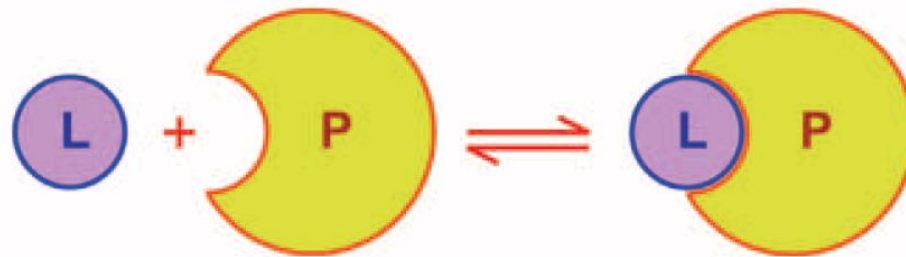
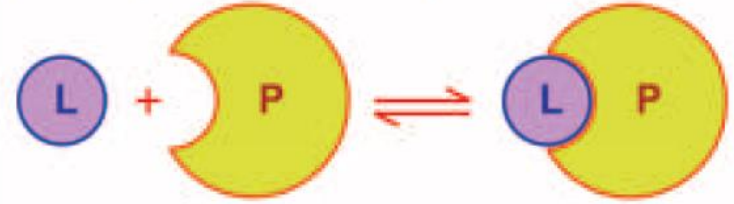


FUNZIONI delle PROTEINE

- la maggior parte delle proteine possiede un'**attività biologica** che può essere ricondotta alla capacità di formare complessi molecolari reversibili (transitori) con determinate sostanze
- la sostanza che viene legata reversibilmente da una proteina viene definita **ligando** di quella proteina
- la proteina forma un complesso con il ligando, legandolo a livello di uno specifico **sito di legame**



Interazione proteina-ligando



$$K_a = \left(\frac{[PL]}{[P][L]} \right)_{eq}$$

K_a : costante di associazione tra P e L

Ha le dimensioni del reciproco di una concentrazione (M^{-1})

$$K_d = \left(\frac{[P][L]}{[PL]} \right)_{eq}$$

K_d : **costante di dissociazione** di PL

Ha le dimensioni di una concentrazione (M)

$$K_d = \frac{1}{K_a}$$



La frazione dei siti occupati rispetto ai siti totali è definita come θ **FRAZIONE di SATURAZIONE**

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


$$\theta = \frac{[PL]}{[P]_{Tot}}$$

Come varia la **Frazione di saturazione** θ in funzione della concentrazione di ligando?

$$(0 \leq \theta \leq 1)$$

$$\% \text{ di saturazione} = \theta \times 100$$

$$[P]_{Tot} = [P] + [PL] \quad [P] = [P]_{Tot} - [PL]$$


$$K_d = \left(\frac{[P][L]}{[PL]} \right)_{eq} \quad [P] = [P]_{Tot} - [PL]$$

$$K_d = \left(\frac{([P]_{Tot} - [PL])[L]}{[PL]} \right)$$

$$K_d = ([P]_{Tot}[L] / [PL]) - [L]$$

$$K_d + [L] = [L] [P]_{Tot} / [PL]$$

$$K_d + [L] = [L] [P]_{Tot} / [PL]$$

$$\theta = \frac{[PL]}{[P]_{Tot}} = \left(\frac{[L]}{K_d + [L]} \right)_{eq}$$

Descrive come varia la **Frazione di saturazione θ** in funzione della concentrazione di ligando

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

Equazione del tipo

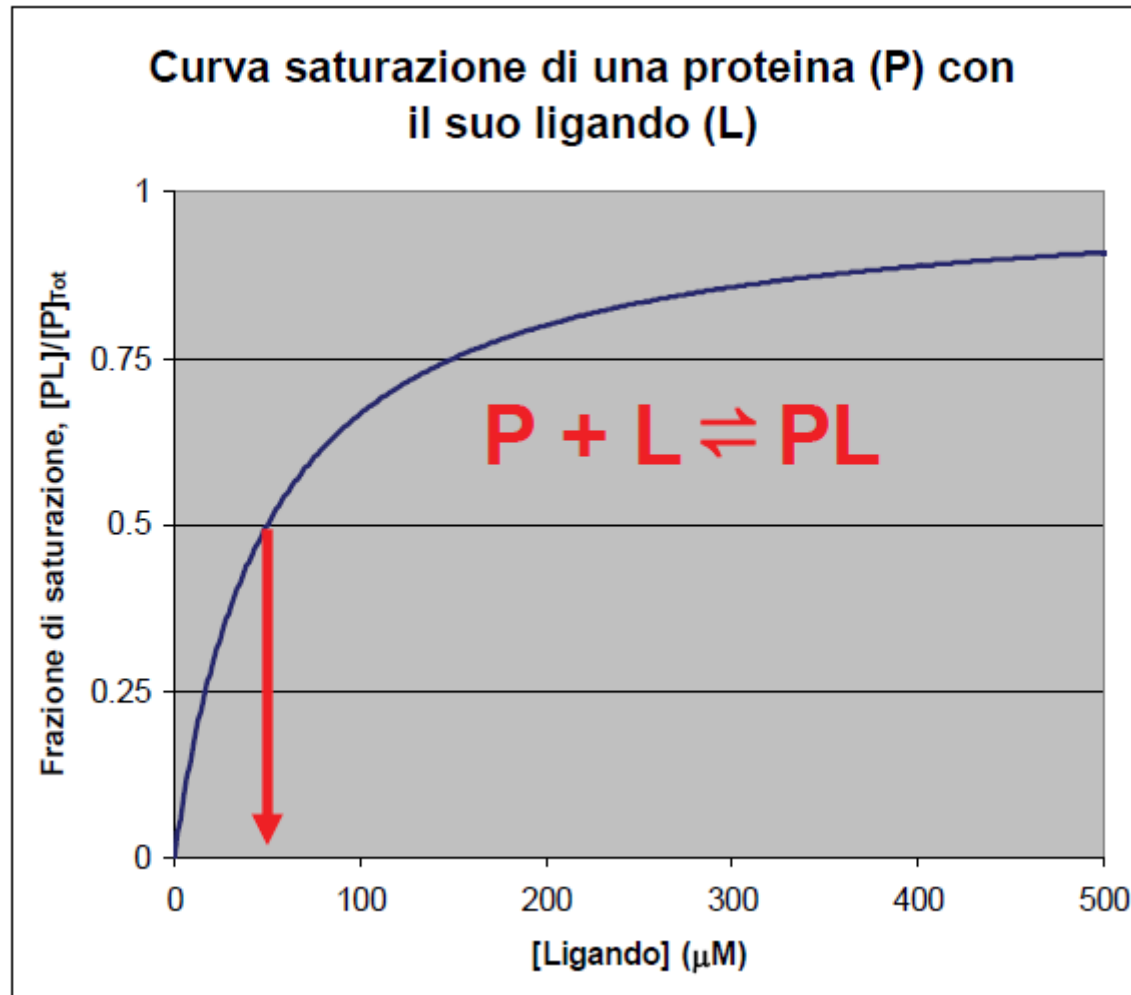
$$y = ax / b+x$$

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

Curva iperbolica (*iperbole equilatera*)

\Rightarrow asintoti perpendicolari

K_d : **costante di dissociazione** di PL



Ha le dimensioni di una concentrazione (M)

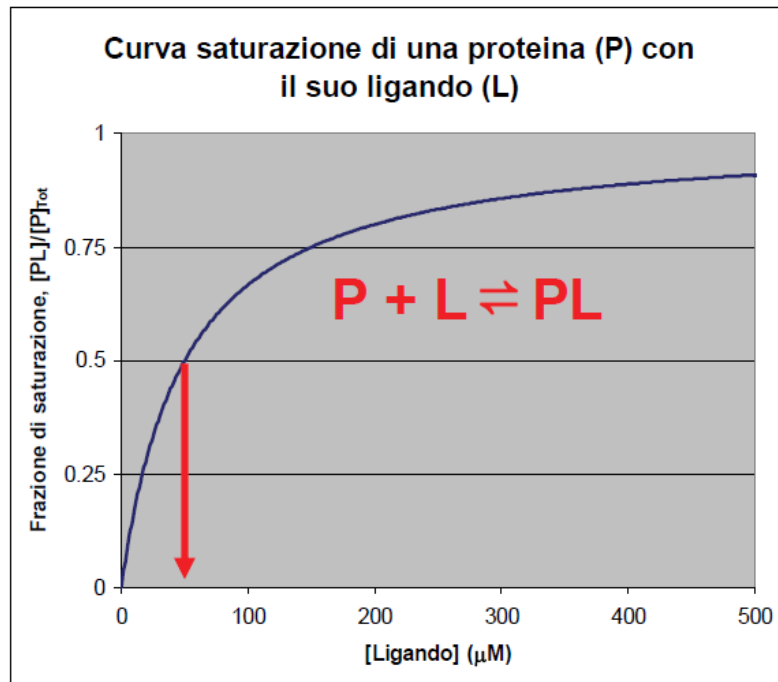
$$\theta = \frac{[L]}{[L] + Kd}$$

Quando $[L]$ è uguale a Kd

$$\theta = Kd / 2Kd = 0.5$$

metà dei siti di legame sono occupati dal ligando

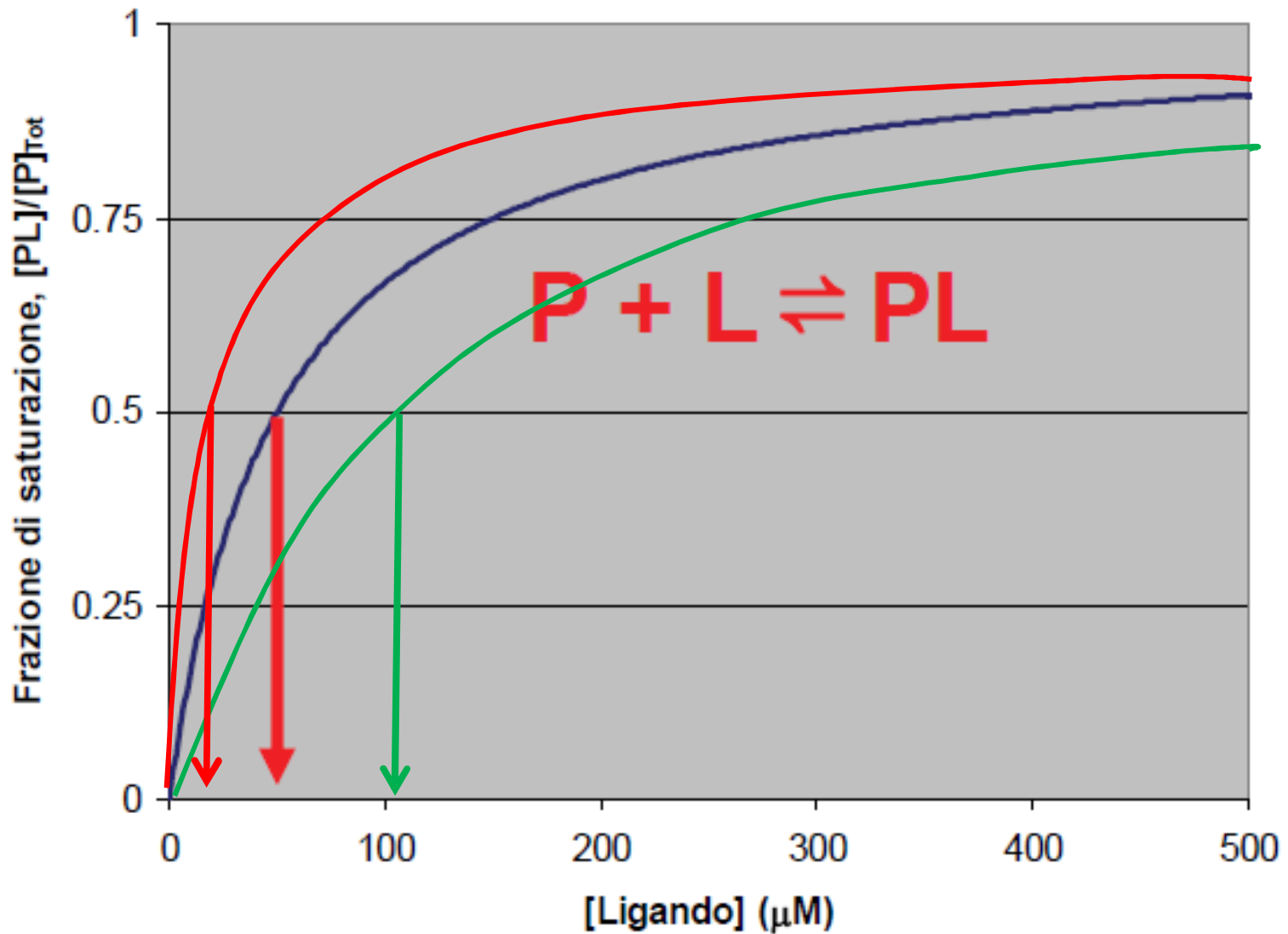
Kd corrisponde alla concentrazione di ligando a cui metà dei siti di legame disponibili sono occupati dal ligando.



Quando $[L]$ è minore di Kd ,
la quantità di ligando legata alla proteina è piccola.
Affinché il 90% dei siti di legame siano occupati, il valore di $[L]$ deve essere nove volte più alto di quello di Kd .

Quanto più strettamente la proteina lega il ligando (maggiore affinità), tanto più bassa è la concentrazione di ligando necessaria a occupare metà dei siti di legame e minore è il valore di Kd .

Curva saturazione di una proteina (P) con il suo ligando (L)



Interazione proteina-ligando

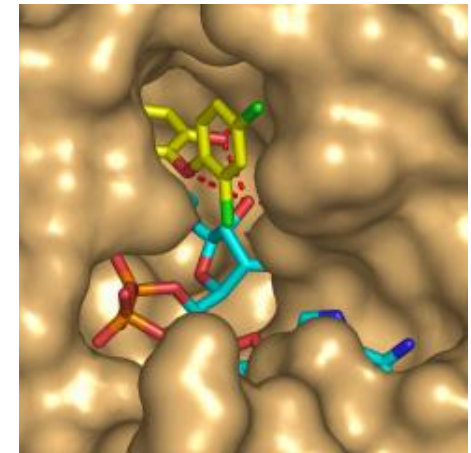


Il legame è **STEREOSPECIFICO**:
complementarietà di forma

Il legame è mediata da legami chimici deboli :

- ponti idrogeno,
- forze di van der Waals,
- interazioni idrofobiche
- legami ionici

Il **effetto biologico** è
proporzionale alla concentrazione
del complesso [PL].



$$K_d = \left(\frac{[P][L]}{[PL]} \right)_{eq}$$

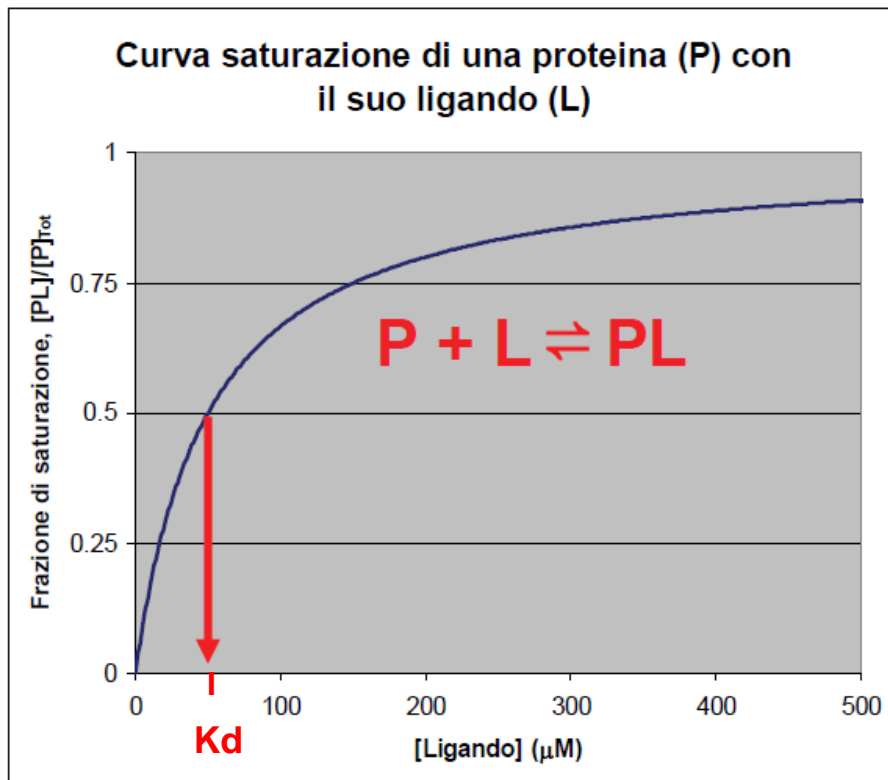
$$\theta = \frac{[L]}{[L] + Kd}$$

Per basse $[L]$, il peso di Kd è elevato:
Il denominatore è molto più grande del
numeratore - θ è piccolo.

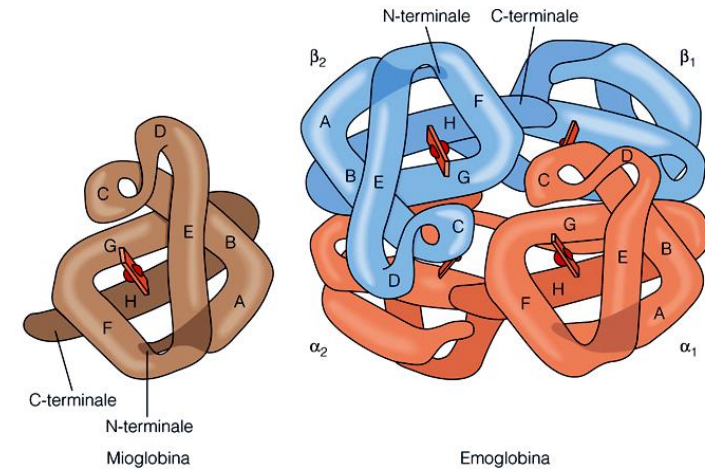
Lievi variazioni di $[L]$ producono
SIGNIFICATIVE variazioni di θ .

All'aumentare di $[L]$, si riduce il peso
relativo del valore di Kd .
Significative variazioni di $[L]$ producono
MODESTE variazioni di θ .

*Affinché il 90% dei siti di legame siano
occupati, il valore di $[L]$ deve essere
nove volte più alto di quello di Kd .*



IL TRASPORTO DELL'OSSIGENO



- il **metabolismo aerobico** richiede l'apporto di O₂ ai tessuti
- l'O₂ ha una **bassa solubilità in acqua** ($\sim 10^{-4}$ M nel sangue)

⇒ apposite **proteine trasportatrici** di ossigeno ne **aumentano la solubilità** nei fluidi circolanti

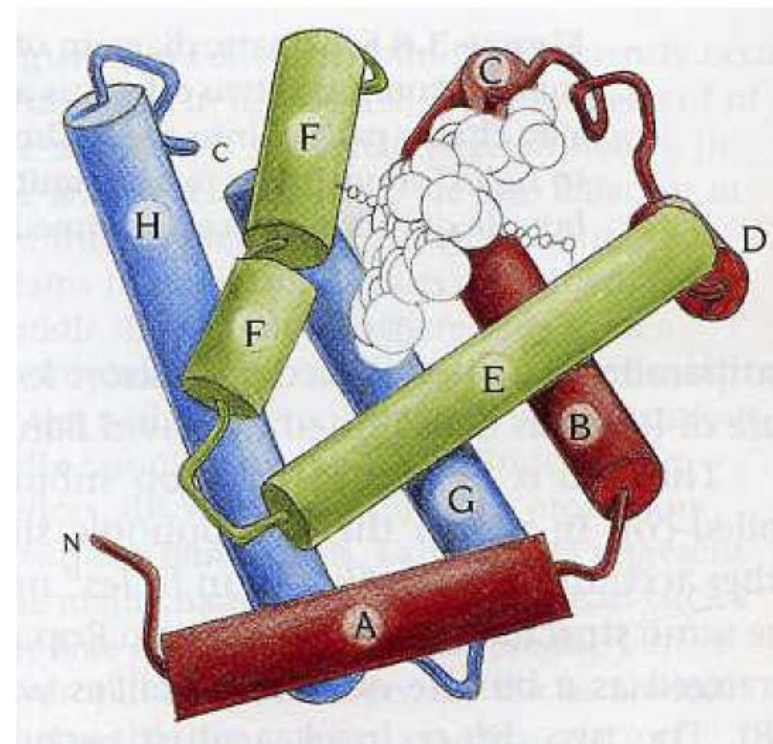
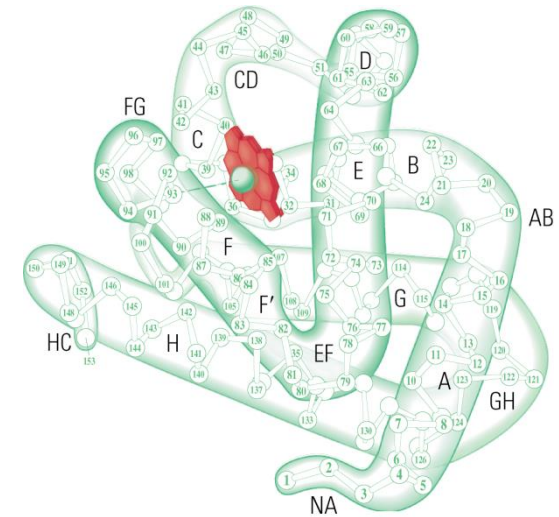
- una sostanza deputata al trasporto di O₂ deve:

- **legarlo e rilasciarlo** in modo opportuno
- **impedire che reagisca con altre sostanze**

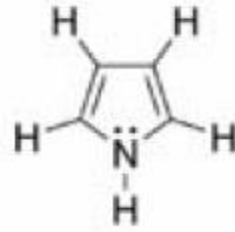
Mb: MIOGLOBINA È il Í serbatoioî

- Proteina citosolica del tessuto muscolare: cuore e muscolo scheletrico rosso (fibrocellule muscolari rosse)
- E' costituita da **1 sola subunità** di 153 amminoacidi (ca 17 kDa), disposti per l' 80% ad α -elica
- E' una proteina globulare (4,5 x 4,5 x 2,5 nm)

La mioglobina funziona da deposito di O₂ a livello muscolare.



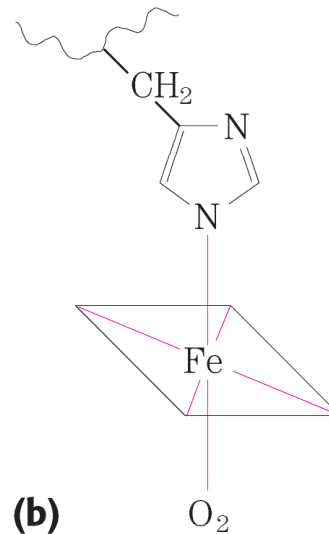
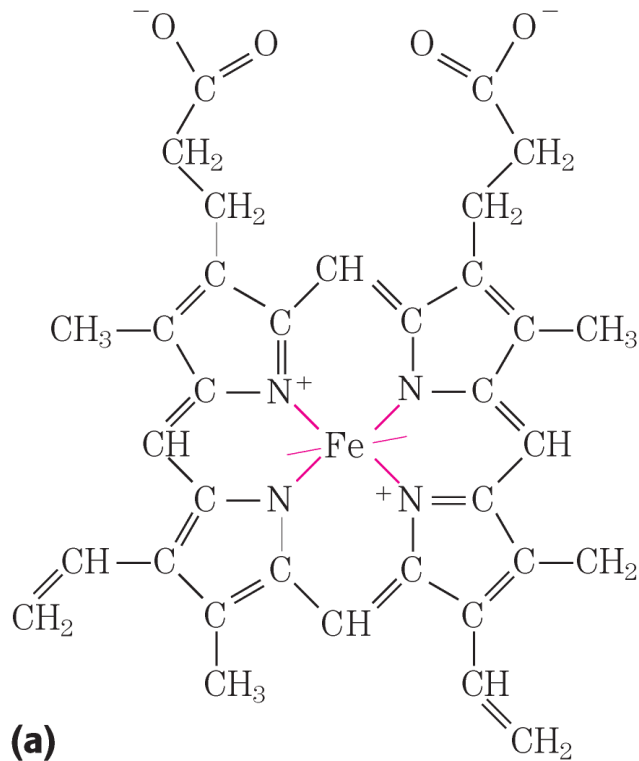
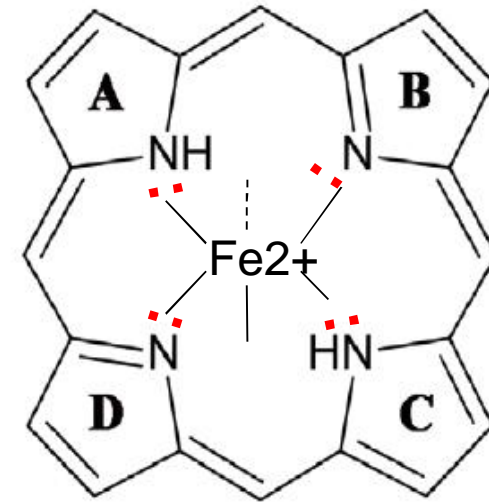
Pirrolo: composto aromatico eterociclico, planare a forma di pentagono quasi regolare.



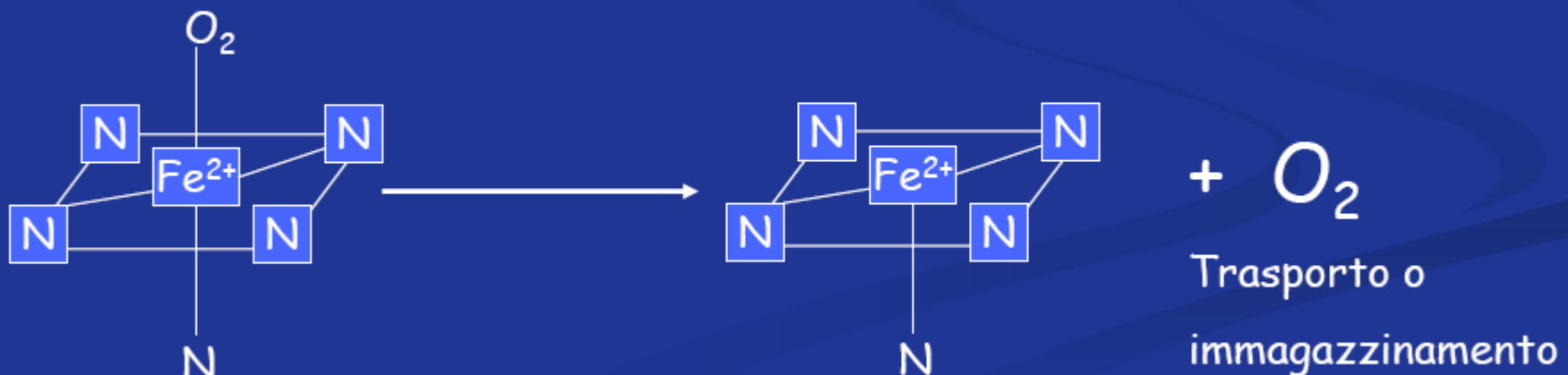
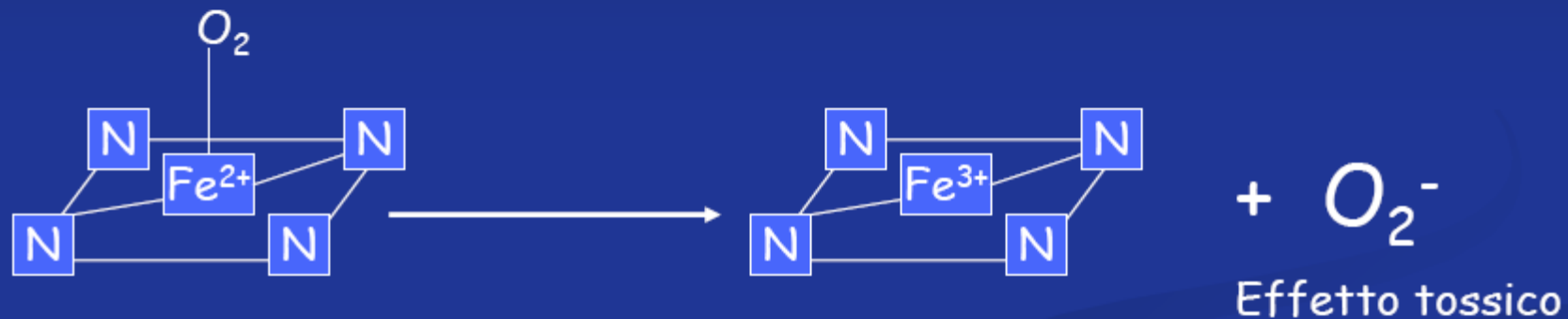
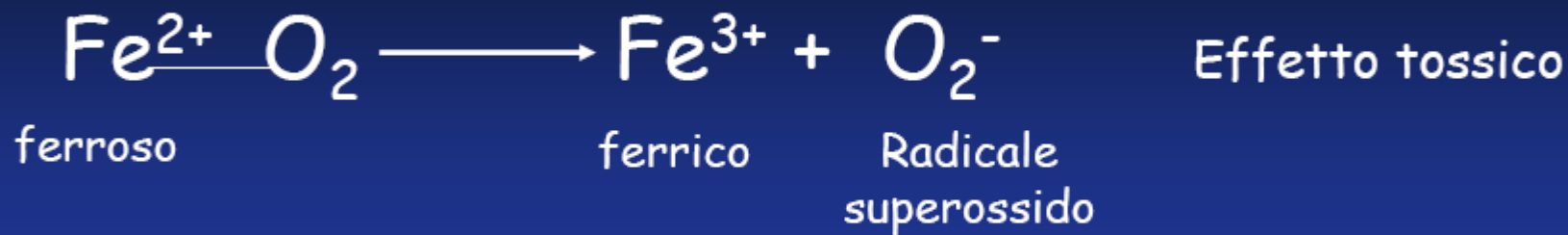
PORFIRINE:

sono costituite da 4 subunità di pirrolo (A-D) unite da ponti -metinici (=CH.)

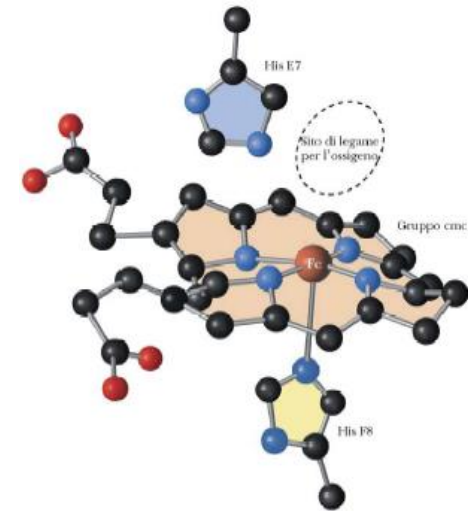
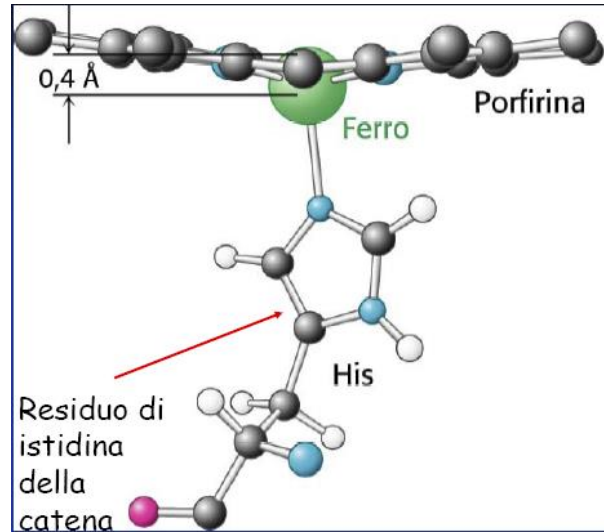
- ciascun N possiede una coppia di e- liberi per formare un legame di coordinazione con il Fe²⁺



Perché il gruppo eme nella mioglobina e nell'emoglobina



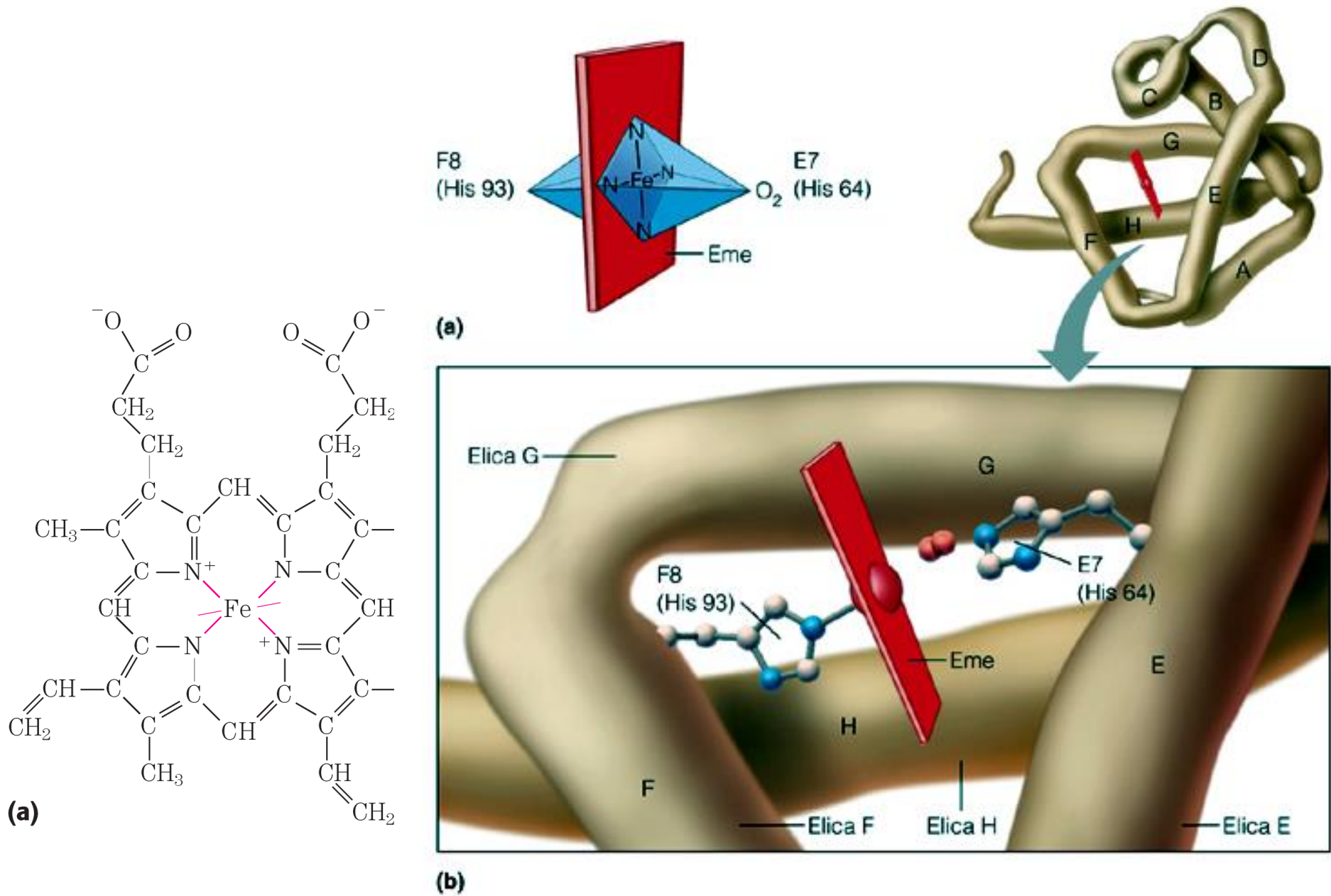
La funzione dell'interazione Fe-istidina è che l'azoto dell'istidina funge da elettroattrattore e consente di compensare l'effetto elettronattrattivo dell'ossigeno. In questo modo il Ferro rimane nello stato ridotto.



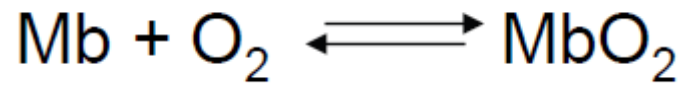
Il Fe^{2+} dell'eme può legare altre piccole molecole nel suo 6° legame di coordinazione, come CO, CN^- , NO e H_2S

L'affinità dell'eme per tali molecole è molto maggiore che per O_2 .

Per questo, tali molecole sono molto tossiche



La coordinazione del Fe^{2+} entro la porfirina in una tasca idrofobica permette il legame dell' O_2 senza ossidazione del ferro



$$K_d = \frac{[\text{Mb}][\text{O}_2]}{[\text{MbO}_2]} = P_{50}$$

$$\theta = \frac{\text{siti di legame occupati}}{\text{totale dei siti di legame}}$$

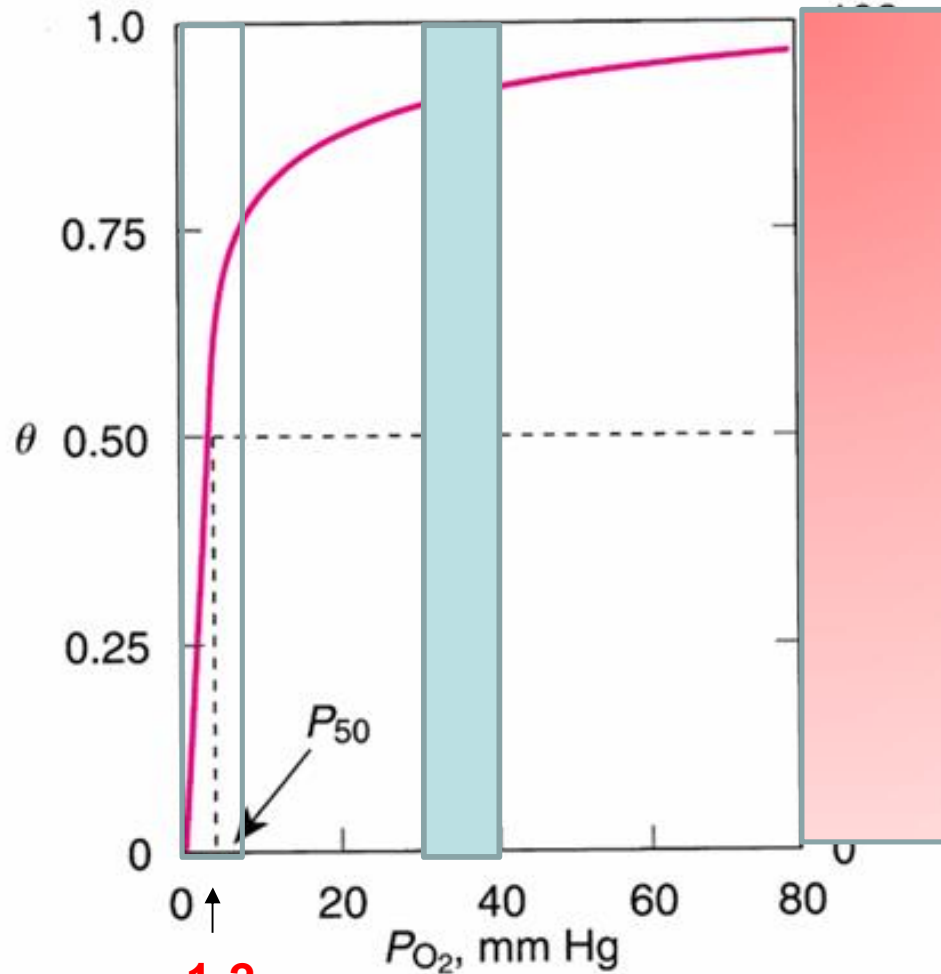
$$\theta = \frac{[\text{O}_2]}{[\text{O}_2] + [\text{O}_2]_{0,5}}$$

Essendo O_2 un gas, esprimeremo $[\text{O}_2]$ come $p\text{O}_2$

$$\theta = \frac{p\text{O}_2}{p\text{O}_2 + P_{50}}$$

$$\theta = \frac{P_{O_2}}{P_{50} + P_{O_2}}$$

Il legame dell'O₂ alla Mb è descritto da un'iperbole equilatera



pO₂ polmoni = 100 mm Hg
 pO₂ sangue venoso = 30-40 mm Hg
 pO₂ tessuti = 0-5 mm Hg

Mb lega l'O₂ con ELEVATA AFFINITÀ e lo cede SOLAMENTE quando pO₂ è molto bassa.

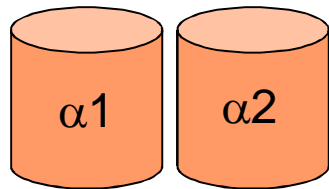
La mioglobina funziona da deposito di O₂ a livello muscolare.

Quando il muscolo è a riposo la mioglobina rimane legata all'O₂;

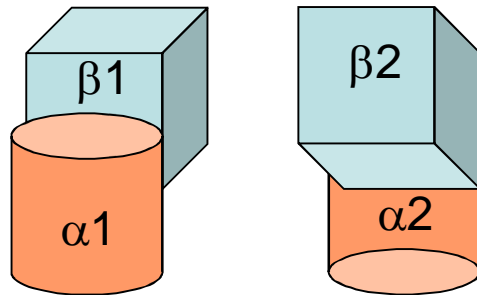
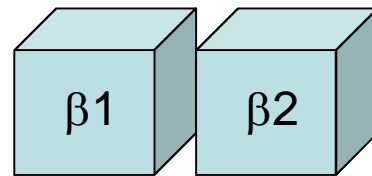
quando il muscolo è attivo viene consumato O₂ e diminuisce la pO₂ la mioglobina rilascia l'O₂

Il trasporto dell'Ossigeno: EMOGLOBINA

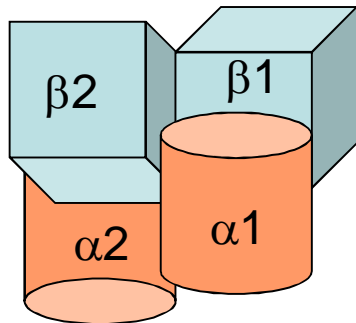
2 subunità α



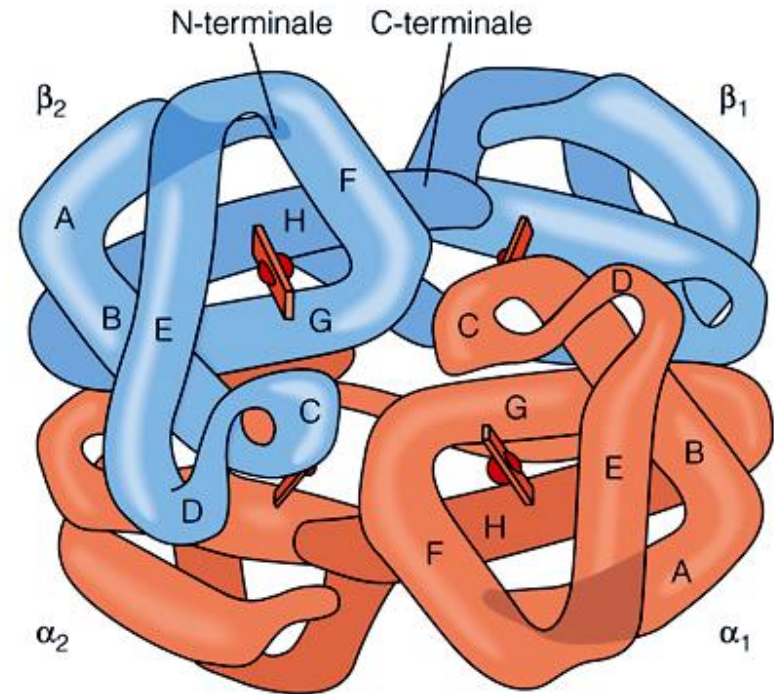
2 subunità β



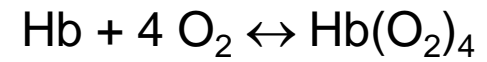
35 residui all'interfaccia



19 residui all'interfaccia



Emoglobina

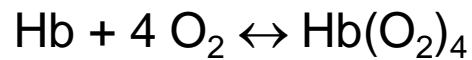


MIOGLOBINA : 1
ligando per molecola
proteica

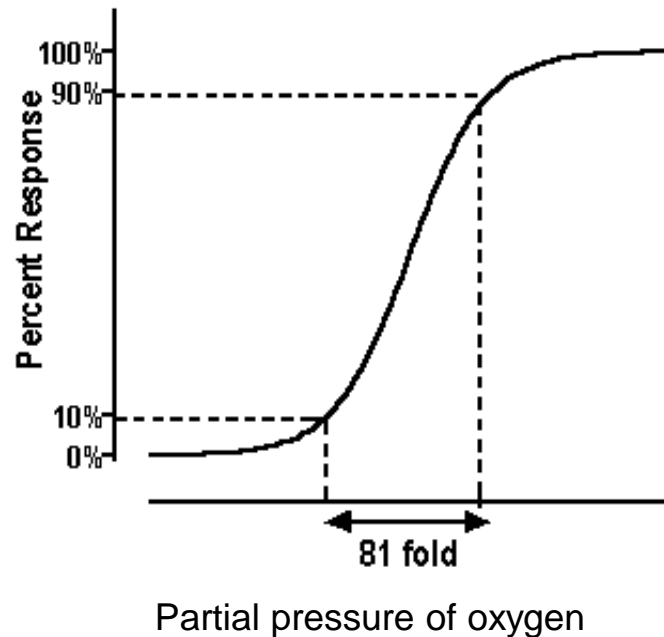
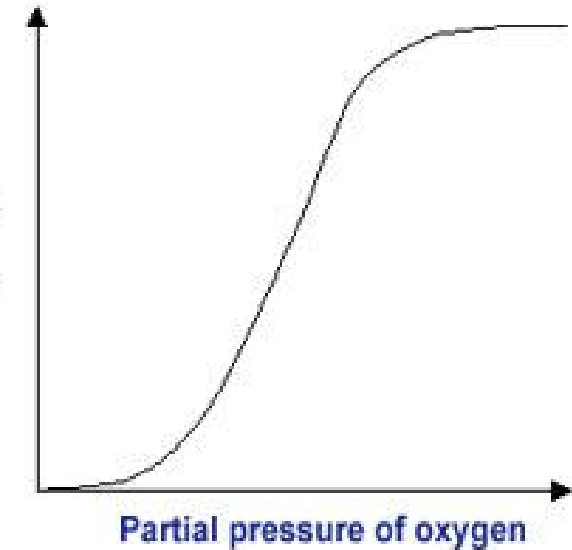
$$\theta = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}}$$

Se i siti di legame sono
n, per molecola proteica

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

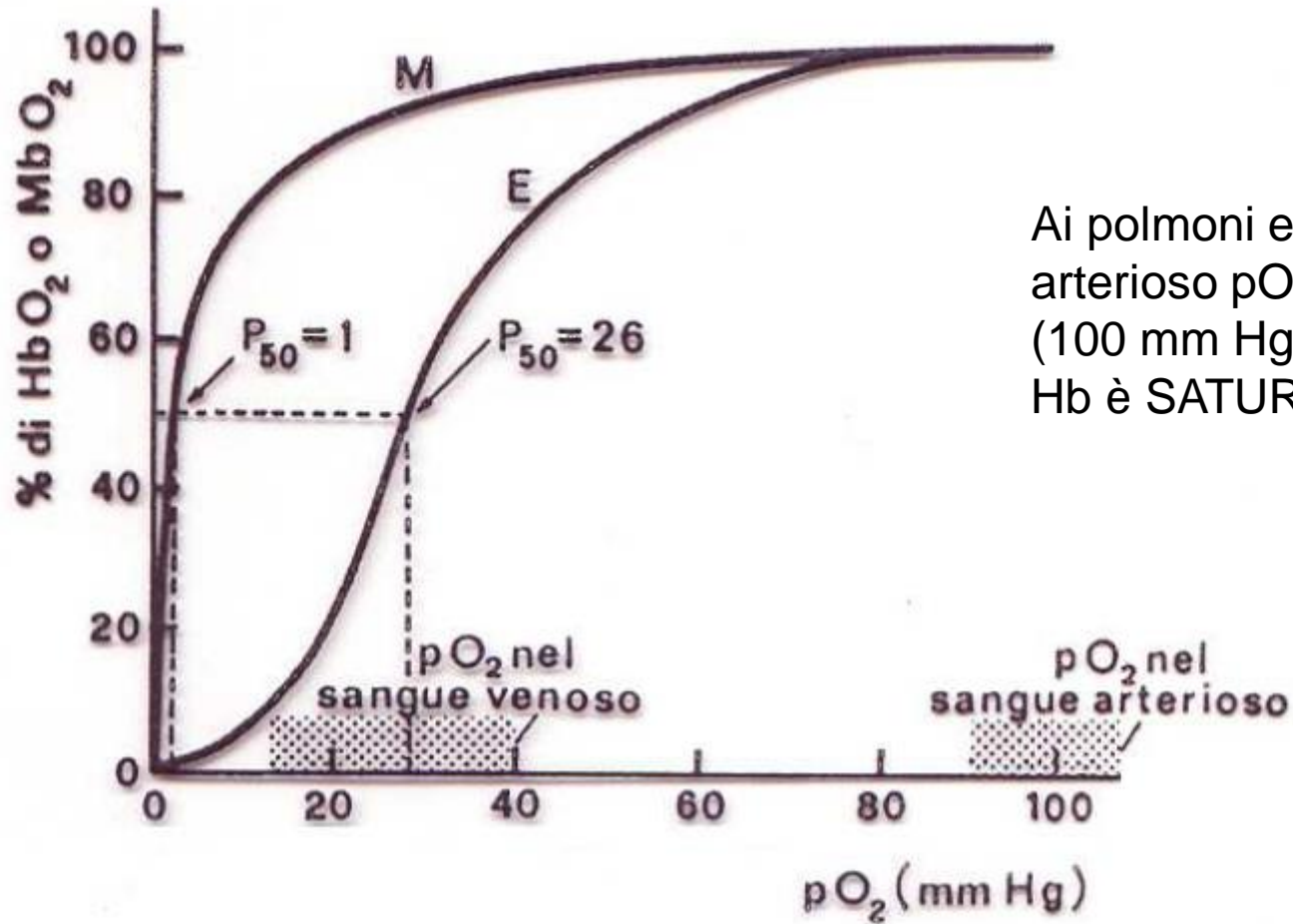


% saturation
of
haemoglobin



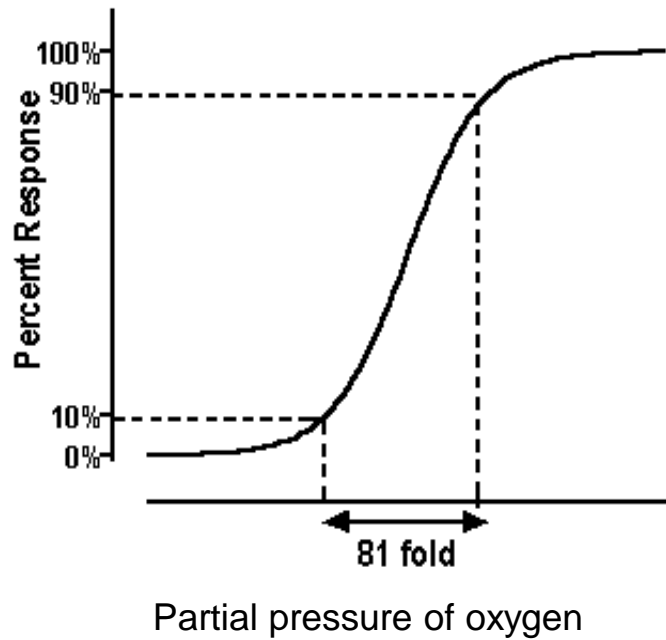
Una curva sigmoide descrive un
andamento cooperativo:
In un breve intervallo di pO₂ si
passa dal 10% al 90% di
saturazione

Nel sangue venoso
e nei tessuti, pO_2 è bassa:
Hb cede O_2



Ai polmoni e nel sangue
arterioso pO_2 è alta
(100 mm Hg):
Hb è SATURA di O_2

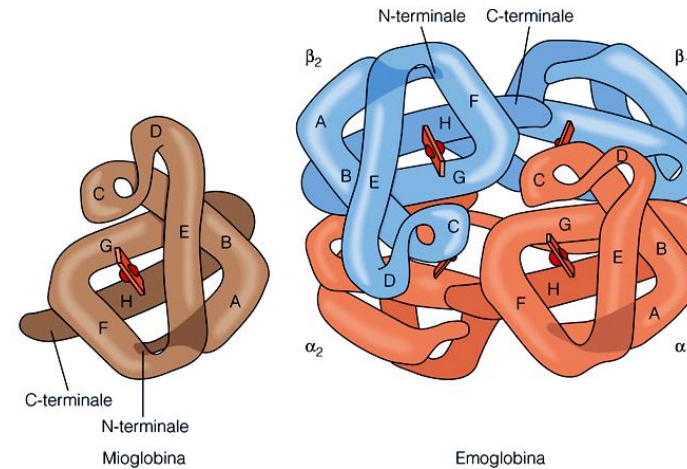
Curve di dissociazione della mioglobina (M) e della emoglobina (E).



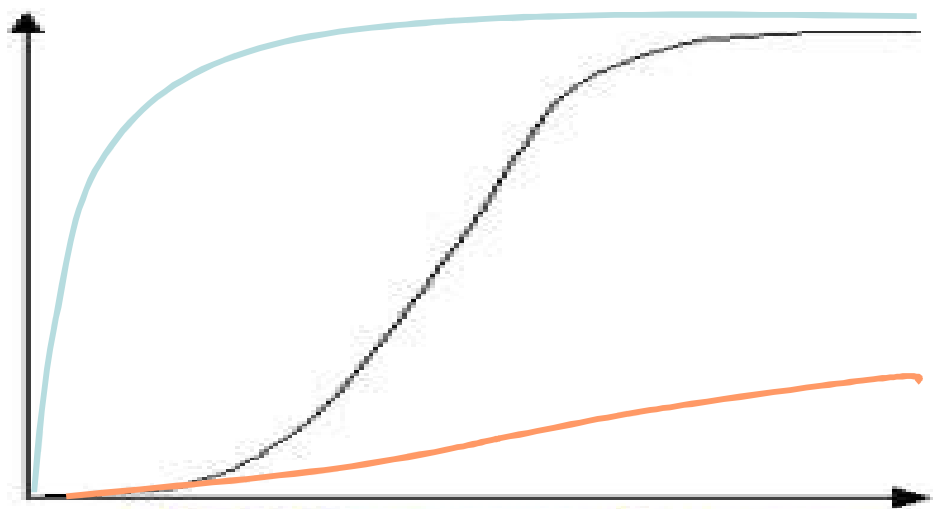
Questo indica che il legame è di tipo **COOPERATIVO**:
 Il legame di una molecola di O_2 FAVORISCE il legame
 delle altre 3 molecole (Hb lega 4 O_2)

Come è possibile?

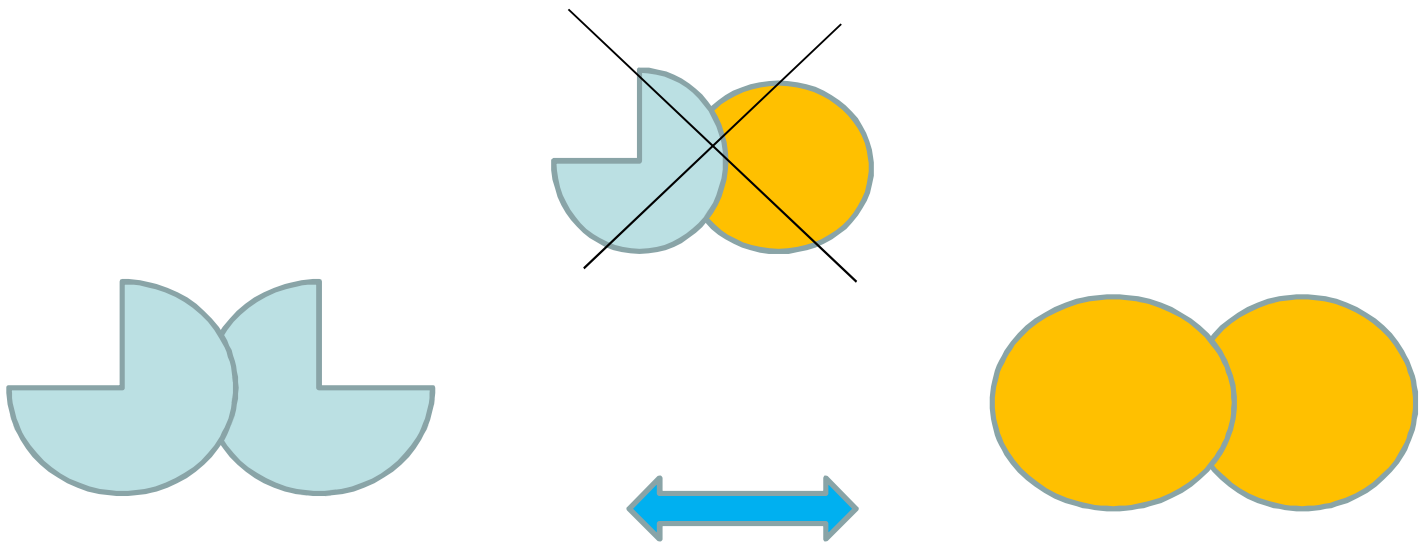
Vantaggio garantito dalla struttura IV

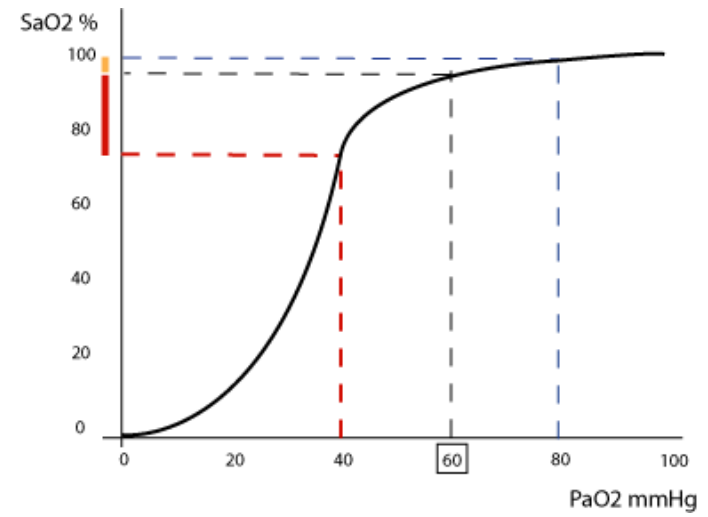
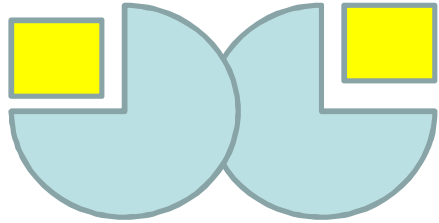
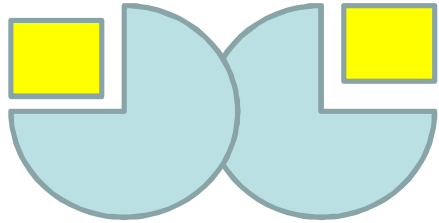
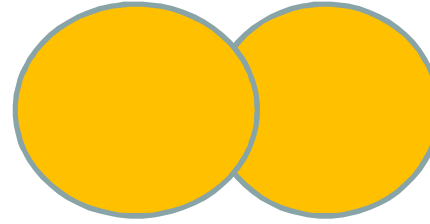
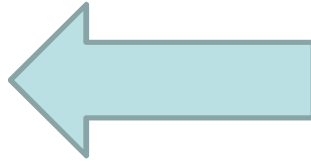
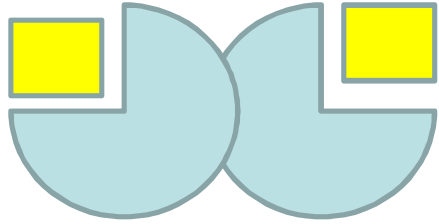
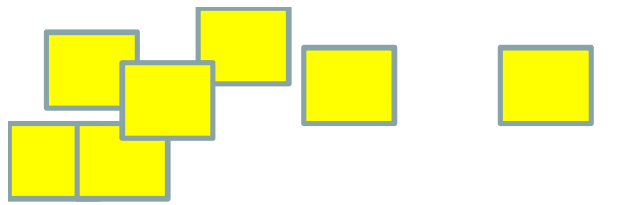


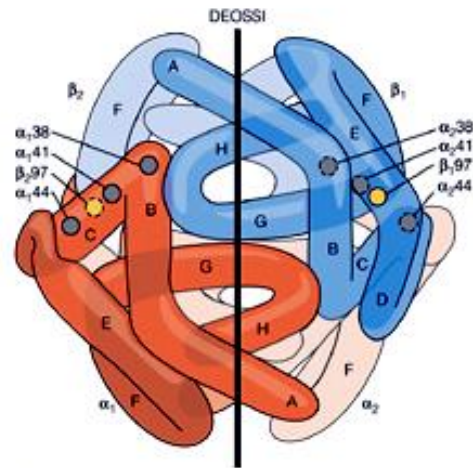
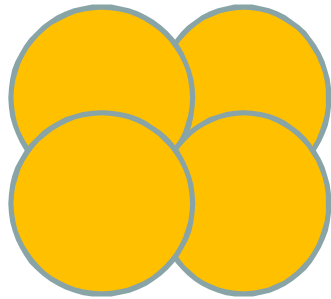
% saturation of haemoglobin



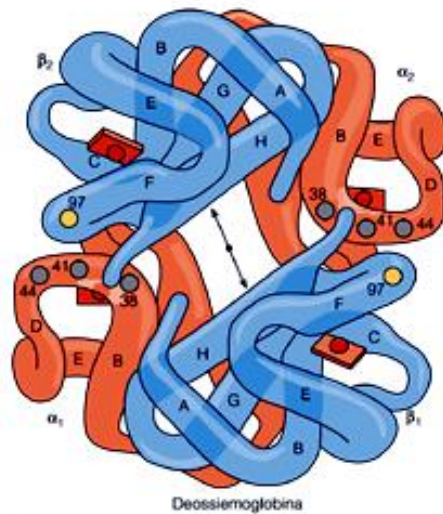
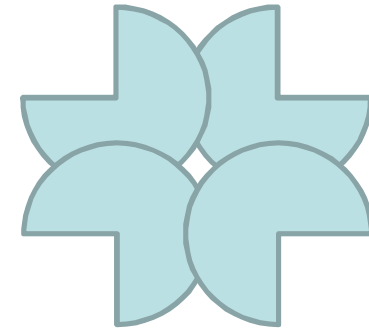
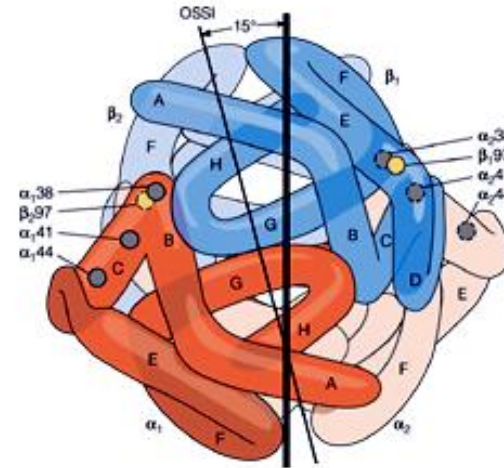
Partial pressure of oxygen



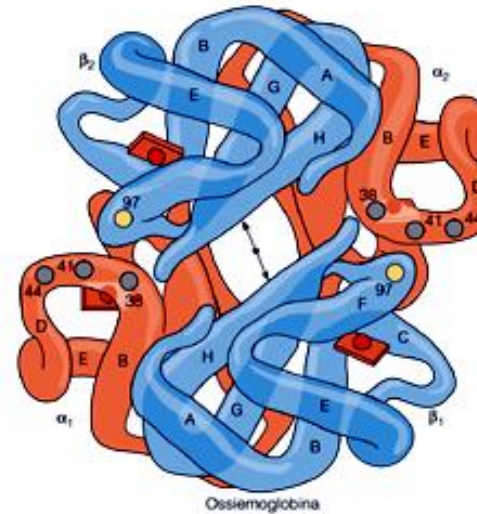




(a)



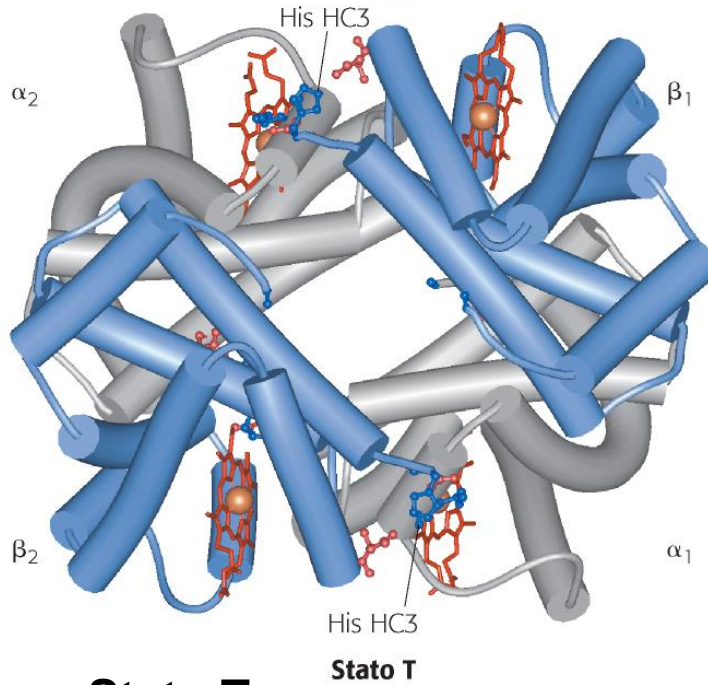
(b)



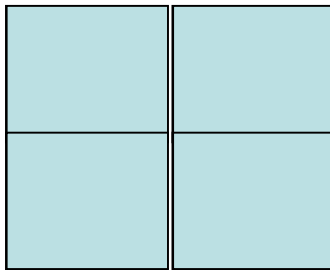
La forma ossi dell'Hb ha un'affinità superiore per H_2O_2 , giustificando la cooperatività del legame

Hb

Desossiemoemoglobina



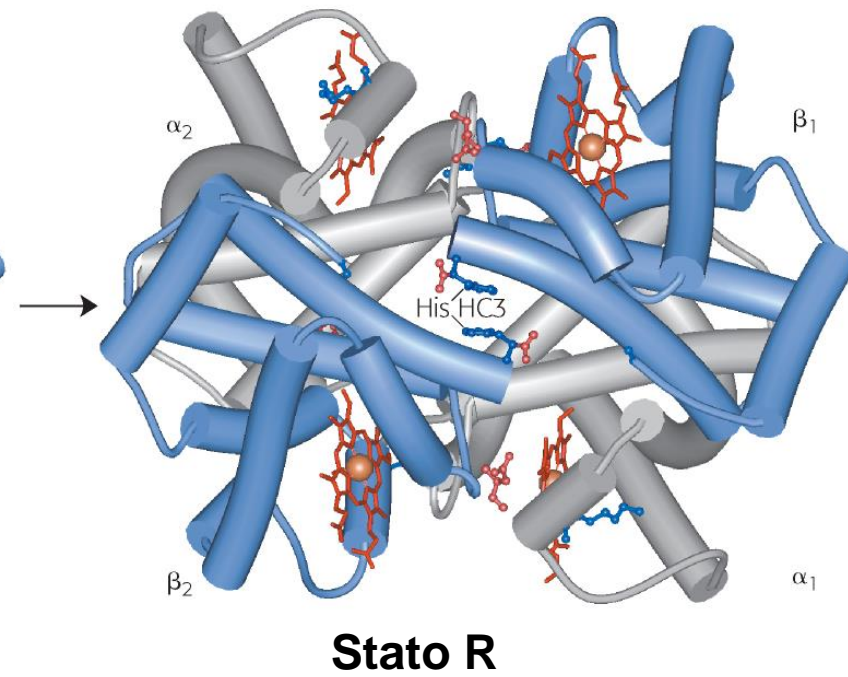
Stato T



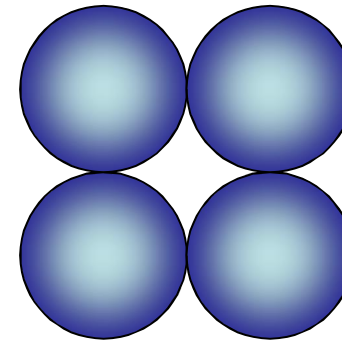
Bassa affinità per O_2

Hb(O_2)₄

Ossiemoemoglobina



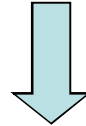
Stato R



Alta affinità per O_2

Nella forma
ossigenata ciascuna
subunità ha
un'affinità superiore
per $10O_2$,

Il legame di un ligando ad un sito MODIFICA le proprietà di un altro sito di legame sulla stessa proteina

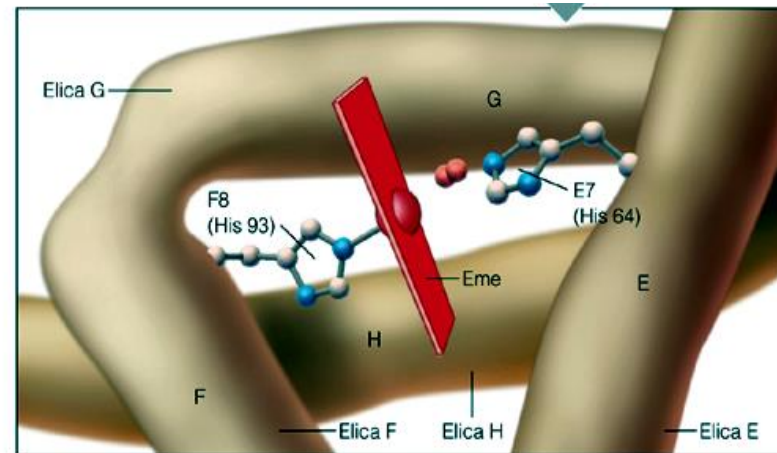


PROTEINA ALLOSTERICA

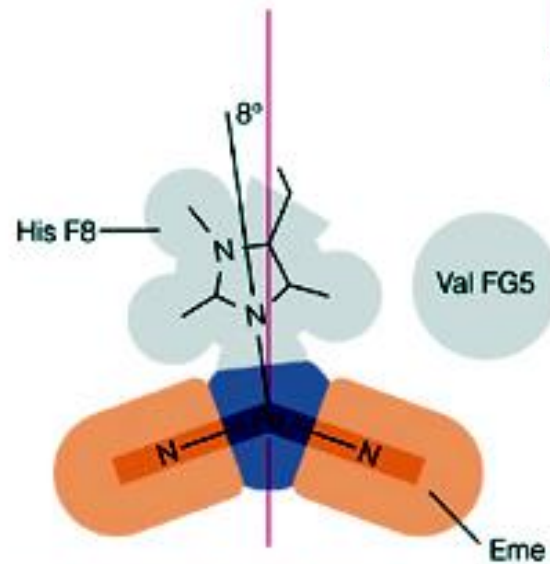
(dal greco α llos stereos+ σ altra forma)

Se la transizione conformazionale è causata dal normale ligando (come in questo caso) si parlerà di MODIFICAZIONE ALLOSTERICA OMOTROPICA

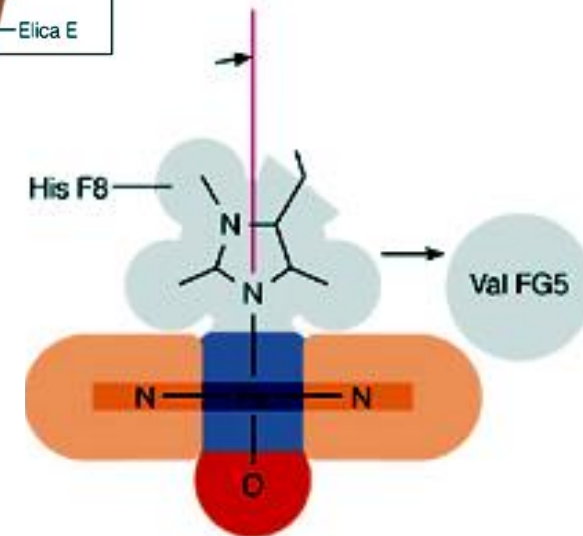
COME MAI IL LEGAME DI UNA MOLECOLA DI OSSIGENO DETERMINA LA VARIAZIONE CONFORMAZIONALE NEGLI ALTRI SITI DI LEGAME?



(b)

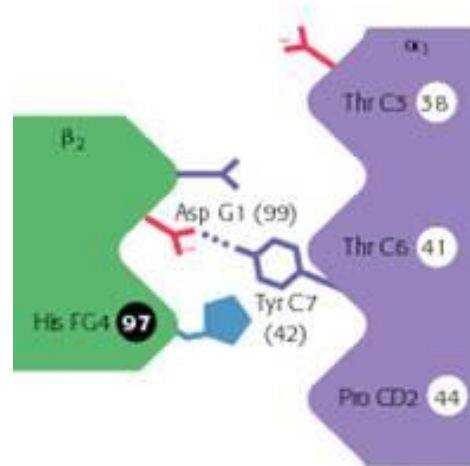
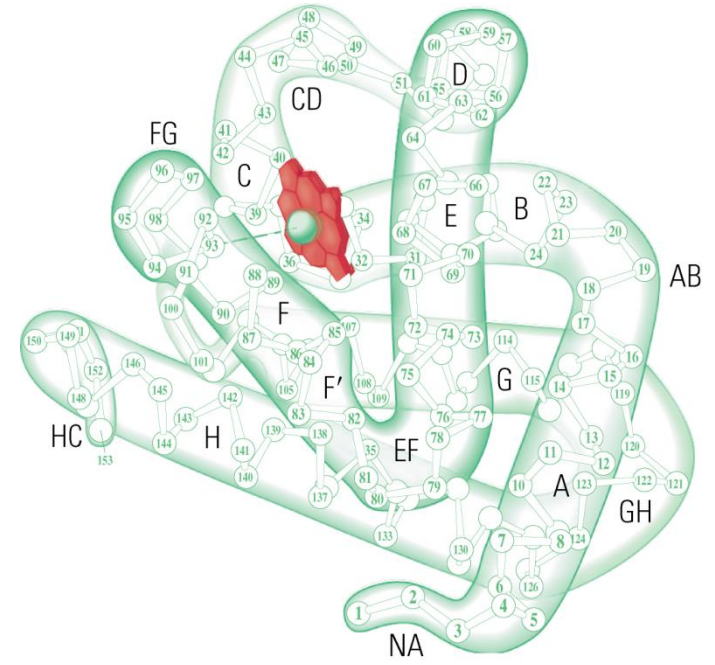
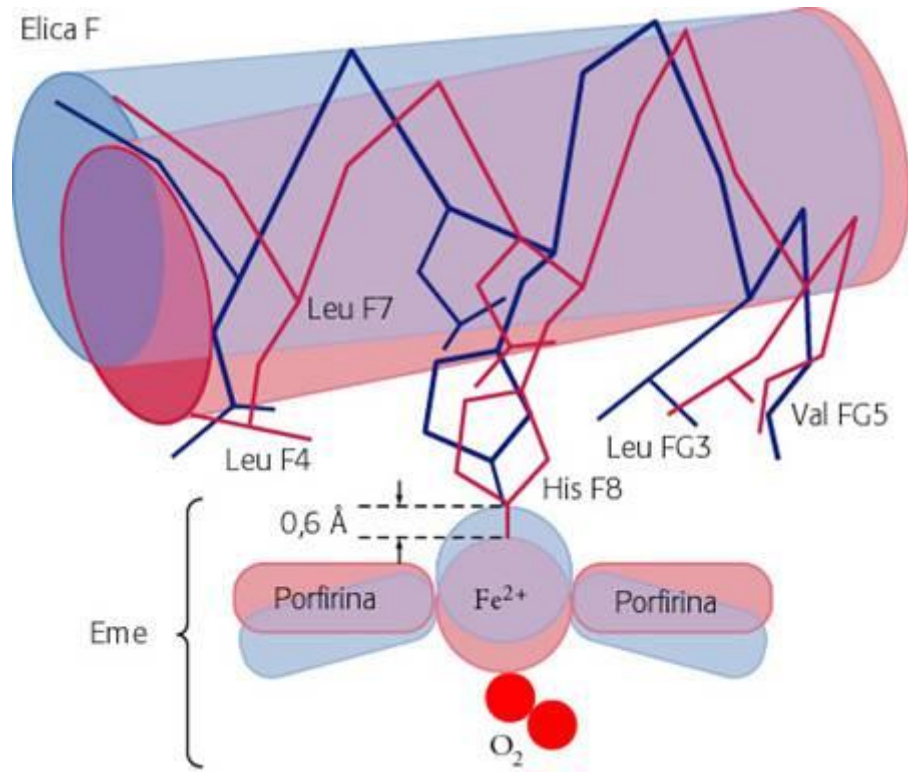


(a) Deossiemoglobina (stato T)

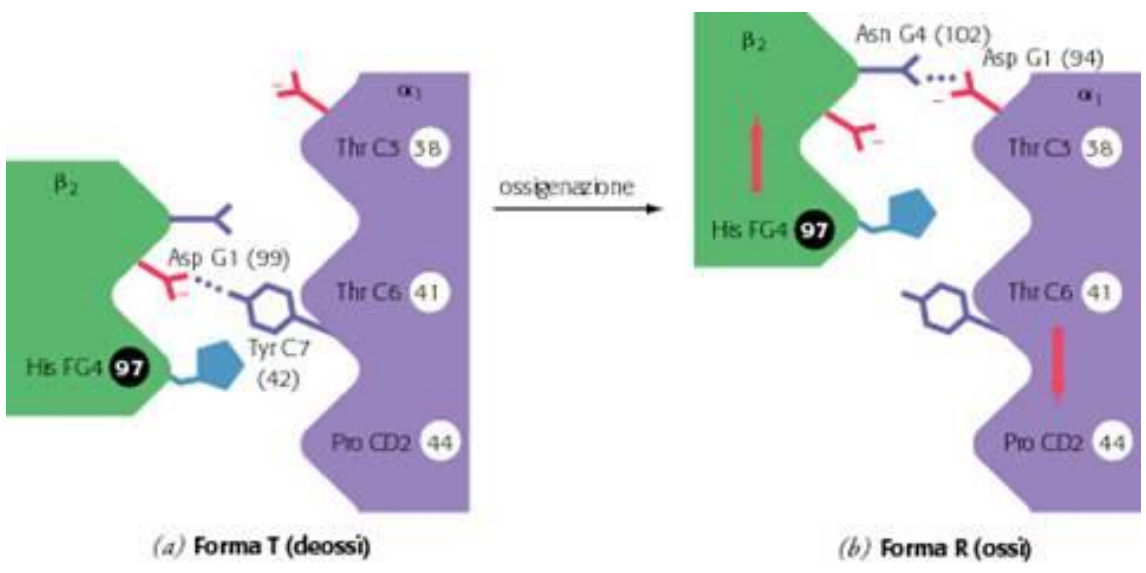
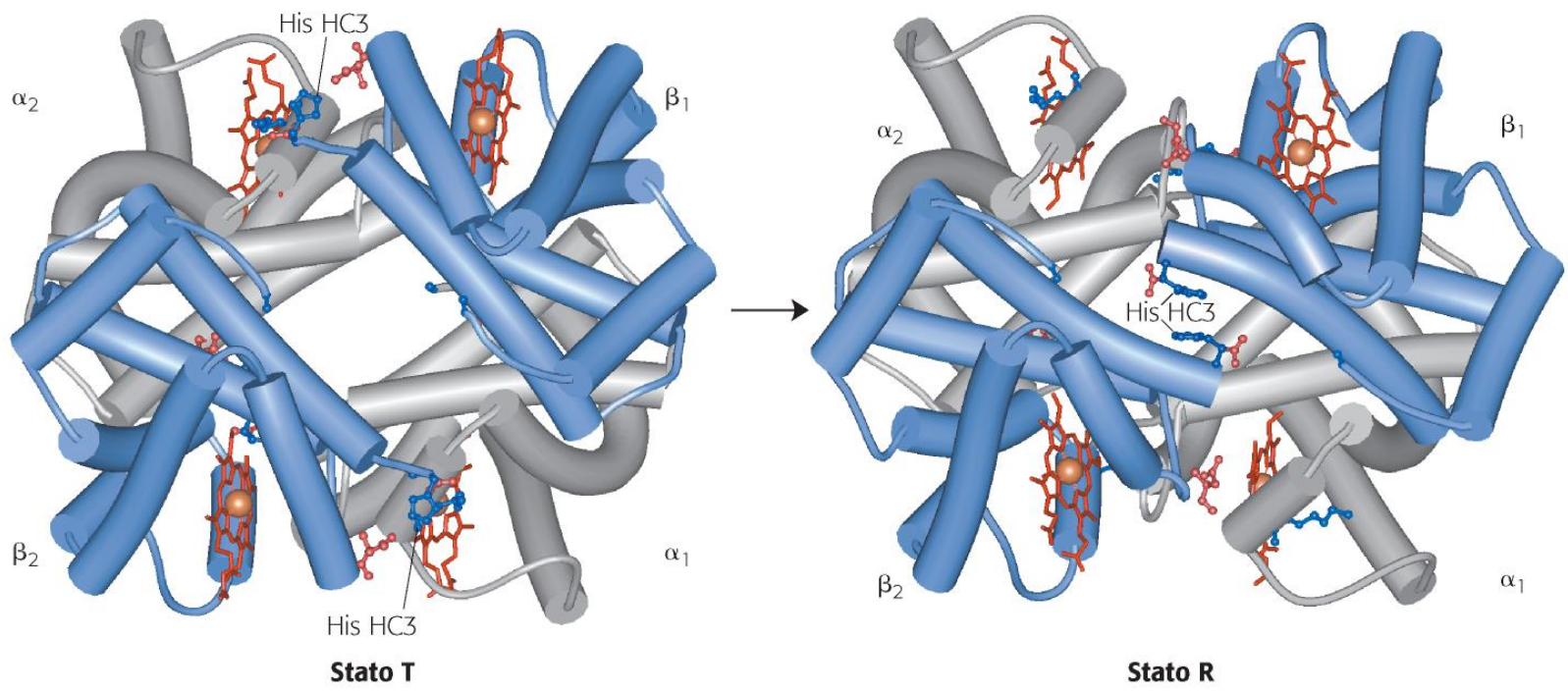


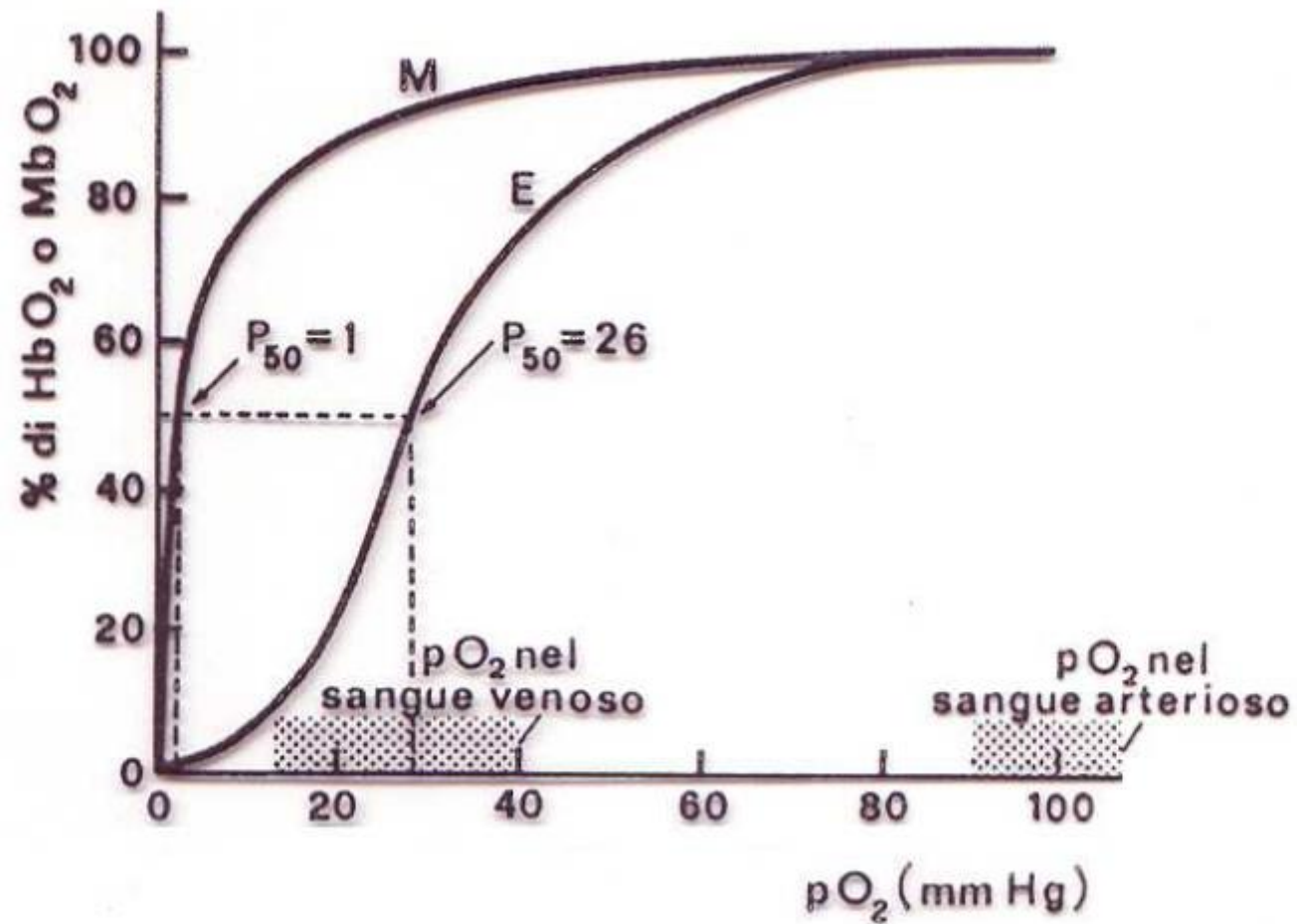
(c) Ossiemoglobina (stato R)

Elica F



(a) Forma T (deossi)





Curve di dissociazione della mioglobina (M) e della emoglobina (E).

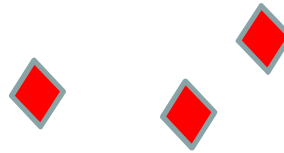
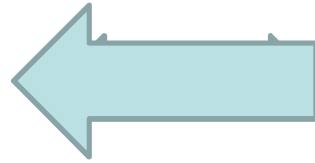
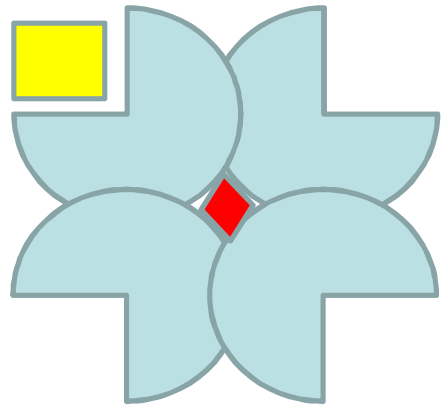
PROTEINE ALLOSTERICHE

Se la transizione conformazionale è causata da un'altra molecola che si lega ad un sito diverso si parlerà di **MODIFICAZIONE ALLOSTERICA ETEROTROPICA**

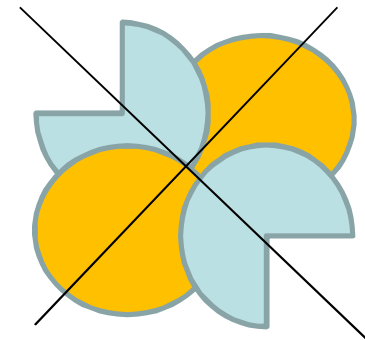
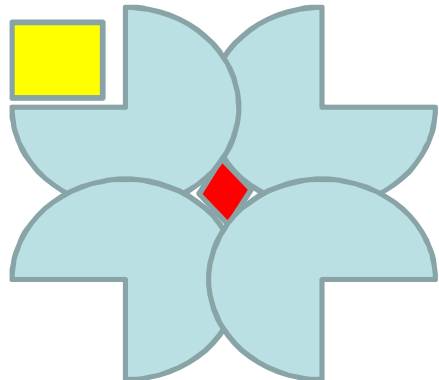
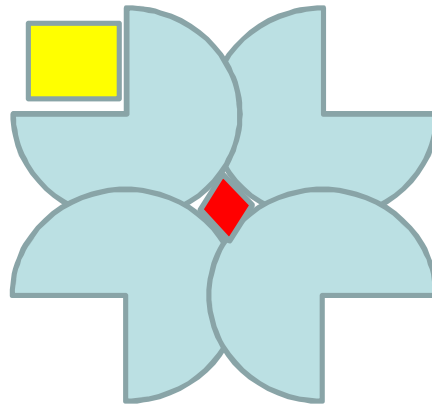
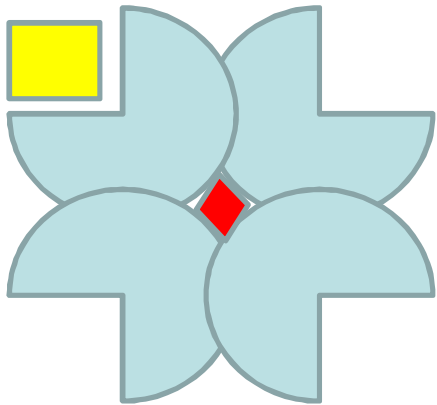
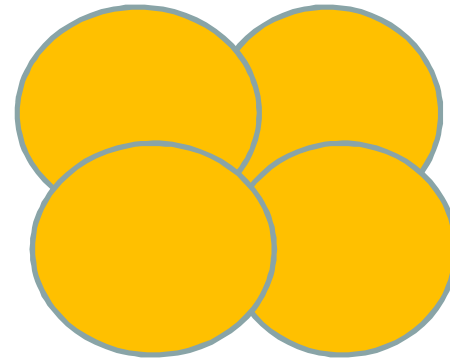
EFFETTORI ALLOSTERICI:

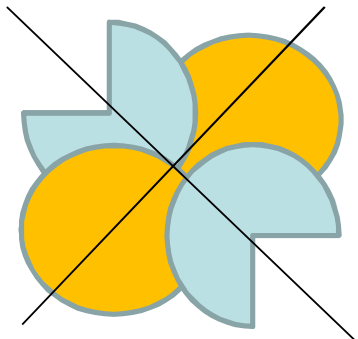
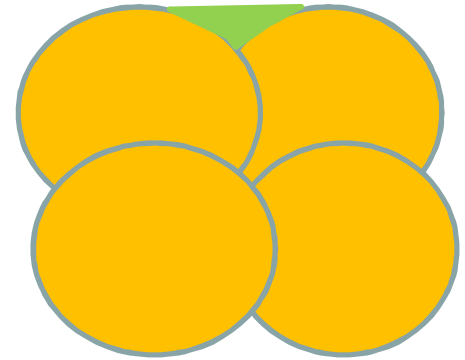
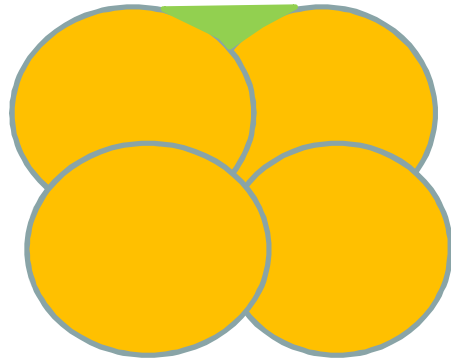
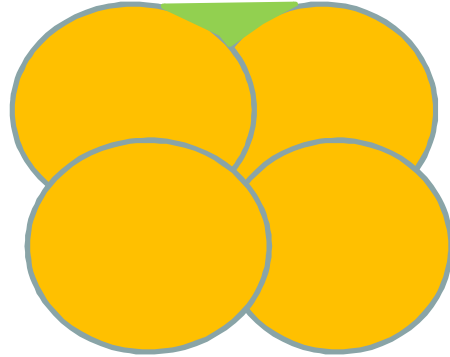
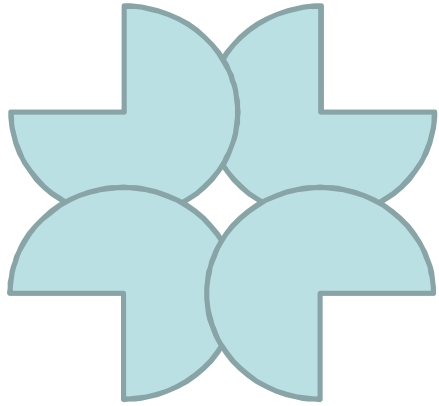
Molecole che legandosi non covalentemente a proteine, in un sito diverso dal sito attivo, ne modificano la conformazione globale, regolandone quindi la funzione

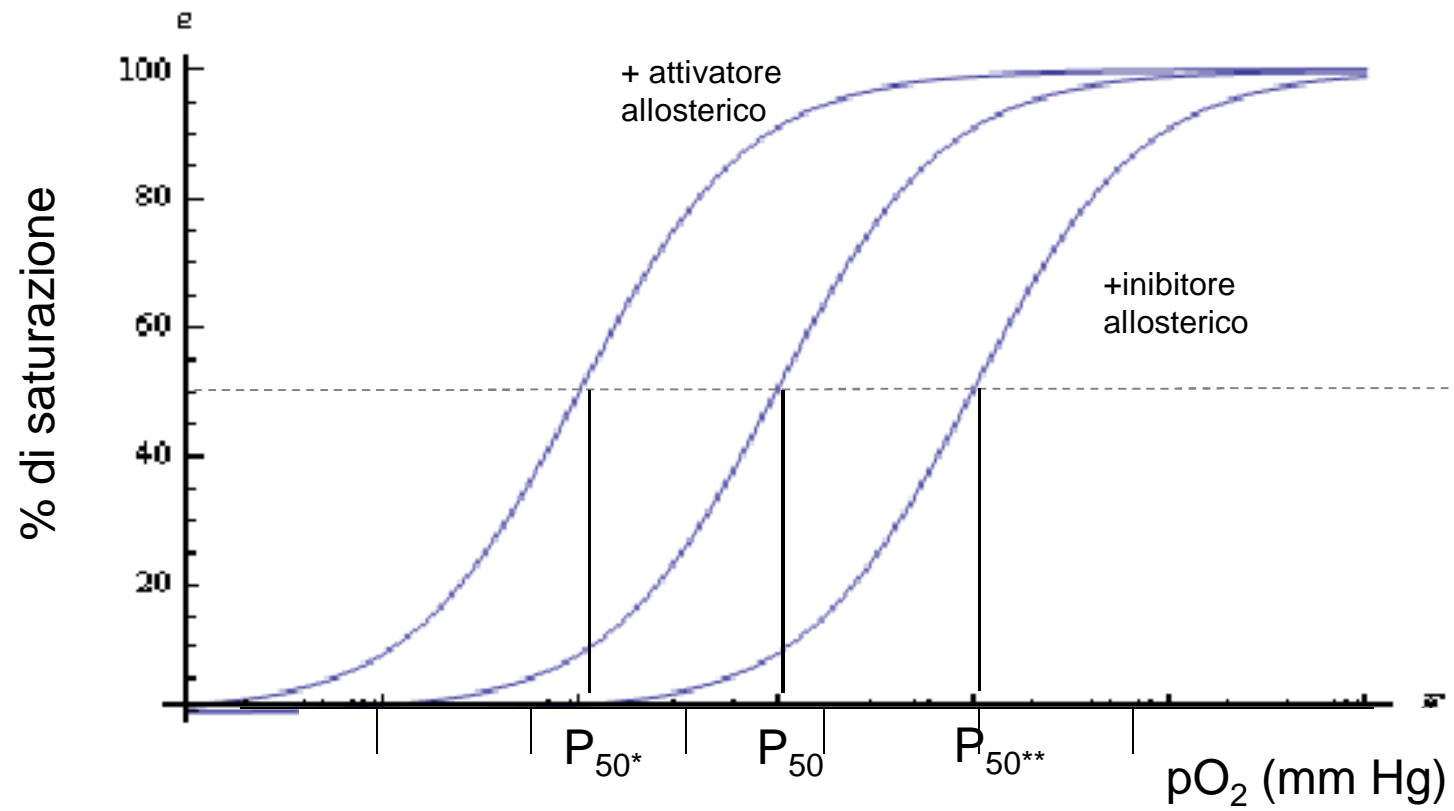
ATTIVATORI e INIBITORI allosterici



ATTIVATORE ALLOSTERICO

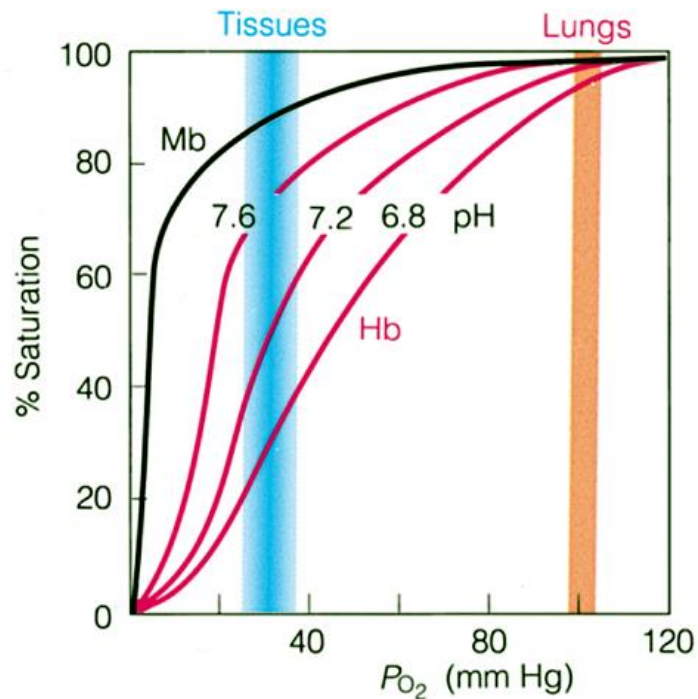
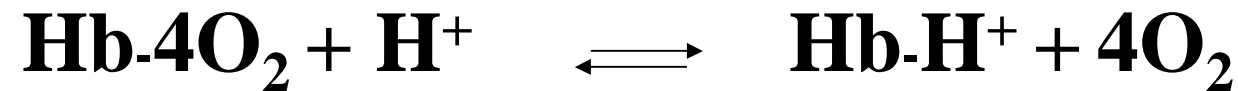






L'emoglobina cede più facilmente O₂ in tessuti metabolicamente attivi

COME?

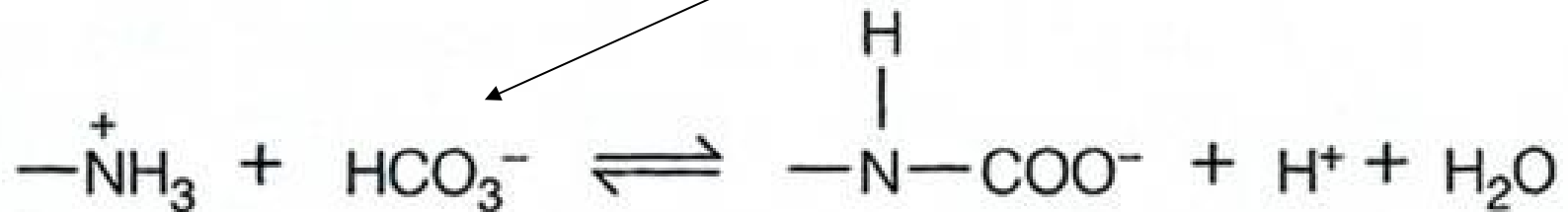


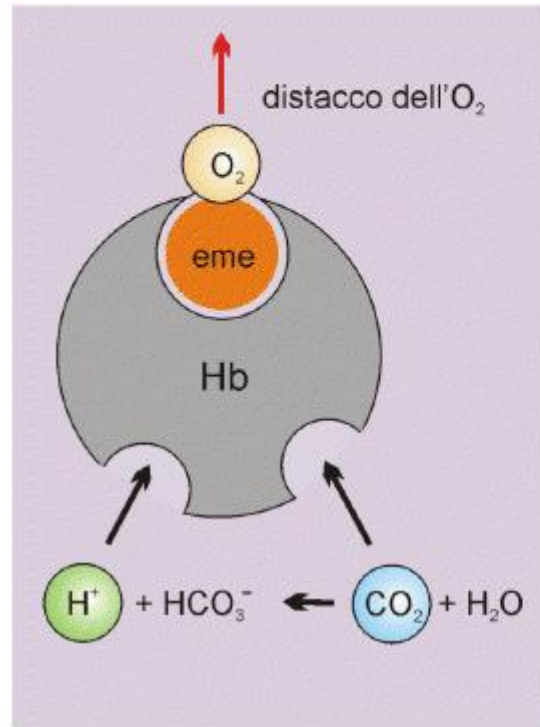
Gli ioni H⁺ determinano una perdita di affinità per O₂ agendo come INIBITORI ALLOSTERICI ETEROTROPICI

EFFETTO BOHR

Trasporto di anidride carbonica

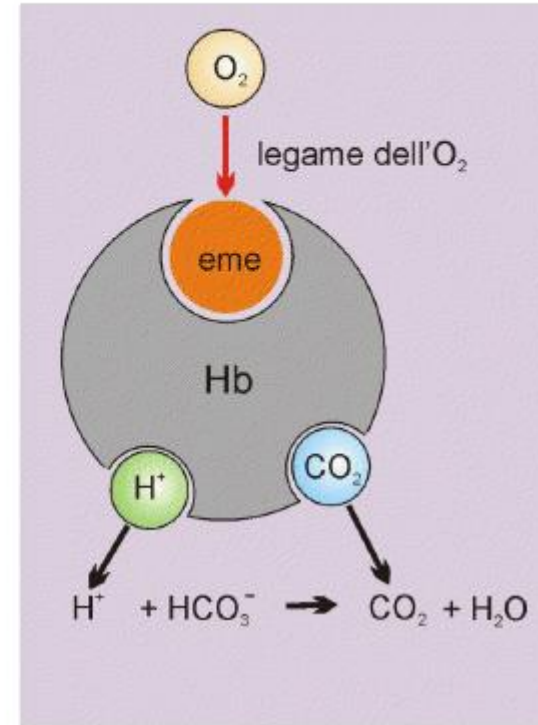
L~~o~~Hb lega 4 CO₂





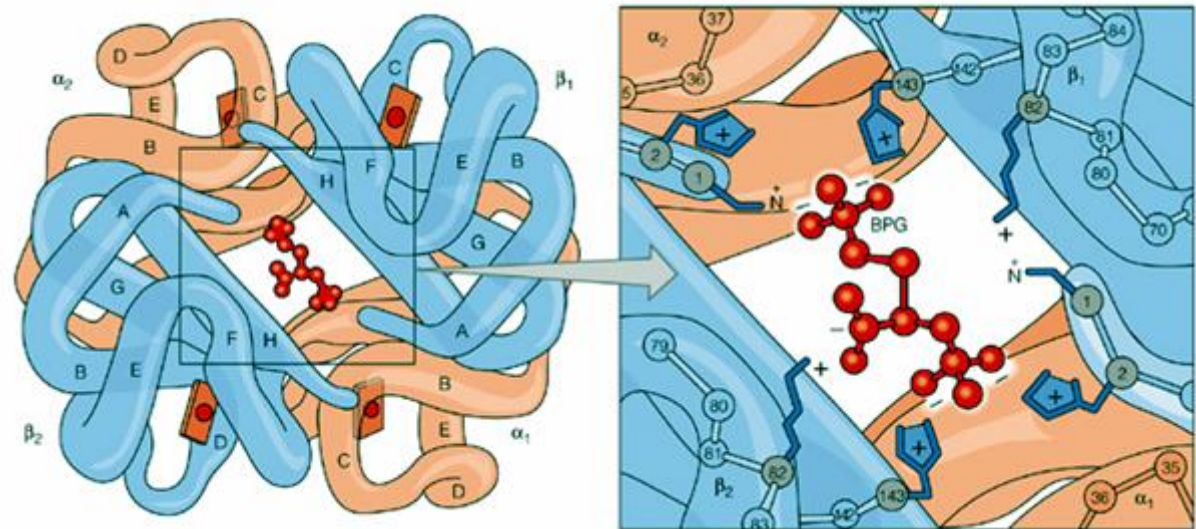
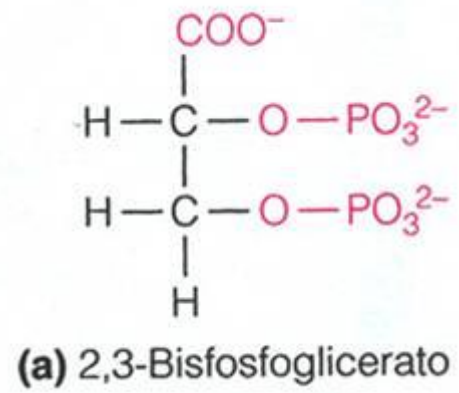
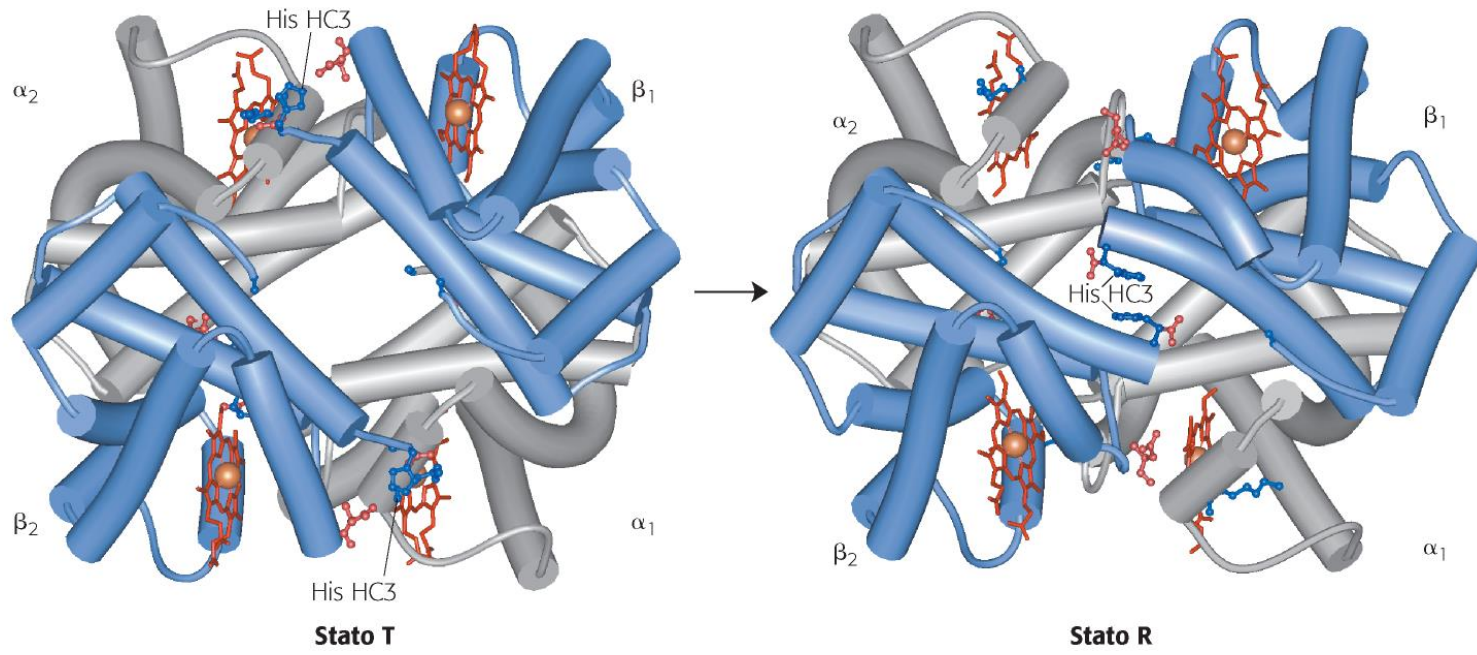
A livello tissutale:

- l'***Hb deossigenata*** lega meglio la CO₂ (***alta affinità***) formando composti carboammino-emoglobinici (HbCO₂)

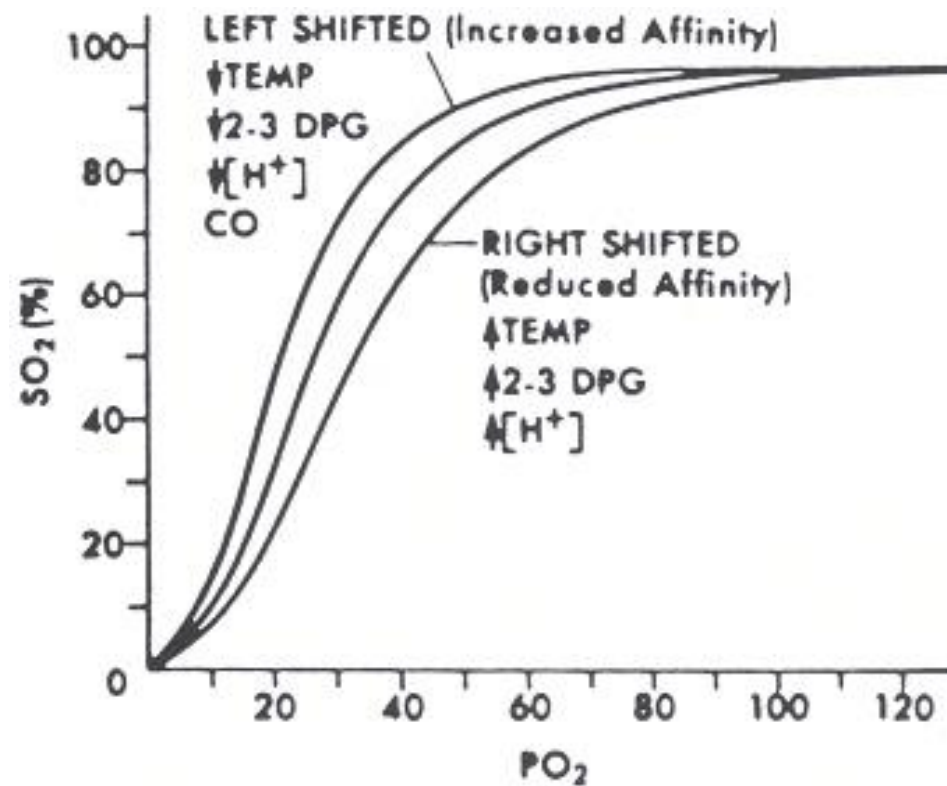


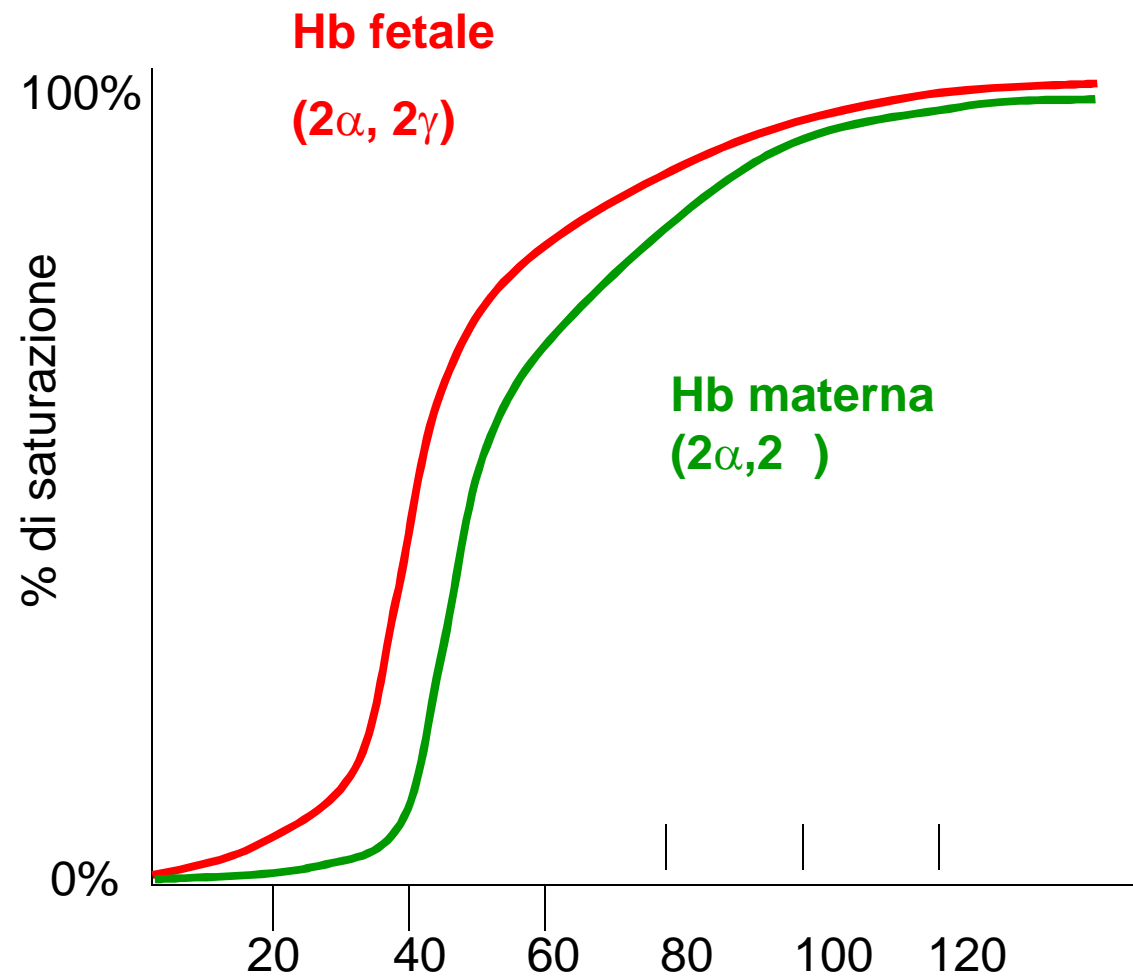
A livello alveolare:

- la ***formazione di HbO₂*** riduce l'affinità della CO₂ e H⁺ per l'Hb (***bassa affinità***)
- la CO₂ che si libera viene scambiata con l'alveolo ed espulsa



H⁺, CO₂ e BPG sono INIBITORI ALLOSTERICI dell'EMOGLOBINA





- 1) **Emoglobina fetale (HbF)** è meno sensibile al 2,3-DPG, di conseguenza la sua affinità per l'O₂ risulta complessivamente superiore a quella dell'uomo adulto (HbA). È un effetto benefico per il feto che ha un PO₂ arteriosa bassa.