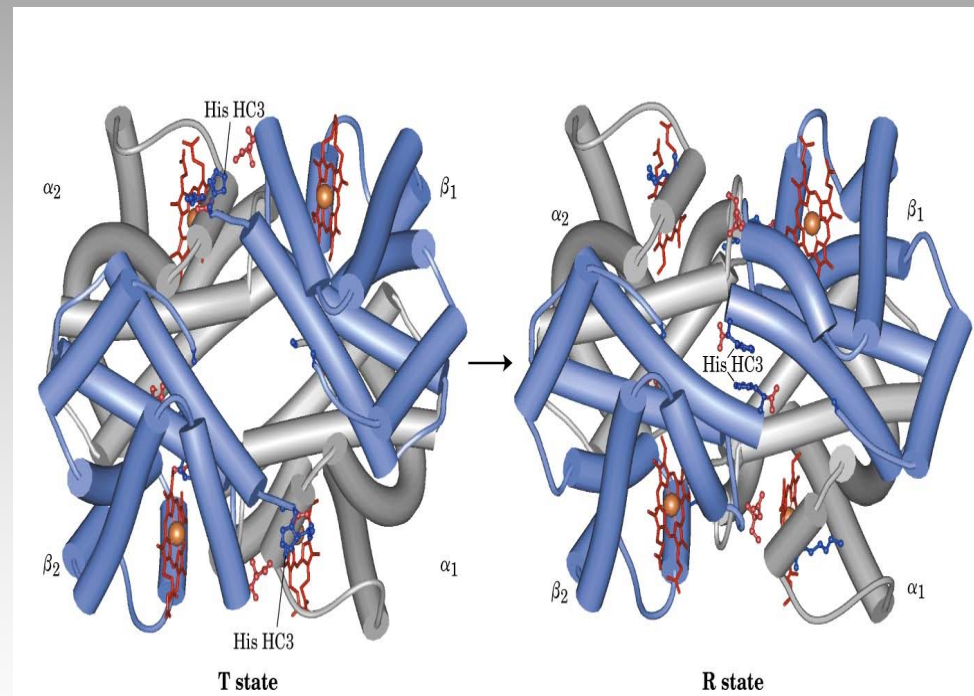
i contatti tra le subunità dello stesso tipo sono pochi e
prevalentemente polari;
infatti, sono separate da un **canale di 20A** pieno di solvente.



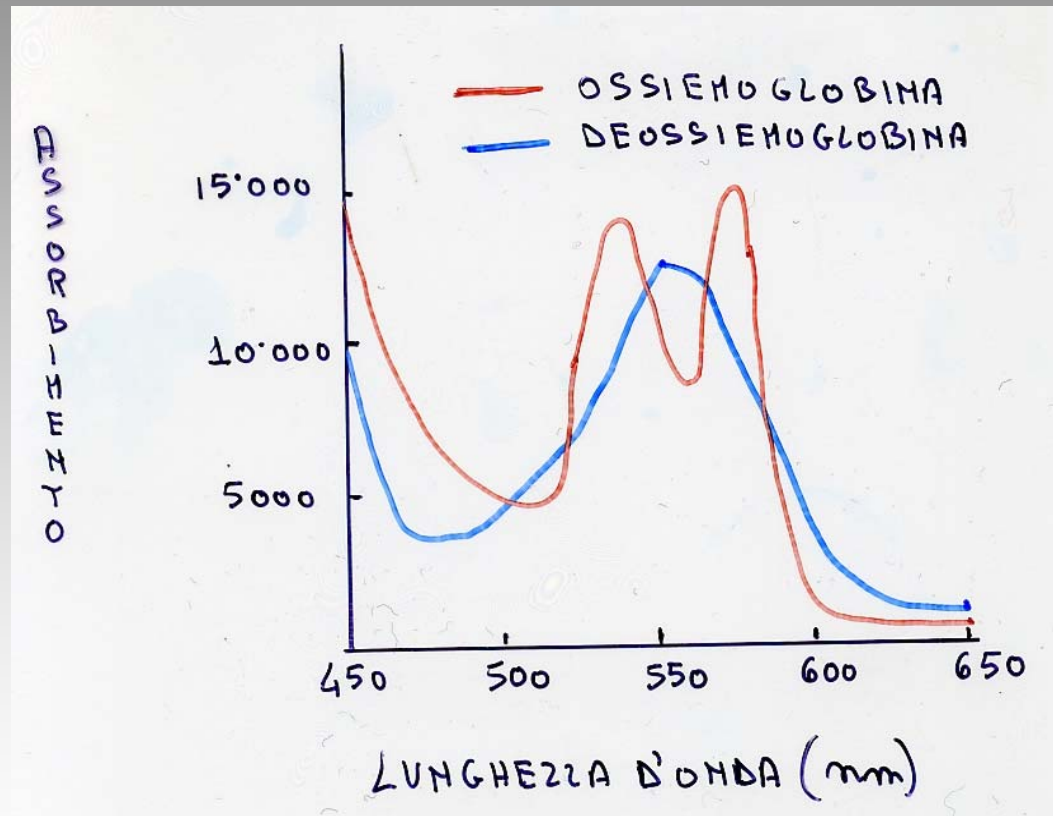
LA TRANSIZIONE T→R

L'Hb possiede due stati di struttura quaternaria:

- 1) la forma deossi (**stato T**),
- 2) la forma ossi (**stato R**), che ha affinità superiore per l'ossigeno, giustificando la cooperatività di legame.



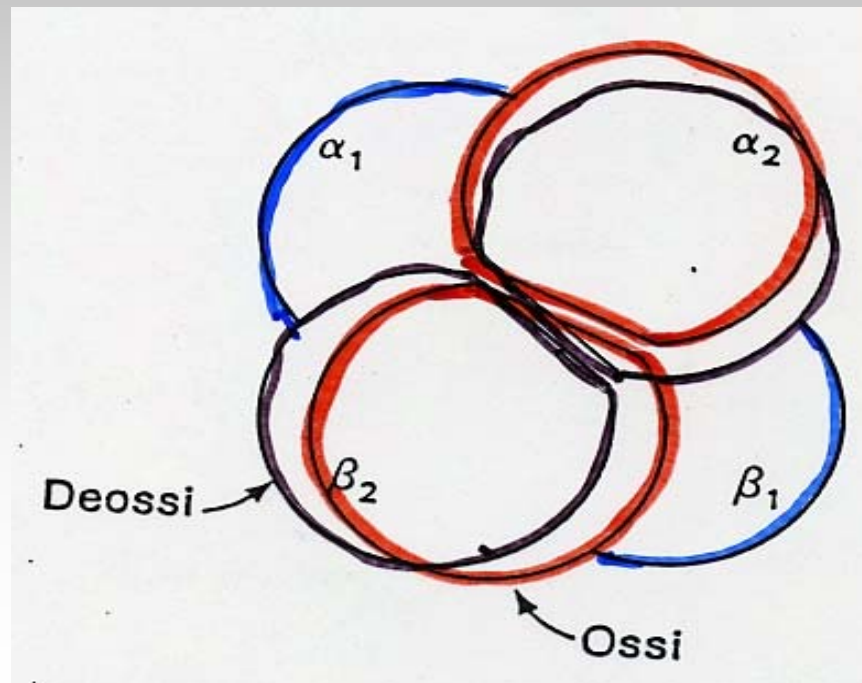
LO SPETTRO DI ASSORBIMENTO DELLA LUCE VISIBILE DELLA OSSIEMOGLOBINA E DEOSSIEMOGLOBINA



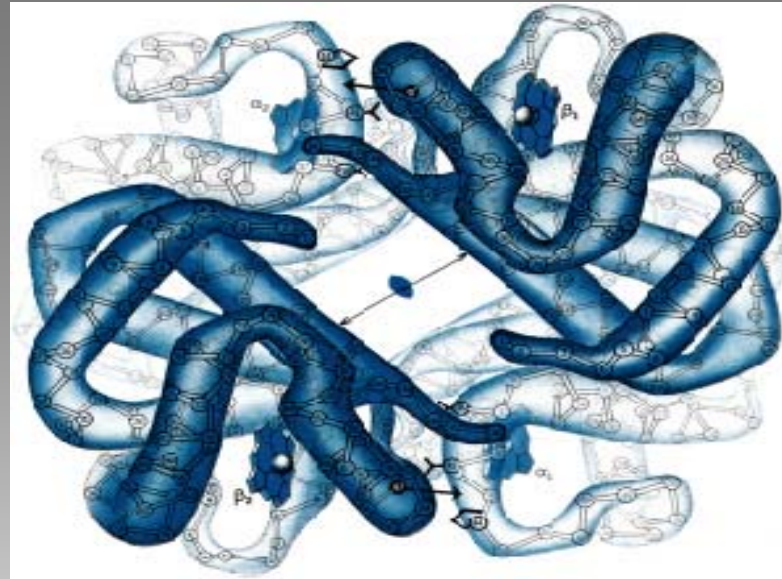
LA TRANSIZIONE T→R

L'ossigenazione determina un cambiamento nella struttura quaternaria, accompagnato ad un cambiamento della struttura terziaria della Hb,

una coppia $\alpha\beta$ ruota e scivola rispetto all'altra. Questo movimento porta le catene β più vicine tra loro e restringe la cavità centrale della molecola.



DEOSSIHb

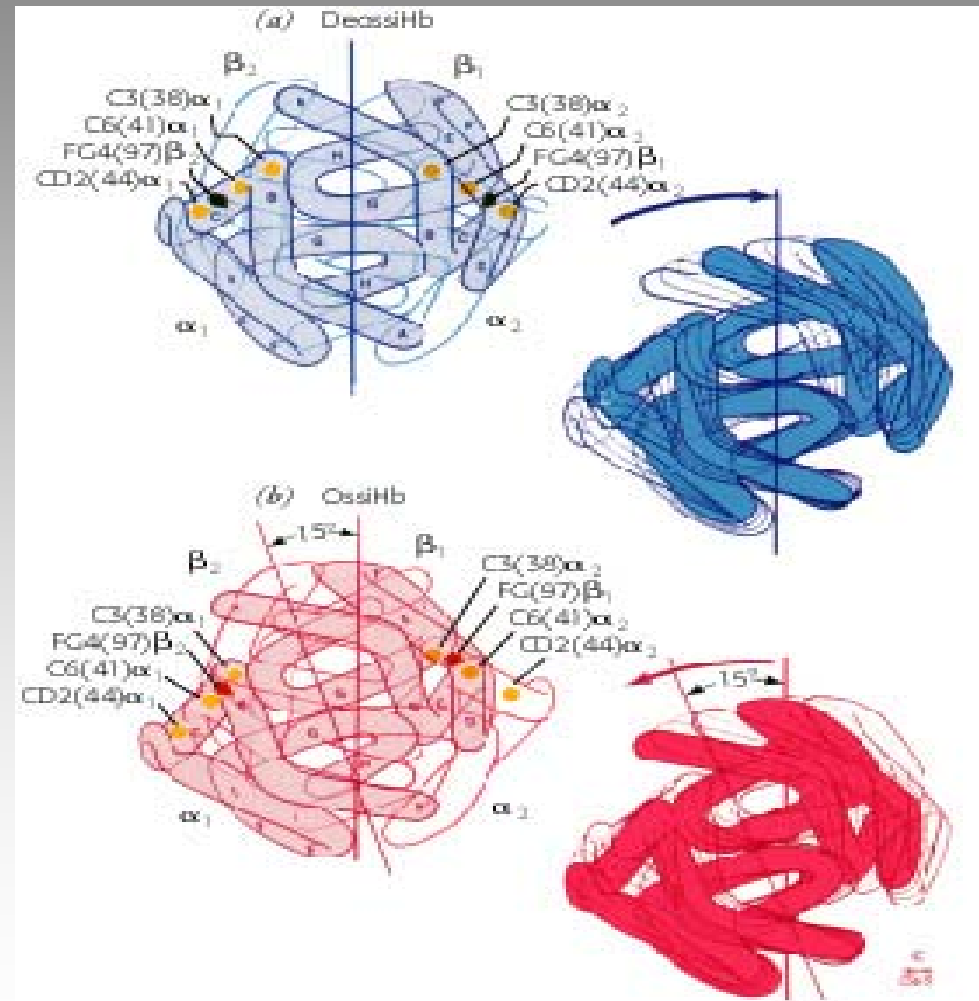


OSSIHb



LA TRANSIZIONE T→R

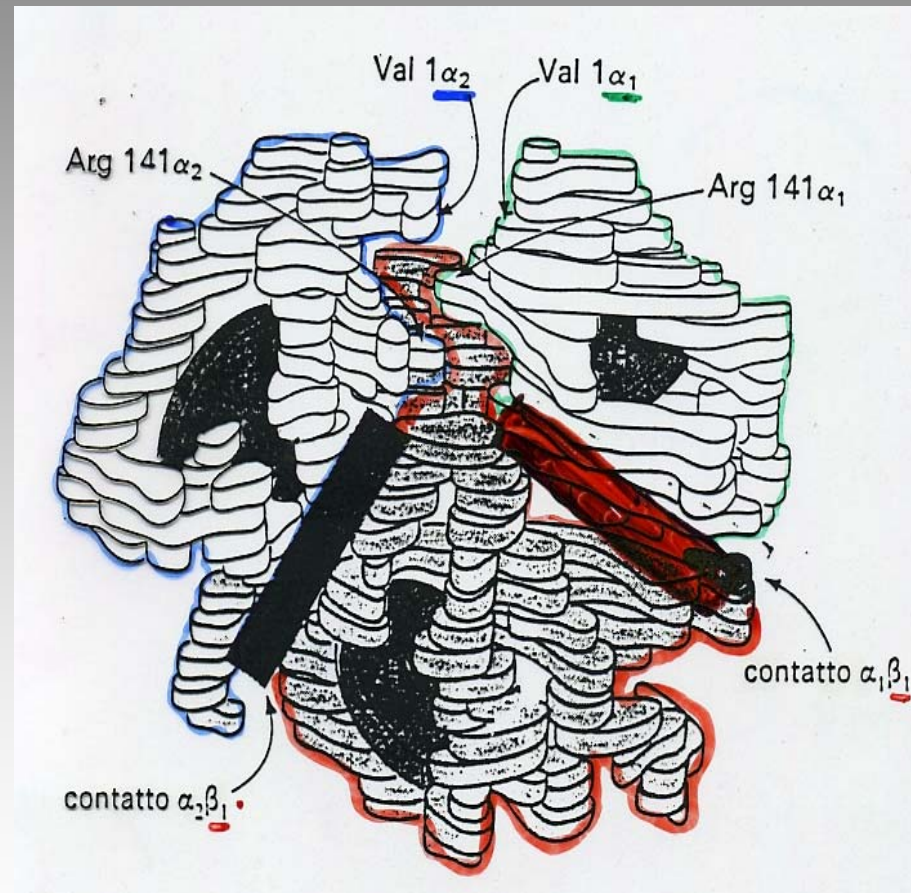
Durante l'ossigenazione, la coppia $\alpha_1 \beta_1$ ruota di 15° rispetto all'altra coppia.



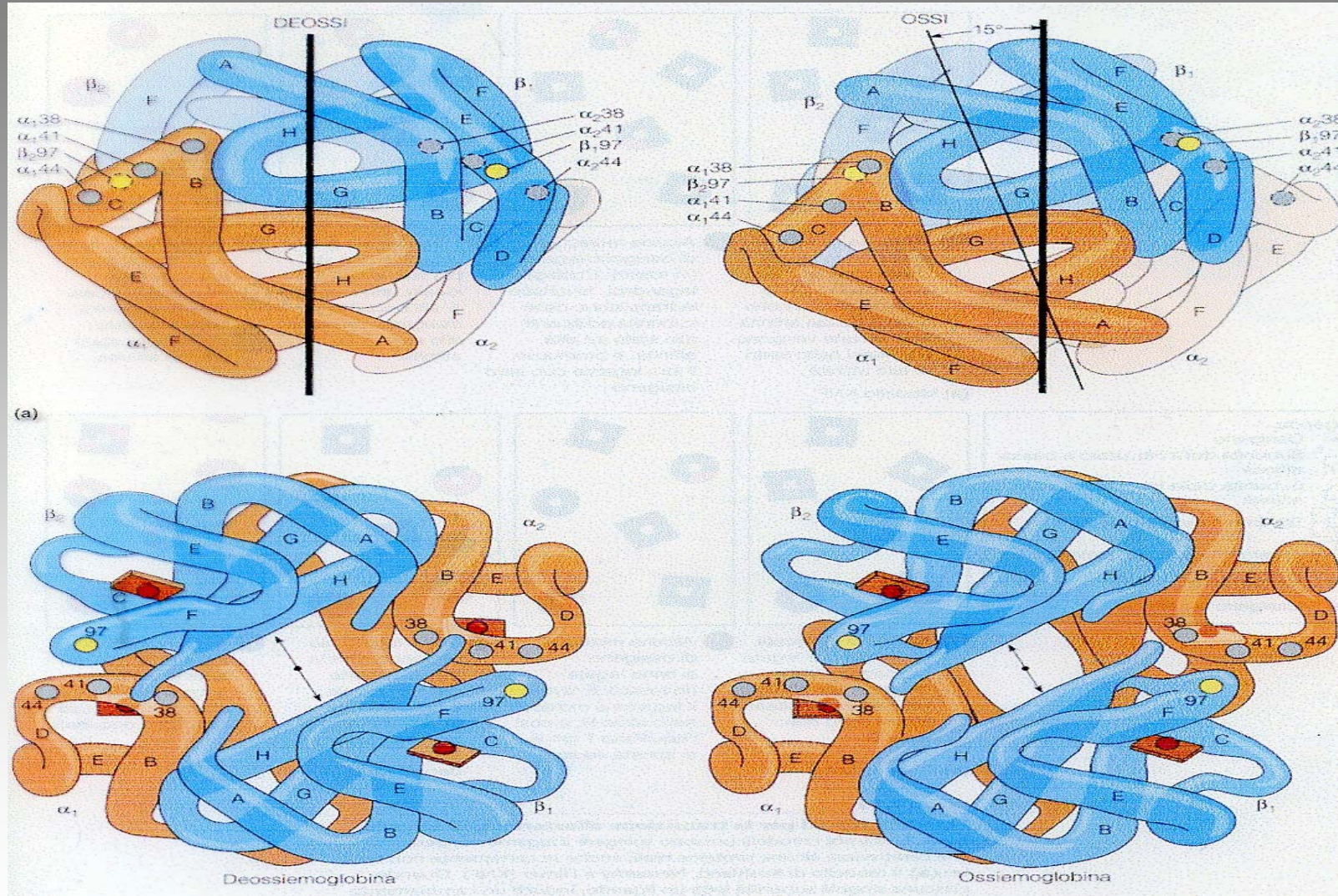
LA TRANSIZIONE T→R

Durante l'ossigenazione, i contatti $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ rimangono immutati,

numerose modificazioni strutturali avvengono a livello delle regioni di contatto $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$.

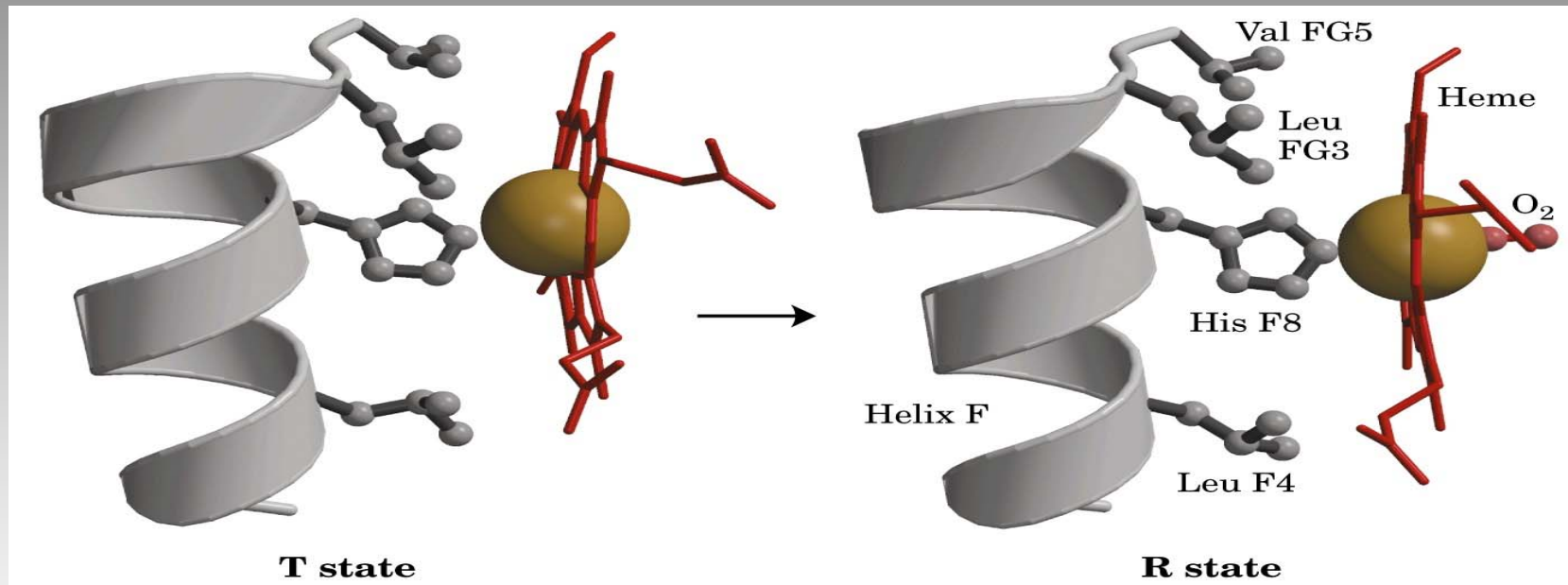


LA TRANSIZIONE T→R



LA TRANSIZIONE T→R

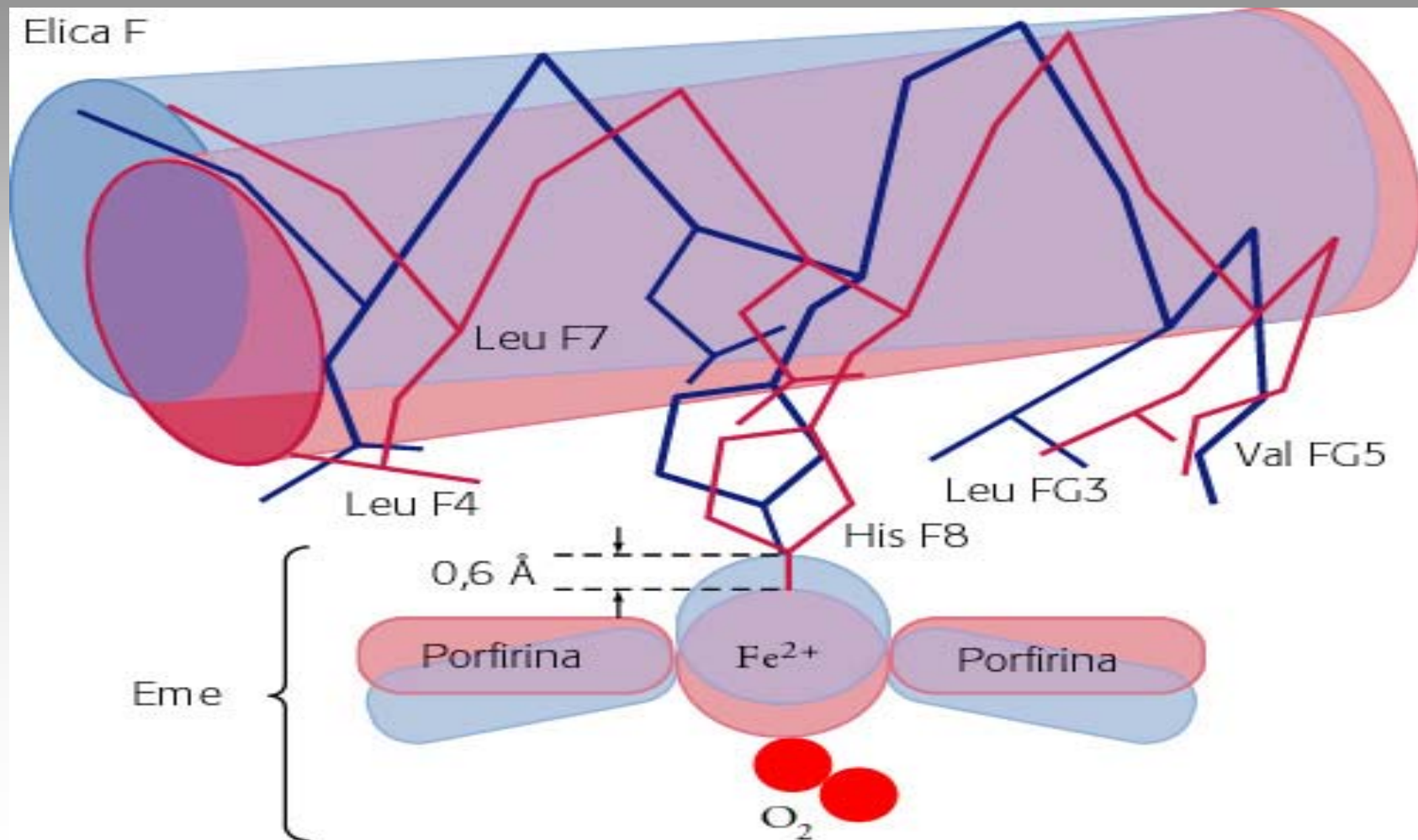
Il legame dell'O₂ ad una subunità determina cambiamenti nella sua struttura terziaria a partire dall'eme, che da una forma "curvata" assume una forma "appiattita".



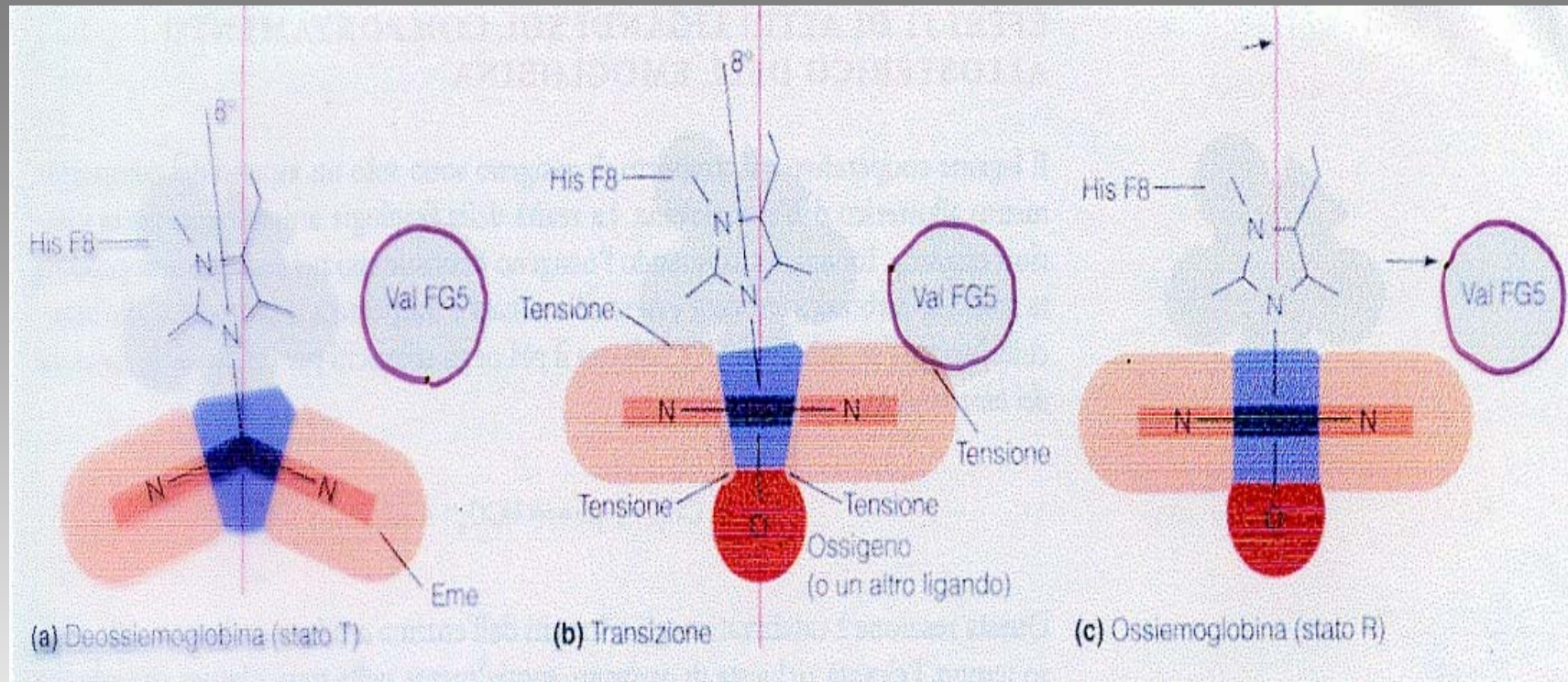
Questo provoca una tensione ed un conseguente cambiamento nella struttura circostante, in particolare nelle zone critiche dell'interfaccia $\alpha\beta$.

LA TRANSIZIONE T→R

Il legame dell' O_2 determina una contrazione di circa 0.1Å dei legami **Fe-N porfirina** ed il conseguente abbassamento della cupola dell'eme.



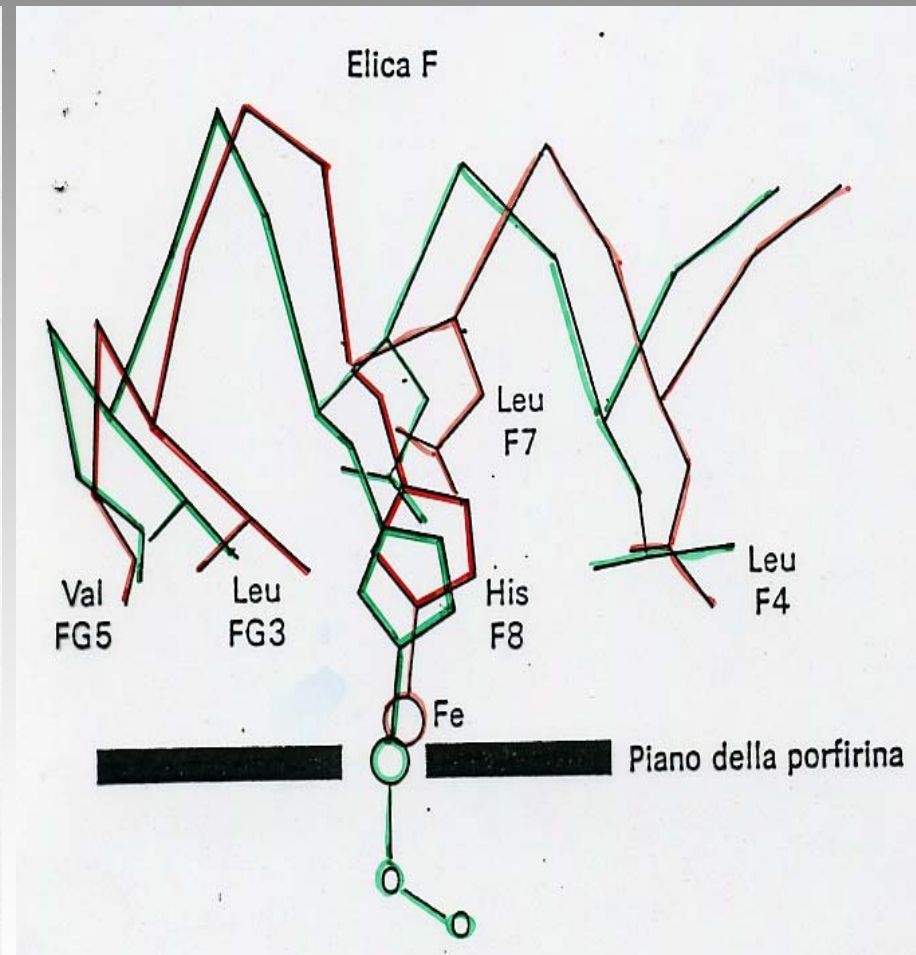
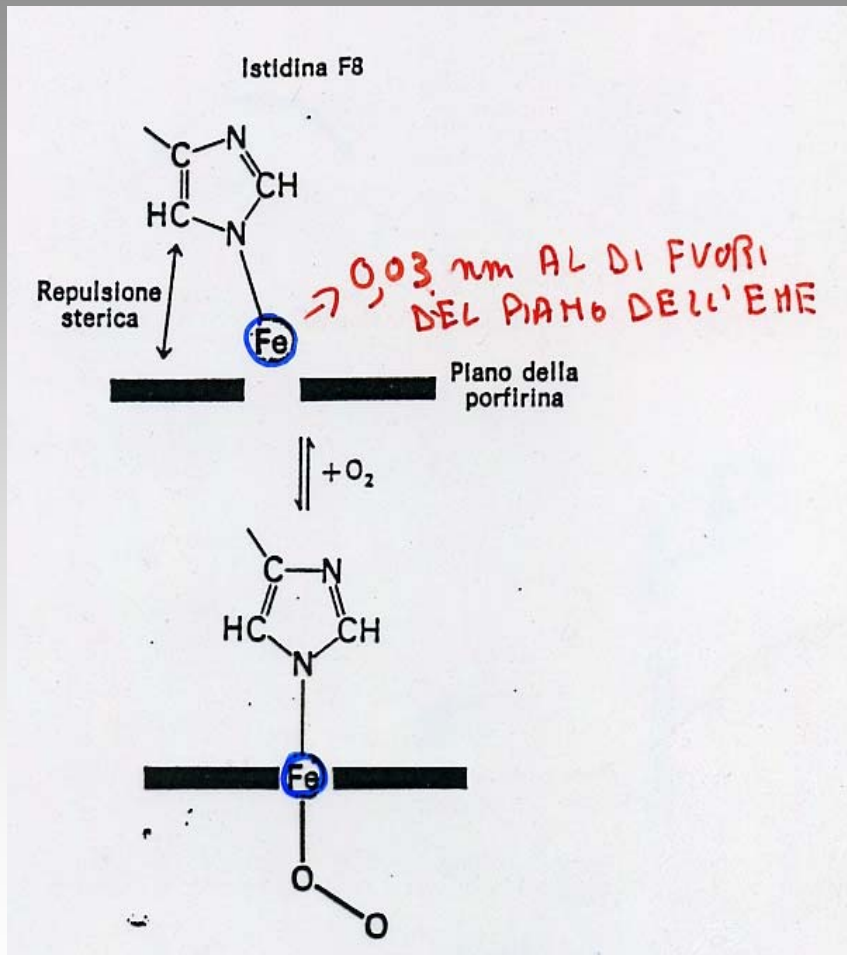
LA TRANSIZIONE T→R



Il legame dell'ossigeno attira il ferro all'interno del piano dell'eme, appiattendolo e provocando tensione, che è attenuata da una variazione nell'orientamento della **His F8** e ciò è in parte mediato dalla spinta verso destra della **val FG5**.

Il cambiamento di struttura terziaria dell'eme viene comunicato all'angolo **FG**.

IL MOVIMENTO DEL FERRO ALL'INTERNO DELL'EME, CHE DIVENTA PIÙ PLANARE, VIENE TRASMESSO ALLE ALTRE SUBUNITÀ ATTRAVERSO MODIFICAZIONI CONFORMAZIONALI ALLE LORO INTERFACCE.

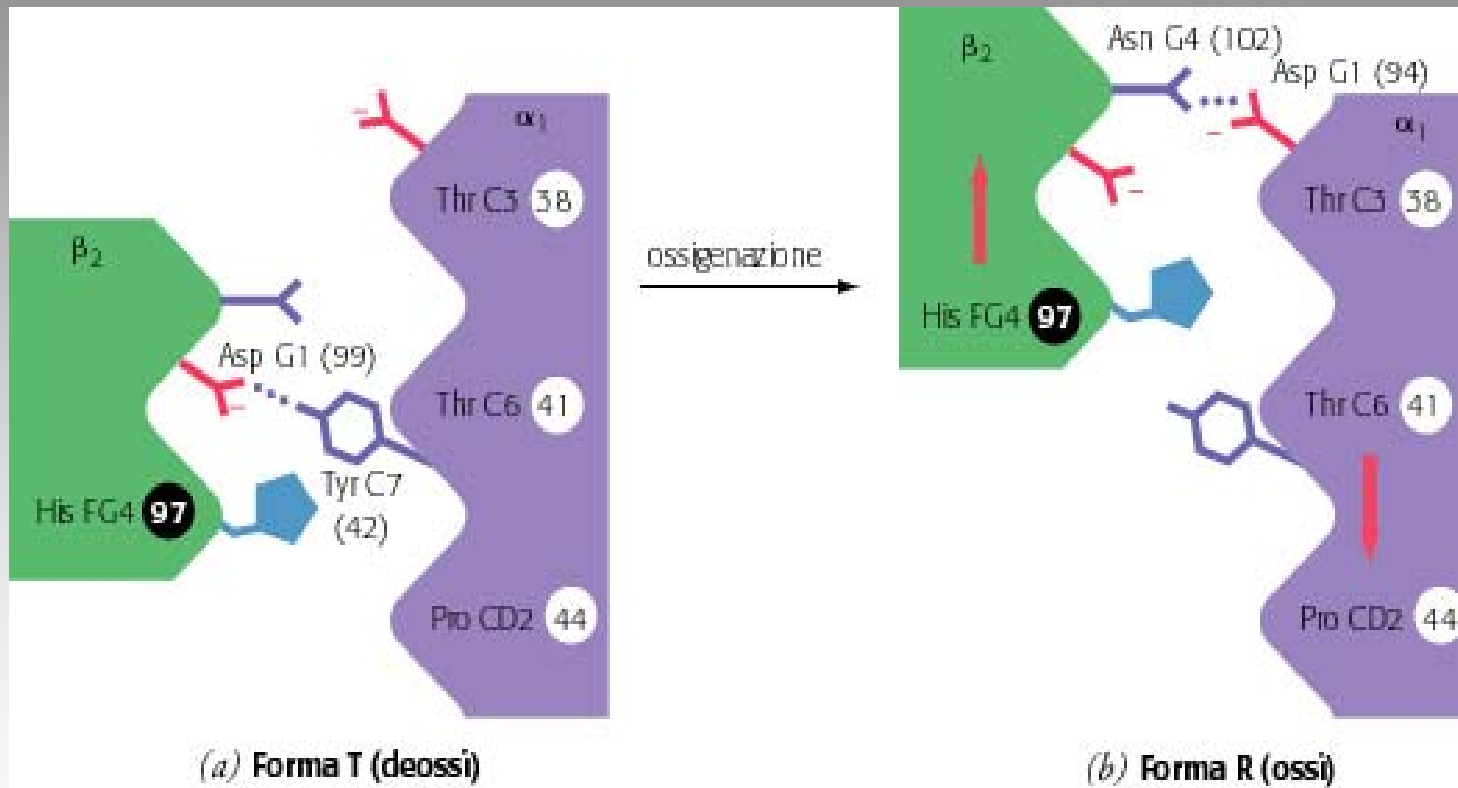


LA TRANSIZIONE T→R

Il rimaneggiamento della **struttura terziaria** di una subunità porta ad un accumulo di tensione che determina una **transizione quaternaria (T→R)**.

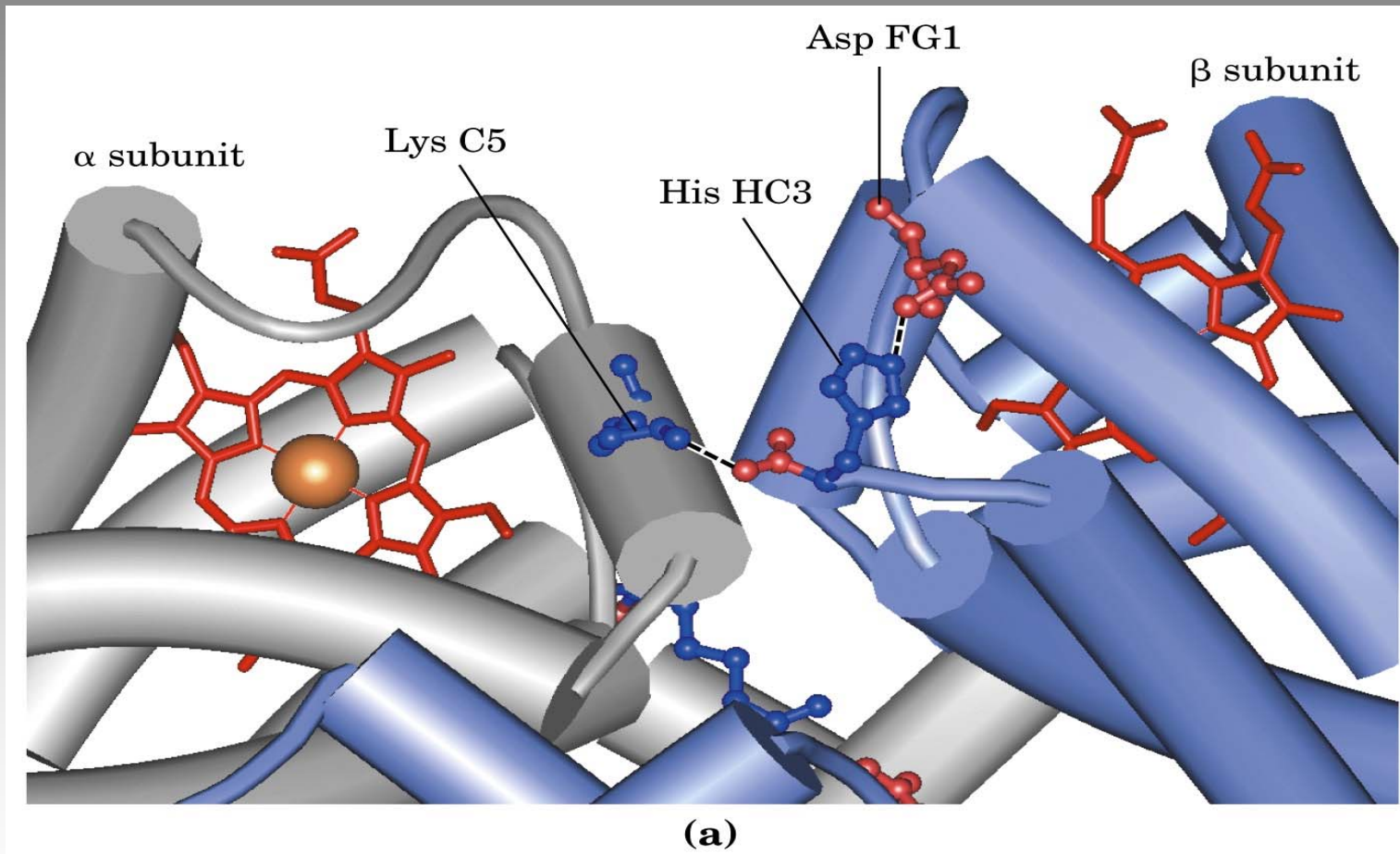
I CONTATTI ALL'INTERFACCIA $\alpha\beta$

Le regioni di contatto tra due subunità agiscono come un **interruttore** in grado di innescare due strutture diverse. Le due strutture sono stabilizzate da gruppi diversi di **legami H**;

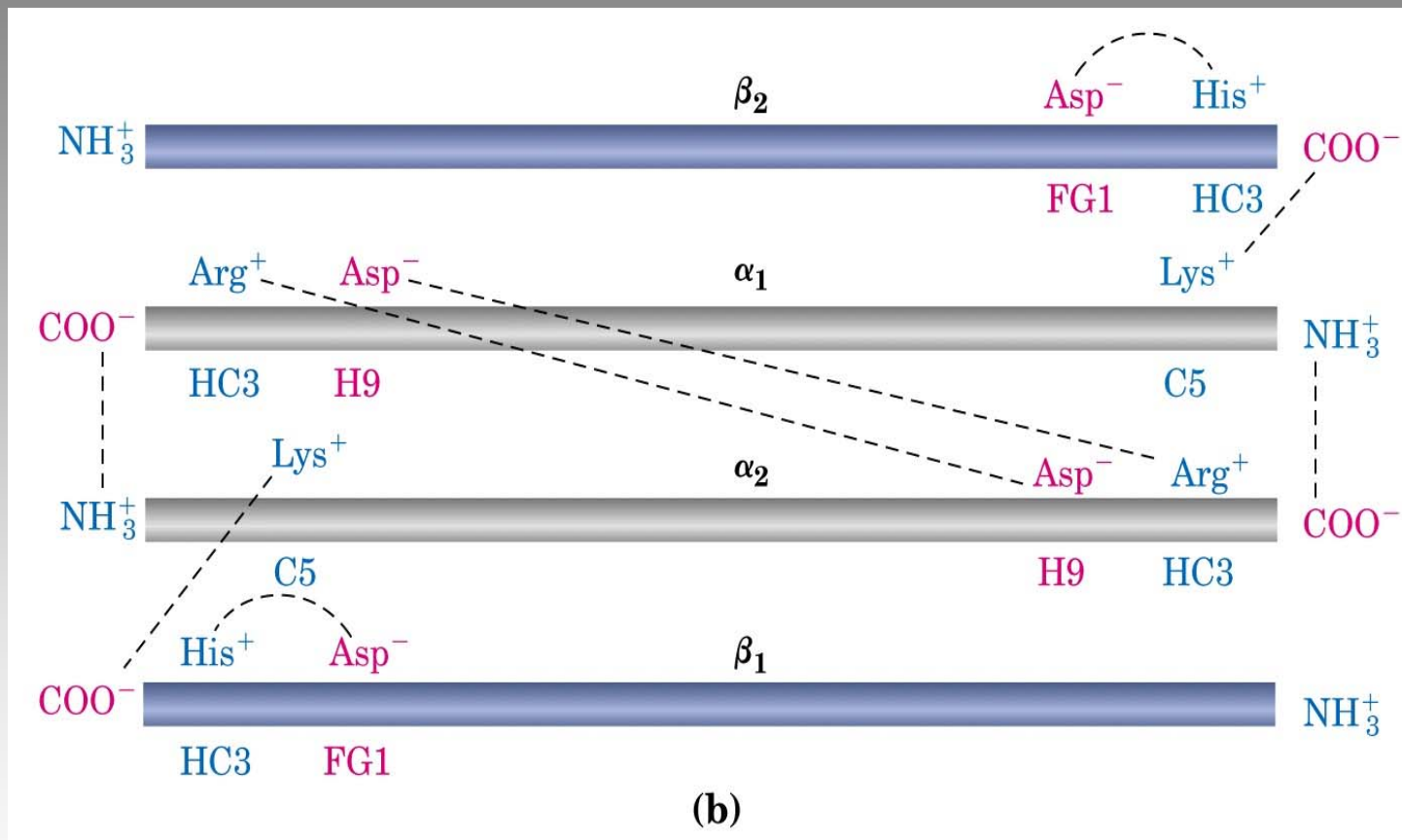


in entrambe le conformazioni, le **"protuberanze"** di una subunità si adattano esattamente agli **"incavi"** presenti nell'altra subunità.

OTTO COPPIE IONICHE (PONTI SALINI) STABILIZZANO LO STATO T DELLA DEOSSIEMOGLOBINA

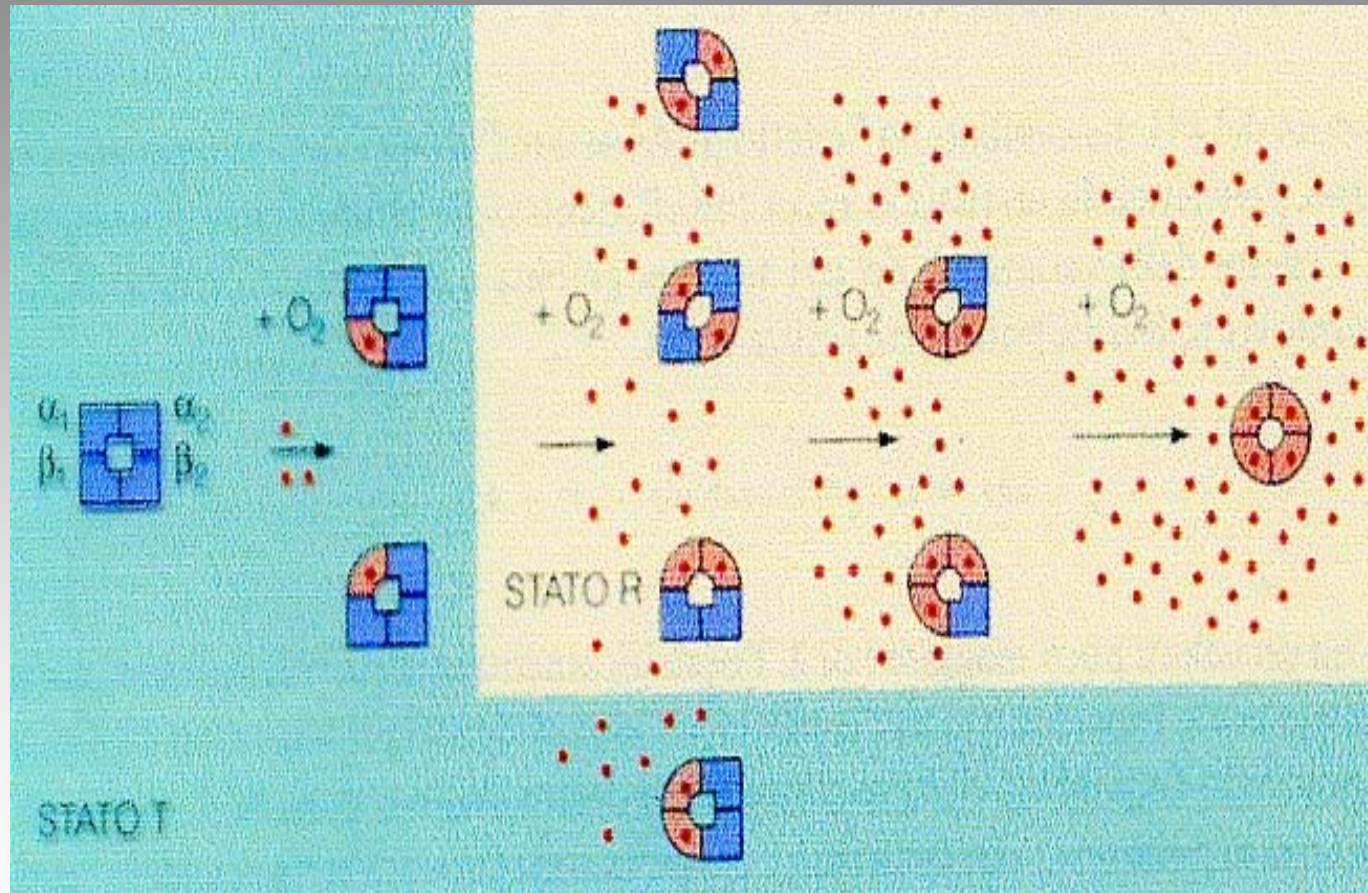


GLI OTTO LEGAMI SALINI FRA LE SUBUNITÀ DELLA DEOSSIEMOGLOBINA



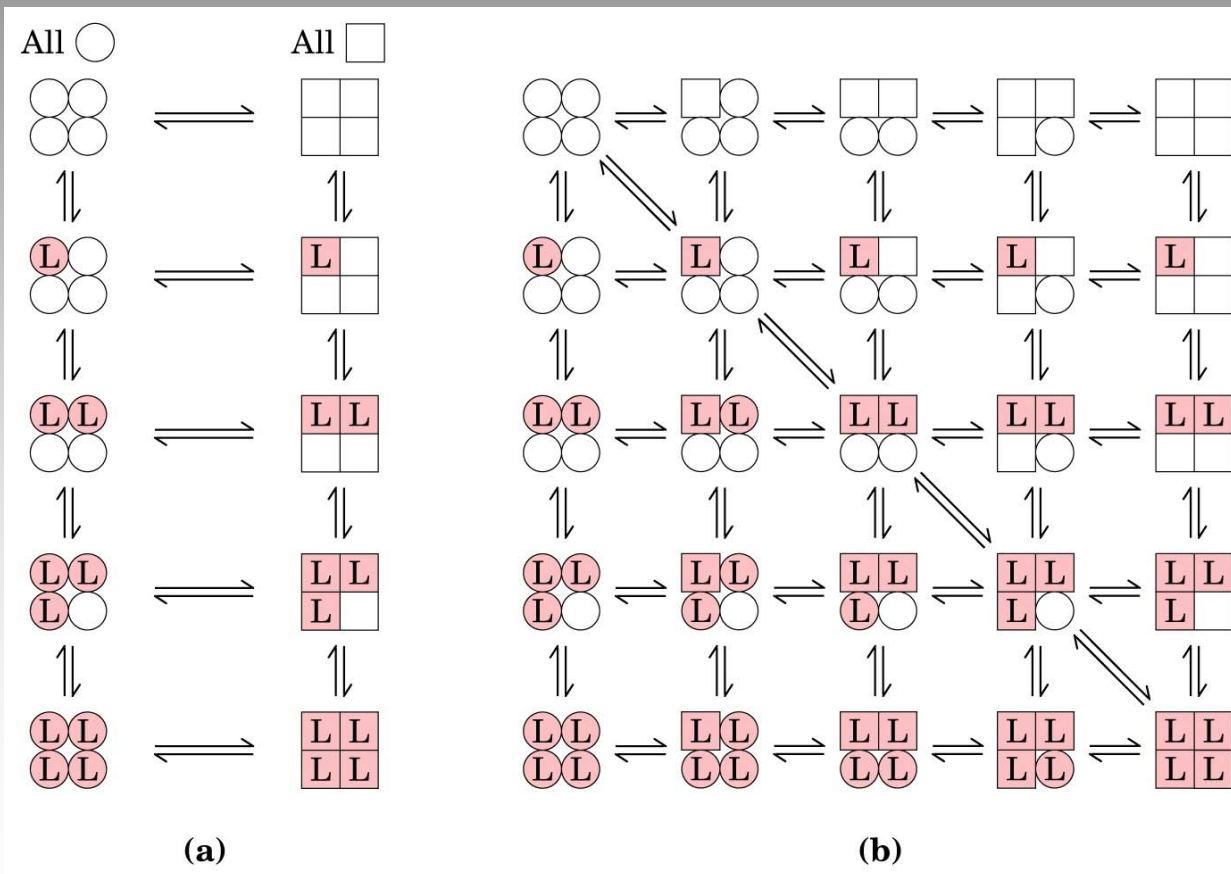
La transizione T→R determina la **rottura** dei ponti salini.

UN MODELLO RECENTE PER LA TRANSIZIONE COOPERATIVA DELL'EMOGLOBINA.



LA TRANSIZIONE T→R

A=modello concertato B=modello sequenziale



I modelli Allosterici

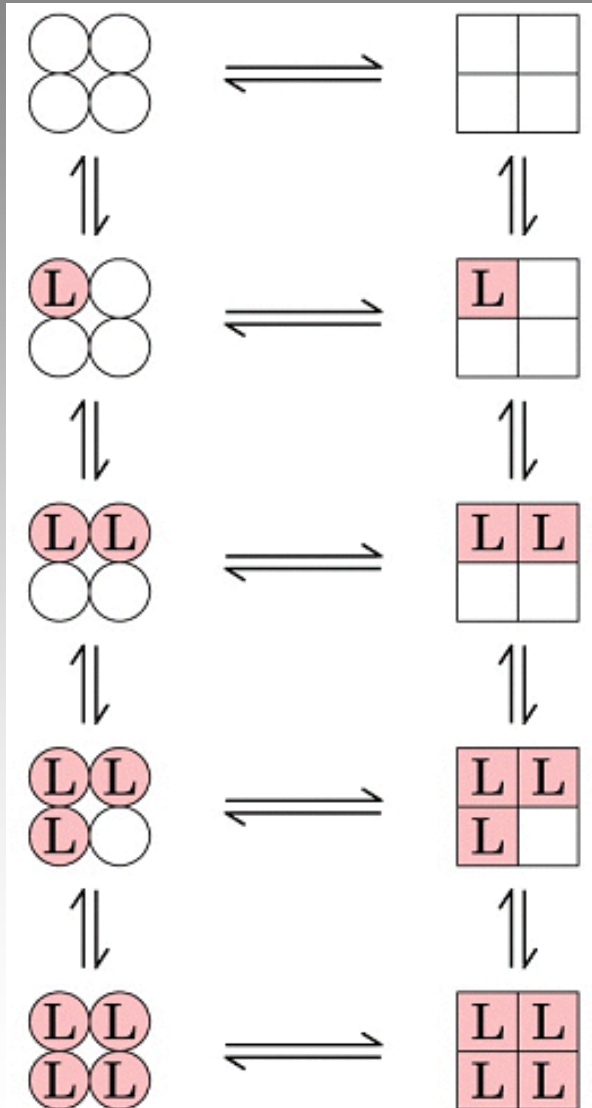
Sono stati sviluppati diversi modelli per cercare di descrivere i meccanismi molecolari alla base dei fenomeni di cooperatività di legame nelle proteine allosteriche.

Il modello più noto che descrive il legame cooperativo di un ligando ad una proteina è il modello MWC sviluppato nel 1965 da J. Monod, J. Wyman e J.P. Changeaux.

Il modello simmetrico MWC (1965)

Protomeri
nello stato T

Protomeri
nello stato R

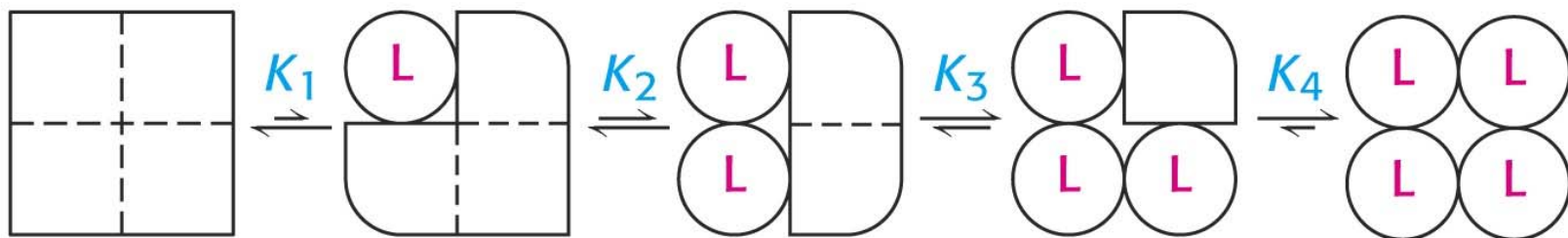


- Una proteina allosterica è un oligomero costituito da protomeri (subunità) simmetricamente correlati;
- ogni protomero può esistere in due stati conformazionali, chiamati T (tensed) e R (relaxed) in equilibrio tra loro;
- il legame del ligando induce un cambiamento conformazionale concertato dalla forma T alla forma R senza formazione di specie intermedie e mantenendo la simmetria della proteina.

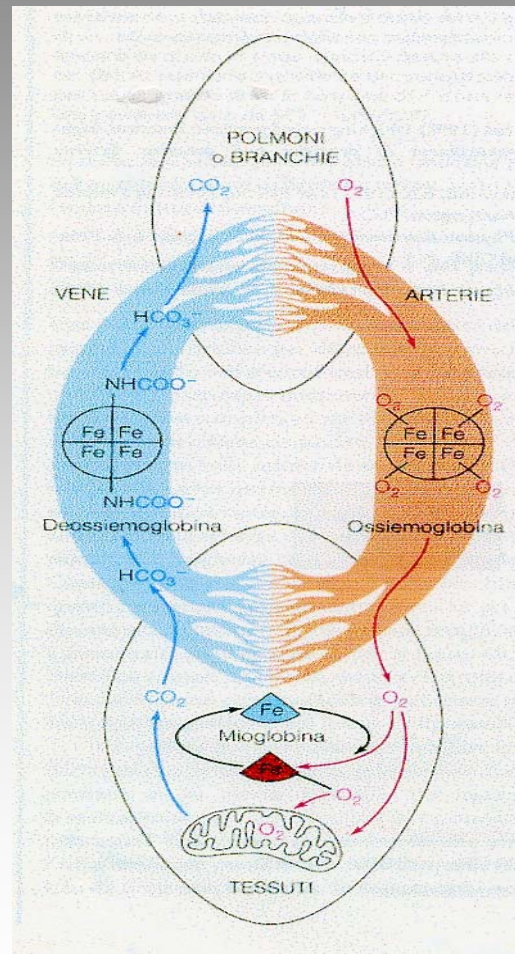
Il modello sequenziale KNF (1966)

Koshland, Nemethy e Filmer nel 1966 proposero un modello confermato in molti enzimi mediante analisi ai raggi X.

Nel modello sequenziale, il legame del ligando induce una modificazione conformazionale in un protomero (subunità); le interazioni cooperative derivano dagli effetti che queste variazioni conformazionali hanno sulle subunità vicine. L'affinità della proteina per il legame del ligando varia con il numero di molecole di ligando legate, passando attraverso una serie di forme intermedie.



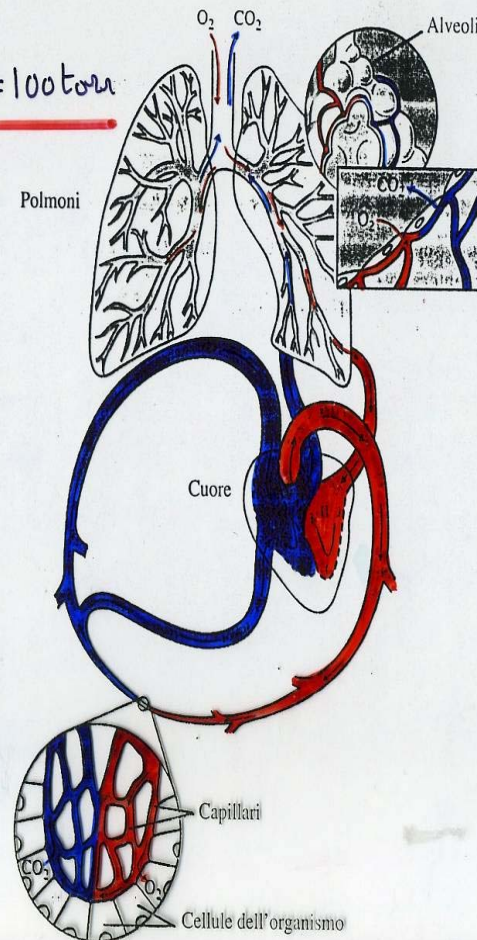
IL MOVIMENTO DELL'O₂ ATTRAVERSO IL SISTEMA RESPIRATORIO E CIRCOLATORIO



IL MOVIMENTO DELL'O₂ E DELLA CO₂ ATTRAVERSO
IL SISTEMA RESPIRATORIO E CIRCOLATORIO

pO₂ NEGLI ALVEOLI POLMONARI = 100 torr

pO₂ NEI CAPILLARI DEI MUSCOLI
IN ATTIVITÀ = 20 torr



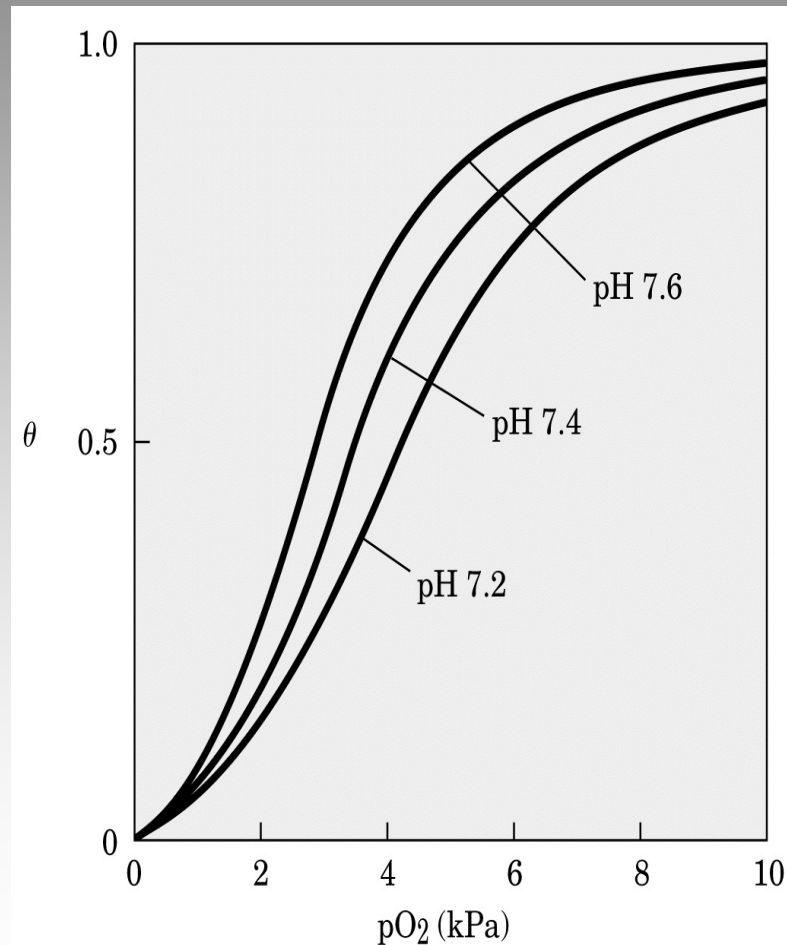
L'EFFETTO BOHR

L'effetto della variazione del pH sull'Hb.

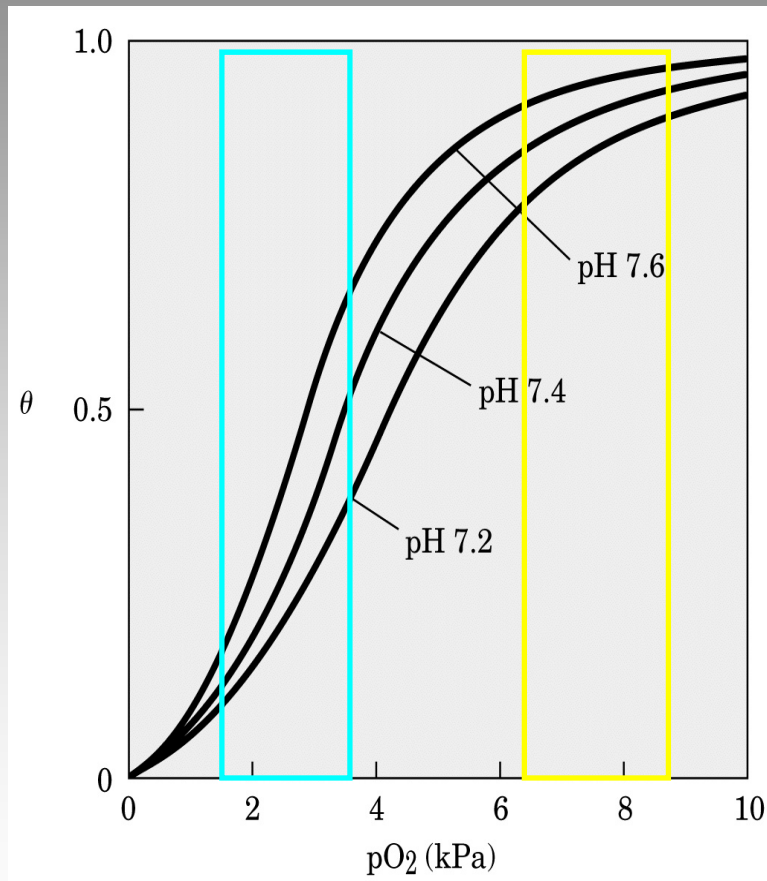
Una **caduta del pH** nei capillari tissutali ha l'effetto di abbassare l'affinità dell'Hb per l'ossigeno, permettendo un **rilascio ancora più efficiente** delle ultime tracce di ossigeno legato.

L'effetto reciproco avviene nei capillari dei polmoni.

Il pH è un **effettore eterotropico negativo**.



L'EFFETTO BOHR NELL'Hb



L'efficienza di rilascio dell' O_2 aumenta fortemente con la diminuzione del pH.

Quando il sangue circola dai polmoni (giallo) ai tessuti (azzurro), il basso valore di pH sposta il legame dell' O_2 verso le curve a più bassa affinità.

Nel caso della Mb, l'effetto Bohr è scarso.

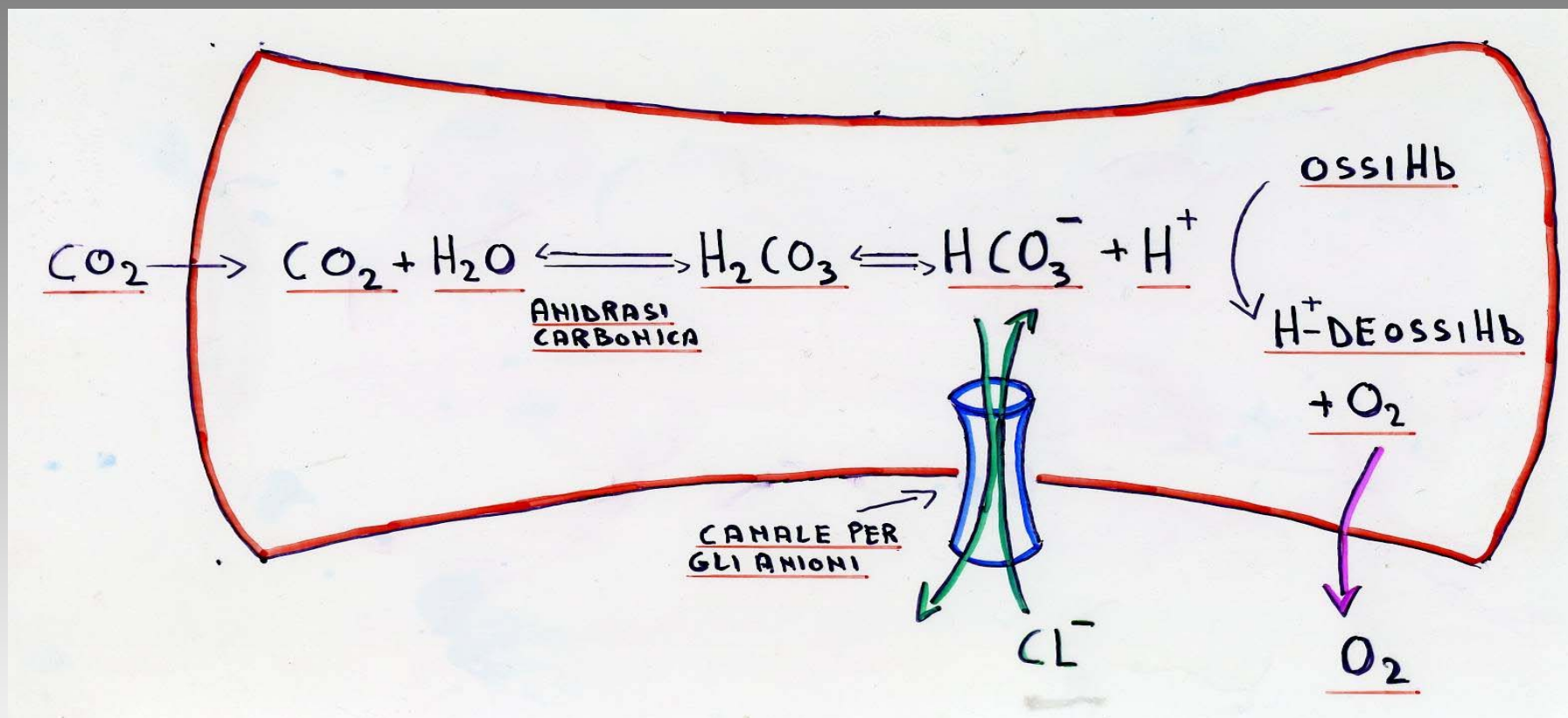
L'EFFETTO BOHR

Durante la respirazione, 0,8 molecole di CO_2 sono formate per ogni molecola di O_2 consumata; la CO_2 diffonde dai tessuti ai capillari.

Nei globuli rossi:



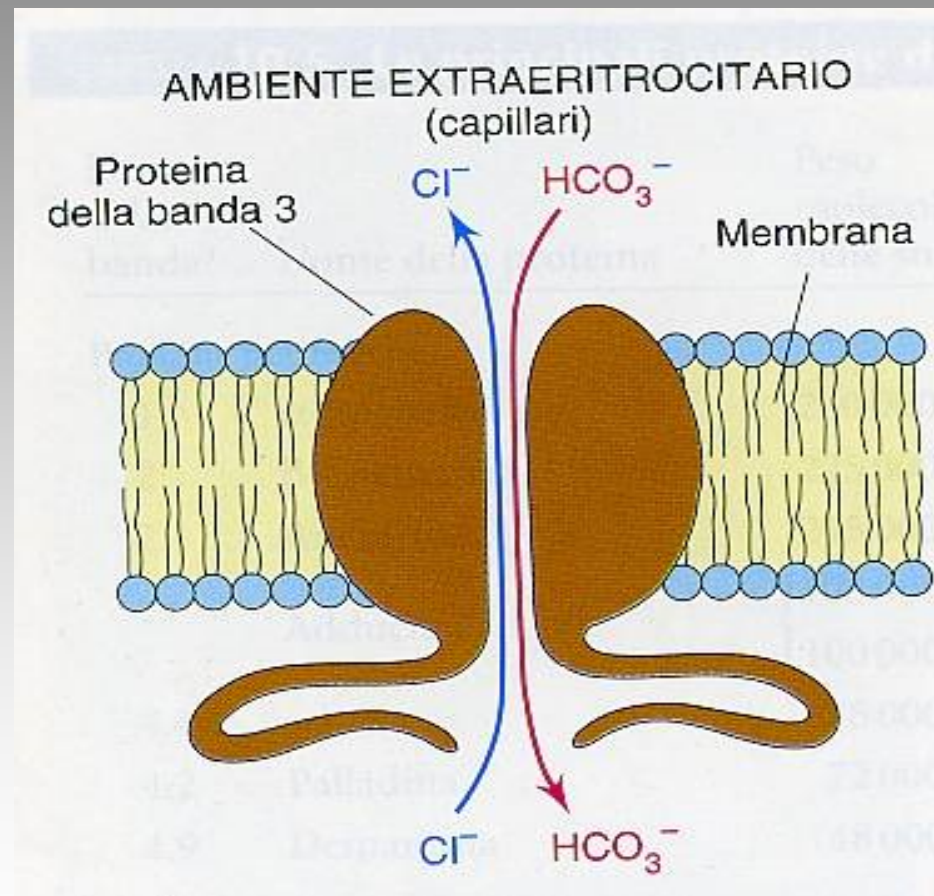
L'EFFETTO BOHR NEL GLOBULO ROSSO



Gli ioni H⁺ vengono assunti dalla Hb che viene indotta a rilasciare l'O₂ che ha legato.

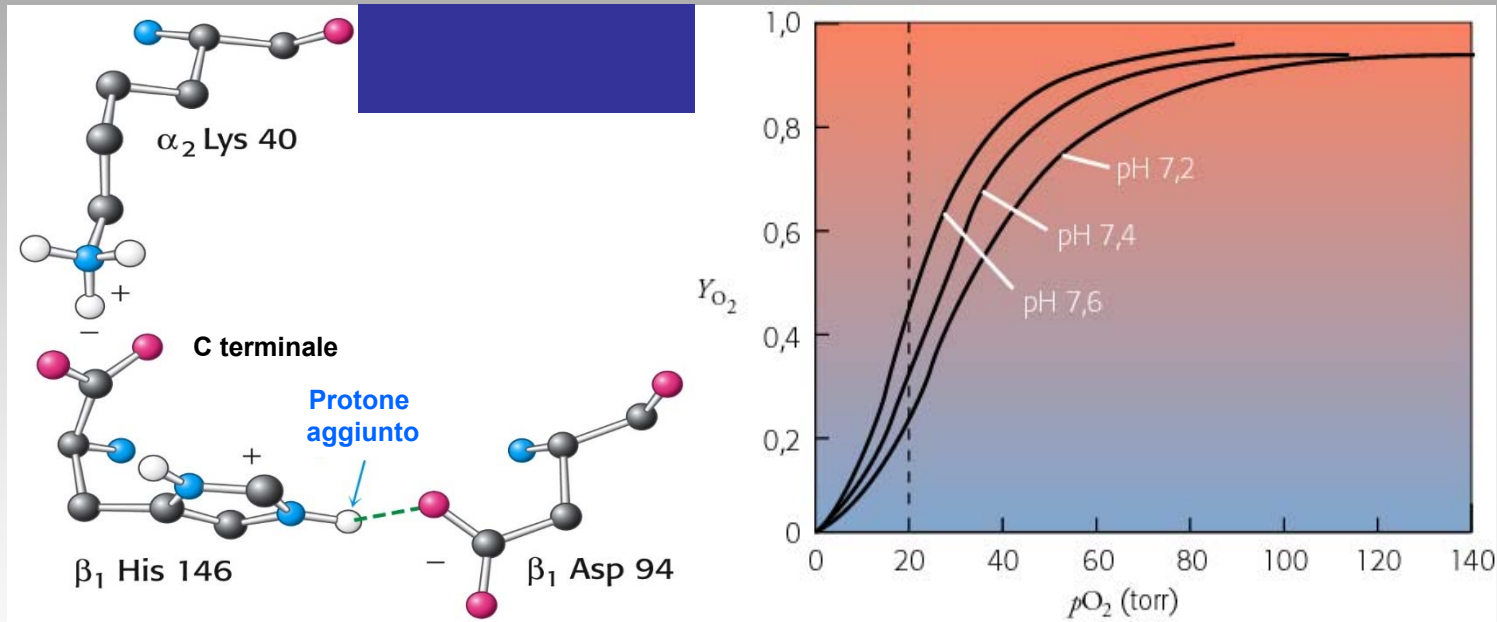
Al contrario, nei polmoni, dove la pO₂ è elevata, il legame dell'ossigeno all'Hb determina il rilascio dei protoni implicati nell'effetto Bohr.

LA PROTEINA TRASPORTATRICE DEGLI ANIONI NELL'ERITROCITA

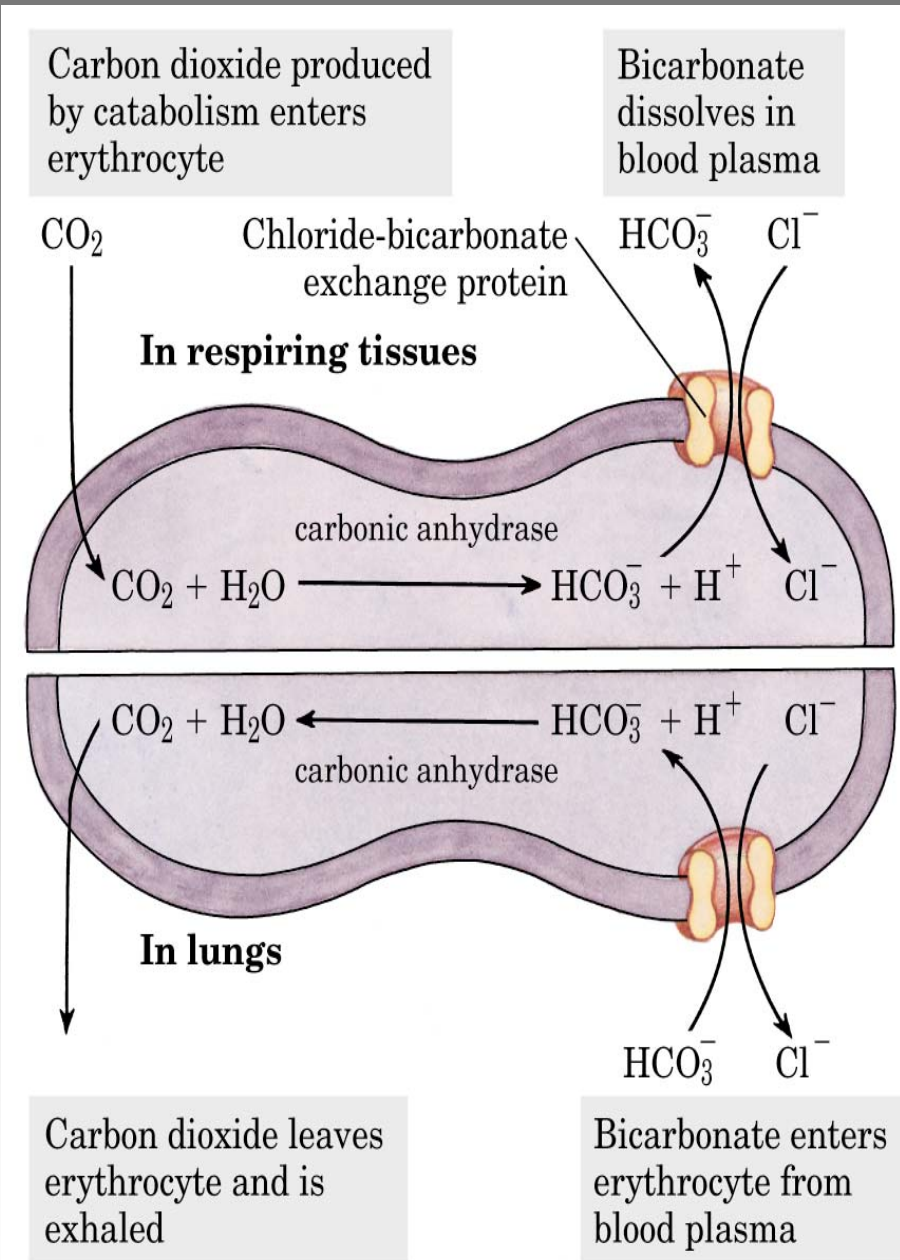


IL RUOLO DEGLI IONI H^+ ASSUNTI DALL'Hb

Gli ioni H^+ permettono l'interazione tra l'**His 146** (cat. β_1) e l'**Asp 94** (cat. β_1), stabilizzando lo **stato T** (deossi) dell'Hb.



RIASSUNTO DELL'EFFETTO BOHR NEL GLOBULO ROSSO



L'EFFETTO BOHR

La reazione complessiva è:



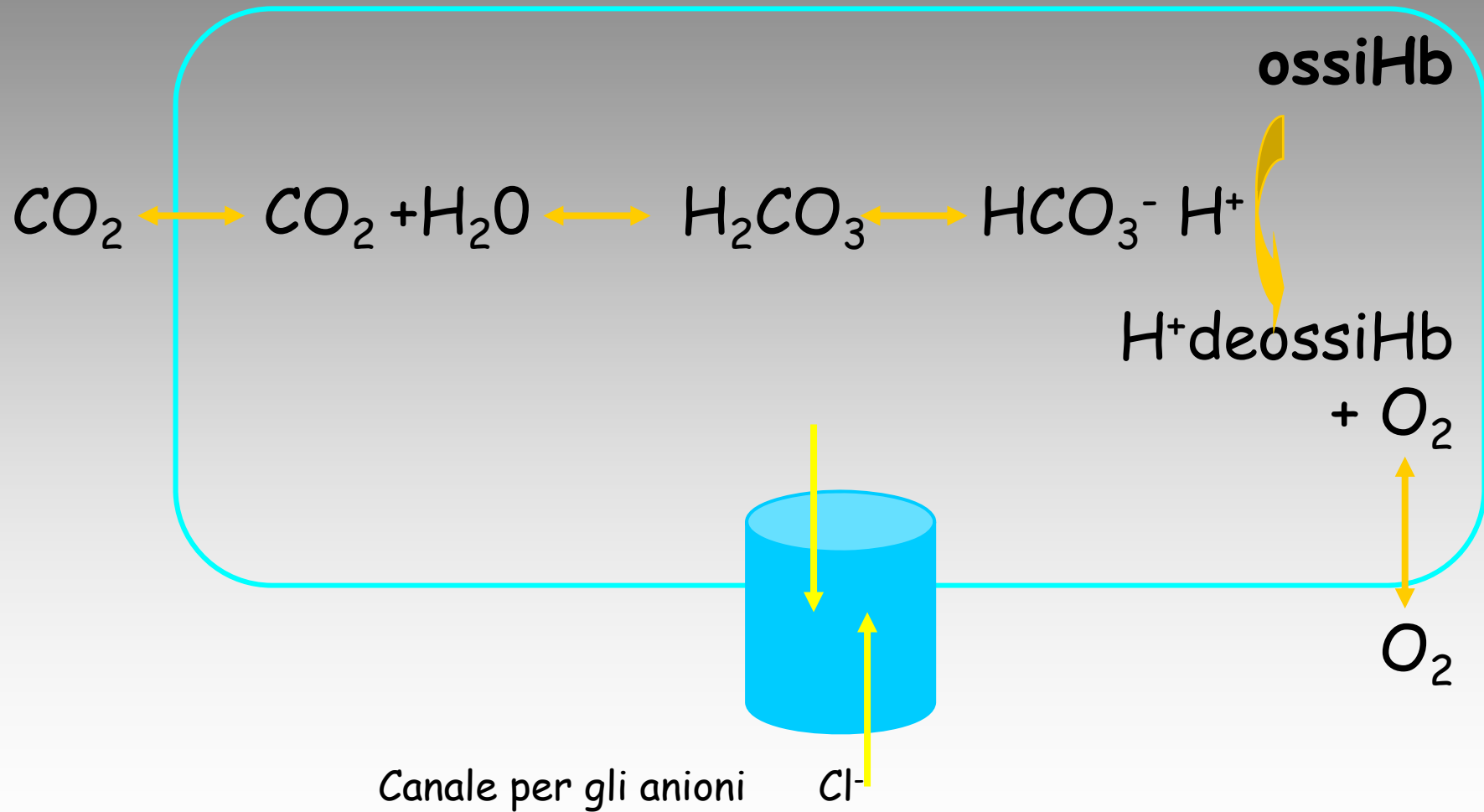
dove n ha un valore poco superiore a 2

Nei **capillari tessutali**, gli ioni H^+ promuovono il rilascio di O_2 , spostando l'equilibrio della reazione verso **destra**;

nei **capillari polmonari**, l'ossigenazione provoca il rilascio di H^+ , spostando l'equazione a **sinistra**. In seguito al legame dell' O_2 , l'Hb diventa un acido più forte.

A sua volta, l' H^+ tende a liberare la CO_2 dal bicarbonato disciolto nel sangue. La CO_2 può così essere espirata.

L'EFFETTO BOHR NEL GLOBULO ROSSO



IL RUOLO DELLA CO₂

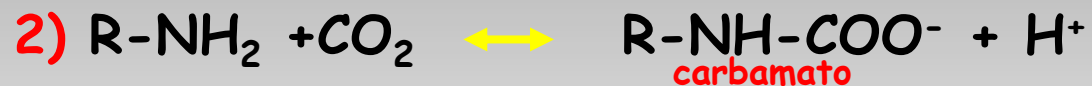
La CO₂ é un **effettore eterotropico negativo** per il legame dell'O₂ all'Hb,

la CO₂ rilasciata dai tessuti abbassa, infatti, la sua affinità per l'O₂ in due modi:

- 1) con la formazione di **bicarbonato** (gli H⁺ rilasciati contribuiscono all'effetto Bohr),
- 2) con la formazione di **carbamati**, le cui interazioni elettrostatiche con gli amminogruppi N-terminali delle catene stabilizzano la deossiHb.

IL TRASPORTO DELLA CO₂ DAI TESSUTI AI POLMONI

1) Esso é fundamentalmente un fenomeno passivo (ione bicarbonato).

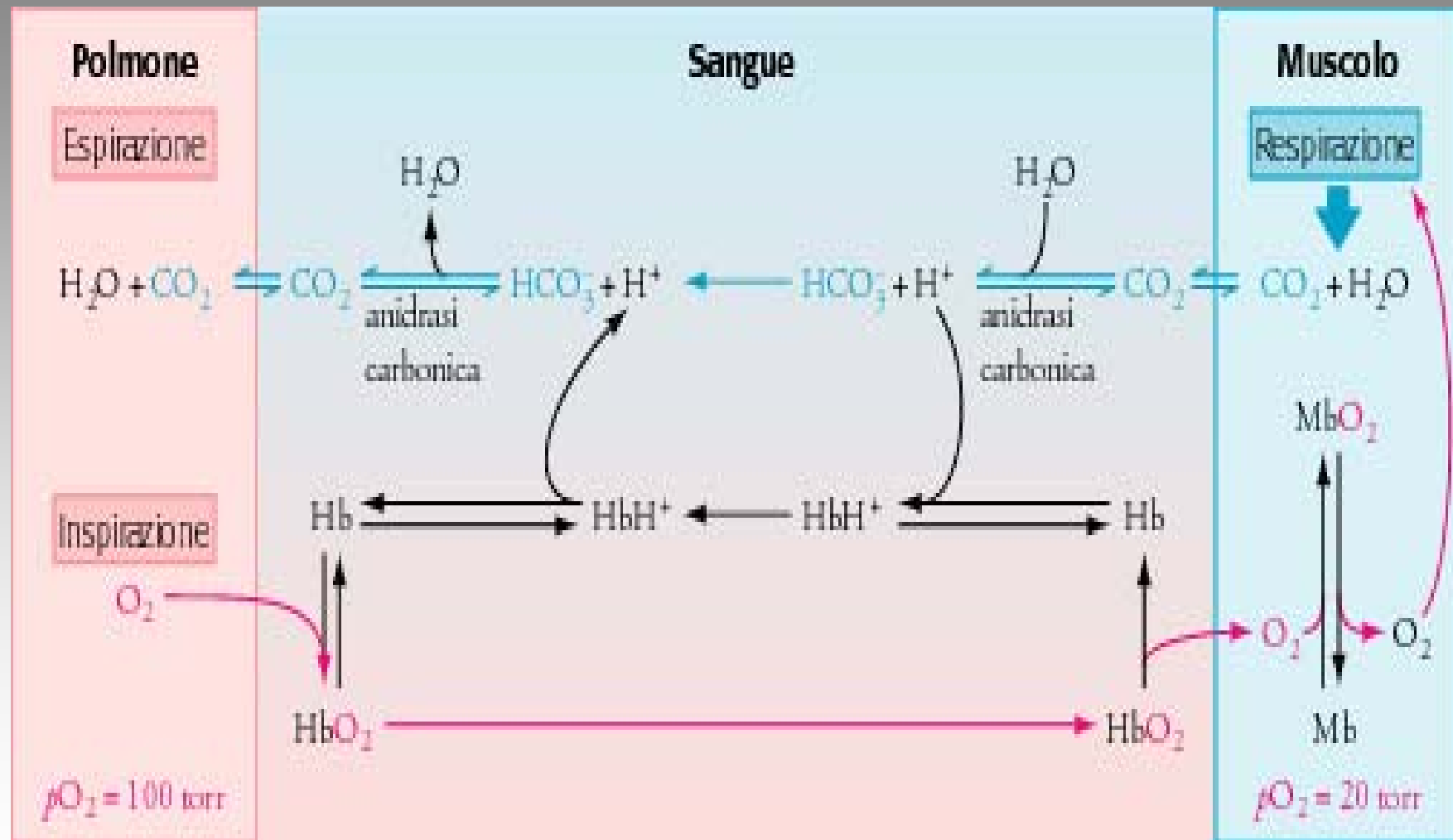


Il carbamato forma interazioni elettrostatiche stabilizzanti la deossiHb con gli **amminogruppi N-terminali** delle catene,

l'equilibrio della reazione dipende dalla [CO₂].

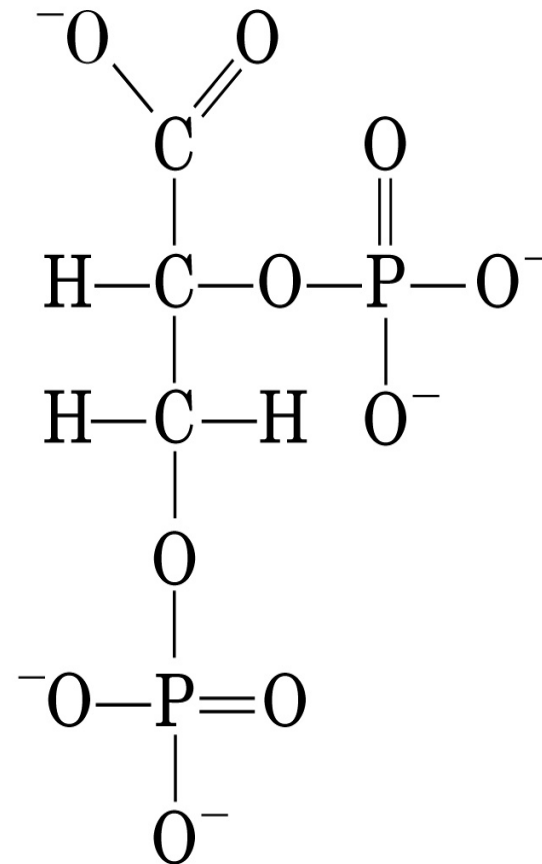
3) CO₂ disciolta (in piccola quantità, perchè è poco solubile).

IL RUOLO DELL'Hb E DELLA Mb NEL TRASPORTO DELL'O₂ DAI POLMONI AI TESSUTI CHE RESPIRANO E DELLA CO₂ (SOTTO FORMA DI HCO₃⁻) DAI TESSUTI AI POLMONI.



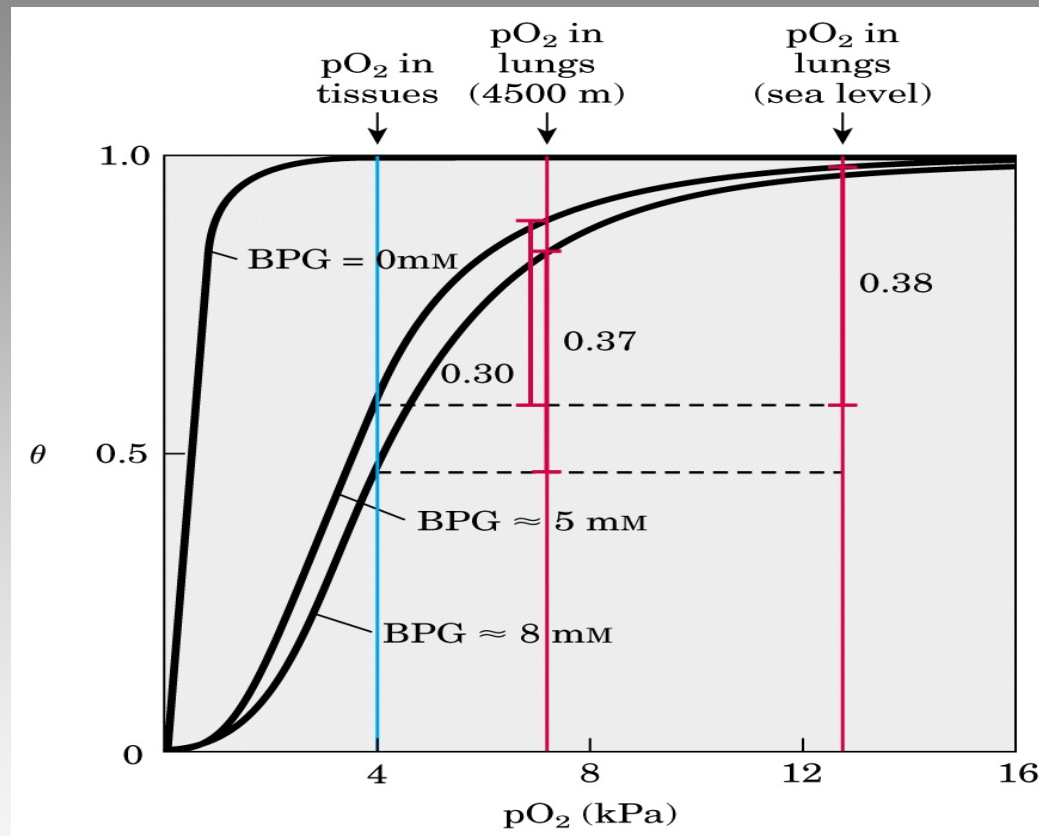
IL RUOLO DEL BPG

Il BPG (bisfosfoglicerato) è un **effettore eterotropico negativo** dell'Hb, perché diminuisce la sua affinità per l'O₂.



2,3-Bisphosphoglycerate

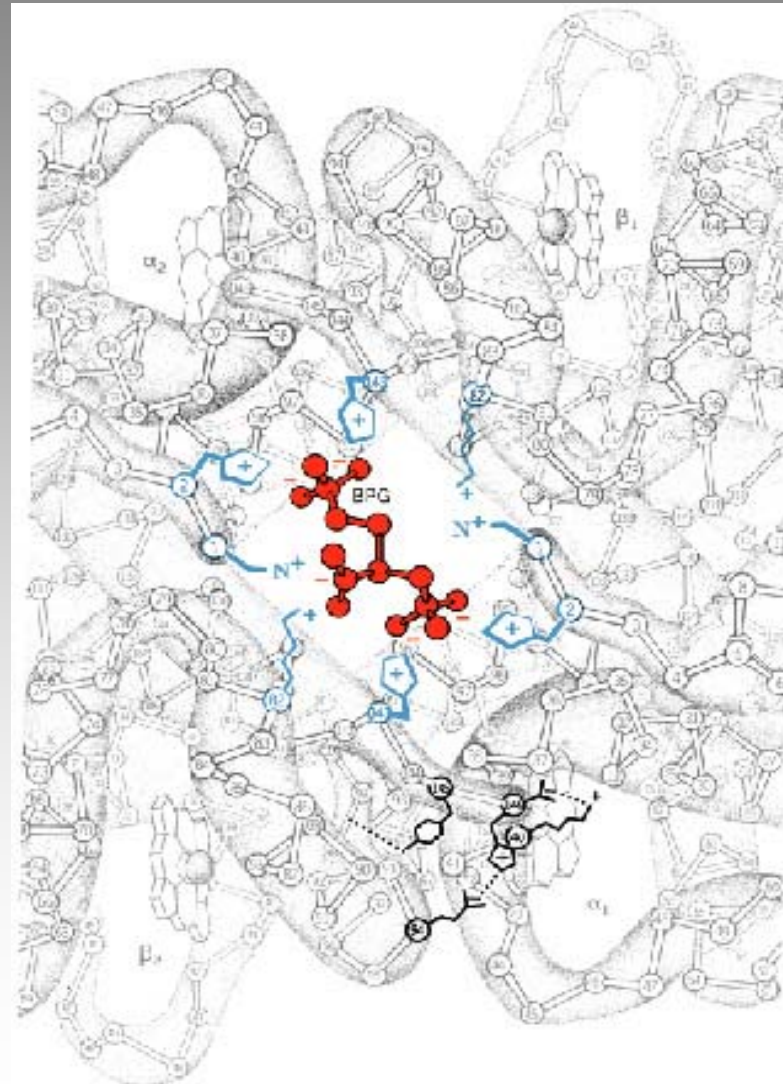
IL BISFOSFOGLICERATO (BPG)



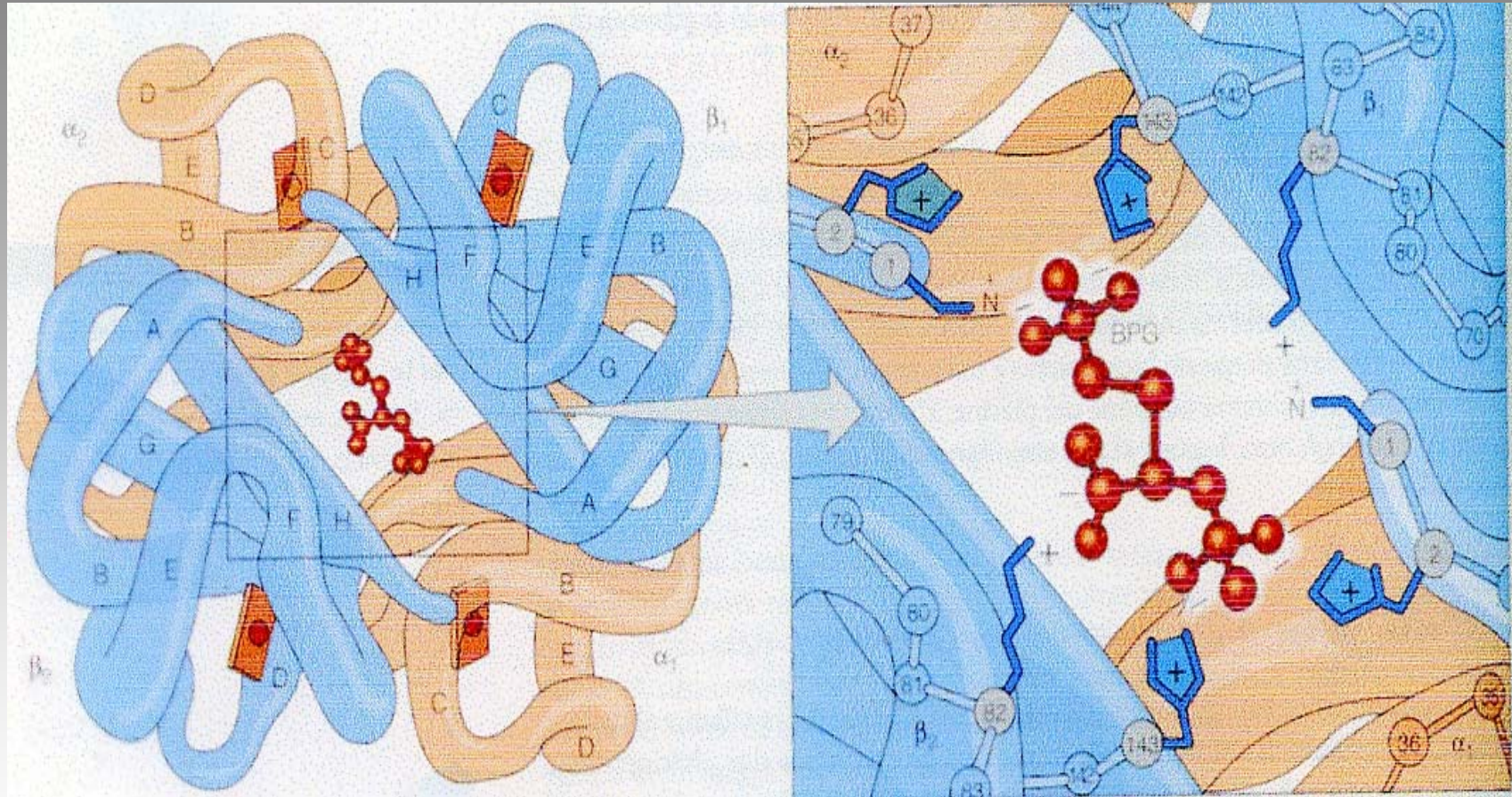
L'effetto del BPG sul legame dell'ossigeno all'emoglobina.

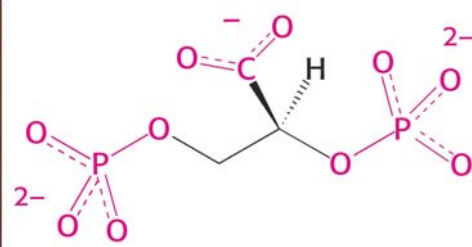
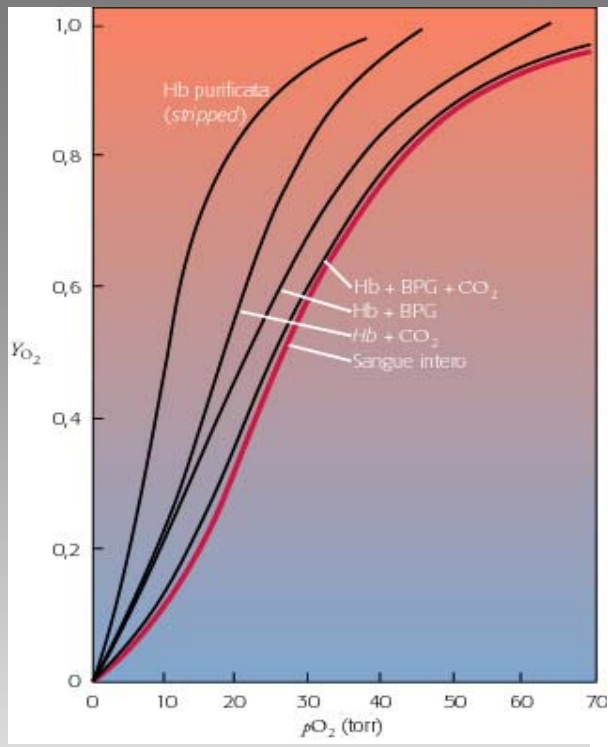
IL LEGAME DEL BPG ALLA DEOSSIHb

Il BPG si lega alla **deossiHb** (in un rapporto di **1:1**) nella cavità tra le **catene β** , formando interazioni elettrostatiche con i gruppi carichi positivamente, presenti attorno a questa apertura.

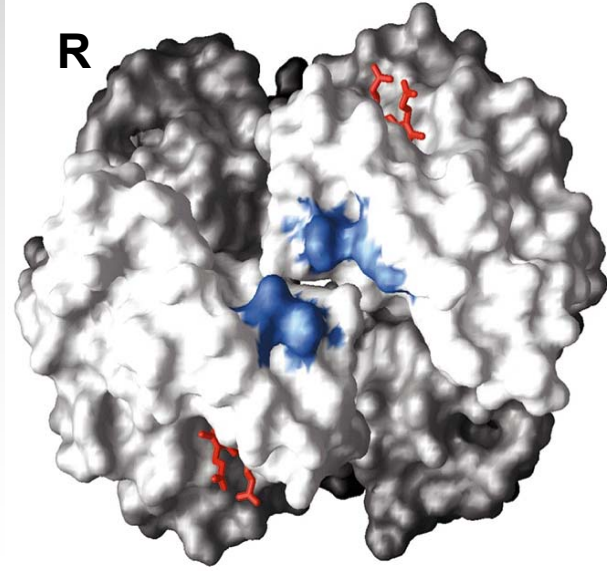
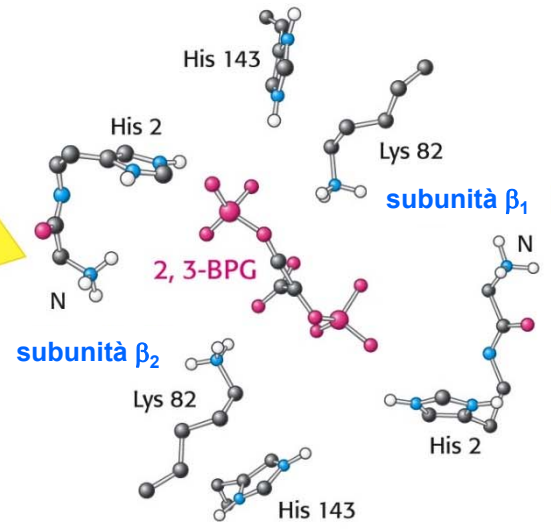
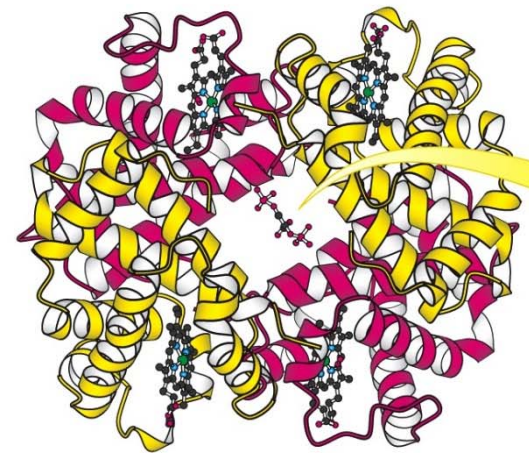


IL LEGAME DEL BPG ALLA DEOSSIHb





IL LEGAME DEL BPG ALLA DEOSSIHb

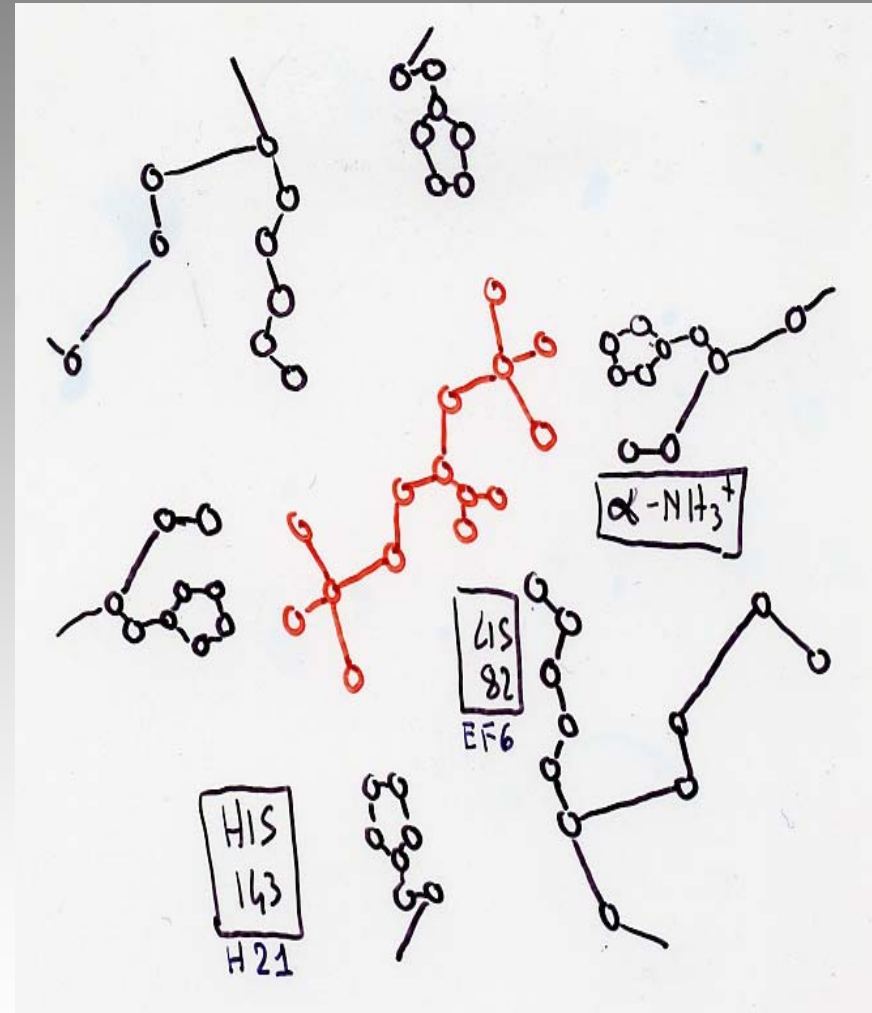


IL RUOLO DEL BPG

Il **BPG** è stereochimicamente complementare alle **sei** cariche positive presenti nella cavità centrale, formate da 3 residui di ciascuna catena β .

Il BPG **stabilizza** la deossiHb, diminuendo l'affinità della deossiHb per l'ossigeno.

I cambiamenti conformazionali che hanno luogo con l'ossigenazione **rompono** il sito di legame.

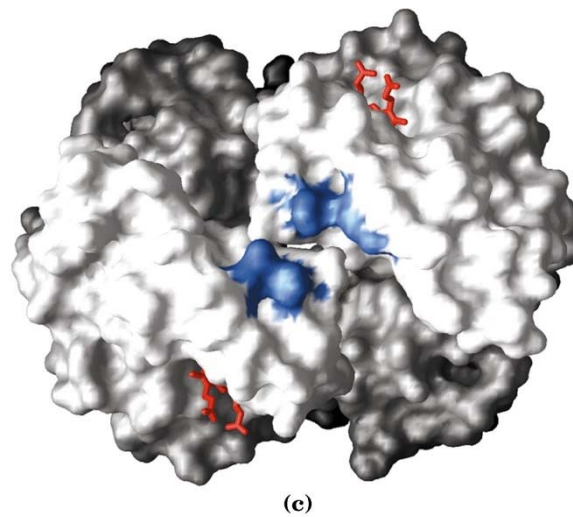
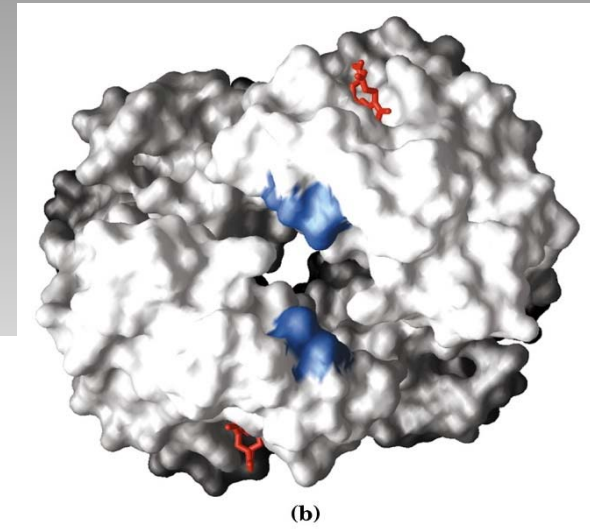
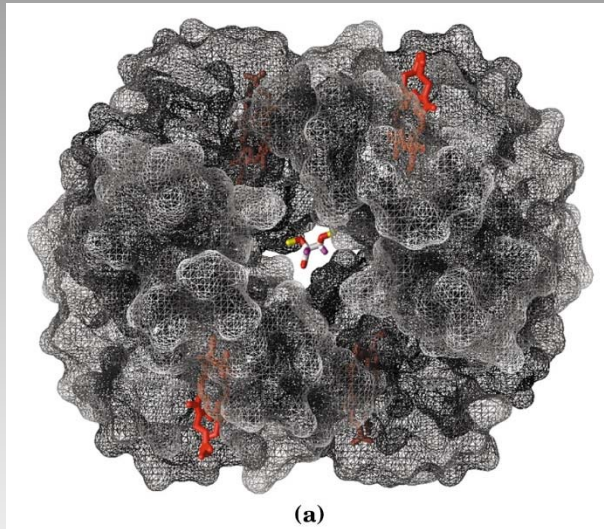


IL RUOLO DEL BPG

Legame del BPG alla deossiemoglobina

A e B = deossiHb

C = ossiHb



IL RUOLO DEL BPG

Il BPG **non** si adatta alla forma **ossiHb**, infatti, durante l'ossigenazione, esso viene rilasciato per il restringimento della cavità centrale,

maggiore è il contenuto di BPG negli eritrociti, più stabile è la struttura della deossiHb,

il BPG **regola** i cambiamenti a lungo termine nell'affinità per l'O₂. Un esempio è il suo aumento di concentrazione negli individui che si recano ad **alte quote**.

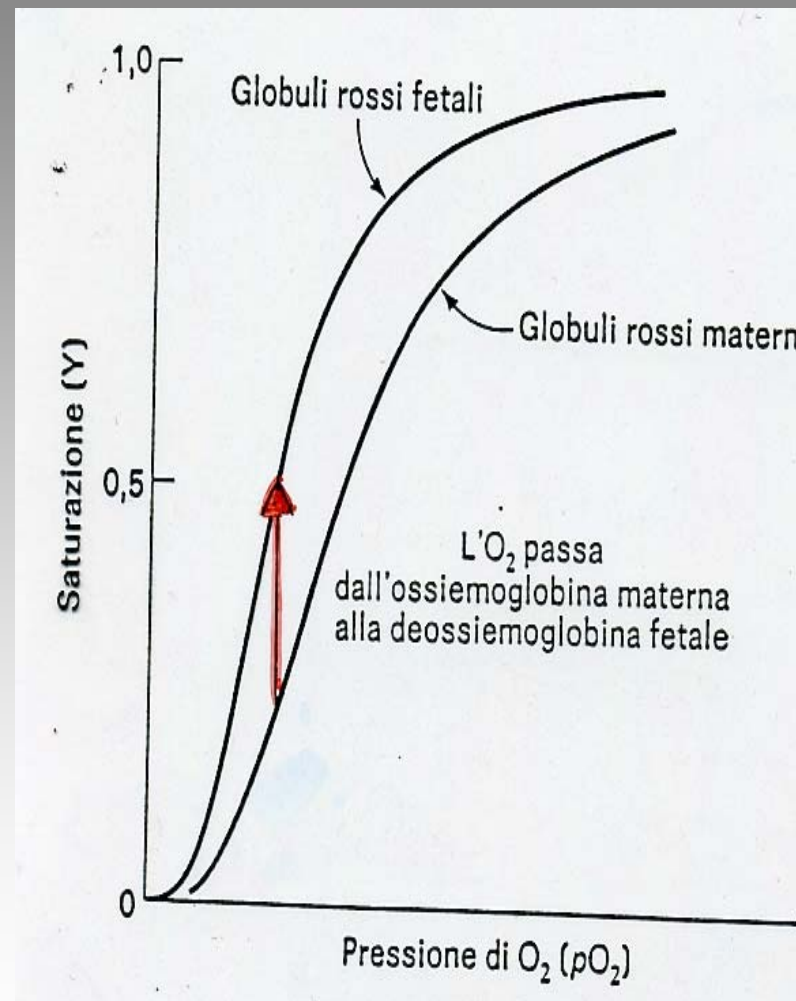
L'EMOGLOBINA FETALE (HbF)

Essa ha un ruolo nel passaggio di O_2 dalla madre al feto attraverso la placenta.

L'Hb fetale ($\alpha_2\gamma_2$) lega **meno** saldamente dell'Hb adulta il BPG, perché un residuo di **serina** (non carico), in ogni catena γ , sostituisce **l'istidina** (con carica positiva), presente in ogni catena β , nel sito di legame con il BPG, ne consegue una minore formazione di legami ionici (da 6 a 4);

quindi, l'**HbF** presenta una **maggiore** affinità per l'ossigeno rispetto all'**HbA**.

La curva sigmoide è spostata a **sinistra**.



LE EMOGLOBINE ANORMALI E PATOLOGICHE

Esse possono riguardare:

alterazioni sulla superficie della molecola,

alterazione del sito attivo,

alterazione della struttura terziaria,

alterazione della struttura quaternaria.

LE EMOGLOBINE ANORMALI E PATOLOGICHE

La presenza di emoglobine anormali e patologiche è dovuta ad alterazioni della parte proteica della molecola.

Sono possibili

1) Modificazioni:

A) nelle catene α o β ,

B) nelle catene δ o γ .

LE EMOGLOBINE ANORMALI E PATOLOGICHE

2) Sostituzione di intere catene dovute a loro difetti di sintesi:

A) le emoglobine tetramere (HbH), con catene tutte uguali (es. β_4),

B) le talassemie.

L'ELENCO DI ALCUNE MUTAZIONI NELLE EMOGLOBINE UMANE

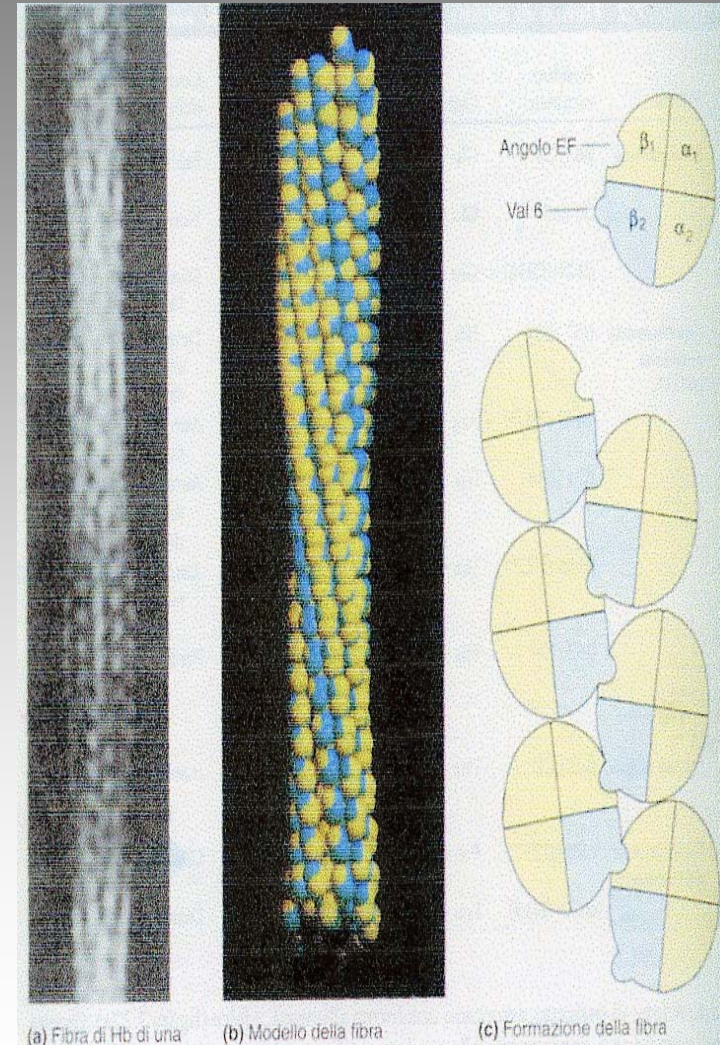
Effetto	Residuo cambiato	Cambiamento	Nome	Conseguenze della mutazione	Spiegazione
Falcizzazione	$\beta 6$ (A3)	Glu \longrightarrow Val	S	Falcizzazione	Val si adatta nella tasca EF della catena di un'altra molecola di emoglobina.
	$\beta 6$ (A3)	Glu \longrightarrow Ala	G Makassar	Non significative	Ala probabilmente non si adatta altrettanto bene nella tasca
	$\beta 121$ (GH4)	Glu \longrightarrow Lys	O Araba, Egitto	Stimola la falcizzazione in eterozigoti S/O	$\beta 121$ si trova vicino al residuo $\beta 6$; Lys aumenta l'interazione tra molecole.
Cambiamento di affinità per l'O ₂	$\alpha 87$ (F8)	His \longrightarrow Tyr	M Iwate	Determina la formazione di metemoglobina, diminuisce l'affinità per l'O ₂	L'istidina normalmente legata a Fe è stata sostituita da Tyr.
	$\alpha 141$ (HC3)	Arg \longrightarrow His	Suresnes	Aumenta l'affinità per l'O ₂ favorendo lo stato R	La sostituzione elimina il legame tra Arg 141 e Asn 126 nello stato deossi.
	$\beta 74$ (E18)	Gly \longrightarrow Asp	Shepherds Bush	Aumenta l'affinità per l'O ₂ diminuendo il legame del BPG	A carica negativa in questa posizione diminuisce l'affinità per il BPG.
	$\beta 146$ (HC3)	His \longrightarrow Asp	Hiroshima	Aumenta l'affinità per l'O ₂ , riduce l'effetto Bohr	Distrugge un ponte salino nello stato deossi ed elimina His, che fornisce il protone dell'effetto Bohr.
	$\beta 92$ (F8)	His \longrightarrow Gln	St. Etienne	Perdita dell'eme	Il legame che normalmente unisce F8 a Fe è assente, e la glutammilina polare tende a determinare l'apertura della tasca dell'eme.
Perdita di eme	$\beta 42$ (CD1)	Phe \longrightarrow Ser	Hammersmith	Instabile, perde l'eme	La sostituzione di una Phe idrofobica con Ser attira acqua all'interno della tasca dell'eme.
Dissociazione del tetramero	$\alpha 95$ (G2)	Pro \longrightarrow Arg	St. Lukes	Dissociazione	Alterata geometria nella regione di contatto tra subunità.
	$\alpha 136$ (H19)	Leu \longrightarrow Pro	Bibba	Dissociazione	Pro interrompe l'elica H.

L'ANEMIA A CELLULE FALCIFORMI

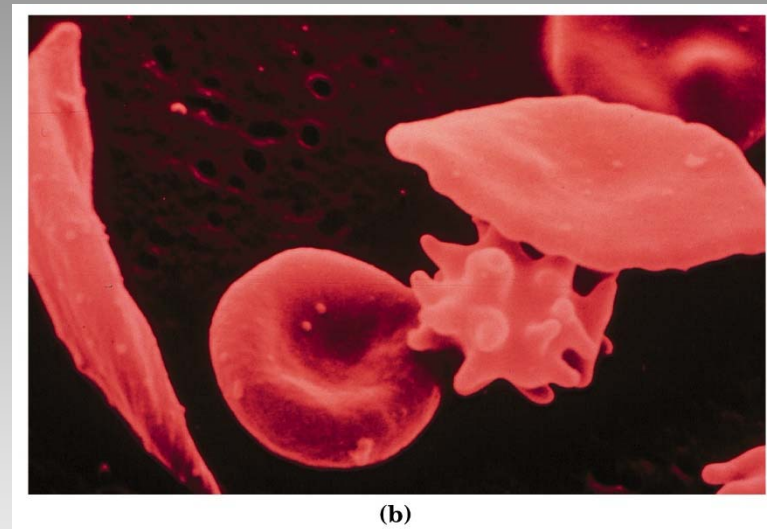
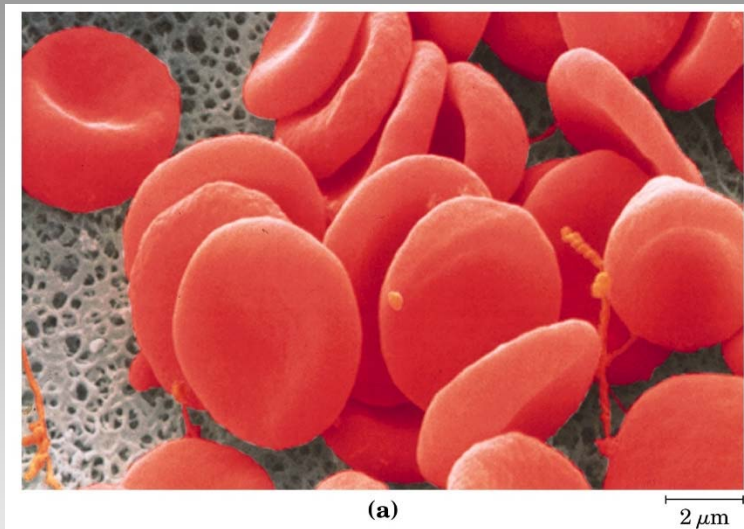
I globuli rossi, in presenza di basse concentrazioni di O_2 , assumono una forma **allungata a falce**,

questa deformazione è conseguente alla tendenza dell'Hb mutante, nel suo stato deossigenato, ad aggregarsi in lunghe strutture a **bastoncino**,

le cellule allungate formatesi tendono a bloccare i capillari, causando infiammazioni e dolore.



L'ANEMIA A CELLULE FALCIFORMI



Confronto tra eritrociti di un soggetto normale (a) e quelli di un paziente affetto da anemia falciforme (b).

L'ANEMIA A CELLULE FALCIFORMI

Tali cellule sono fragili e la loro rottura porta ad **anemia**, rendendo la persona sensibile a infezioni e malattie;

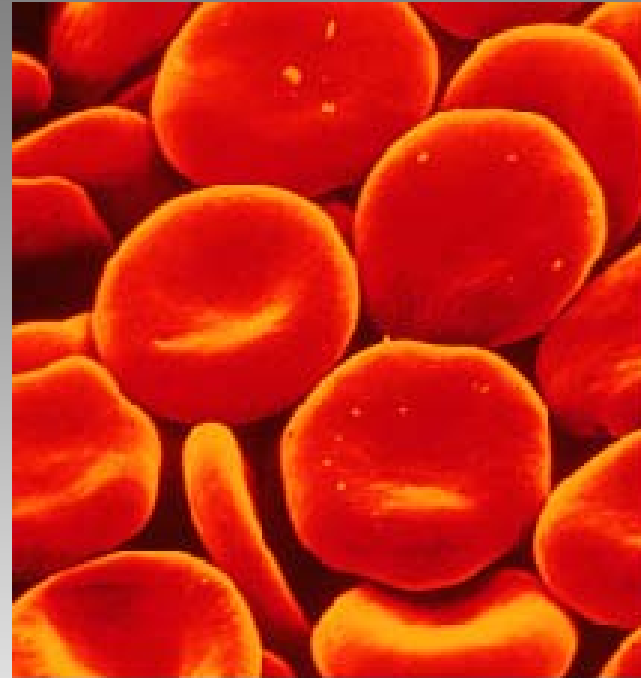
questa é una malattia genetica,

gli **omozigoti** per la mutazione falciforme spesso non sopravvivono fino all'età adulta, o la raggiungono gravemente debilitati,

gli **eterozigoti**, che possono produrre l'Hb normale, presentano di norma disturbi solo in condizioni di grave carenza di ossigeno.

L'ANEMIA A CELLULE FALCIFORMI

Confronto tra gli eritrociti di un soggetto normale e quelli di un paziente affetto da anemia falciforme.



L'ANEMIA A CELLULE FALCIFORMI

I soggetti, che sono malati per anemia a C.F., sono **omozigoti** per un gene autosomico,

i soggetti, che presentano il tratto a cellule falciformi, sono **eterozigoti** per lo stesso gene autosomico e sono di norma asintomatici;

la patologia si manifesta nel **circolo venoso** (quando l'Hb é in forma deossi),

nella **circolazione venosa** di un omozigote il **50%** dei globuli rossi è a falce, negli eterozigoti solo **l'1%**.

L'ANEMIA A CELLULE FALCIFORMI

L'anemia falciforme é trasmessa geneticamente ed è per lo più limitata alla popolazioni tropicali (l'incidenza tra le persone nere é circa il 4‰),

il tratto a cellule falciformi é presente in 1 nero su 10;

essa é una patologia cronica ed emolitica,

le cellule a falce rimangono intrappolate nei piccoli vasi sanguigni, creando danni agli organi.

L'HbS

La **solubilità** della deossiHb nei globuli rossi falciformi è anormalmente bassa (soltanto il 4% della deossiHb normale).

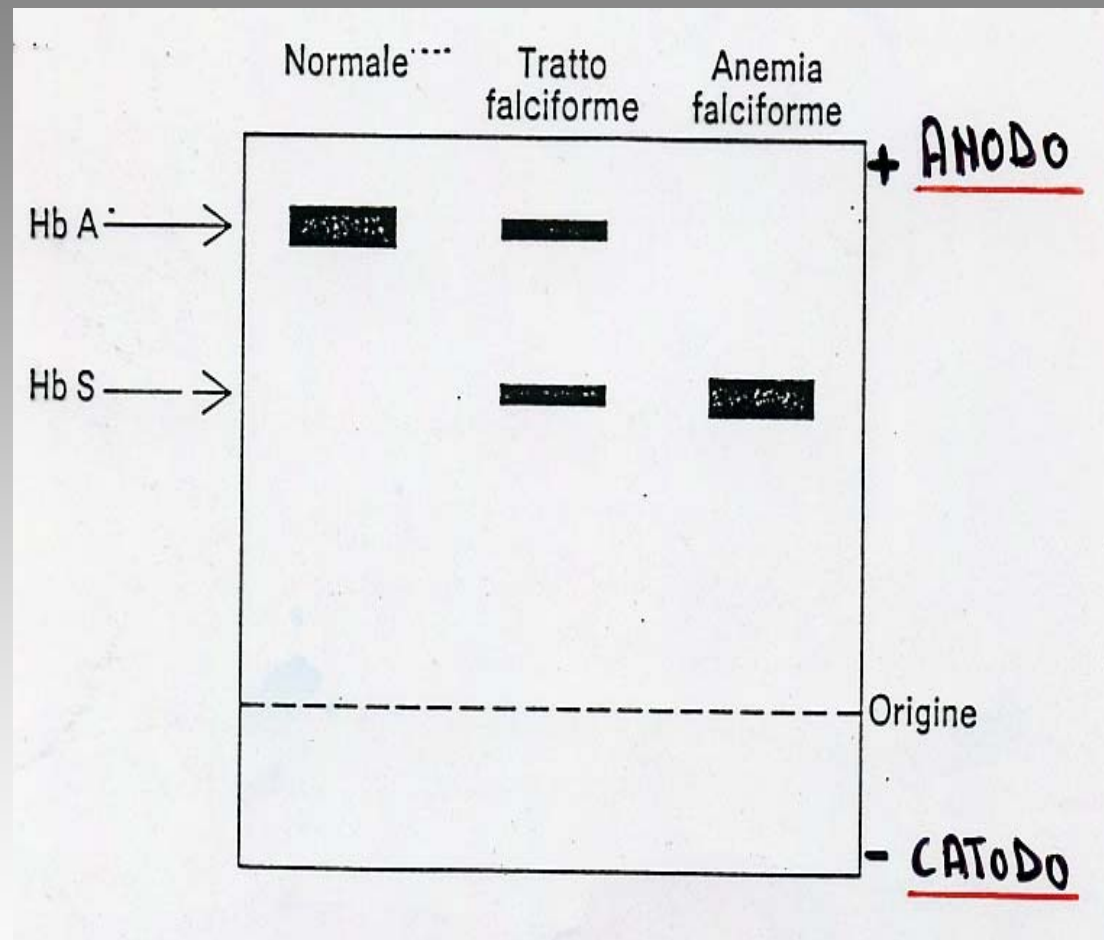
Si produce un abbondante **precipitato fibroso** con deformazione dei globuli rossi, che assumono una forma a falce.

L'Hb delle cellule falciformi é chiamata **HbS (sickle = falce)**.

**L'HbS HA UNA DIVERSA
MOBILITÀ
ELETTROFORETICA
RISPETTO ALL'HbA**

- P.I. HbA = 6.87
- P.I. HbS = 7.09

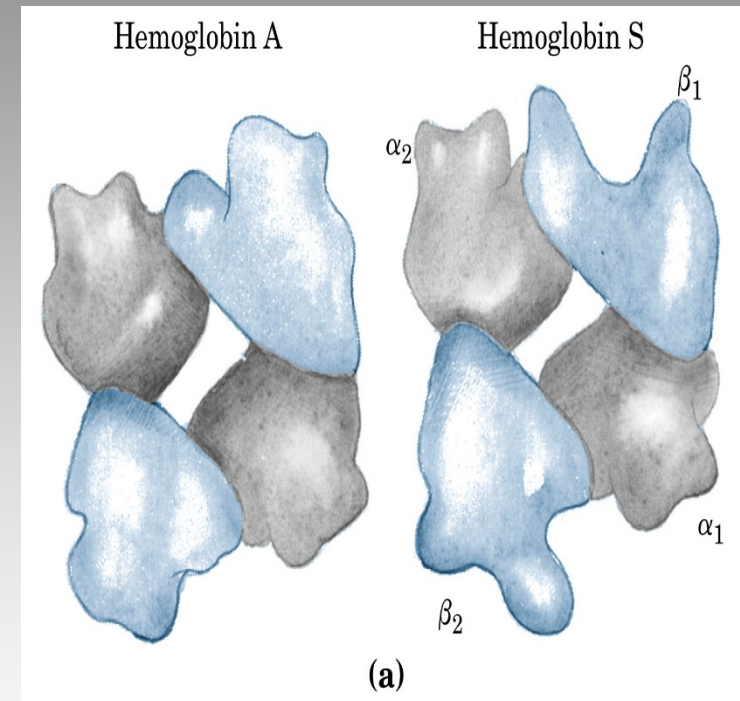
(Elettroforesi eseguita
a pH 8,6).



IL CONFRONTO TRA HbA (NORMALE) ED HbS (ANEMIA FALCIFORME)

L'anemia a cellule falciformi é una "malattia molecolare".

Le piccole differenze di conformazione tra Hb normale ed HbS derivano dalla sostituzione di un solo amminoacido nelle catene β .



L'ANEMIA A CELLULE FALCIFORMI

La patologia, infatti, dipende da una singola mutazione di **una base azotata** nelle catene β , che porta alla sostituzione in posizione **6** dell'**acido glutammico** con la **valina**.



L'ANEMIA A CELLULE FALCIFORMI

Per individuare la presenza di tale sostituzione, é stata utilizzata la tecnica del **fingerprint**,

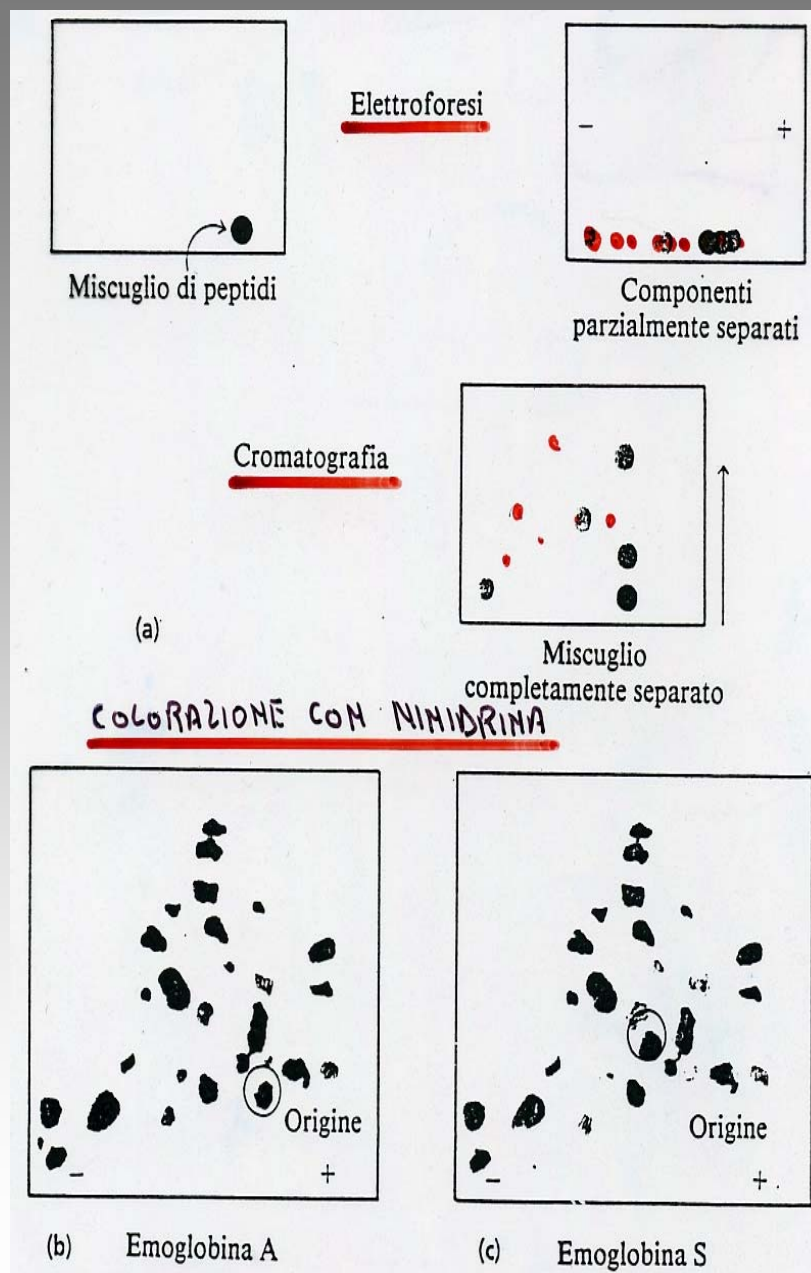
l'Hb viene tagliata in singoli frammenti, impiegando la **tripsina**;

il trattamento triptico produce 28 diversi peptidi dal dimero **$\alpha\beta$** .

LA TECNICA DEL FINGERPRINT

Dal trattamento triptico si ottiene, così, un miscuglio di **28** frammenti sia dalla HbA, sia dalla HbS;

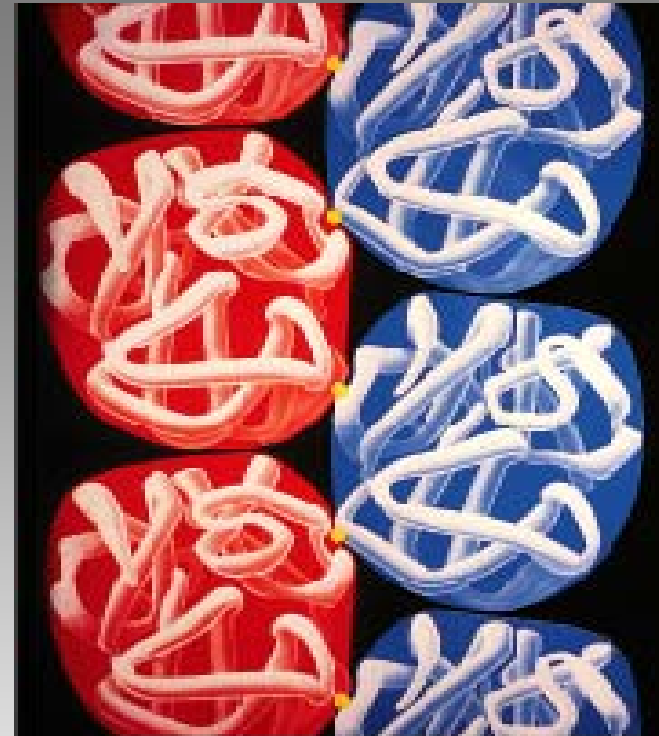
si eseguono poi l'**elettroforesi** e la **cromatografia**, che permettono di evidenziare l'amminoacido mutato nell'HbS.



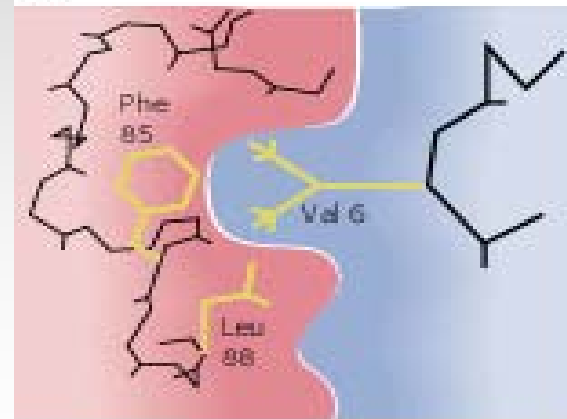
L'HbS

La **valina idrofobica** si inserisce in una tasca nell'angolo EF della **catena β** di un'altra Hb e così Hb adiacenti possono adattarsi l'una all'altra formando una **fibra elicoidale**;

tale riarrangiamento si ha **solo** per la **deossiHb**, perché nella forma **ossi** il **riarrangiamento** delle subunità rende la tasca inaccessibile.



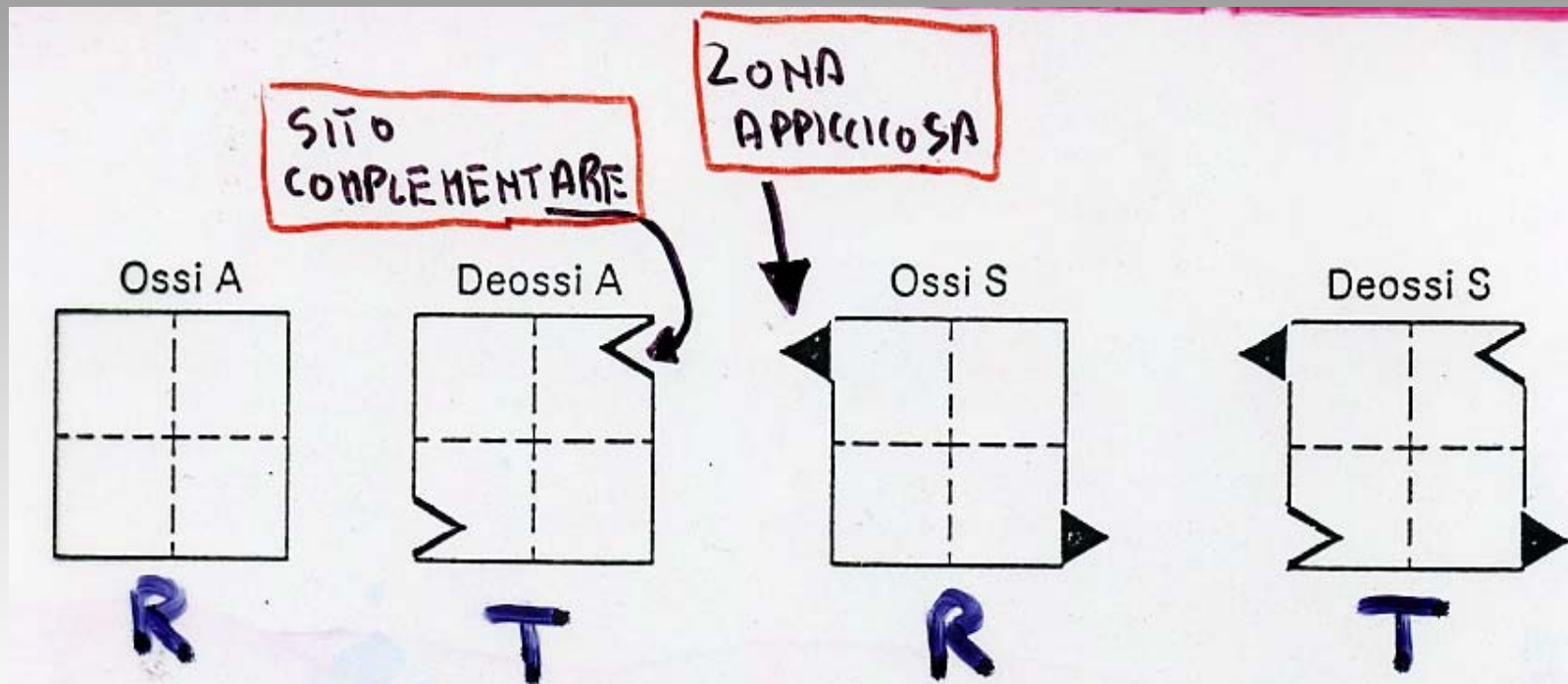
(a)



(b)

L'HbS

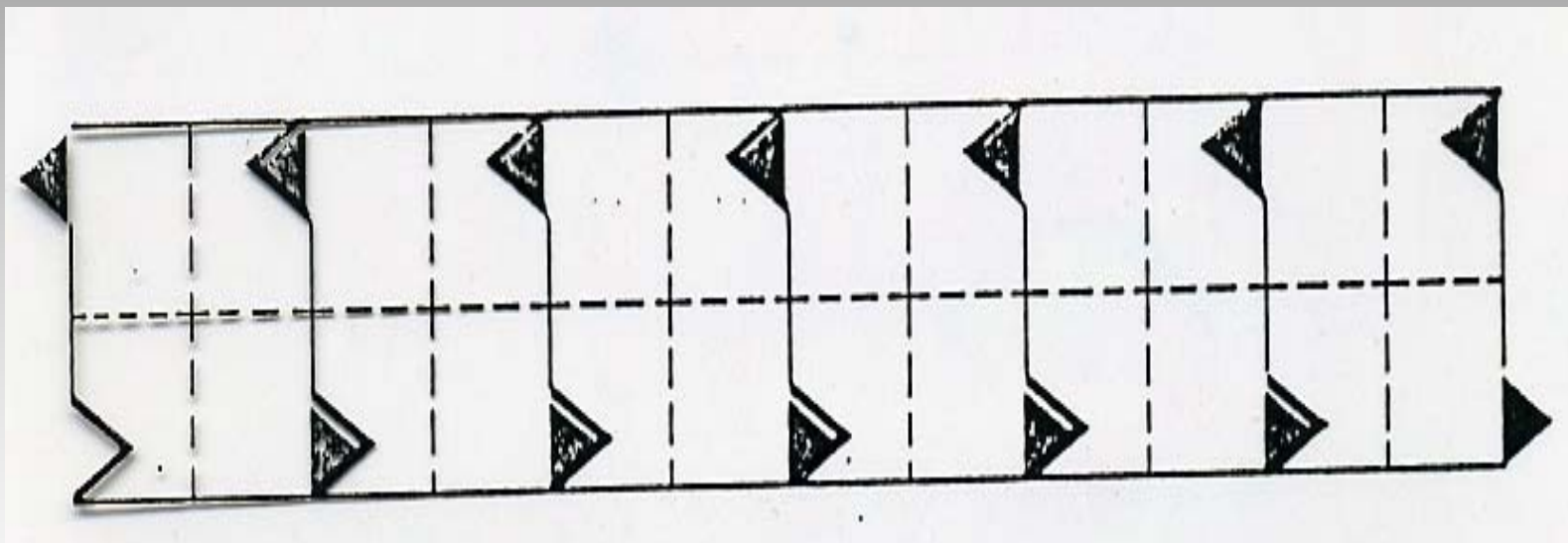
Un **sito idrofobico**, complementare alla zona appiccicosa (valina), compare in **ogni catena β** delle **HbS** e **HbA** nella loro forma **deossigenata**.



Nelle rispettive forme **ossigenate**, il sito complementare é **nascosto**.

L'HbS

Il sito complementare di HbS deossigenata può legarsi alla zona appiccicosa di un'altra deossi-HbS, con formazione di **lunghe fibre**, che trasformano i G.R. in **cellule a falce**, le quali distorcono il vaso sanguigno.



L'HbS

Il blocco di un vaso determina una zona a **bassa** concentrazione di ossigeno, che porta ad una ulteriore deossigenazione dell'HbS con produzione **prima** di altre fibre e **conseguentemente** di nuove cellule a falce;

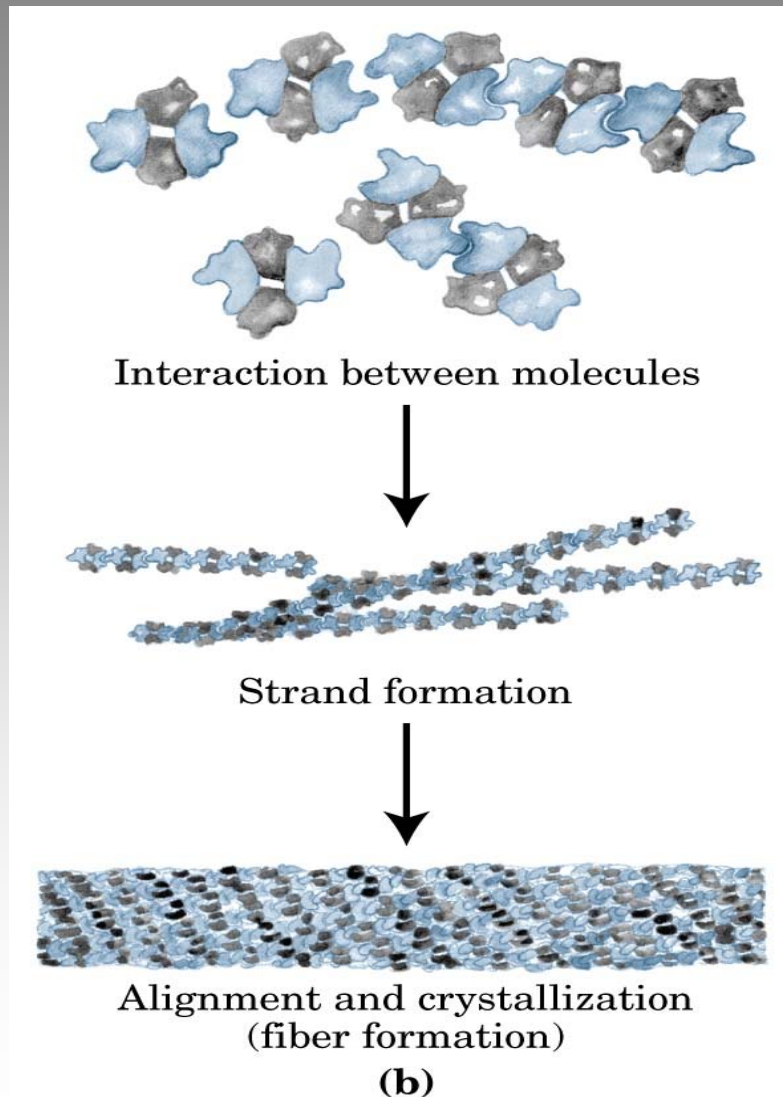
ha così origine un **circolo vizioso**.

IL TRATTO A CELLULE FALCIFORMI

Una persona eterozigote è normalmente **asintomatica**, avendo solo il **50%** dell'HbS, che è insufficiente per produrre tante fibre da trasformare i G.R. in cellule a falce;

la forma a falce è infatti causata da un'**alta** concentrazione di deossi-S.

LE FASI DI NUCLEAZIONE NELLA FORMAZIONE DELLE FIBRE DI DEOSI HbS



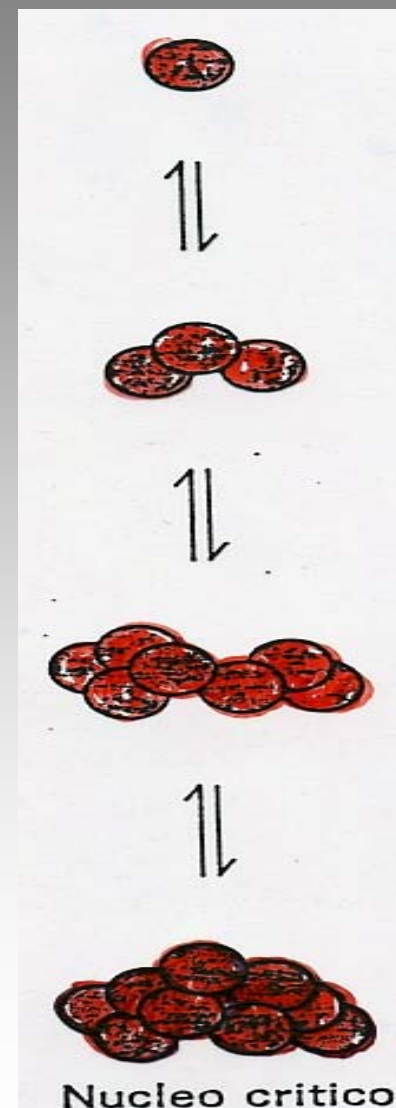
La **HbS** ha una **regione idrofobica** sulla **superficie**, che causa un'**aggregazione** di queste molecole in **catene**, che si organizzano in **fibre insolubili**.

LE FASI DI NUCLEAZIONE NELLA FORMAZIONE DELLE FIBRE DI DEOSI HbS

La forma a falce degli eritrociti è dovuta, quindi, alla **polimerizzazione** della **deossi HbS** sotto forma di fibre rigide, che si estendono per tutta la lunghezza della cellula.



(b)

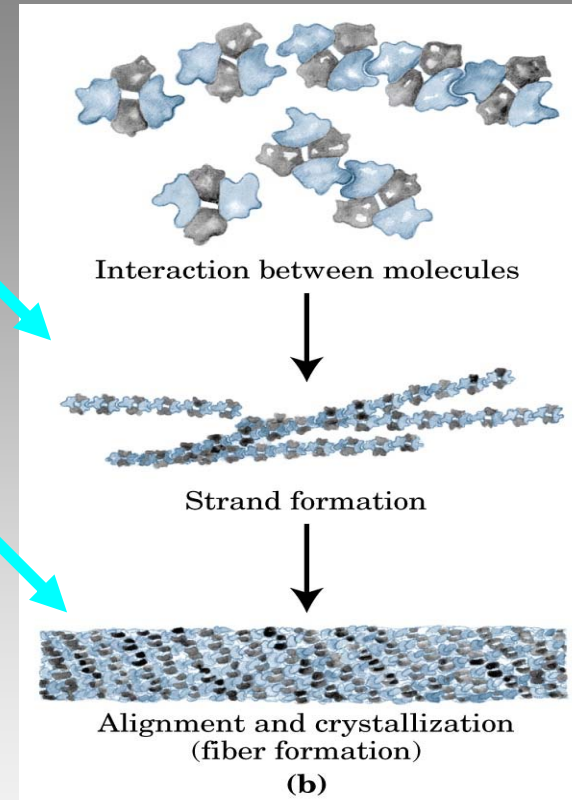


LE FASI DI NUCLEAZIONE NELLA FORMAZIONE DELLE FIBRE DI DEOSSI HbS

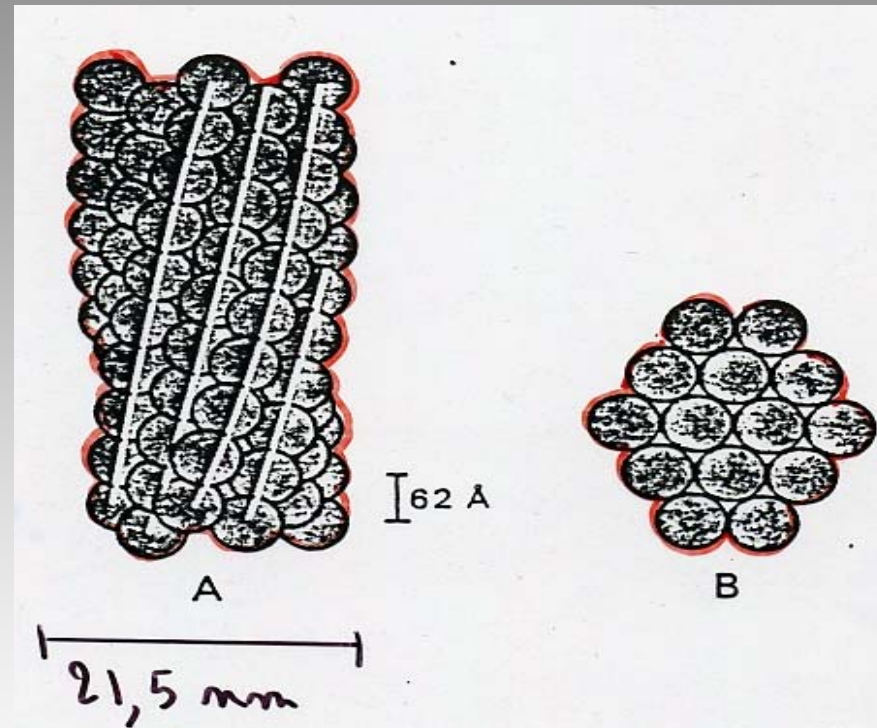
- 1) Si forma un nucleo di molecole di deossi HbS.
- 2) Quando la fibra si è formata, essa può nucleare la crescita di altre fibre, di conseguenza, **il processo diventa autocatalitico.**

Se il tempo per la formazione della fibra è **superiore** al tempo

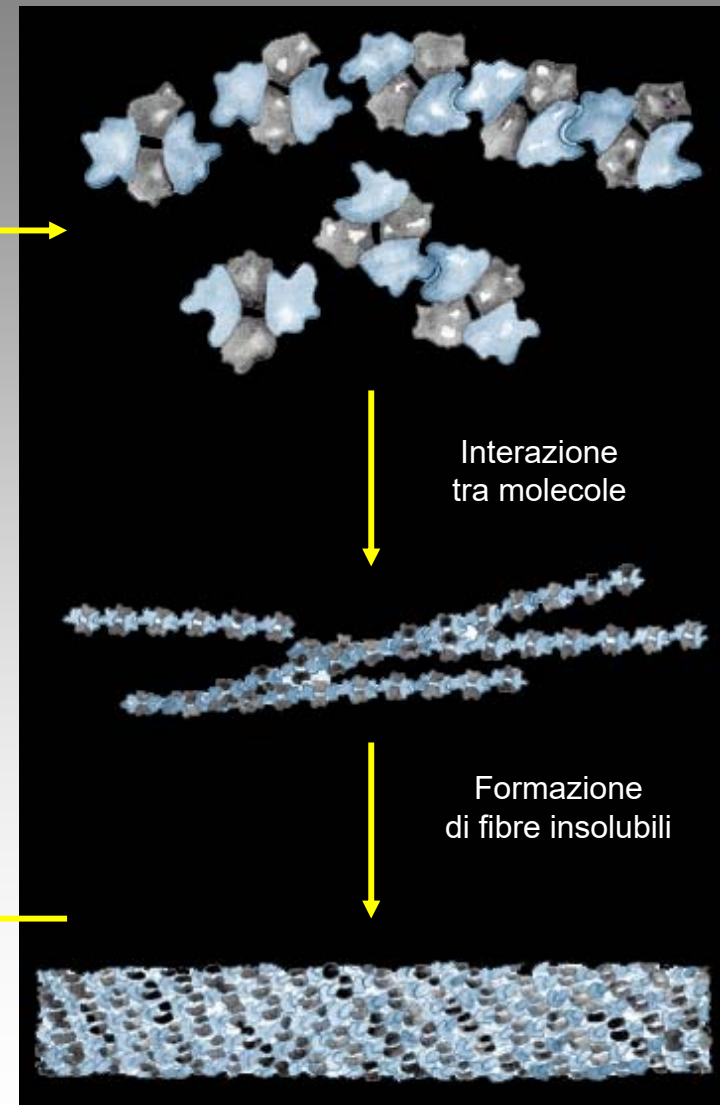
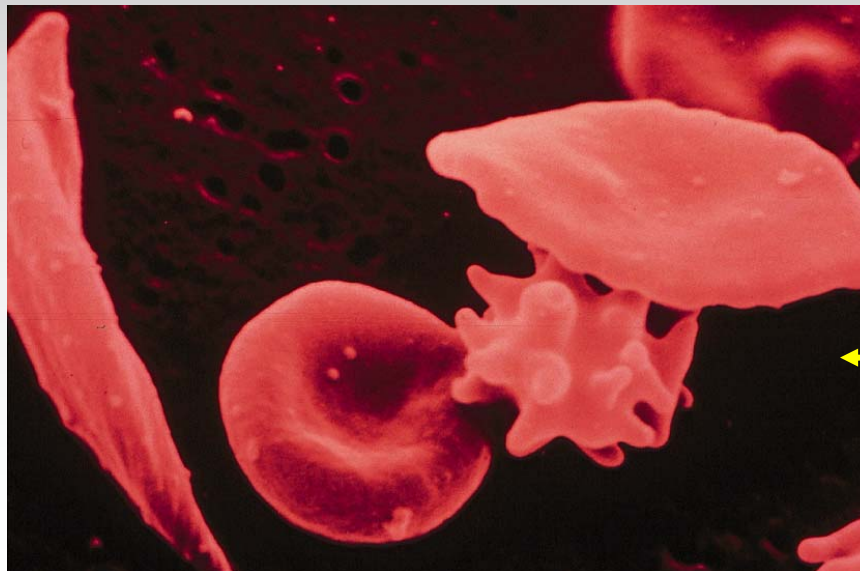
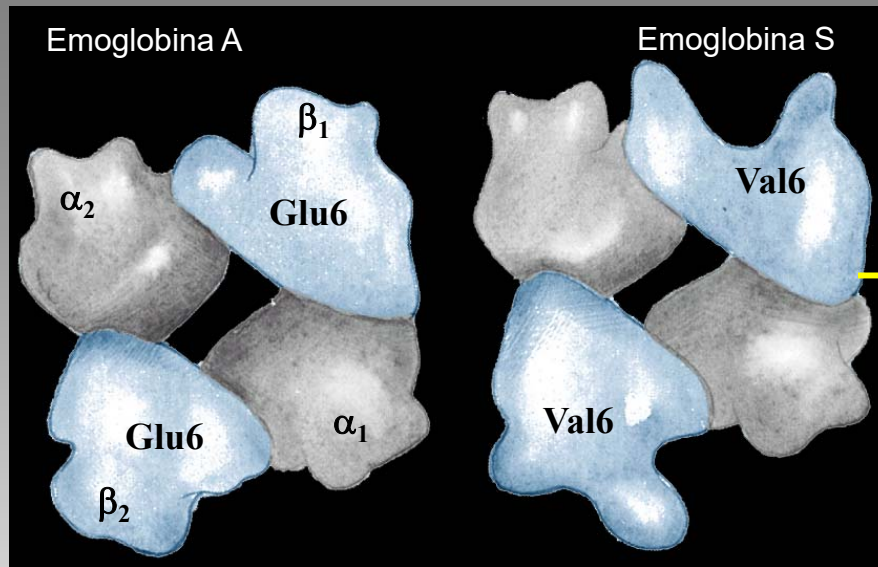
di transito dei globuli rossi dai capillari periferici agli alveoli polmonari, **non** si formeranno le cellule a falce e **non** ci sarà alcun blocco del flusso sanguigno.



SI FORMA UNA FIBRA ELICOIDALE A 14 ELEMENTI



LE MODIFICAZIONI CHE PORTANO ALLA FORMAZIONE DI AGGREGATI



L'ANEMIA FALCIFORME E LA MALARIA

La malaria è una malattia parassitaria trasmessa dalla zanzara tropicale **anofele**,

il **plasmodium falciparum** è un protozoo che sta nei globuli rossi per la maggior parte del ciclo vitale (48 ore), aumentandone **l'acidità** e determinandone **l'adesione** ad una specifica proteina sulla parete dei vasi;

esso crea, quindi, un impedimento del flusso sanguigno nell'organo in cui esso è presente (es. **malaria cerebrale**).

L'ANEMIA FALCIFORME E LA MALARIA

L'anemia falciforme è **limitata** alle popolazioni originarie della zone tropicali, con alta incidenza della **malaria**;

gli **individui eterozigoti** per l'HbS presentano una **maggiore resistenza** alla malaria rispetto agli individui che non portano tale mutazione,

perché?

in essi, la presenza dell'infezione determina un **aumento** delle cellule a falce **dall'1% fino al 40%** nella circolazione venosa;

infatti, la maggiore acidificazione dei globuli rossi infettati dal protozoo aumenta la formazione di **deossiHbS** (per **l'effetto Bohr**), con la loro conseguente **trasformazione** in cellule a falce.

L'ANEMIA FALCIFORME E LA MALARIA

Un globulo rosso normale mantiene alta la concentrazione di **potassio**; l'aumentata fragilità delle cellule falciformi porta invece ad un rilascio dello ione,

il parassita spesso **interrompe** il suo ciclo vitale, poiché **necessita di alte concentrazioni** di potassio;

quindi, il tratto per l'anemia falciforme risulta essere un **adattamento vantaggioso** in ambiente malarico.

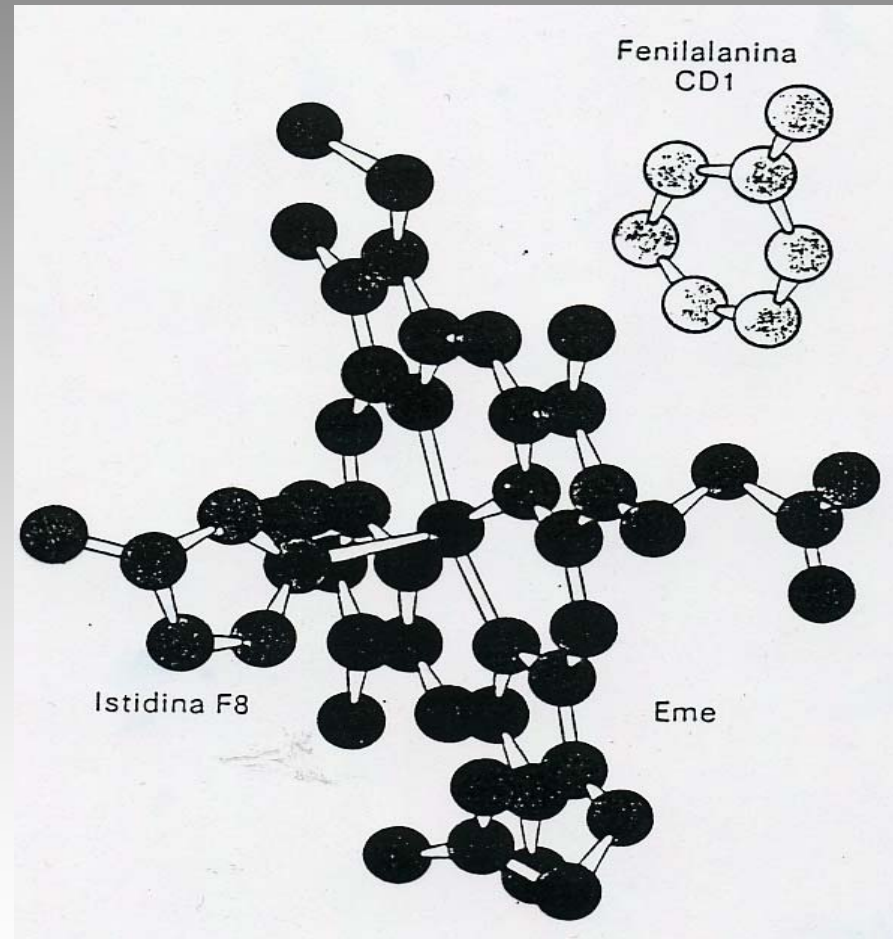
L'ANEMIA FALCIFORME E LA MALARIA

Gli **eterozigoti** hanno **maggiori** possibilità di sopravvivenza e quindi maggiore possibilità di trasmettere i propri geni nelle regioni infestate dalla malaria,

questo porta anche alla nascita di un gran numero di individui **omozigoti** per il tratto mutante.

L'Hb DI HAMMERSMITH

- Essa é un altro esempio di Hb patologica.
- In posizione **CD1** la **Phe** é sostituita da una **serina**, con la riduzione del legame dell'eme (esso tende a perdersi).



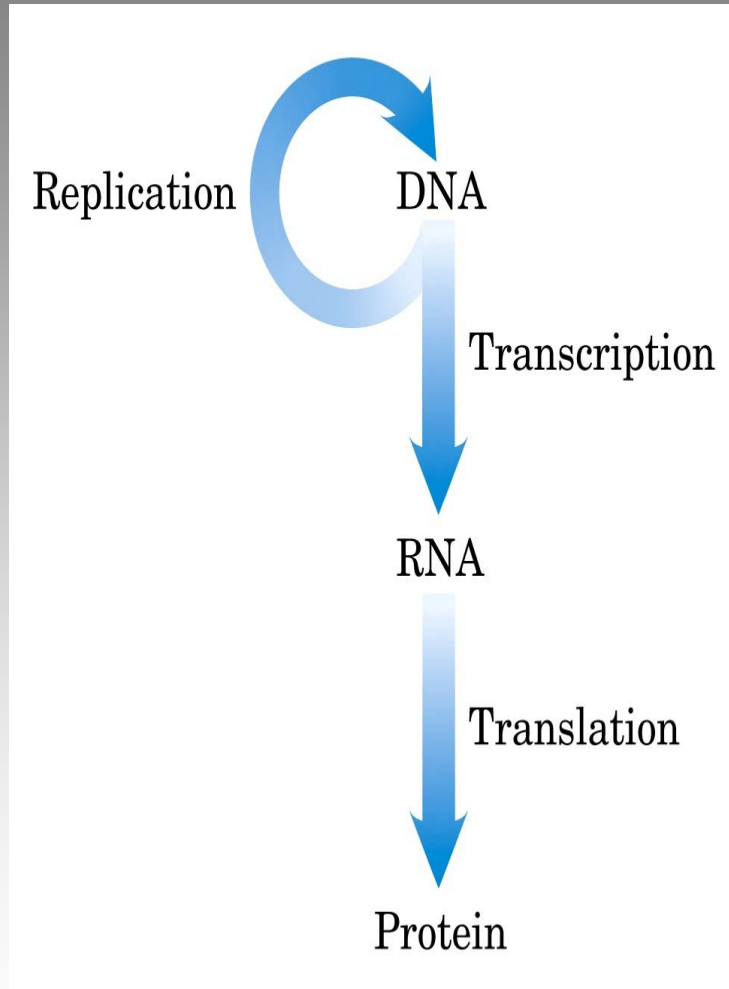


LE TALASSEMIE

Sono difetti genetici, in cui una o più catene non sono prodotte o sono prodotte in piccole quantità.

Si distinguono le α -talassemie e β -talassemie.

IL FLUSSO DELL'INFORMAZIONE GENETICA



LE TALASSEMIE

Le sindromi talassemiche possono insorgere nei seguenti casi:

- 1) uno o più geni codificanti per le catene dell'Hb hanno subito una **delezione** completa,
- 2) uno o più geni presentano una **mutazione non senso** (con conseguente catena polipeptidica accorciata), o **della fase di lettura**, che produce una catena non funzionale,
- 3) i geni sono presenti, ma c'è una **mutazione al di fuori della regione codificante**, che determina il blocco della trascrizione, oppure un errato riarrangiamento del pre-mRNA.

L' α -TALASSEMIA

Si ha quando il gene della α -globina è stato perduto, o non può essere espresso,

il basso livello di α -Hb è parzialmente compensato dalla formazione di HbH (β_4) e Hb di Bart (γ_4);

questi tetrameri trasportano l'ossigeno, ma non mostrano la transizione allosterica (sono sempre nello stato R) e mancano dell'effetto Bohr,

la totale assenza di α -Hb è incompatibile con la vita.

LA β -TALASSEMIA

Si ha quando il gene della β -globina è stato perduto, o non può essere espresso,

negli **omozigoti**, è una condizione patologica molto grave che causa la **morte** del soggetto affetto, prima della maturità,

in caso di **eterozigosi**, il gene della β -globina è ancora funzionante;

esistono anche **talassemie più leggere**, in cui la produzione di β -globina è ridotta, ma non completamente soppressa.

LE TIPOLOGIE DELLA β -TALASSEMIA

1) maior

essa si manifesta negli omozigoti, nei quali HbF è circa il 90%,
é chiamata morbo di Cooley o Anemia Mediterranea

2) minor

3) minima