



**FUNZIONE DELLE
PROTEINE**

**RAPPORTO
STRUTTURA-FUNZIONE**

Principi basilari:

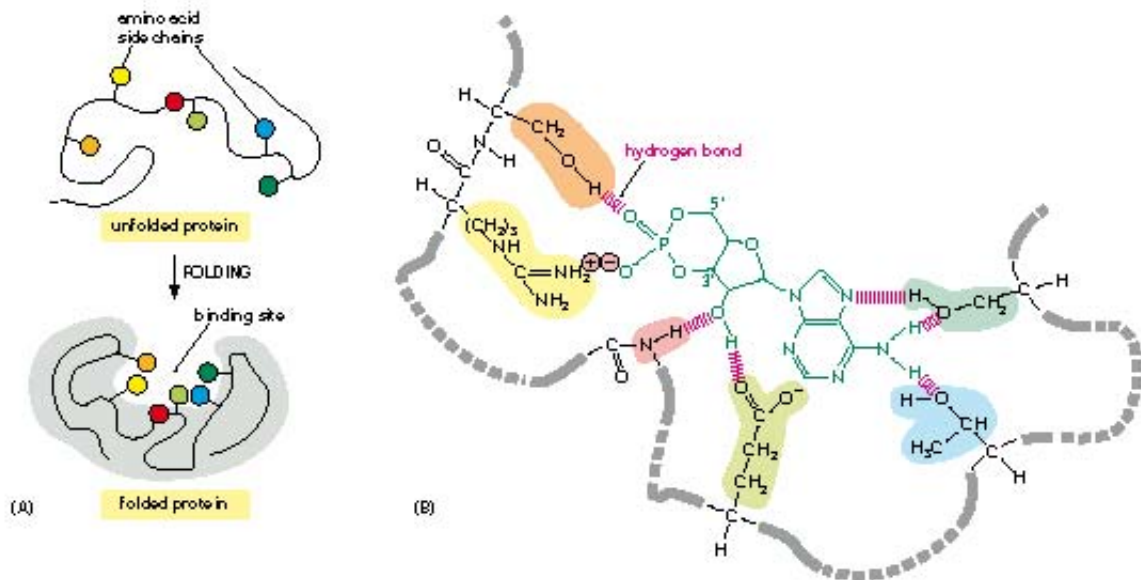
1. Le funzioni di molte proteine richiedono il legame reversibile con altre molecole (**LIGANDO**)

Un ligando può essere di natura diversa, anche un'altra proteina

La natura transitoria delle interazioni proteina-ligando è essenziale per la vita perché consente all'organismo di rispondere rapidamente e reversibilmente a variazioni ambientali e metaboliche

2. Un ligando si lega ad una regione della proteina (**SITO DI LEGAME**) complementare al ligando per dimensione, carica e carattere idrofobico.

L'interazione è specifica ed è in grado di discriminare tra migliaia di molecole presenti in prossimità del sito di legame. Una proteina può possedere siti di legame diversi per altrettanti ligandi.



3. Il legame proteina-ligando è spesso accompagnato da una modificazione conformazionale della proteina che rende il sito di legame più complementare al ligando con un conseguente rafforzamento del legame **(ADATTAMENTO INDOTTO)**

4. Le interazioni proteina-ligando possono essere regolate mediante il legame con altri ligandi specifici che possono causare nella proteina alterazioni strutturali che modificano l'affinità e quindi la forza di legame con il primo ligando.

5. Le modificazioni conformazionali possono essere impercettibili (vibrazioni molecolari e piccoli movimenti dei residui AA) o più evidenti (spostamenti di parti della struttura della molecola di diversi nanometri).

Le modificazioni conformazionali sono molto spesso essenziali per la funzione della proteina.

6. In un sistema multisubunità, una modificazione conformazionale a livello di una delle subunità può essere trasmessa alle altre subunità provocando modificazioni strutturali simili.

MIOGLOBINA e EMOGLOBINA

- esempio classico di come la struttura influenza la funzione e le caratteristiche delle proteine
- prime proteine di cui è stata determinata la struttura tridimensionale (cristallografia a raggi X, J. C. Kendrew, M. F. Perutz)
- l'analisi comparativa delle due proteine ha permesso di ottenere preziose informazioni sui rapporti struttura-attività delle proteine. la scoperta delle basi molecolari dell'anemia falciforme ha dimostrato per la prima volta che un cambiamento nella sequenza AA di una proteina può determinare l'insorgenza di una malattia
- evolutivamente correlate ed entrambe molecole trasportatrici di ossigeno, **ma....**

...hanno **diversa funzione metabolica specifica...**

L'**EMOGLOBINA** trasporta l'ossigeno dai polmoni ai tessuti periferici, dove una parte di esso può essere direttamente utilizzata per il metabolismo.

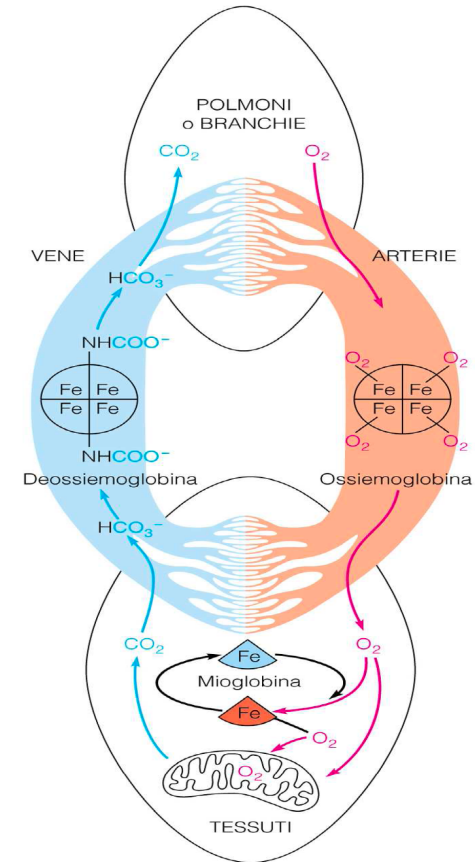
Un'altra parte può essere immagazzinata mediante il legame alla **MIOGLOBINA** e resa quindi disponibile quando la domanda di ossigeno da parte dei mitocondri dei tessuti periferici è forte.

A livello dei tessuti periferici l'**EMOGLOBINA** lega la CO_2 rilasciata dai processi ossidativi e la trasporta ai polmoni.

EMOGLOBINA - trasportatrice di ossigeno nel sangue

MIOGLOBINA - riserva di ossigeno nel muscolo

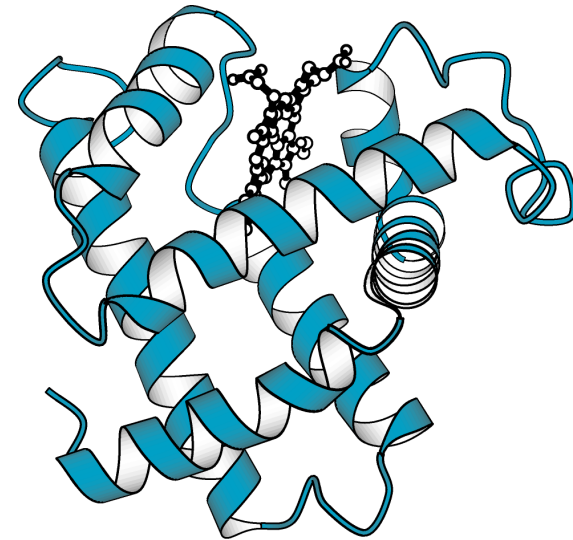
diversa affinità per l'ossigeno, diverso sistema di regolazione



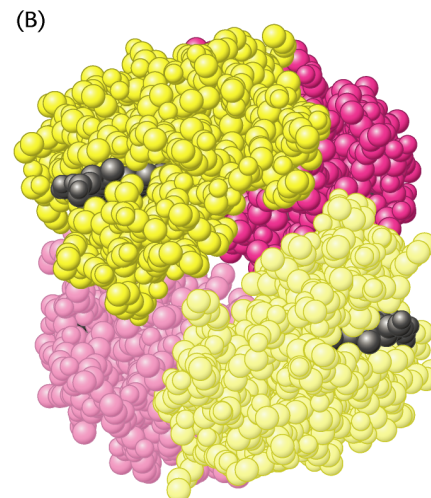
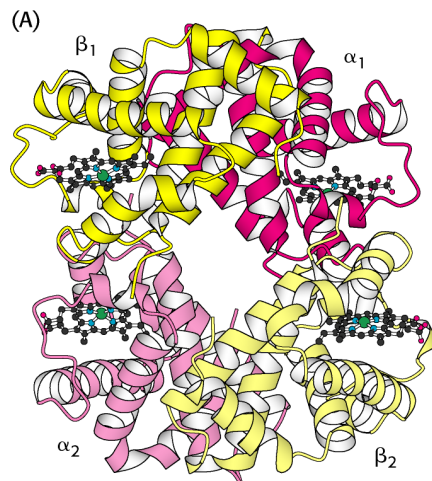
... e diversa struttura

EMOGLOBINA è un tetramero

MIOGLOBINA è un monomero



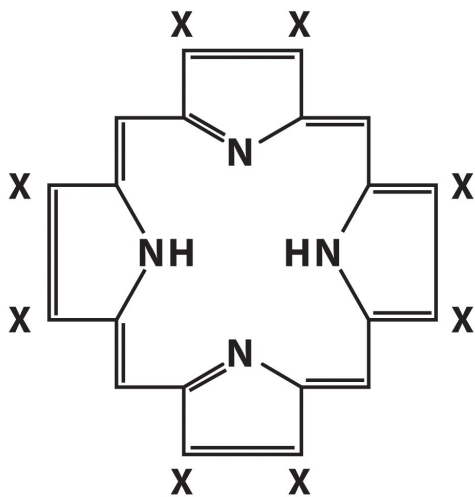
Mioglobina



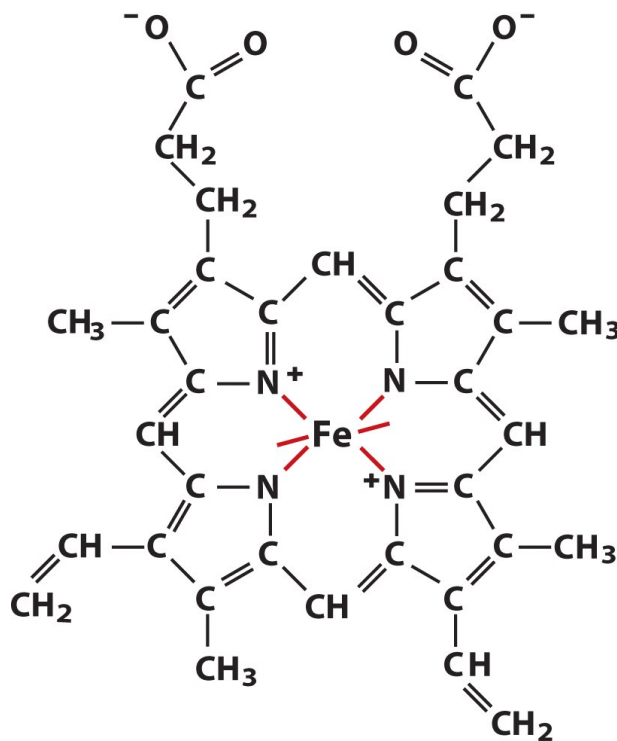
Emoglobina

Nessuna delle catene laterali degli AA naturali può legare reversibilmente O_2 . Questo ruolo viene in genere svolto da metalli di transizione tra cui Fe e Cu.

La capacità di emoglobina e mioglobina di legare O_2 dipende dalla presenza del gruppo EME che conferisce alle due proteine il colore caratteristico

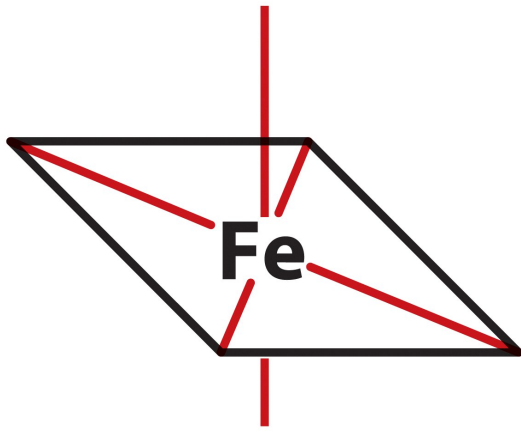


Anello tetrapirrolico
(4 anelli pirrolici legati da ponti metinici)



Catene laterali:
4 metili
2 vinili
2 propionati

Heme
(Fe-protoporfirina IX)

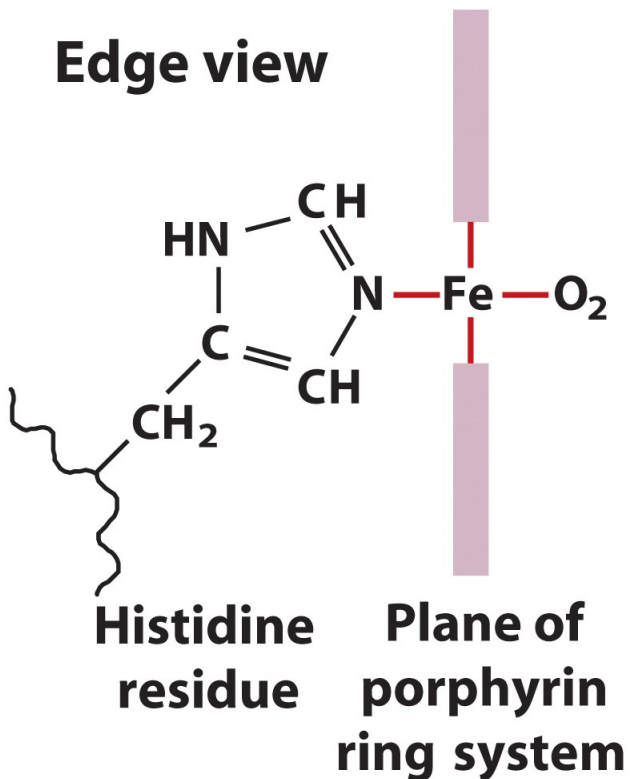


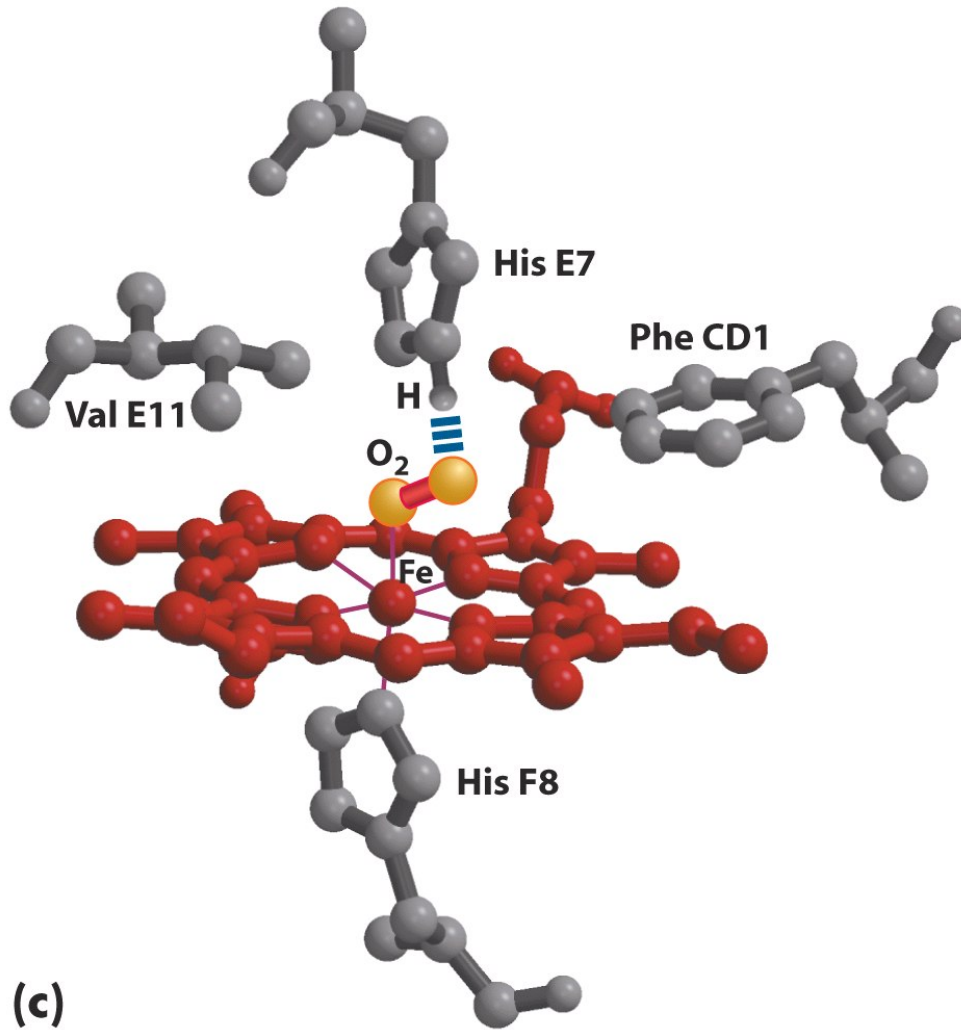
L'atomo di ferro può formare sei legami di coordinazione: quattro sono impegnati con gli N dell'anello porfirinico, il 5° e il 6° sono perpendicolari al piano della porfirina.

5° legame di coordinazione: residuo di His (ISTIDINA PROSSIMALE o RESIDUO F8)

6° legame di coordinazione: O_2

Gli atomi N (donatori di elettroni) impediscono la conversione del Fe dell'eme da (+2) a (+3)
Solo Fe+2 è in grado di legare reversibilmente O_2



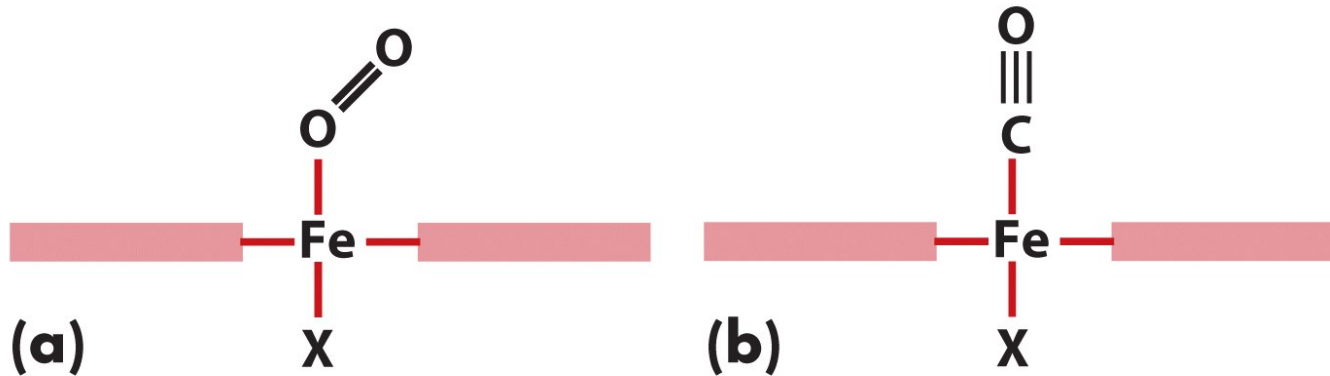


Residui che circondano il gruppo eme
nella mioglobina

Oltre a His F8 (His⁹³), un secondo residuo di His, His⁶⁴, (RESIDUO E7 o ISTIDINA DISTALE), si trova vicino all'eme ma non è legato ad esso.

Il legame H tra O₂ legato e His E7 stabilizza il legame di O₂ a Fe e impedisce l'ossidazione di Fe²⁺ a Fe³⁺ con conseguente perdita della capacità legante.

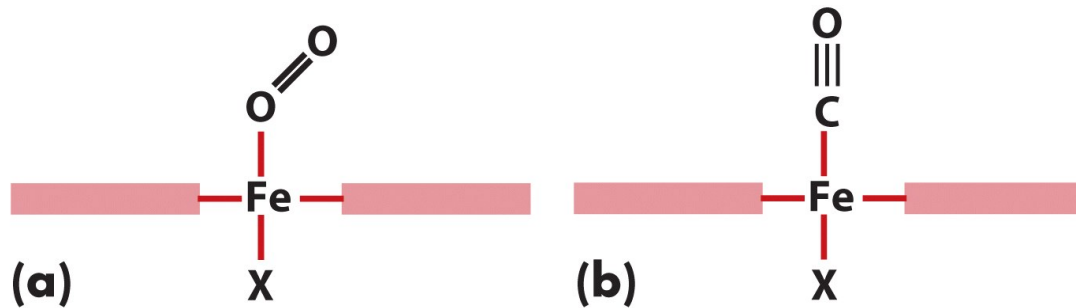
La reattività di Fe²⁺ è diversa se l'eme è isolato o si trova dentro la proteina, indicando l'importanza di E7.



Il legame Fe-O₂ ha una geometria angolare, conformazione che si adatta agli spazi interni della mioglobina

Il legame Fe-CO ha una geometria lineare, perpendicolare al piano dell'eme

CO è un potente veleno proprio per la sua capacità di legarsi a ferroemoglobina e ferromioglobina bloccando il trasporto di O₂



Se il gruppo EME è isolato:

CO ha un'affinità per Fe 25.000 volte maggiore di O_2

Se il gruppo EME si trova nella mioglobina (o emoglobina):

CO ha un'affinità per Fe 200 volte maggiore di O_2

Nella mioglobina HisE7 forza CO a legarsi a Fe con una geometria angolare simile a O_2

Questo effetto indebolisce il legame di CO all'eme della mioglobina

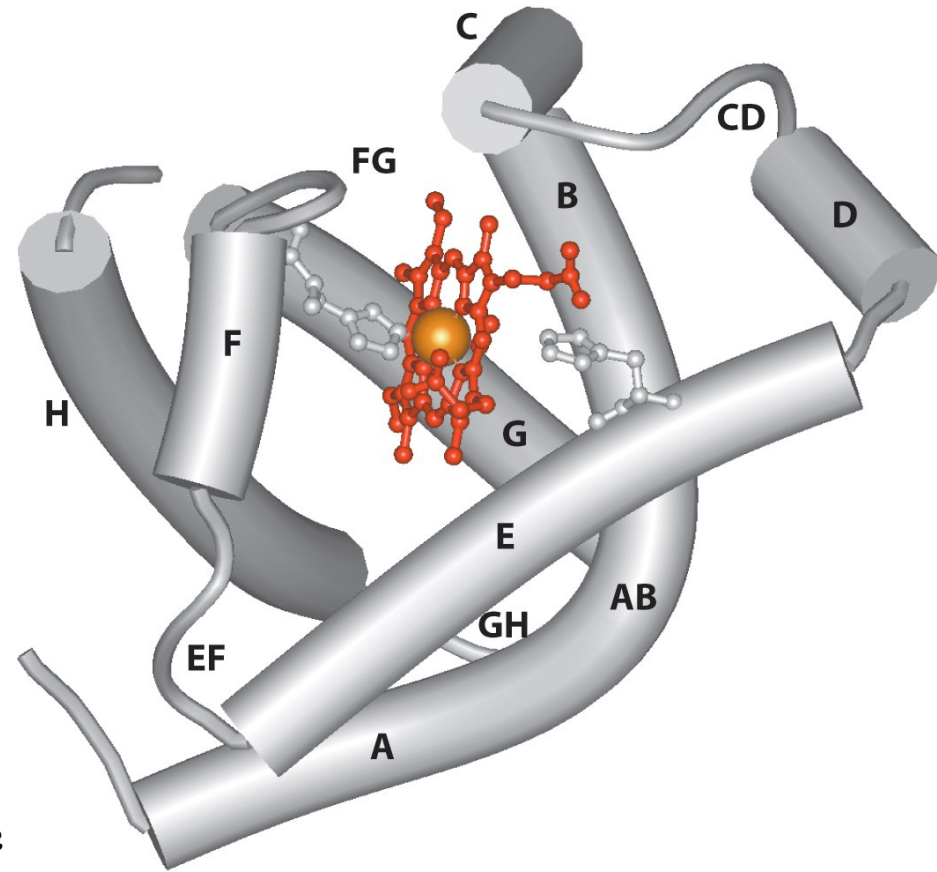
L'effetto di HisE7 sul legame con CO è fisiologicamente importante perché, anche se in quantità molto basse, CO è un sottoprodotto del nostro metabolismo

Quindi, in generale:

la funzione di un gruppo prostetico è modulata dal suo ambiente polipeptidico

La mioglobina ha un solo sito di legame per O₂

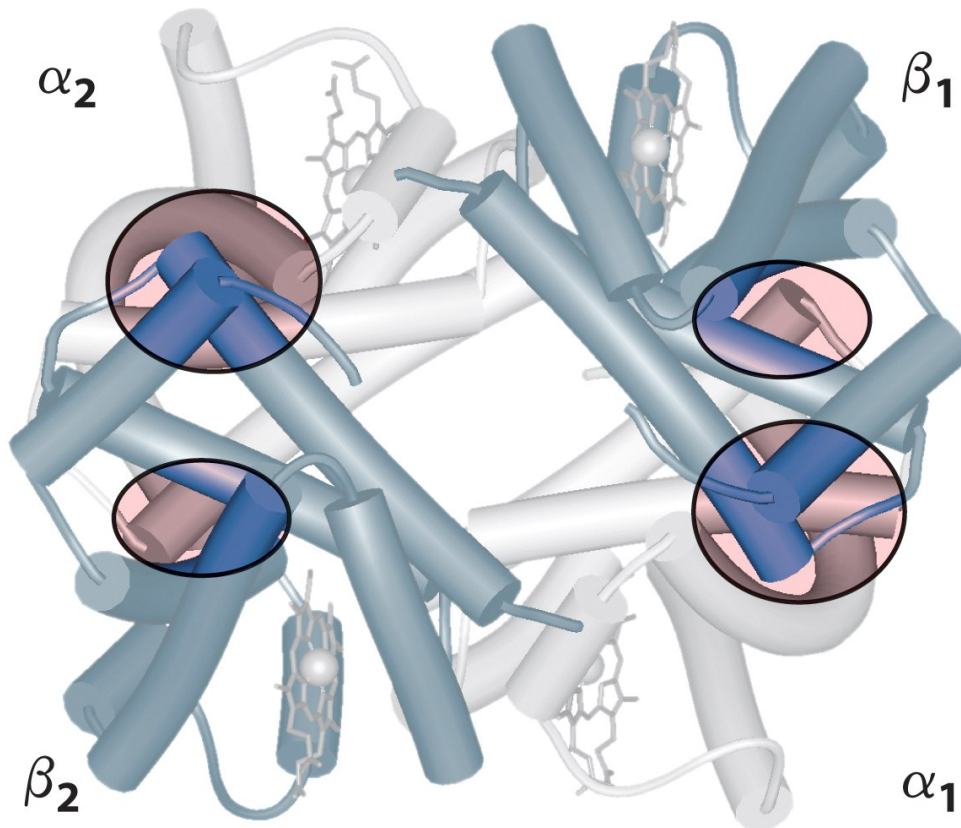
- struttura estremamente compatta (45x35x25 Angstrom)
- circa il 78% della catena ha struttura ad α -elica (8 segmenti principali collegati da ripiegamenti)
- spazio interno molto limitato. Contiene quasi esclusivamente gruppi non polari (leucina, valina, metionina, fenilalanina). Gli unici due residui polari all'interno sono due istidine che hanno una funzione critica nel sito di legame.
- il gruppo eme è localizzato in una fenditura della molecola. Le catene di propionato del gruppo eme sono esposte verso la superficie. Il resto del gruppo eme è all'interno ed è circondato da gruppi non polari, eccetto le due istidine



PM= 16700
153 AA

EMOGLOBINA

- è costituita da 4 catene polipeptidiche uguali a 2 a 2 legate tra loro da legami non covalenti
- ogni subunità contiene un gruppo eme ed un sito di legame per O_2
- i gruppi eme sono posti vicino all'esterno
- il tetramero è quasi sferico (diametro 55 Angstrom)
- ciascuna subunità α è in contatto con entrambe le β e viceversa. Poche interazioni α - α e β - β



Catene α = 141 AA

Catene β = 146 AA

**α e β hanno struttura
tridimensionale molto simile
Omologia di sequenza <50%**

E' nota la sequenza primaria di Emoglobina di più di 60 specie.
Notevole variabilità della struttura primaria.

Solo 9 AA sono conservati in tutte le specie (residui costanti=costrizioni funzionali)

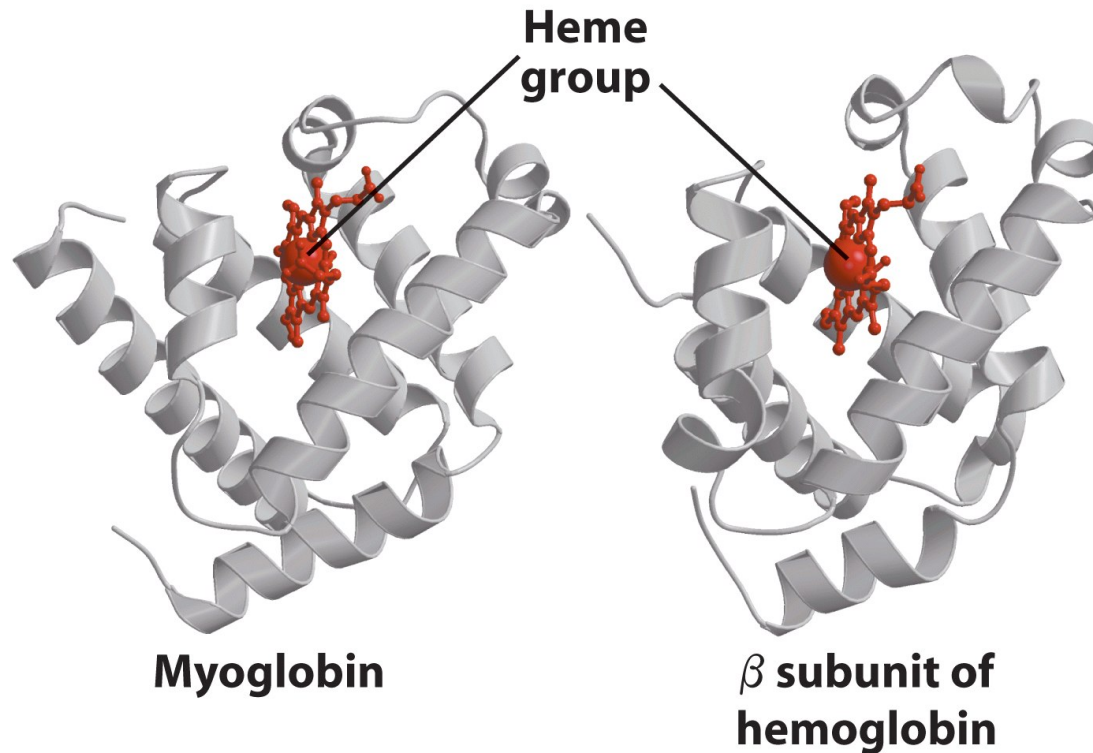
Residui conservati dell'Emoglobina (Costrizioni funzionali)		
Posizione	AA	Ruolo
F8	His	Istidina prossimale, lega EME
E7	His	Istidina distale, vicina a EME
CD1	Phe	In contatto con EME*
F4	Leu	In contatto con EME*
B6	Gly	Permette stretta vicinanza tra eliche B ed E
C2	Pro	Termine dell'elica (gomito della catena polipeptidica)
HC2	Tyr	Lega tra loro eliche H ed F
C4	Thr	
H10	Lys	

*contribuisce a creare l'ambiente idrofobico necessario all'eme ostruendone la tasca idrofobica.

Le forti caratteristiche non polari dell'interno si conservano inalterate a causa della sostituzione tra AA idrofobici.

Molto più variabili sono i residui sulla superficie della molecola.

LE STRUTTURE TRIDIMENSIONALI DELLA MIOGLOBINA E DELLE CATENE α E β DELL'EMOGLOBINA SONO MOLTO SIMILI

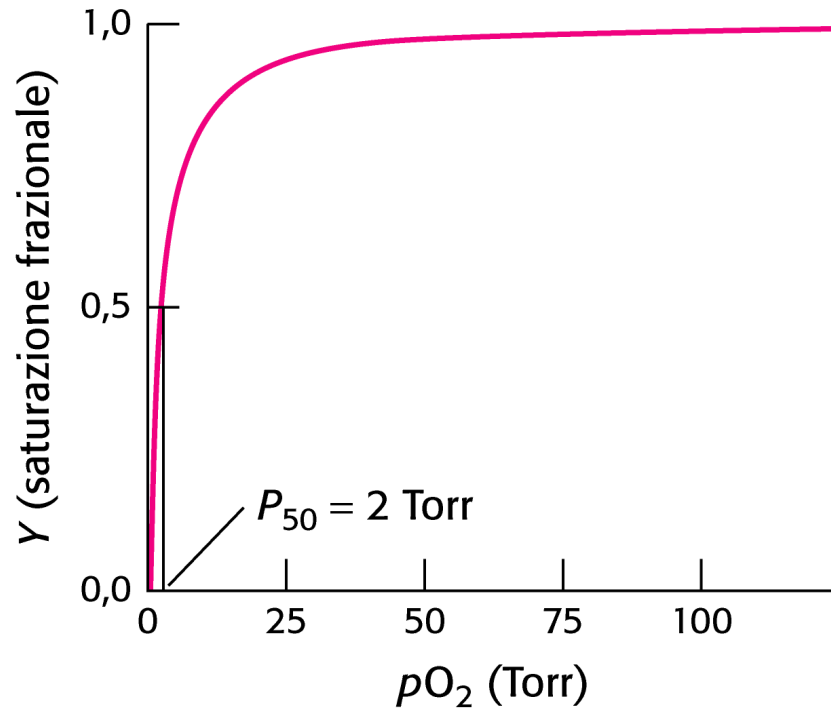


Struttura terziaria simile nonostante la diversità di sequenza (identità di sequenza tra le tre catene: 27AA)

Il folding è importante per la funzione, che è la stessa (in questo caso trasporto di O_2)
Tra le tre catene sono conservati solo i residui importanti per la funzione

Sebbene le subunità α e β dell'emoglobina abbiano al stessa struttura della mioglobina, nuove proprietà emergono quando le quattro subunità si uniscono per formare un tetramero

CINETICA DI OSSIGENAZIONE DELLA MIOGLOBINA



1 Torr:
la pressione esercitata da
una colonna di Hg di 1 mm
a 0°C e gravità standard
(1 mmHg)

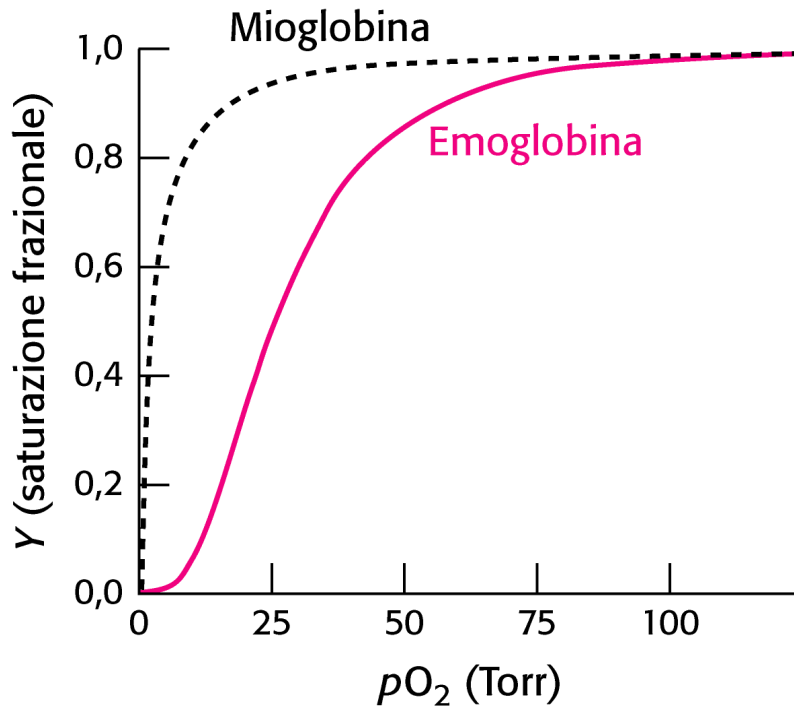
Curva di legame (curva di saturazione) dell'ossigeno: saturazione frazionale Y in funzione della concentrazione di O_2

Saturazione frazionale: frazione dei possibili siti di legame a cui è effettivamente legato O_2 . Rapporto tra siti di legame per O_2 occupati e non occupati. Il valore di Y può variare da 0 (tutti i siti vuoti) a 1 (tutti i siti occupati)

La concentrazione di O_2 è riportata sotto forma di pressione parziale di O_2 (pO_2) ed è espressa in Torr

Il valore di pO_2 a cui la metà dei siti sono occupati da O_2 (P_{50} - 50% di saturazione) è di 2 Torr

DIFFERENZE TRA MIOGLOBINA E EMOGLOBINA



1. La mioglobina ha maggiore affinità per O₂ della emoglobina

diversi valori di P₅₀ (Y=0,5)

Per la mioglobina P₅₀ = 2 Torr

Per l'emoglobina P₅₀ = 26 Torr

2. La cinetica di ossigenazione è diversa

La curva di dissociazione per la mioglobina è iperbolica, mentre quella per l'emoglobina è sigmoide

O₂ si lega all'emoglobina in maniera cooperativa: il legame ad un gruppo eme facilita il legame di O₂ agli altri gruppi eme dello stesso tetramero

Allo stesso modo, il distacco da un eme facilita il distacco degli altri

I gruppi eme di una molecola di emoglobina comunicano l'uno con l'altro

L' emoglobina è una proteina allosterica, la mioglobina no

Proteina allosterica: il legame della proteina con un ligando a livello di uno specifico sito di legame modifica le proprietà di un altro sito sulla stessa molecola proteica attraverso una modificazione conformazionale

allosterico = altra forma

IL LEGAME DI O₂ PROVOCA UNA MODIFICAZIONE STRUTTURALE DELL'EMOGLOBINA

Tramite analisi a raggi X è stato osservato:

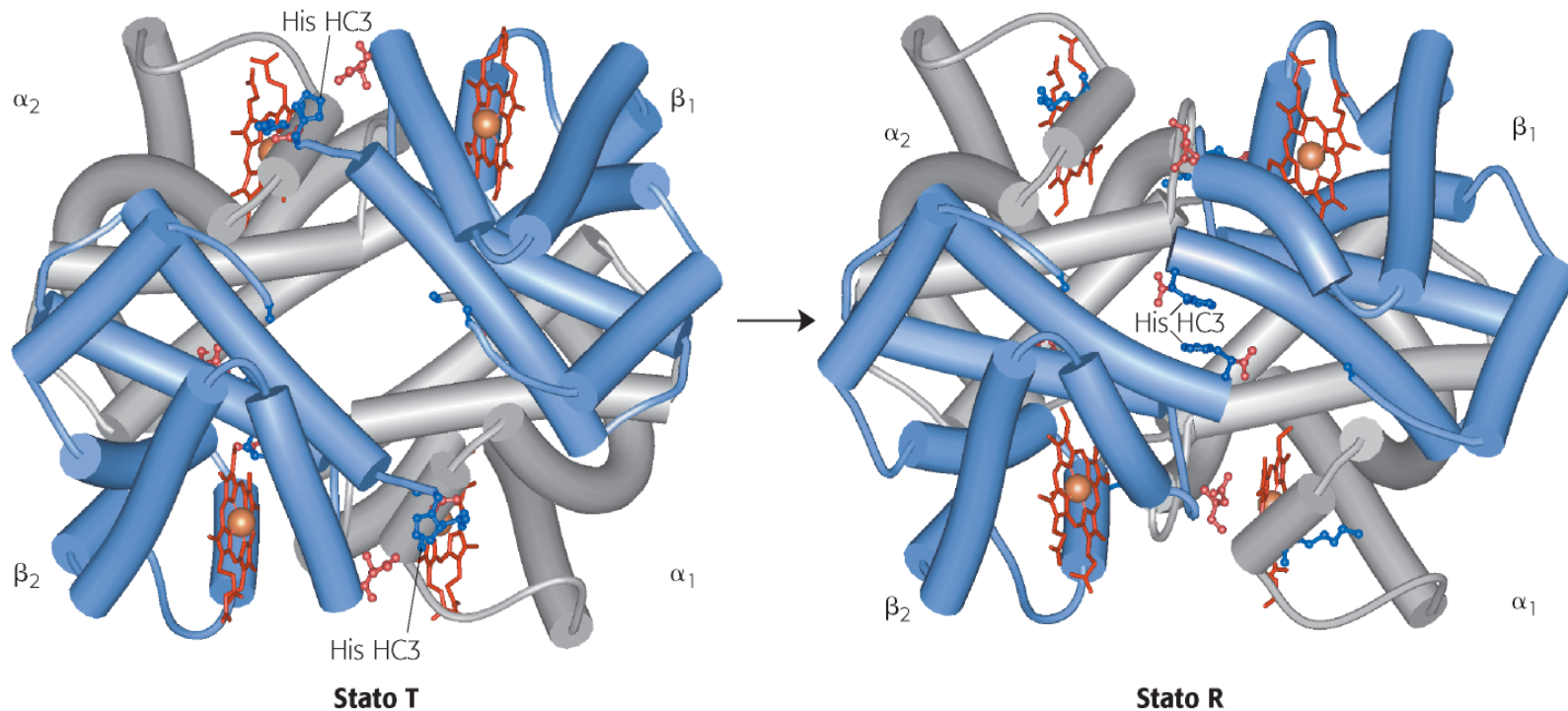
L'emoglobina può esistere in due stati conformazionali:

T (tense) bassa affinità per O₂

R (relaxed) alta affinità per O₂

Il legame di O₂ all'emoglobina stabilizza lo stato R

Quando O₂ non è disponibile lo stato T è più stabile



Significato biologico del legame cooperativo di O_2 nell'emoglobina:

in condizioni fisiologiche tipiche, permette all'emoglobina di trasportare una quantità di O_2 1,83 volte maggiore di quella teoricamente trasportabile se i siti di legame fossero indipendenti

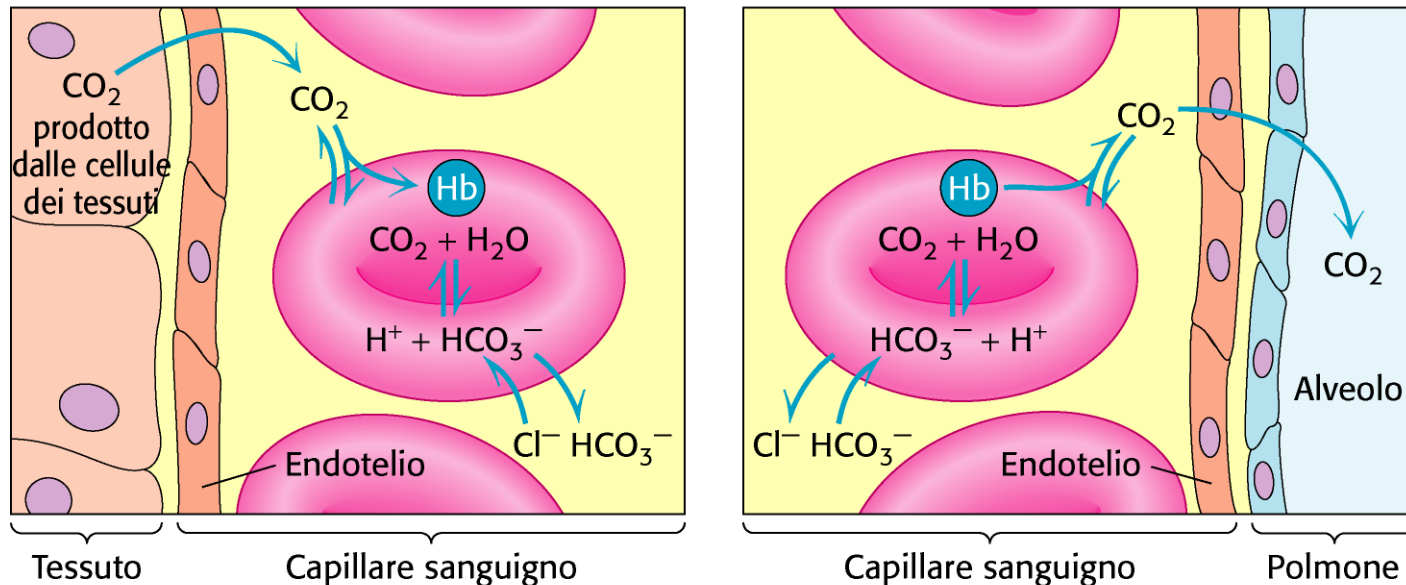
Oltre a trasportare O_2 necessario alle cellule, l'emoglobina trasporta anche CO_2 dai tessuti ai polmoni e ai reni, dove CO_2 viene escretata.

Il legame di CO_2 all'emoglobina è inversamente correlato al legame di O_2 e dipende dal pH ematico (reazione idratazione CO_2 - anidasi carbonica).

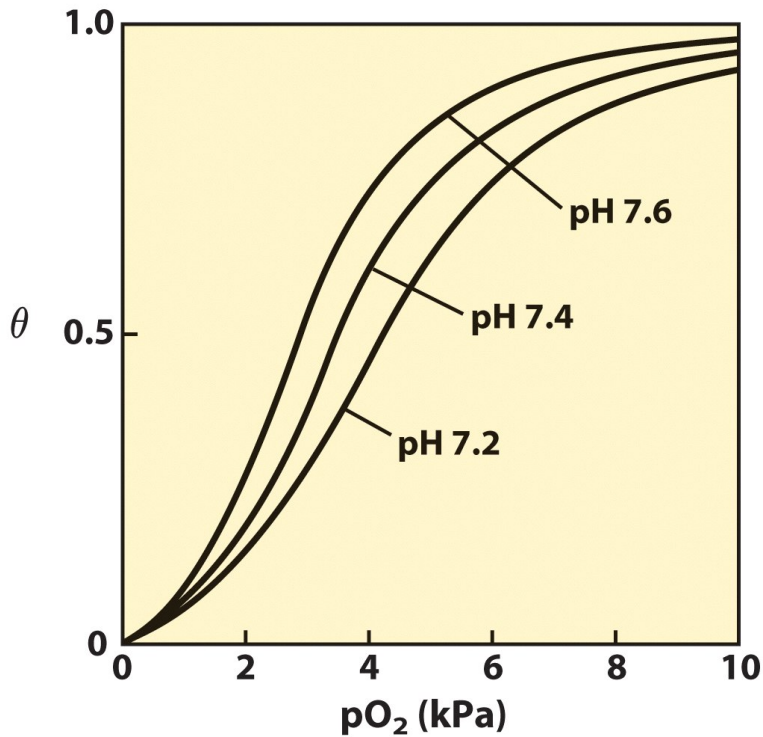
L'affinità dell'emoglobina per O_2 diminuisce al diminuire del pH, a partire dal valore fisiologico di 7,4.

Nei capillari dei tessuti periferici (pH < 7,4, elevata $[CO_2]$) è favorito il rilascio di O_2 e il legame con CO_2 .

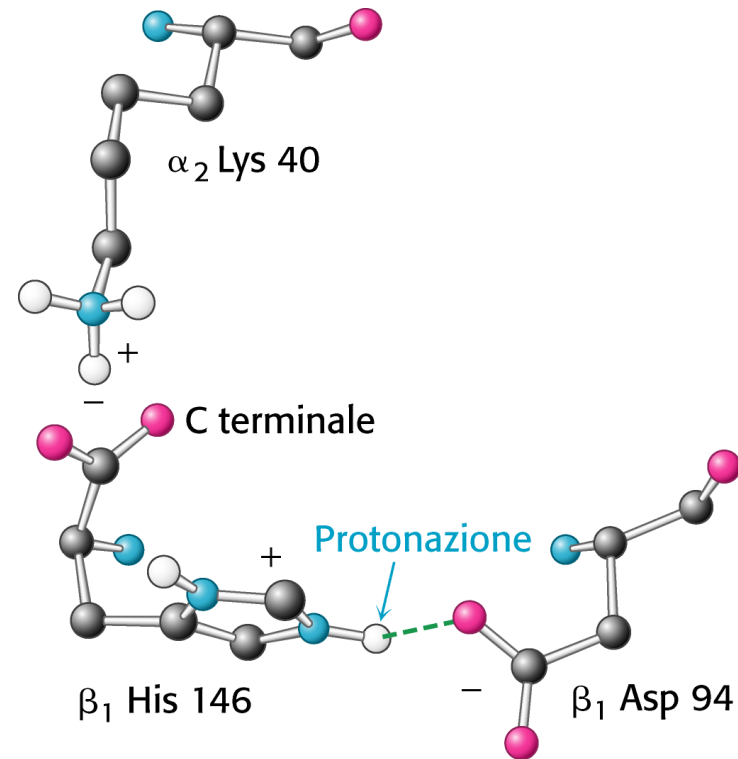
Nei capillari dei polmoni (pH > 7,4, bassa $[CO_2]$): favorito il rilascio di CO_2 e il legame con O_2



L'effetto del pH e della concentrazione di CO_2 sul legame e sul rilascio di O_2 dall'emoglobina è detto **effetto Bohr** (Christian Bohr, 1904)



pH del sangue nei polmoni = 7,6
pH del sangue nei tessuti = 7,2

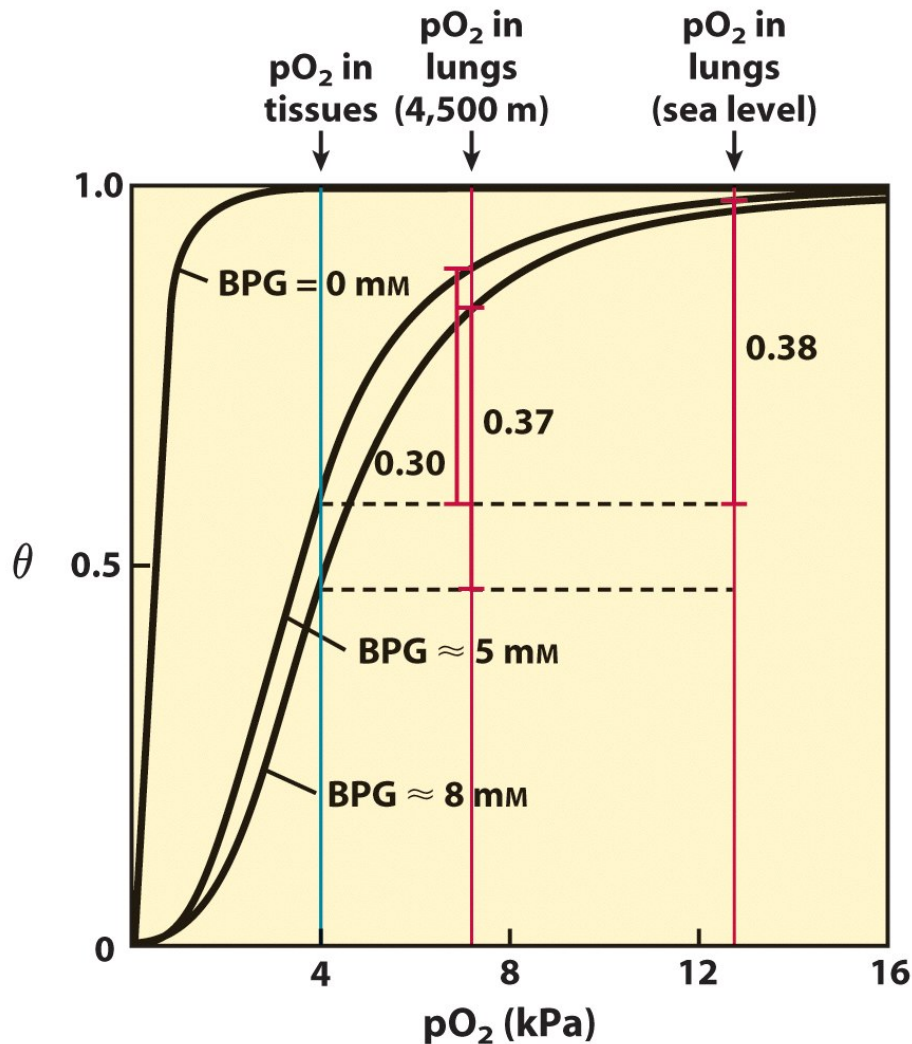


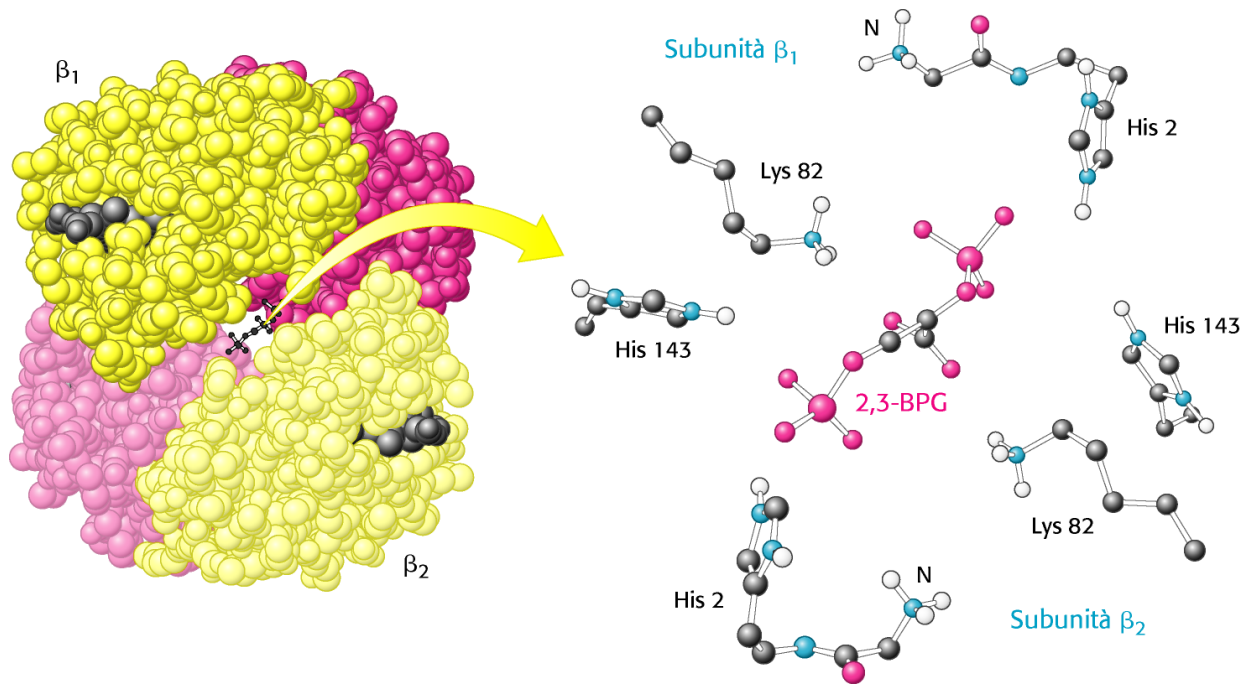
Basi chimiche dell'effetto Bohr:

La struttura quaternaria dello stato T è stabilizzata da due ponti salini e da un legame H tra i tre residui AA.

Il legame H e il ponte salino tra His146 e Asp94 dipendono dalla protonazione di His, quindi dalla $[\text{H}^+]$.

L'affinità dell'emoglobina per O_2 nei globuli rossi è minore di quella dell'emoglobina libera in soluzione. Questa differenza è dovuta alla presenza nei globuli rossi umani di 2,3-bifosfoglicerato (BPG) in quantità circa equimolari rispetto all'emoglobina (circa 2mM).





Una molecola di BPG si lega al centro del tetramero in una tasca presente solo nella forma T ed in un sito diverso da quello per O_2

Durante la transizione T-R la tasca si contrae e BPG viene rilasciato

Perché la transizione T-R possa avvenire si devono rompere i legami tra BPG e emoglobina

In presenza di BPG, per promuovere la transizione T-R deve essere occupato un maggior numero di siti di legame per O_2 (bassa affinità)

Il decremento dell'affinità per O_2 quando l'emoglobina si trova nei globuli rossi è essenziale per permettere il rilascio di O_2 a livello tissutale

BPG è un regolatore allosterico dell'emoglobina

L'interazione Emoglobina-BPG ha altre importanti implicazioni fisiologiche:

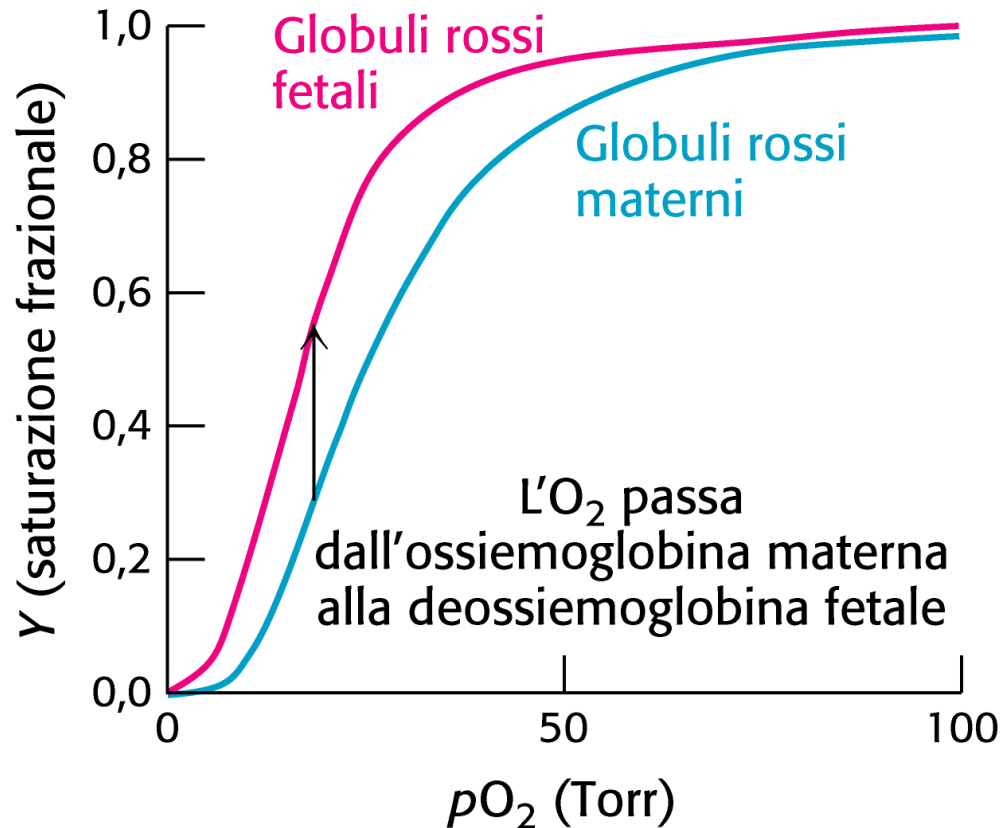
Il tetramero dell'emoglobina fetale è costituito da 2 catene α e 2 catene γ

La sequenza primaria di γ ha una identità di sequenza del 72% rispetto a β

Una differenza importante è a livello del sito di legame per BPG: S^{143} in γ sostituisce His^{143} di β . Minore affinità per BPG e conseguentemente maggiore affinità per O_2 .

L'affinità per O_2 dell'emoglobina fetale è più alta di quella materna

Questa differenza di affinità rende possibile il trasferimento di O_2 dai globuli rossi materni a quelli fetali



Il gene della globina espresso dal feto umano è diverso da quello espresso dall'adulto

Emoglobina fetale e emoglobina adulta sono due **isoforme** o **isotipi**,
cioè:

proteine distinte che svolgono la stessa funzione
diverse proprietà regolatorie
esprese da geni diversi
esprese in tessuti diversi
diversa struttura primaria, qualche volta terziaria e quaternaria

Emoglobina fetale e emoglobina adulta sono un esempio tipico che dimostra come la duplicazione genica e la specializzazione molecolare possano risolvere un problema biologico: nel caso specifico, il trasporto dell'ossigeno dalla madre al feto

L'emoglobina è contenuta nell'eritrocita e occupa gran parte del suo volume (150g/L)

Oltre all'emoglobina l'eritrocita contiene poche altre molecole

Non contiene nucleo nè mitocondri

Non si ha sintesi proteica

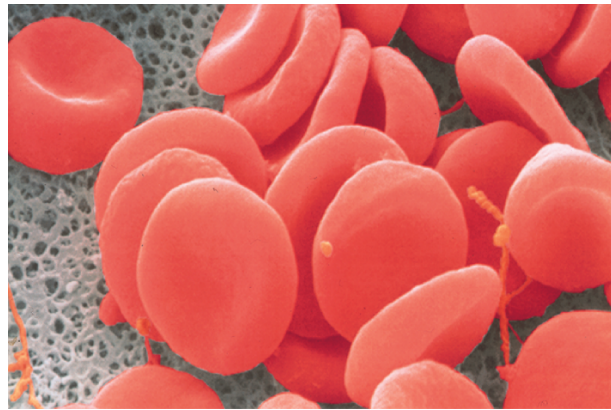
Vita breve non avendo la capacità di sostituire eventuali componenti danneggiati ($t_{1/2}$ 20gg).



(a)

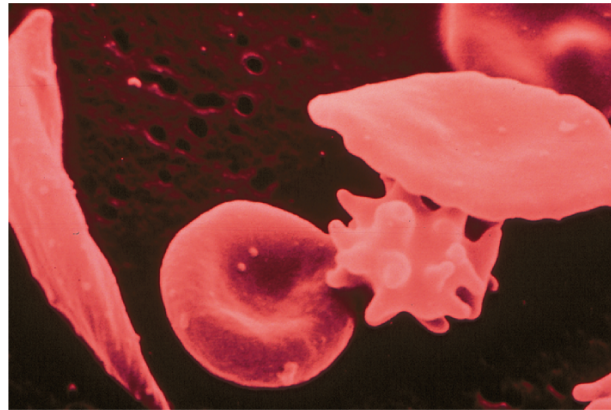
2 μ m

L'anemia falciforme risulta dall'aggregazione di molecole mutate di deossiemoglobina



(a)

2 μm

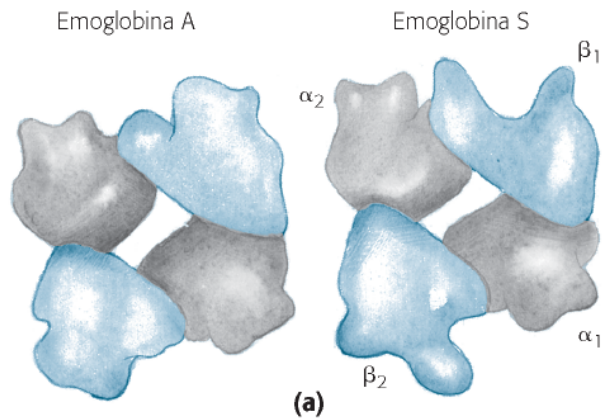


(b)

Emoglobina normale
Emoglobina anormale

...Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Gly-Lys...
...Val-His-Leu-Thr-Pro-Val-Gly-Lys...

tratto di catena β dell'emoglobina



Per effetto della mutazione la deossi-emoglobina S ha una regione idrofobica sulla superficie che causa un'aggregazione di queste molecole in catene che si organizzano in fibre insolubili

