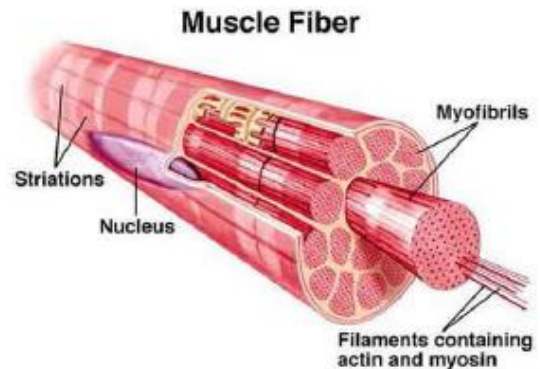
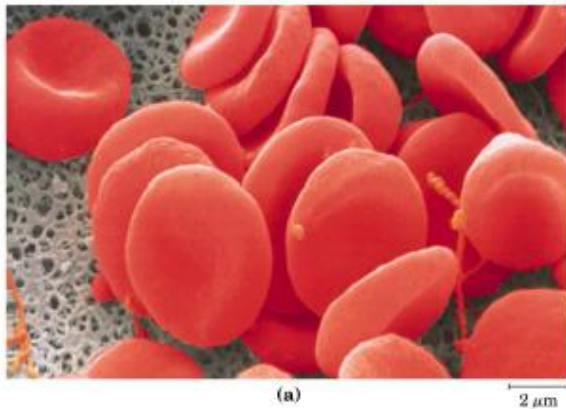


MIOGLOBINA ED EMOGLOBINA



emoglobina nei globuli rossi

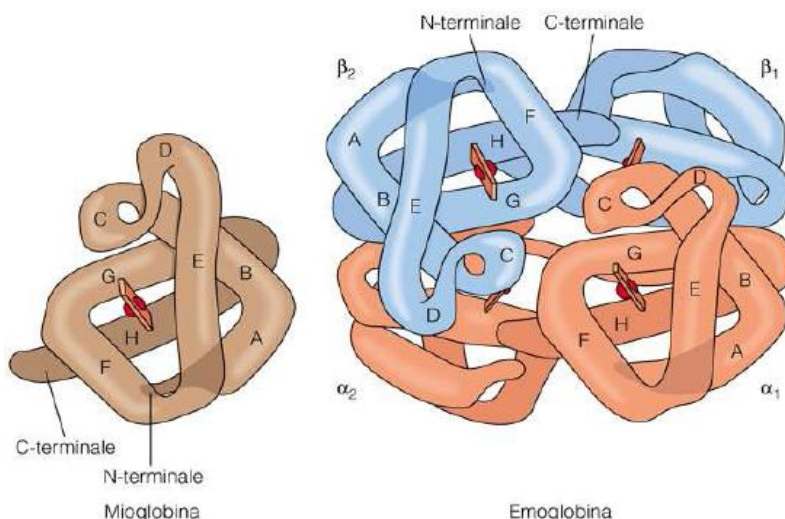
mioglobina nei muscoli

Il passaggio dalla vita anaerobia al metabolismo di tipo aerobico ha rappresentato un vantaggio energetico incredibile. L'ossigeno è assolutamente indispensabile per il metabolismo, in quanto esso serve a tutte le nostre cellule per estrarre energia durante i processi metabolici.

Ovviamente il nostro corpo non è in grado di produrre ossigeno, per cui lo assorbiamo dall'atmosfera, introducendolo nel nostro corpo. Una volta all'interno, per raggiungere tutte le cellule, è necessario il sistema cardiocircolatorio. Siccome all'interno del sistema circolatorio scorre il sangue, l'ossigeno non potrebbe essere trasportato mediante esso in tutte le cellule del nostro corpo, in quanto è apolare e non si scioglie nel sangue. Per questo motivo, si sono sviluppate alcune proteine in grado di legare l'ossigeno, in modo tale che possa essere trasportato attraverso il sistema circolatorio.

L'ossigeno è molto importante per il nostro corpo anche perché consente di operare, sulle sostanze nutritive, una degradazione ossidativa, mediante la quale avviene la liberazione di anidride carbonica. Anche l'anidride carbonica viene trasportata mediante proteine attraverso il sangue. Questa, una volta raggiunti i polmoni, viene espulsa dal nostro corpo mediante l'espirazione. Un esempio di degradazione ossidativa, con conseguente eliminazione di anidride carbonica dal nostro corpo, è dato dal metabolismo del glucosio.

PROTEINE CHE LEGANO L'OSSIGENO



La mioglobina e l'emoglobina sono due proteine in grado di legare e trasportare l'ossigeno nel sangue.

L'emoglobina è specificatamente deputata al trasporto di ossigeno nel sangue ed è situata nei **globuli rossi**, che sono le cellule più abbondanti del sangue. La particolarità dei globuli rossi è che sono cellule terminalmente differenziate, in quanto, in seguito al differenziamento, hanno perso il nucleo e tutti gli organuli cellulari, per cui presentano solo il citoplasma al loro interno. Tutte le

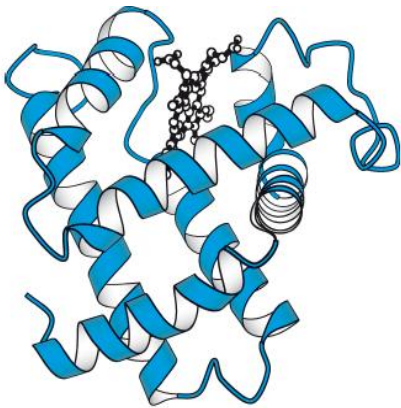
cellule del sangue sono prodotte nel midollo osseo e, una volta prodotti, i globuli rossi vengono

immessi nel torrente circolatorio come reticolociti, per cui inizialmente presentano sia il nucleo che gli organelli. Dopo un certo periodo di tempo essi perderanno sia gli organuli che il nucleo. Per poter adempiere al proprio compito, i globuli rossi si riempiranno di emoglobina, i quali si colorano di rosso grazie a questa proteina.

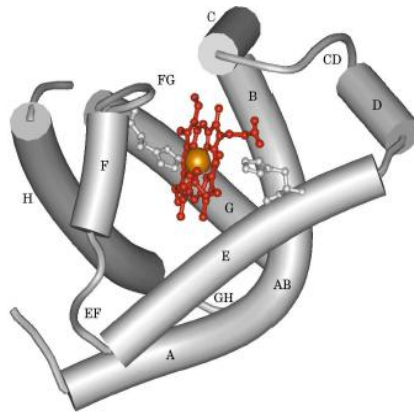
La mioglobina invece non è una proteina presente nei globuli rossi, ma è situata nelle **fibroculture muscolari**. Il compito della mioglobina è quello di fungere da riserva di ossigeno nei muscoli. Quindi, così come l'emoglobina, anche la mioglobina è in grado di legare l'ossigeno, cedendolo ai muscoli nel momento del bisogno. Così come il sangue, anche i muscoli sono rossi a causa della presenza della mioglobina.

Dal punto di vista strutturale c'è una grande similitudine tra queste proteine: la mioglobina è un monomero, formato da una singola catena polipeptidica; l'emoglobina è un tetramero, formato da 4 catene polipeptidiche, uguali a due a due. La catena polipeptidica della mioglobina e le catene α e β dell'emoglobina sono tra di loro estremamente simili, sia nella struttura primaria che nella struttura terziaria.

MIOGLOBINA

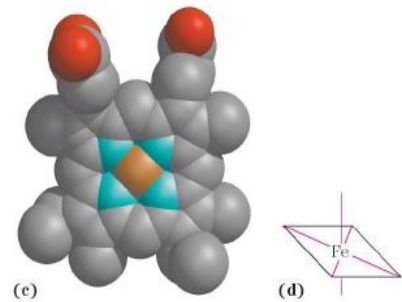
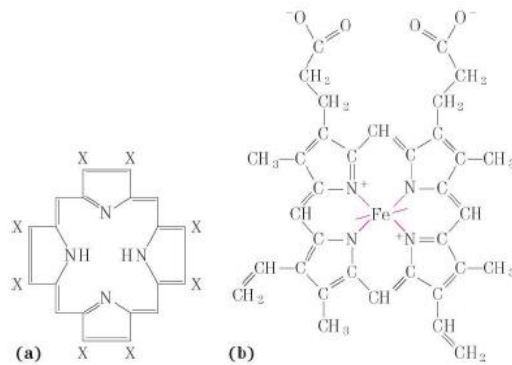


Mioglobina

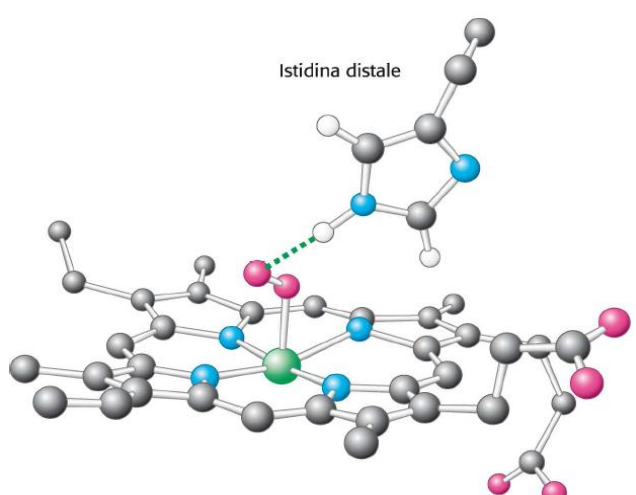
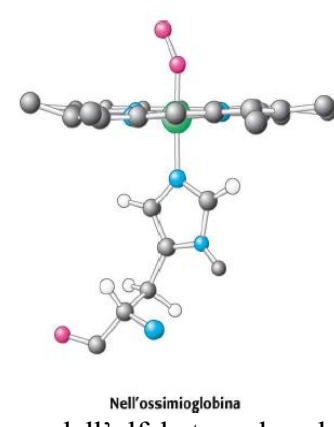
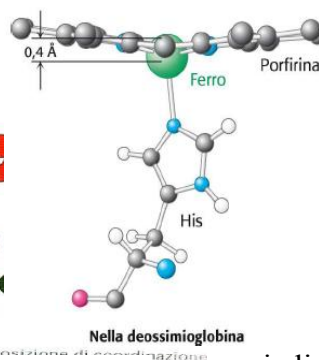
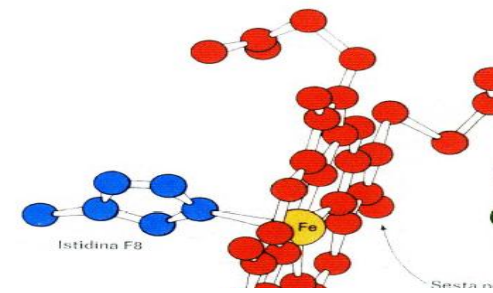


La mioglobina ha un peso molecolare di 16700 kDa ed è costituita da 153 aminoacidi. Nella sua struttura troviamo 8 tratti ad α -elica e nessun foglietto- β . Per una questione storica, i tratti ad α -elica della mioglobina sono indicati con lettere dell'alfabeto, mentre i tratti random-coil prendono il nome di entrambe le α -eliche (ad esempio CD). La

presenza di 8 strutture ad α -elica è tipico di tutte le globine che trasportano l'ossigeno. Questa precisa disposizione degli 8 tratti ad α -elica, in queste proteine, viene detto **ripiegamento globinico**.



Per identificare un amminoacido all'interno di un tratto di α -elica si indica il nome del tratto di α -elica,

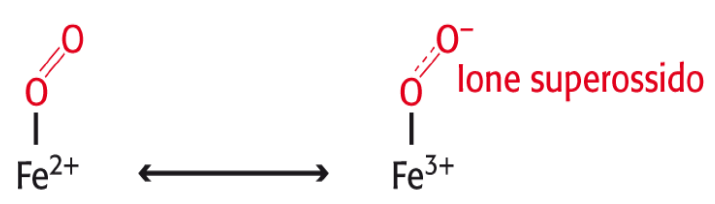


quindi la lettera dell'alfabeto che lo identifica, e il numero dell'amminoacido da analizzare, ossia il numero che corrisponde alla posizione dell'amminoacido all'interno dell' α -elica (ad esempio A7). La mioglobina oltre ad avere la porzione di amminoacidi, contiene anche un gruppo chimico distinto dalla catena polipeptidica, che prende il nome di **gruppo prostetico**. Con il termine gruppo prostetico si intende una molecola organica legata covalentemente alla catena polipeptidica della proteina, la quale svolge delle importanti funzioni all'interno della proteina. Il gruppo prostetico legato alla

mioglobina è il cosiddetto **gruppo eme**, che è il cuore funzionante della mioglobina. Esso deriva da una molecola chiamata **protoporfirina**, la quale presenta un anello tetra-pirrolico, ossia formato da 4 gruppi pirrolici. Oltre a ciò il gruppo eme presenta anche diversi sostituenti sulla protoporfirina, ossia: 2 propili, 2 vinili e 4 metili. Inoltre il gruppo eme contiene anche il ferro, che si trova al centro del piano tetra-pirrolico. Il ferro, all'interno del gruppo eme, ha sempre +2 come stato di ossidazione, quindi, avrà lo stato di ossidazione più basso. All'interno del gruppo eme va incontro alla formazione di 6 legami di coordinazione ed è legato a tutti e 4 gli azoti. Gli altri due legami sporgono uno nella parte superiore, l'altro nella parte inferiore del centro del piano tetra-pirrolico. La parte inferiore interagisce con la parte proteica della mioglobina. In particolare, il ferro reagisce con un residuo di istidina della proteina, più precisamente il residuo numero 8 del tratto α -elica F, per cui si dice che è legato all'**istidina F8**. Questa istidina legata covalentemente all'ossigeno prende il nome di **istidina prossimale**, perché è molto vicina al ferro. L'altro legame a disposizione con il ferro sarà occupato dalle molecole di O_2 . In prossimità di questo legame, inizialmente libero per mancanza di molecole di O_2 , è posizionata l'**istidina E7**, la quale non si legherà mai al ferro, ma siccome si trova vicino ad esso prende il nome di **istidina distale**.

Prendendo in considerazione un gruppo eme isolato, in cui il ferro non lega né l'istidina, né l'ossigeno, il ferro si trova perfettamente nel piano tetra-pirrolico. Invece, se il ferro si lega all'istidina non sarà più perfettamente allineato nel piano tetra-pirrolico, ma fuoriesce di 0,4Å, a causa del legame con l'istidina che lo appesantisce.

Ferro³⁺ non è più in grado di legare O_2 . Nella mioglobina e nell'emoglobina il ferro è mantenuto nella forma +2, quindi ridotto, perché il gruppo eme è racchiuso in una



tasca idrofobica e non è a contatto con l'ambiente, per cui non si ossida. Il ferro non sta perfettamente sul piano del gruppo eme, ma essendo tirato dall'istidina, va leggermente in basso. Dall'altra parte del gruppo eme c'è il sito di legame dell'O₂.

Esistono due tipi di mioglobine in base alla presenza o meno del legame con l'ossigeno:

- Deossimioglobina: è la mioglobina che non ha legato l'ossigeno.
- Ossimioglobina: è la mioglobina che ha legato l'ossigeno.

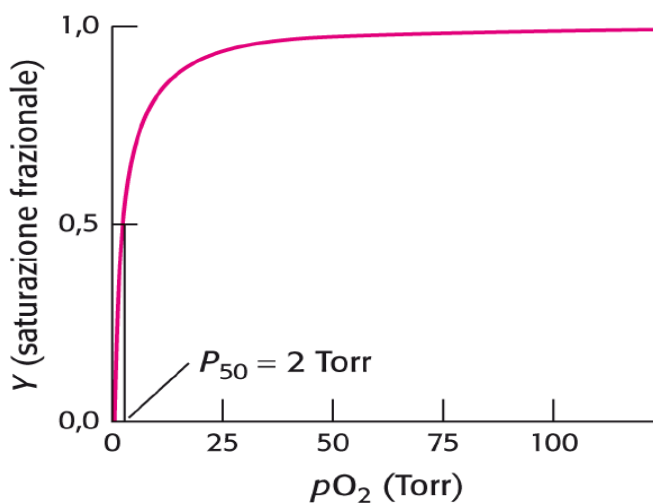
La presenza dell'istidina distale è importante perché coordina, con un ponte H, la molecola di ossigeno legata all'eme nell'ossimioglobina.

L'ossigeno è molto elettronegativo e nel momento in cui si lega a Fe²⁺ tende a strappare un elettrone al ferro e quindi caricarsi di un elettrone in più. L'ossigeno molecolare che si prende un elettrone diventa un **anione superossido**. Il rilascio da parte della mioglobina dell'anione superossido è dannoso, perché è una molecola estremamente reattiva per le cellule (la **metamioglobina** è la mioglobina con il ferro ossidato 3+). L'istidina distale minimizza questo rischio con la formazione del ponte a H. La presenza dell'istidina distale crea un ingombro sterico, in modo tale che l'ossigeno non possa legarsi perpendicolarmente al piano del Fe, ma debba legarsi con una certa angolatura. Il gruppo eme della mioglobina, oltre all'ossigeno, può legare anche il monossido di carbonio e lega il monossido con un'affinità spaventosamente superiore rispetto all'ossigeno (2000 volte superiore). L'organismo produce tracce di monossido di carbonio (una molecola) proprio dalla degradazione del gruppo eme. Il monossido si può legare al Fe senza angolatura e quindi sullo stesso piano del Fe. L'istidina distale riduce l'affinità rispetto al monossido di carbonio (da 2000 si passa a 200 volte superiore), che all'ossigeno.

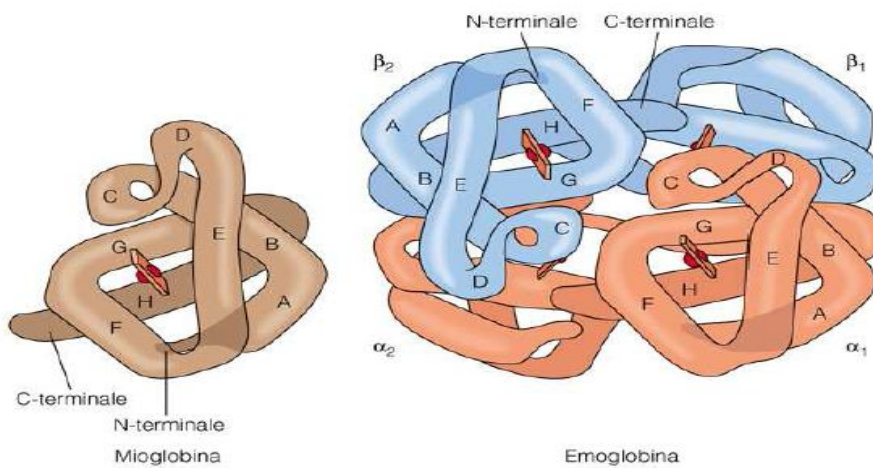
Il legame dell'ossigeno dipenderà dalla concentrazione del ligando. La quantità di ossigeno disponibile è in ascissa (pressione parziale di ossigeno). Sulle ordinate si mette la percentuale di saturazione. Il valore di saturazione viene raggiunto abbastanza precocemente.

La **P₅₀** è la pressione parziale di ossigeno per la quale sono saturati la metà dei siti legati per l'ossigeno. Dà un valore sull'affinità dell'ossigeno per la mioglobina. Più è alta la P₅₀, più l'affinità è ridotta. La P₅₀ della mioglobina è di 2Torr, quindi a 2 Torr, saranno legate la metà delle molecole di ossigeno. La pressione parziale dell'ossigeno nei polmoni è 100Torr. Man mano che si va negli altri tessuti, essa diminuisce. In un tessuto a riposo, la P₅₀ è circa 40Torr, mentre quando il tessuto è in azione, la P₅₀ si riduce a 20Torr. In un muscolo a riposo dove la P₅₀ è 40Torr, la mioglobina lega l'ossigeno e lo tiene legato.

Nel muscolo, la mioglobina rappresenta una riserva di ossigeno. Quando l'attività del muscolo riprende, l'affinità della mioglobina per l'ossigeno si riduce, quindi l'ossigeno che era legato, viene rilasciato. Perché la mioglobina rilasci la metà dell'ossigeno attaccato, la P₅₀ deve scendere a 2Torr. La P₅₀ ha valore 2Torr solo in caso di estrema difficoltà. Questo meccanismo è dovuto alla sua alta affinità per l'ossigeno. Per questa ragione la mioglobina è un'eccellente riserva di ossigeno per il muscolo, ma sarebbe un pessimo trasportatore di ossigeno per l'organismo, dato che non lo rilascia a meno che la P₅₀ non abbia il valore di 2Torr.

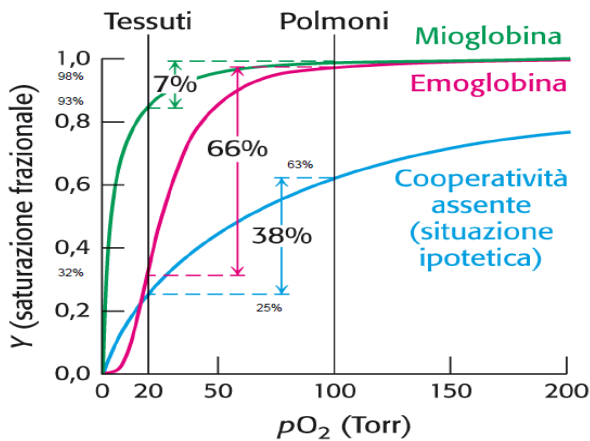
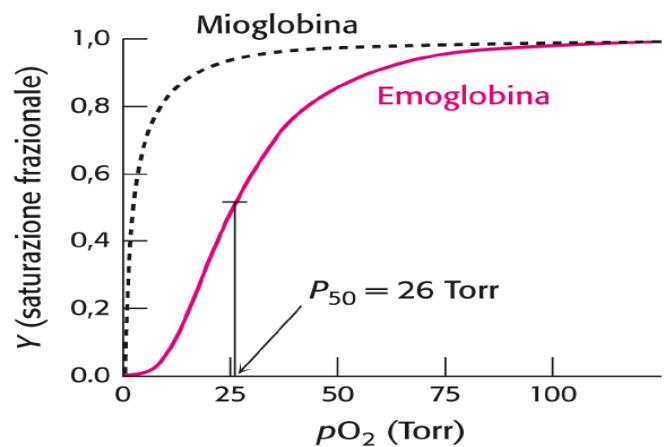


EMOGLOBINA



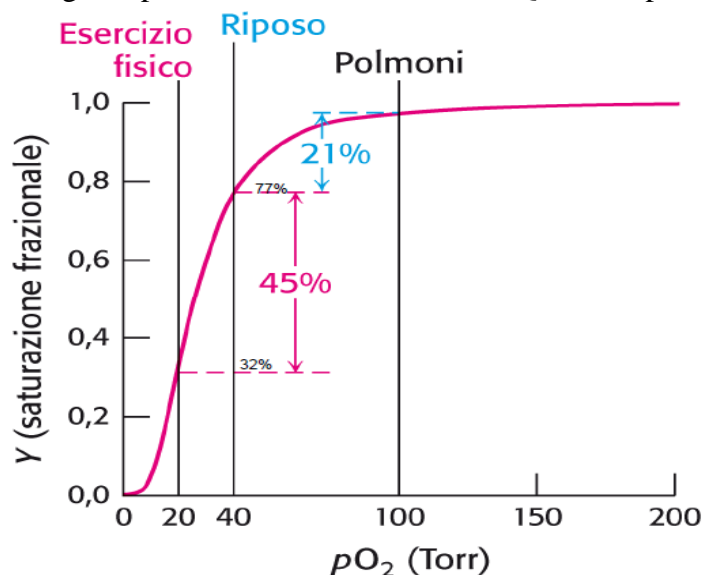
La mioglobina è un'eccellente deposito di ossigeno, mentre l'emoglobina è un'eccellente trasportatore di ossigeno. Dal punto di vista strutturale, la differenza tra mioglobina ed emoglobina è che quest'ultima è un tetramero (2 catene α e due β , nell'adulto; 2 catene α e 2 γ , nel feto; le catene β

cominciano a venir prodotte dopo la nascita). L'emoglobina ha una struttura quaternaria. Le 4 sub-unità sono disposte intorno, creando una cavità all'interno (come una ciambella). Ogni catena α e β è simile alle molecole di mioglobina: ciascuna sub-unità α e β dell'emoglobina contiene un gruppo eme. Quindi la molecola di emoglobina sarà in grado di legare 4 molecole di ossigeno. Le catene polipeptidiche dell'emoglobina sono simili di struttura con la mioglobina, ma sono più corte: 141-146 amminoacidi per l'emoglobina; 153 amminoacidi per la mioglobina.



che l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno è più bassa, rispetto a quella della mioglobina per l'ossigeno. Anche perché, come detto, la P_{50} è intorno ai 26Torr contro i 2Torr della mioglobina. Nel momento in cui l'emoglobina comincia a legare ossigeno, esso comincia a legarsi velocemente. In sostanza, il legame con l'ossigeno avviene con pressioni parziali alte, ma quando le prime molecole cominciano a legarsi, il legame

Il ripiegamento globinico della mioglobina e dell'emoglobina, si mantiene perfettamente identico anche nelle catene α e β dell'emoglobina (anche se gli amminoacidi sono differenti). Nell'emoglobina cambia la cinetica di legame dell'ossigeno. La curva di saturazione è differente, perché la curva è meno ripida, per cui la P_{50} è maggiore (26Torr). La curva ha un andamento **sigmoideale**. Per pressioni parziali di ossigeno basse, esso non si lega, poi all'aumentare della pressione parziale dell'ossigeno, esso comincia a legarsi, per arrivare alla saturazione. Questo implica

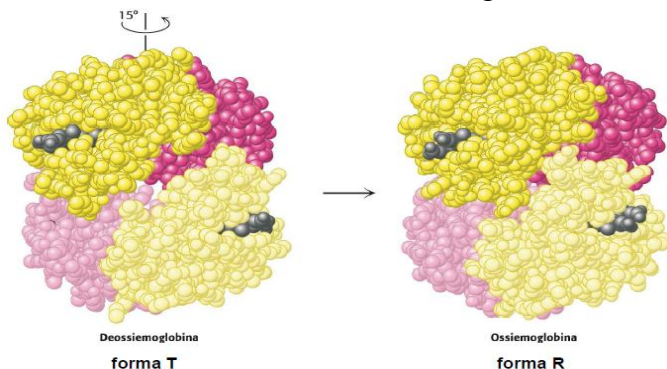


con le successive molecole è facilitato. Questo tipo di effetto prende il nome di **cooperatività**, vuol dire che il legame dell'ossigeno con l'emoglobina è di tipo cooperativo. Questo fa sì che per la variazione di pressione parziale in uno stretto range, l'emoglobina si porta ad uno stato completamente saturo. Questo andamento fa dell'emoglobina un'eccellente trasportatore di ossigeno dai polmoni (P₅₀ 100Torr), agli altri tessuti (20-40Torr).

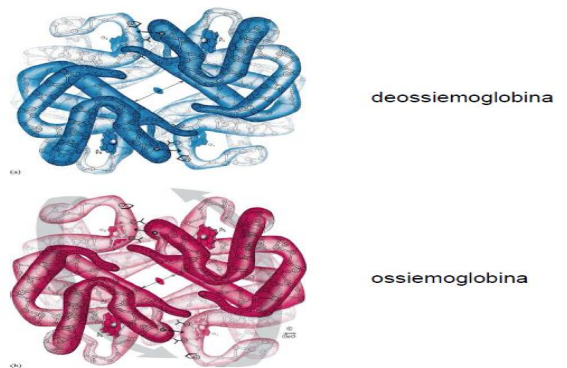
Meccanismo per la cooperatività del legame Fe-O₂

Questo fenomeno è acquisito dall'emoglobina in virtù di essere un tetramero. La struttura quaternaria dell'emoglobina cambia a seconda che abbia legato l'ossigeno o che non lo abbia legato. Cambia la posizione delle sub-unità. Si dice che l'emoglobina non cambia struttura, ma conformazione.

Esistono due conformazioni dell'emoglobina:

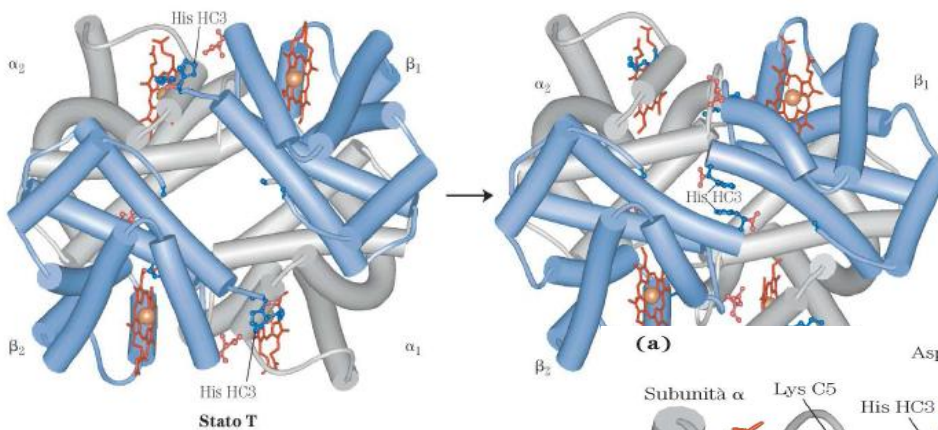


- Deossiemoglobina (forma T): emoglobina a cui non è legato l'ossigeno
 - Ossiemoglobina (forma R): emoglobina a cui è legato l'ossigeno
- Questi stati conformazionali derivano dal fatto che, essendo legato dell'ossigeno nell'ossiemoglobina, c'è una rotazione dell'asse.

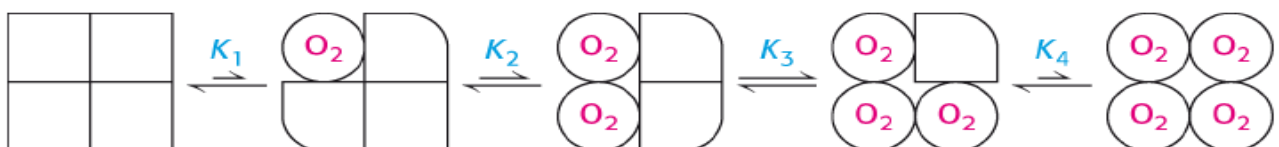


Nell'ossiemoglobina, l'istidina HC3 viene a trovarsi nella posizione centrale. Questa conformazione è data anche dal fatto che il Fe della deossiemoglobina è leggermente spostato verso il basso, mentre nell'ossiemoglobina, il legame con l'ossigeno, compensa quello con l'istidina e il Fe viene a trovarsi esattamente sul piano del gruppo eme. Questo determina la rottura di certe interazioni deboli.

L'istidina HC3 determina interazioni elettrostatiche con la catena laterale dell'aspartico e con una lisina sulle catene α (questo nella deossiemoglobina). Quando si lega



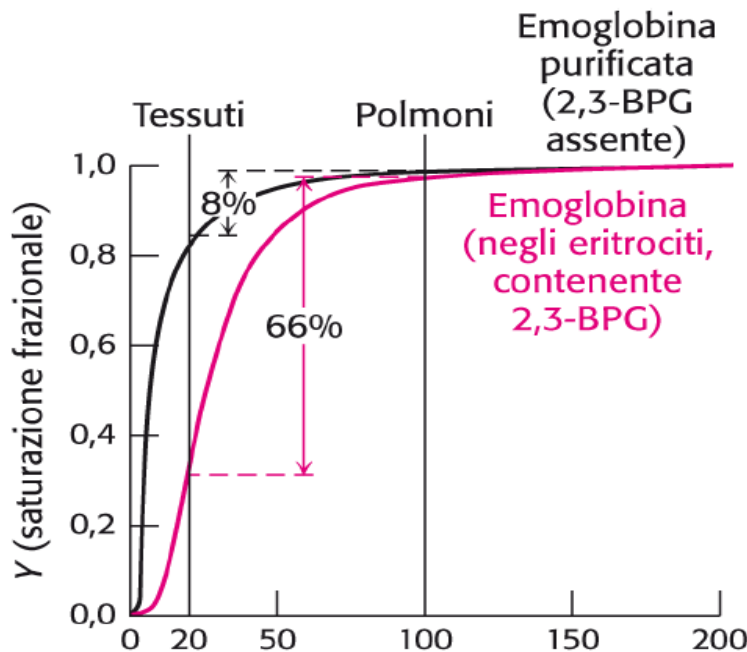
l'ossigeno, l'istidina si porta verso il centro della molecola, quindi rompe le interazioni deboli viste qui sopra. Questo cambio conformazionale che deriva dal legame dell'ossigeno con il gruppo eme di una sub-unità, determina, per effetto domino, lo stesso meccanismo, in modo tale che esse



possano legare l'ossigeno più facilmente. La seconda sub-unità, dopo il legame tra l'ossigeno il gruppo eme nella prima, è più libera perché l'interazione ossigeno Fe nella prima sub-unità rompe alcuni legami deboli (es. 4 francobolli che formano un quadrato → stacchi il primo con due tagli, il secondo e il terzo li stacchi con un solo taglio, mentre il quarto è già tagliato).

REGOLAZIONE DEL LEGAME OSSIGENO-EMOGLOBINA

2,3-difosfoglicerato



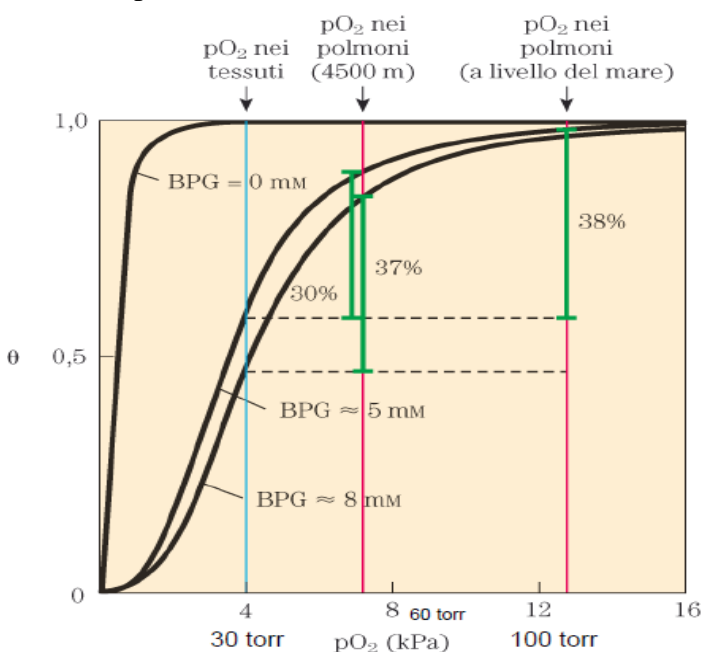
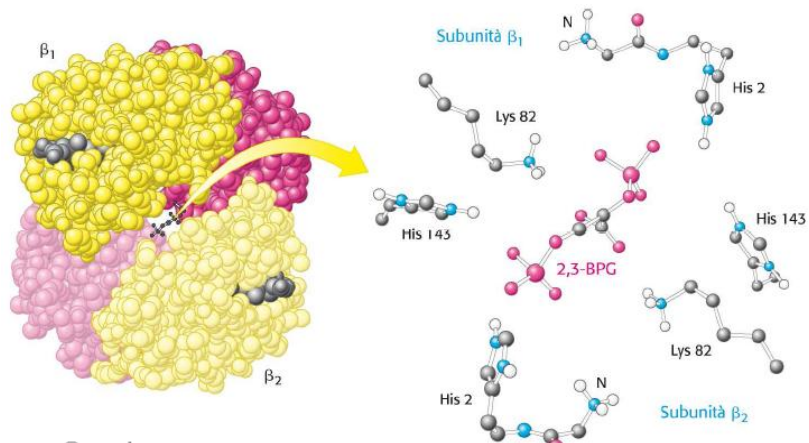
Il 2,3-difosfoglicerato è una piccola molecola prodotta all'interno dei globuli rossi, che si lega all'emoglobina e ne riduce l'affinità per l'ossigeno.

Se si dovesse purificare l'emoglobina dai globuli rossi togliendo anche il 2,3-difosfoglicerato, allora la curva si sposterebbe fortemente verso sinistra, rimanendo sigmoidale. Quindi la P₅₀ si riduce e quindi l'affinità per l'ossigeno è maggiore.

Il globulo rosso può cambiare la quantità di 2,3-difosfoglicerato che produce e, a seconda delle condizioni, il globulo rosso può decidere di produrre più o meno 2,3-difosfoglicerato, quindi la curva si

sposterà più a destra o a sinistra, aumentando o diminuendo la P₅₀. E' più frequente però che il globulo rosso decida di produrne di più che di meno.

Il 2,3-difosfoglicerato interagisce fisicamente con l'emoglobina in un rapporto di 1 molecola di 2,3-difosfoglicerato per una molecola di emoglobina. Dentro la cavità dell'emoglobina, il 2,3-difosfoglicerato stabilisce delle interazioni elettrostatiche (ponti H con gruppi polari) con le catene β della proteina. Il 2,3-



difosfoglicerato instaura ulteriori legami salini, rispetto a quelli che già c'erano nella deossi-emoglobina e che riducevano l'affinità con l'ossigeno. In presenza di 2,3-difosfoglicerato, l'emoglobina, per passare dalla forma deossi alla forma ossi, deve rompere un numero maggiore di legami deboli. Di fatti, quando il 2,3-difosfoglicerato si colloca nella tasca della deossi-emoglobina, ma quando riesce a passare nella forma ossi c'è un cambio di conformazione che riduce di molto lo

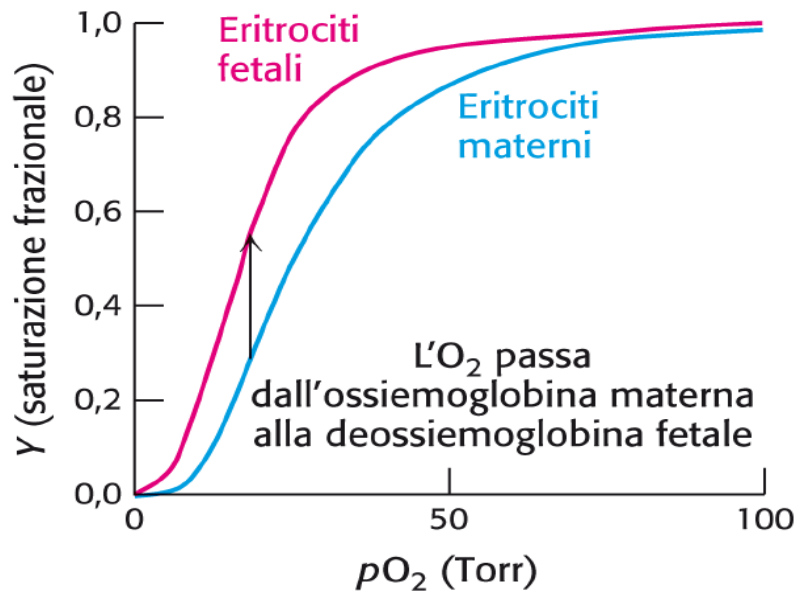
spazio all'interno delle 4 sub-unità. Questo non crea più lo spazio per ospitare il 2,3-difosfoglicerato, quindi viene rilasciato. In questo modo lo spazio interno della proteina si può restringere. Il risultato è che la curva si sposta verso destra e sempre più a destra per concentrazioni maggiori di 2,3-difosfoglicerato.

Il 2,3-difosfoglicerato è uno dei meccanismi con cui ci si adatta alle diverse quote. La vita ad alta quota è problematica, perché salendo la pressione parziale dell'atmosfera è bassa e quindi anche nei polmoni la pressione parziale sarà minore di 100 Torr.

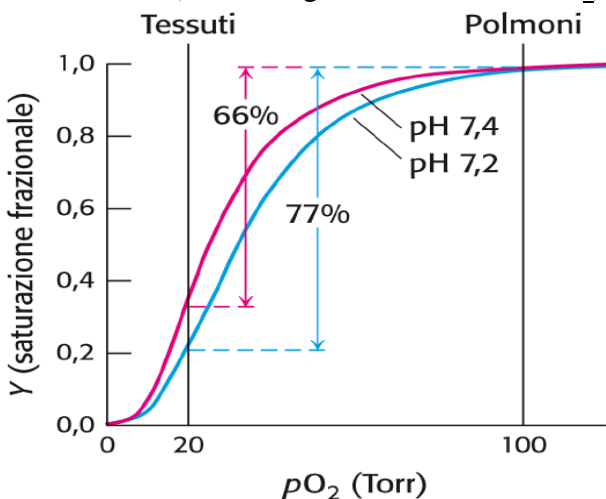
L'emoglobina, passando dai polmoni, si satura di meno, poi circola e va nei tessuti, dove la pressione parziale è sempre uguale, e rilascia ossigeno, ma, essendo partita meno carica dai polmoni, ne rilascia di meno. Ad alte quote si hanno dei problemi metabolici non indifferenti. Al problema ci si adatta nel giro di qualche giorno, perché è il tempo necessario affinché i globuli rossi capiscano questo problema e aumentino la produzione di 2,3-difosfoglicerato.

Il 2,3-difosfoglicerato è importante in diverse patologie, perché il fatto che l'emoglobina si saturi di meno quando passa dai polmoni è un problema anche patologico. Queste patologie impediscono l'efficiente legame con l'ossigeno nei polmoni, quindi si aumenta la sintesi di 2,3-difosfoglicerato per far sì che le pressioni parziali tornino standard.

L'altro significato importantissimo del 2,3-difosfoglicerato, è che grazie ad esso l'ossigeno può passare attraverso la placenta, dall'emoglobina materna verso l'emoglobina fetale. Se le due emoglobine fossero uguali, l'ossigeno non si staccerebbe dall'emoglobina materna per andare in quella fetale, quindi l'emoglobina fetale deve avere un'affinità maggiore per l'ossigeno rispetto a quella materna, perché l'emoglobina fetale non è fatta da catene α e β , ma da catene α e γ . Le catene β sono quelle che legano il 2,3-difosfoglicerato, mentre le catene γ sono meno efficienti. Risulta che l'emoglobina fetale ha un'affinità maggiore per l'ossigeno rispetto all'emoglobina materna. Perché nel feto non c'è 2,3-difosfoglicerato, mentre nella madre sì. Questo consente quindi il passaggio dell'ossigeno dall'emoglobina materna a quella fetale. Alla nascita non c'è più bisogno di attuare questo meccanismo, perché nel neonato le catene γ dell'emoglobina sono dannose, quindi immediatamente dopo la nascita c'è un ricambio totale di emoglobina: si smette di produrre catene γ e si comincia a produrre le catene β .



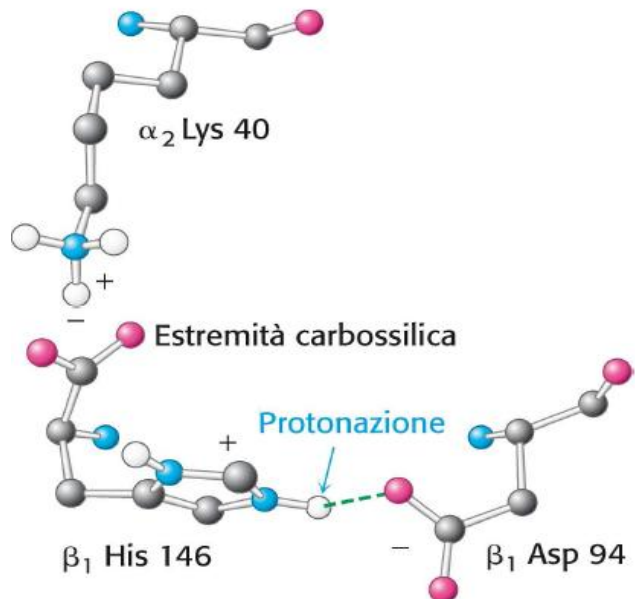
Effetto Bohr (effetto degli ioni H⁺ e della CO₂)



Se la regolazione da 2,3-difosfoglicerato è orientata ad un adattamento di un problema a lungo termine, l'effetto Bohr è un meccanismo che risponde alle esigenze locali del tessuto dove l'emoglobina si presume debba rilasciare l'ossigeno.

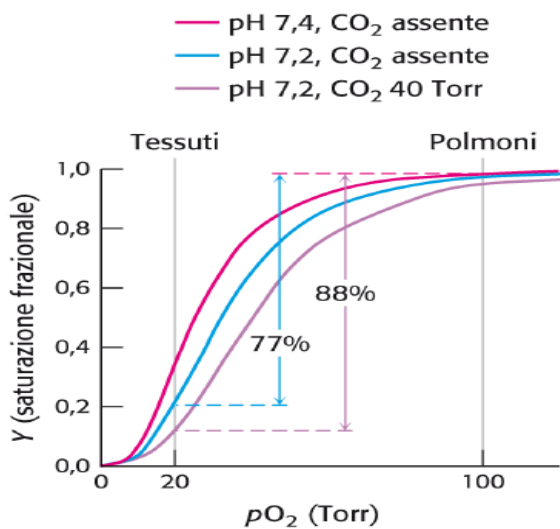
L'effetto Bohr consiste nel fatto che gli ioni H⁺ e la CO₂ riducono l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno e quindi facilitano il rilascio di ossigeno.

- Effetto degli ioni H^+ : più protoni ci sono, più l'affinità è ridotta perché diminuisce il pH. Se il pH scende da 7,4 a 7,2, si riduce l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno, la curva si sposta verso destra e allora a 20Torr la percentuale di saturazione è poco più del 20%, quindi viene rilasciato quasi l'80% dell'ossigeno. I protoni stabilizzano la forma T (deossiemoglobina) creando dei nuovi legami deboli che devono essere rotti, e di fatto aumentano la quantità di protoni, si promuove la protonazione di alcuni gruppi acidi che hanno un pKa vicino al range di pH che abbiamo. Questo cambiamento di pH non andrà a protonare un gruppo carbossilico che ha pH4,7, ma andrà a protonare l'istidina (pH intorno a 6). Nell'effetto Bohr è molto importante l'istidina, che viene quindi protonata quando il pH si riduce, allora l'aumento degli H^+ determina la protonazione dell'istidina. L'istidina HC3 è importante nello stabilizzare la deossiemoglobina, ma con la sua catena laterale fa un ponte H con l'aspartico. Più è basso il pH, più l'istidina è protonata, minore sarà l'affinità dell'ossigeno per l'emoglobina e maggiore sarà il rilascio di ossigeno.

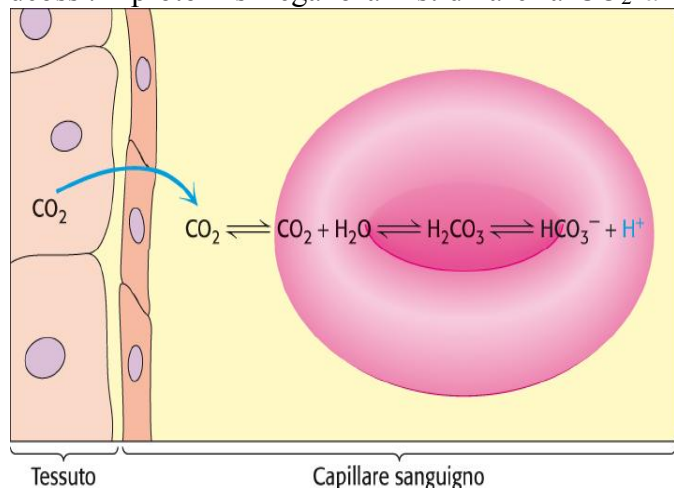


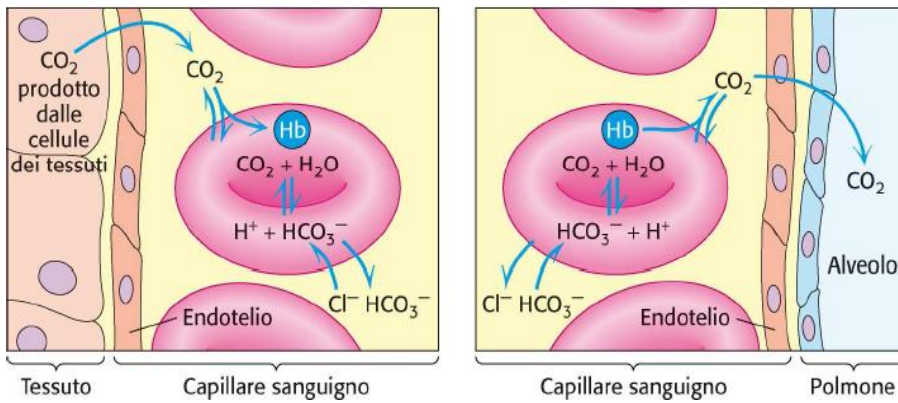
- Effetto della CO_2 : la CO_2 è un acido debole che si dissocia in bicarbonato e H^+ e ha un effetto

analogo all'abbassamento del pH. Anche la CO_2 può legarsi all'emoglobina in piccole quantità e, legandosi all'emoglobina, quest'ultima riduce la sua affinità per l'ossigeno. Di solito la CO_2 si lega alle estremità N-terminali dell'emoglobina, formando un legame ammidico. Il legame di queste molecole di CO_2 cambia le cariche e stabilizza i ponti salini, quindi viene rilasciato l'ossigeno. La quantità di ossigeno rilasciata può salire fino all'88%, quindi l'emoglobina diventa estremamente efficiente. L'effetto Bohr riduce l'affinità dell'emoglobina con l'ossigeno. In entrambi i casi si legano all'emoglobina e stabiliscono diverse interazioni che destabilizzano la forma ossi e stabilizzano quella deossi. I protoni si legano all'istidina e la CO_2 alle



estremità N-terminali. L'effetto Bohr è una risposta alle maggiori esigenze locali d'ossigeno. Una riduzione del pH e la presenza di CO_2 sono un sintomo di un tessuto che è in forte attività metabolica. L'ossigeno viene trasformato in acqua e il glucosio in CO_2 : quindi c'è bisogno di ossigeno, ma questo provoca il rilascio di CO_2 . Questa viene rilasciata nel torrente circolatorio, ma è idrofobica (apolare) e non può circolare da sola. Entra per diffusione nei globuli rossi, essa reagisce con l'acqua grazie a un enzima che si chiama anidrasi-carbonica e diventa acido carbonico. E' una





acido debole che si dissocia in bicarbonato e H^+ . Questo sta benissimo nel sangue perché è polare. Gli H^+ che si formano nel globulo rosso sono quelli che mediano l'effetto Bohr. Quando un tessuto è in attività metabolica e questo per questa ragione si traduce in una riduzione del

pH nel globulo rosso. Una piccola parte di CO_2 che entra nel globulo rosso, anziché compensarsi con l'ossigeno, si può legare all'emoglobina, contribuendo anche questa CO_2 all'effetto Bohr. Questo effetto mette in relazione nel globulo rosso il rilascio di ossigeno da parte dell'emoglobina. Questo sistema rappresenta il principale modo con cui ci liberiamo della CO_2 dai tessuti. La maggioranza della CO_2 che libera nei polmoni viene trasformata dai polmoni sotto forma di bicarbonato, quindi è sbagliato dire che tutta la CO_2 viene trasportata nei polmoni. Si forma il bicarbonato grazie ai globuli rossi, quindi anche loro partecipano allo smaltimento della CO_2 .