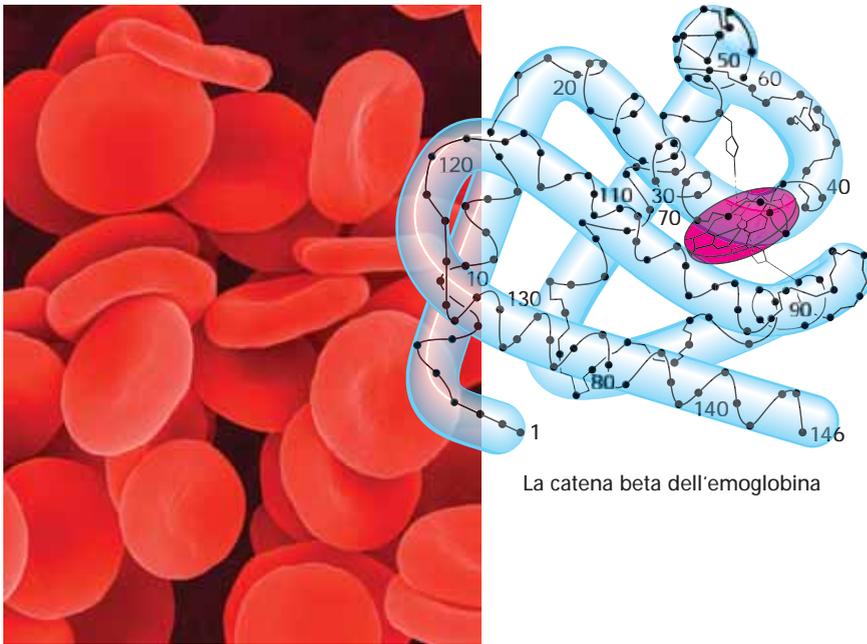


Capitolo supplementare A

Una proteina in azione: l'emoglobina



Nel torrente circolatorio gli eritrociti trasportano l'ossigeno dai polmoni ai tessuti, dove è richiesto. L'emoglobina, una proteina tetramerica che contiene l'eme, un pigmento responsabile del colore rosso del sangue, si lega all'ossigeno, che viene trasportato fino ai tessuti, dove viene rilasciato. L'emoglobina è stata una delle prime proteine di cui sia stata determinata la struttura: il disegno qui in alto mostra il ripiegamento spaziale (folding) di una singola subunità. [Fonte: (foto a sinistra) Dr. Dennis Kunkel/Visual Unlimited.]

La transizione dalla vita anaerobica alla vita aerobica è stata una delle tappe più importanti dell'evoluzione, perché ha reso disponibile una grande riserva di energia. L'energia che si può estrarre dal glucosio è quindici volte più elevata in presenza di ossigeno che in assenza. Gli organismi unicellulari e altri minuscoli organismi viventi assorbono l'ossigeno necessario per il metabolismo cellulare direttamente dall'aria o dall'ambiente acquoso circostante. I vertebrati invece hanno sviluppato due meccanismi principali per rifornire le loro cellule di una quantità adeguata di ossigeno. Il primo è un sistema circolatorio che distribuisce attivamente l'ossigeno alle cellule dei diversi tessuti e organi. Il secondo è l'utilizzo di proteine deputate al trasporto e all'immagazzinamento dell'ossigeno: l'emoglobina e la mioglobina. L'emoglobina, contenuta nei globuli rossi, trasporta l'ossigeno dai polmoni ai tessuti, e nello stesso tempo contribuisce al trasporto del biossido di carbonio e degli ioni idrogeno dai tessuti ai polmoni. La mioglobina, localizzata nei muscoli, costituisce una riserva di ossigeno, disponibile in caso di necessità.

L'analisi comparativa dell'emoglobina e della mioglobina ha permesso di ottenere preziose informazioni su molti aspetti strutturali e funzionali delle proteine. Entrambe le proteine, evolutivamente correlate, possiedono strutture quasi identiche per il legame con l'ossigeno. Però, mentre l'emoglobina è un trasportatore di ossigeno assai efficiente, in grado di utilizzare fino al 90% della sua potenziale capacità di trasporto, la mioglobina è in grado di utilizzarne solo il 7%. A cosa è dovuta questa differenza così netta? La mioglobina è formata da una singola catena polipeptidica, mentre l'emoglobina è un tetramero. Le quattro catene dell'emoglobina legano l'ossigeno *cooperativamente*, cioè il legame dell'ossigeno a

Sommario

- A1 La mioglobina e l'emoglobina legano l'ossigeno a livello dell'atomo di ferro dell'eme
- A2 L'emoglobina lega l'ossigeno con un meccanismo cooperativo
- A3 Gli ioni idrogeno e il biossido di carbonio promuovono il rilascio dell'ossigeno: l'effetto Bohr
- A4 Le mutazioni nei geni che codificano per le subunità dell'emoglobina sono responsabili di alcune malattie

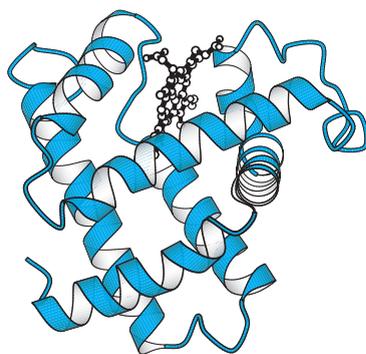
una catena aumenta la probabilità che le altre tre catene leghino l'ossigeno. Inoltre, l'affinità dell'ossigeno per l'emoglobina è modulata dal legame degli ioni idrogeno e del biossido di carbonio, che aumenta la capacità di trasporto dell'ossigeno. La cooperatività e la risposta agli effettori possono essere spiegate sulla base delle variazioni della struttura quaternaria dell'emoglobina, che si verificano a seguito del legame di differenti combinazioni di molecole modulatorie.

L'emoglobina e la mioglobina occupano un posto importante nella storia della biochimica. Esse sono state le prime proteine di cui sia stata determinata la struttura tridimensionale per cristallografia a raggi X. Inoltre, una malattia del sangue, l'anemia a cellule falciformi, causata dalla sostituzione di un singolo amminoacido in una delle catene dell'emoglobina, ha dimostrato per la prima volta che un cambiamento nella sequenza amminoacidica di una proteina può risultare nell'insorgenza di una malattia. Non solo per quanto di per sé ci insegna, ma anche come paradigma per molte altre proteine che incontreremo in seguito, l'emoglobina può essere considerata una fonte di apprendimento e di discussione.

A1 LA MIOGLOBINA E L'EMOGLOBINA LEGANO L'OSSIGENO A LIVELLO DELL'ATOMO DI FERRO DELL'EME

La mioglobina di capodoglio è stata la prima proteina di cui è stata determinata la struttura tridimensionale attraverso la cristallografia a raggi X. Gli studi pionieristici di John Kendrew si conclusero con la risoluzione della struttura della proteina negli anni 1950 (figura A1). La mioglobina è formata per gran parte da α -eliche unite tra loro da avvolgimenti non casuali, a formare una struttura globulare.

La mioglobina può trovarsi in una forma pri-

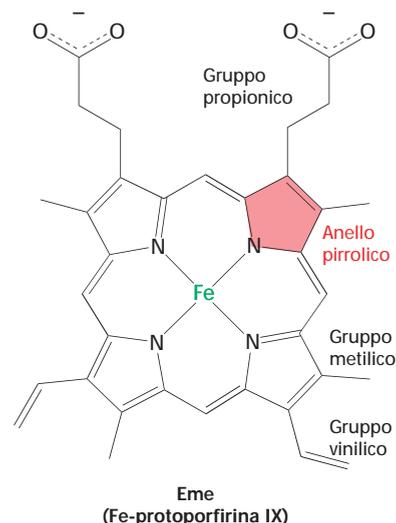


Mioglobina

Figura A1 Struttura della mioglobina

Si noti che la mioglobina è formata da una singola catena polipeptidica, che possiede α -eliche unite da avvolgimenti non casuali. La mioglobina contiene un singolo sito di legame per l'ossigeno. [Fonte: 1MBD.pdb.]

va di ossigeno, denominata *deossimioglobina*, o in una forma legata all'ossigeno, denominata *ossimioglobina*. La capacità sia della mioglobina sia dell'emoglobina di legare l'ossigeno dipende dalla presenza di un gruppo prostetico, chiamato *eme*.



Il color rosso del muscolo e del sangue è dovuto alla presenza dell'eme. L'eme è costituito da una componente organica e da un atomo di ferro in posizione centrale. La componente organica, denominata *protoporfirina*, è costituita da quattro anelli pirrolici legati da ponti metinici per formare un anello tetrapirrolico. All'anello sono legati quattro gruppi metilici, due gruppi vinilici, e due catene laterali di propionato.

L'atomo di ferro è localizzato al centro della protoporfirina, ed è legato ai quattro atomi di azoto degli anelli pirrolici. In condizioni normali è nello stato di ossidazione ferroso (Fe^{2+}). Inoltre, lo ione ferro può formare altri due legami, uno su ciascuna delle due facce del piano nell'eme. Questi siti di legame sono chiamati quinto e sesto sito di coordinazione. Nella mioglobina il quinto sito di coordinazione è occupato dall'anello imidazolico di un residuo di istidina della proteina, denominata *istidina prossimale*. Nella deossimioglobina il sesto sito di coordinazione non è occupato, ed è disponibile per il legame con l'ossigeno. Lo ione ferro si trova circa 0,4 Å all'esterno del piano porfirinico, perché lo ione ferro, nella forma presente nella deossimioglobina, è un po' troppo voluminoso per adattarsi entro la cavità dell'anello porfirinico (parte sinistra della figura A2).

Il legame della molecola di ossigeno al sesto sito di coordinazione dello ione ferro provoca un notevole riordinamento degli elettroni del ferro, che diventa più piccolo, e può così spostarsi nel

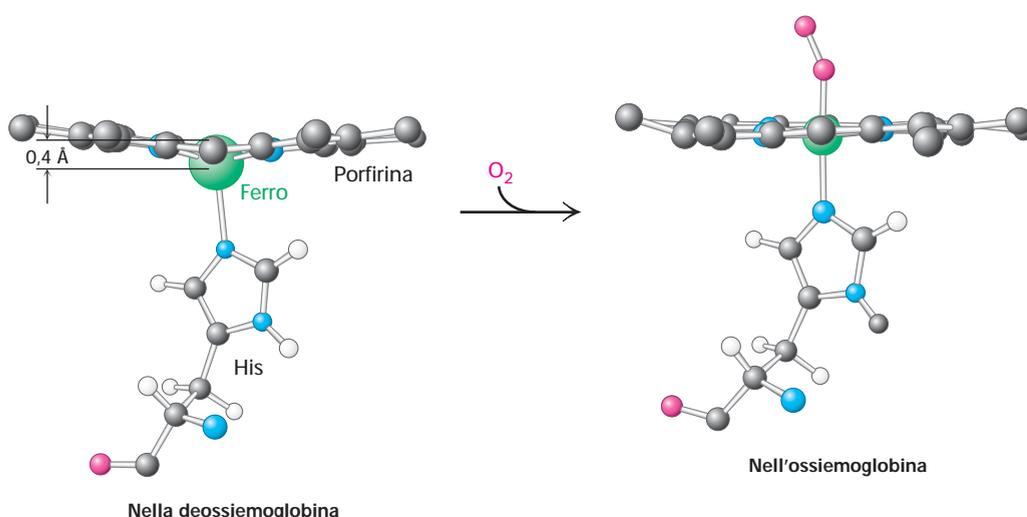


Figura A2 Variazioni nella posizione dello ione ferro a seguito del legame dell'ossigeno

Lo ione ferro è situato leggermente all'esterno del piano della protoporfirina dell'eme nella deossiemoglobina (a sinistra), ma si sposta sul piano dell'eme a seguito dell'ossigenazione (a destra).

piano della porfirina (parte destra della figura A2). Il cambiamento nella struttura elettronica può essere monitorato seguendo le modificazioni delle proprietà magnetiche, che sono il fondamento della *risonanza magnetica nucleare per immagini* (fMRI), una delle tecniche più avanzate per lo studio delle funzioni del cervello (par. 32.1). Nel 1936, quasi 25 anni prima che venisse chiarita la struttura tridimensionale della mioglobina, Linus Pauling, sulla base di misurazioni magnetiche, aveva previsto che dovessero verificarsi modificazioni strutturali nella proteina, a seguito del legame con l'ossigeno.

La struttura della mioglobina previene il rilascio di specie reattive dell'ossigeno

Il legame dell'ossigeno al ferro dell'eme è accompagnato dal parziale trasferimento di un elettrone dallo ione ferroso all'ossigeno. La struttura che si forma può essere descritta come un complesso tra lo ione ferrico (Fe^{3+}) e l'*anione superossido* (O_2^-), come illustrato nella figura A3. È importante però che l'ossigeno, una volta rilasciato dall'emoglobina, rimanga ossigeno molecolare, e non diventi anione superossido. Infatti l'anione superossido stesso e altri composti che potrebbero derivarne sono specie reattive dell'ossigeno (cap. 18, p. 460) che possono danneggiare molte macromolecole biologiche. Inoltre, dopo il rilascio del superossido, lo ione ferro si trova allo stato ferrico. La mioglobina che contiene il ferro ferrico, denominata *metmioglobina*, non è in grado di legare l'ossigeno, e perde così la possibilità di immagazzinarlo. La struttura della mioglobina stabilizza il complesso con l'ossigeno, in modo che risulta più difficile il rilascio del superossido. In particolare, nella sacca idrofoba, dove l'ossi-



Figura A3 Legame ferro-ossigeno

L'interazione tra il ferro e l'ossigeno nell'emoglobina può essere descritta come una combinazione di due strutture di risonanza, una col Fe^{2+} e l'ossigeno molecolare, e l'altra col Fe^{3+} e lo ione superossido.

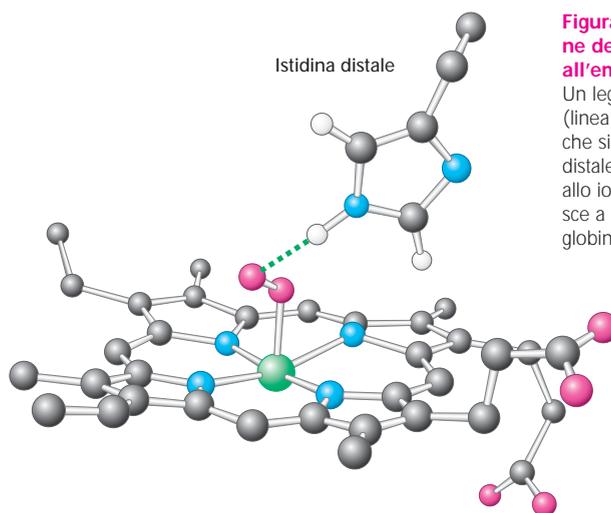


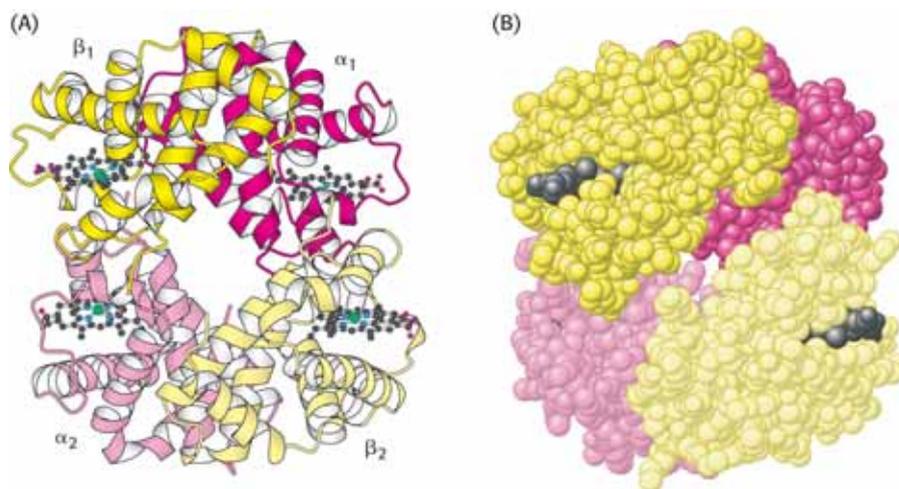
Figura A4 Stabilizzazione dell'ossigeno legato all'eme

Un legame a idrogeno (linea verde tratteggiata) che si forma tra l'istidina distale e l'ossigeno legato allo ione ferroso contribuisce a stabilizzare l'ossiemoglobina.

geno si lega al ferro dell'eme, è presente un altro residuo di istidina (denominato *istidina distale*) che forma un legame a idrogeno con la molecola di ossigeno (figura A4). Il parziale carattere di superossido dell'ossigeno legato rafforza l'interazione tra l'istidina distale e l'ossigeno. Si può quindi affermare che *la componente proteica della mioglobina controlla la reattività intrinseca dell'eme*, rendendolo più adatto a legare reversibilmente l'ossigeno.

Figura A5 Struttura quaternaria della deossiemoglobina

L'emoglobina, che è composta da due catene α e due catene β , funziona come se fosse formata da una coppia di dimeri $\alpha\beta$. (A) Modello a nastri. (B) Modello a spazi pieni. [Fonte: 1A3N.pdb.]



L'emoglobina umana è formata da quattro subunità simili alla mioglobina

La struttura tridimensionale dell'emoglobina di cavallo è stata risolta da Max Perutz subito dopo la determinazione della struttura della mioglobina. In seguito sono state determinate le strutture di emoglobine isolate da altri organismi, incluso l'uomo. Tutte posseggono quattro catene polipeptidiche: una coppia di *catene* α , che hanno la stessa sequenza amminoacidica, e una coppia di *catene* β , la cui sequenza amminoacidica è diversa da quella delle catene α (figura A5). Ciascuna subunità comprende una serie di α -eliche disposte in modo simile a quelle della mioglobina. La struttura ricorrente è denominata *ripiegamento globinico*. In accordo con questa similarità strutturale, le sequenze amminoacidiche delle catene α e β dell'emoglobina umana possono essere allineate con la sequenza amminoacidica della mioglobina di capodoglio, ottenendosi rispettivamente il 25% e il 24% di omologia. I residui essenziali per la funzione, come l'istidina prossimale e l'istidina distale, sono conservati in tutte le catene. Quindi le catene α e β dell'emoglobi-

na sono correlate tra loro e con la miosina per evoluzione divergente (vedi cap. 7, p. 167).

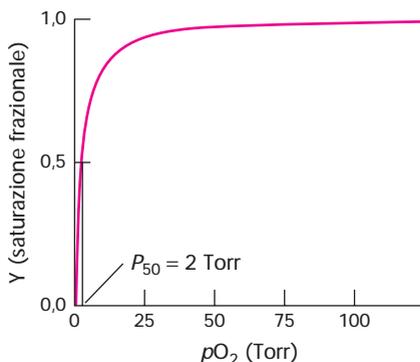
Il tetramero dell'emoglobina, indicato in genere come *emoglobina A* (HbA) è meglio descritto come una coppia di due *dimeri* $\alpha\beta$ identici ($\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$) che si associano per formare un tetramero. Nella deossiemoglobina i due dimeri sono giustapposti da una vasta interfaccia, che include, tra le altre regioni, l'estremità carbossiterminale di ciascuna catena. I gruppi eme sono ben separati nel tetramero: le distanze ferro-ferro sono comprese tra 24 e 40 Å.

A2 L'EMOGLOBINA LEGA L'OSSIGENO CON UN MECCANISMO COOPERATIVO

Consideriamo ora le cinetiche di ossigenazione della mioglobina e dell'emoglobina. Le caratteristiche di legame dell'ossigeno vengono descritte dalla *curva di legame dell'ossigeno* (detta anche *curva di saturazione dell'ossigeno*), un grafico in cui la *saturazione frazionale* viene riportata in funzione della concentrazione dell'ossigeno. La saturazione frazionale, Y , è definita come la frazione dei possibili siti di legame a cui è effettivamente legato l'ossigeno. Il valore di Y varia da 0 (tutti i siti sono vuoti) a 1 (tutti i siti sono occupati). La concentrazione dell'ossigeno viene convenientemente riportata sotto forma di *pressione parziale dell'ossigeno*, pO_2 . La forma della curva di ossigenazione della mioglobina è quella di un semplice equilibrio chimico (figura A6). Si noti che il valore della saturazione frazionale della mioglobina aumenta rapidamente all'aumentare della pO_2 , fino a mantenersi costante a valori di pO_2 relativamente bassi. Il valore della pressione parziale di ossigeno a cui la metà dei siti sono occu-

Figura A6 Curva di ossigenazione della mioglobina

Metà delle molecole di mioglobina sono legate all'ossigeno quando la pressione parziale dell'ossigeno è di 2 Torr.



pati dall'ossigeno (P_{50} corrispondente al 50% di saturazione) è di appena 2 Torr (mm Hg).

Per contro, la curva di ossigenazione dell'emoglobina nei globuli rossi mostra alcune caratteristiche interessanti (figura A7). Essa non può essere ricondotta a una semplice curva di legame, come è quella della mioglobina, e presenta invece forma a «S». Curve di questo tipo vengono denominate *sigmoidi*. Si noti che l'ossigeno si lega più debolmente all'emoglobina che alla mioglobina. Infatti l'emoglobina ha un valore di P_{50} pari a 26 Torr, contro un valore di P_{50} della mioglobina di 2 Torr. Si noti inoltre che la curva di legame è quella che si ottiene lavorando con i globuli rossi. All'interno dei globuli rossi l'emoglobina interagisce con il 2,3-bisfosfoglicerato, una molecola che diminuisce significativamente l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno, come si vedrà più avanti.

Una curva di legame sigmoide suggerisce che la proteina possiede caratteristiche peculiari. In particolare la sigmoideità della curva di ossigenazione dell'emoglobina suggerisce che, una volta che l'ossigeno si lega a uno dei quattro possibili siti di legame, aumenta la probabilità che esso si leghi a uno degli altri tre siti. Analogamente, il distacco dell'ossigeno da uno dei gruppi eme facilita il distacco dell'ossigeno dagli altri tre. Questo meccanismo di legame viene detto *cooperativo* (vedi oltre, p. 7), perché le reazioni di legame dell'ossigeno a ognuno dei siti dell'emoglobina non sono tra loro indipendenti. Torneremo più avanti sul meccanismo della cooperatività dell'emoglobina.

Qual è il significato fisiologico del legame cooperativo dell'ossigeno nell'emoglobina? L'ossigeno deve essere trasportato nel torrente circolatorio dai polmoni, dove la sua pressione parziale è relativamente alta (circa 100 Torr), ai tessuti a elevata attività metabolica, dove la pressione parziale dell'ossigeno è molto più bassa (normalmente, 20 Torr). Vediamo ora come la cooperatività tra i siti di legame, suggerita dalla forma sigmoide della curva di ossigenazione, renda più efficiente il trasporto dell'ossigeno (figura A8). Nei polmoni l'emoglobina è pressoché totalmente saturata con l'ossigeno, e il 98% dei siti di legame con l'ossigeno sono occupati. Quando l'emoglobina raggiunge i tessuti e rilascia l'ossigeno, il livello di saturazione scende fino al 32%. Quindi un totale di $98 - 32 = 66\%$ dei potenziali siti di legame contribuisce al trasporto dell'ossigeno. Il rilascio dell'ossigeno avviene in modo cooperativo, e favorisce una più completa distribuzione ai tessuti. Se invece dell'emoglobina venisse utilizzata la mioglobina, la saturazione sa-

rebbe sempre del 98% nei polmoni, ma nei tessuti sarebbe del 91%. Quindi un totale di $98 - 91 = 7\%$ dei potenziali siti di legame contribuirebbero al trasporto dell'ossigeno; in altre parole, la mioglobina lega l'ossigeno troppo saldamente, per essere un buon trasportatore di ossigeno. Si potrebbe immaginare una situazione diversa, cioè ipotizzare una proteina che si sia evoluta in modo ottimale per il trasporto dell'ossigeno, ma senza cooperatività. Per una tale proteina l'ossigeno che potrebbe essere trasportato da un organo dove la pO_2 è di 100 Torr a un altro dove la pO_2 è di 20 Torr è di $63 - 25 = 38\%$. Quindi il legame e il rilascio dell'ossigeno di tipo cooperativo permettono all'emoglobina di distribuire ai tessuti 10 volte più ossigeno di quanto potrebbe essere distribuito dalla mioglobina, e più di 1,7 volte di più di quanto potrebbe essere distribuito da una proteina non dotata di cooperatività.

Un più attento esame delle concentrazioni dell'ossigeno a riposo e durante l'esercizio fisico chiarisce meglio il ruolo dell'emoglobina nel trasporto dell'ossigeno (figura A9). In condizioni di riposo la concentrazione dell'ossigeno nei muscoli è di circa 40 Torr, ma scende a 20 Torr durante l'esercizio fisico. La diminuzione della pressione parziale dell'ossigeno da 100 Torr nei pol-

Torr

Unità di misura della pressione, equivalente alla pressione esercitata da una colonna di mercurio alta 1 mm a 0 °C e a gravità standard (1 mm Hg). Dal nome di Evangelista Torricelli (1608-1647) inventore del barometro a mercurio.

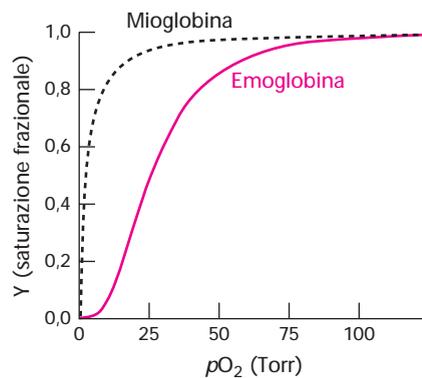


Figura A7 Curva di ossigenazione dell'emoglobina

La curva, ottenuta utilizzando globuli rossi interi, ha pressappoco forma a «S». Il che indica che in ogni molecola di emoglobina sono presenti siti separati per il legame con l'ossigeno, che interagiscono tra loro. La linea tratteggiata nera mostra, per confronto, la curva di ossigenazione della mioglobina.

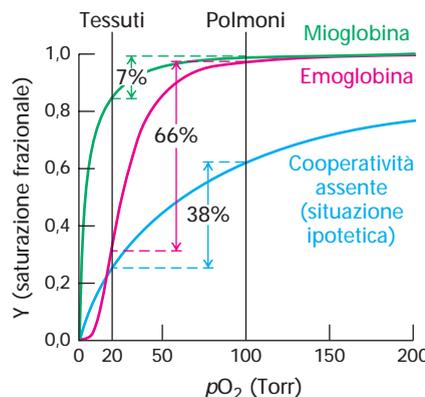
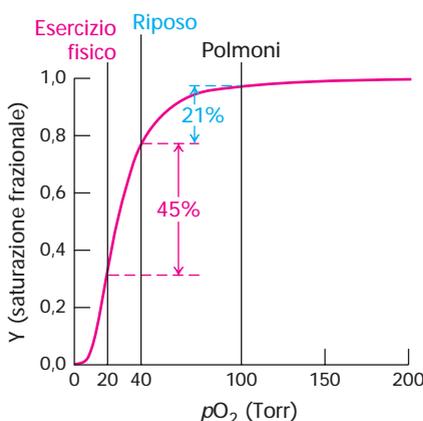


Figura A8 La cooperatività facilita il rilascio dell'ossigeno

La cooperatività tra i siti di legame dell' O_2 fa sì che l'emoglobina rilasci più ossigeno ai tessuti rispetto alla mioglobina e a ogni altra proteina non dotata di cooperatività, anche rispetto a una proteina dotata di affinità ottimale per l'ossigeno.

Figura A9 Effetto dell'esercizio fisico sul trasporto dell'ossigeno

La brusca diminuzione della concentrazione dell'ossigeno da 40 Torr nei tessuti a riposo fino a 20 Torr nei tessuti durante l'esercizio fisico corrisponde alla parte più ripida della curva di ossigenazione. In conseguenza, l'emoglobina è molto efficiente nel rifornire di ossigeno i tessuti durante l'esercizio.



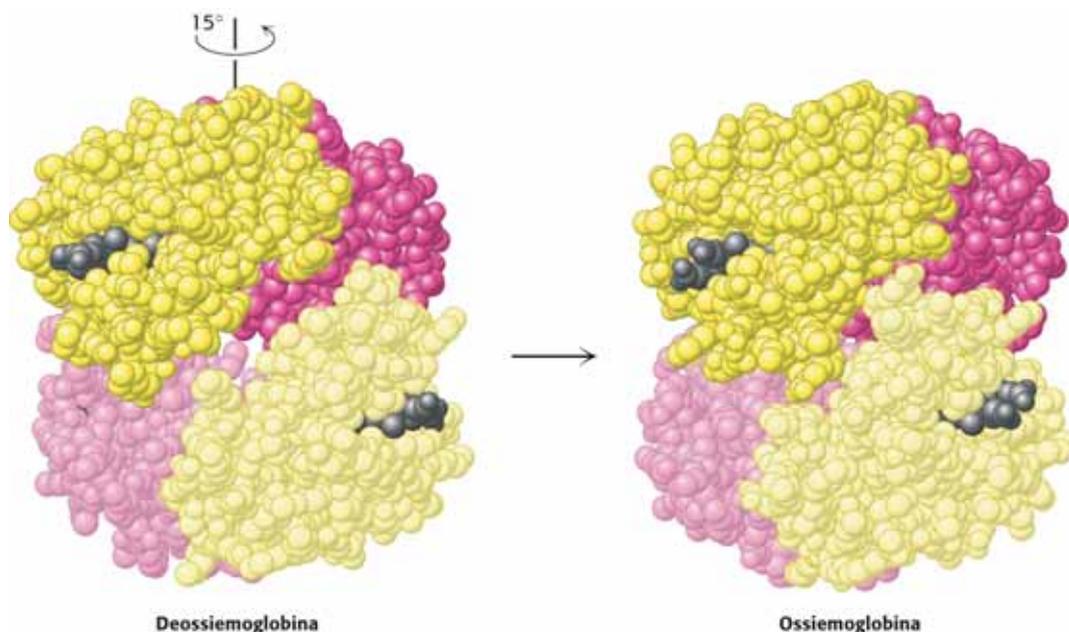
monni a 40 Torr nei tessuti corrisponde a una variazione della saturazione dell'emoglobina dal 98% al 77%. Ne consegue che la quota di ossigeno rilasciato è pari a $98 - 77 = 21\%$ per una diminuzione della pressione parziale dell'ossigeno di 60 Torr. Durante l'esercizio fisico la pressione parziale dell'ossigeno scende da 40 a 20 Torr e la saturazione dell'ossigeno dal 77% al 32%. Ne consegue che la quota di ossigeno rilasciato è pari a $77 - 32 = 45\%$ per una diminuzione della pressione parziale dell'ossigeno di soli 20 Torr. Poiché la variazione della concentrazione dell'ossigeno dalla condizione di riposo all'esercizio fisico corrisponde alla parte più ripida della curva di ossigenazione dell'emoglobina, l'ossigeno può essere trasferito ai tessuti dove è più richiesto. Nel paragrafo A3 verranno esaminate altre proprietà dell'emoglobina, che ne chiariscono meglio il ruolo fisiologico.

L'ossigenazione provoca una sensibile variazione nella struttura quaternaria dell'emoglobina

La cooperatività della curva di ossigenazione comporta che il legame a uno dei quattro siti dell'emoglobina influenzi le proprietà di legame degli altri tre. Una diretta interazione tra i siti non è possibile, perché essi si trovano ben separati nella molecola dell'emoglobina, lontani l'uno dall'altro. Ne consegue che l'interazione deve essere mediata da meccanismi indiretti, correlati con la struttura quaternaria dell'emoglobina.

L'emoglobina va incontro a imponenti variazioni della sua struttura quaternaria durante l'ossigenazione: i dimeri $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ ruotano di circa 15° l'uno rispetto all'altro (figura A10). Però, pur andando incontro a variazioni strutturali, essi mantengono sostanzialmente la stessa forma. È quindi l'interfaccia tra i dimeri $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ a subire le maggiori transizioni strutturali. Studi recenti hanno dimostrato che i dimeri $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ sono più liberi di muoversi l'uno rispetto all'altro nello stato ossigenato, rispetto allo stato deossigenato.

La struttura quaternaria della forma deossigenata dell'emoglobina viene spesso denominata *stato T* (*T* sta per *tense*, «teso») perché le quattro subunità vengono tenute saldamente unite l'una all'altra da interazioni non covalenti. La struttura quaternaria dell'emoglobina totalmente ossigenata viene invece denominata *stato R* (*R* sta per *relaxed*, «rilassato»). Considerando che la forma R dell'emoglobina è meno tesa, le due designazioni, *T* e *R*, appaiono particolarmente ap-

**Figura A10 Variazioni nella struttura quaternaria dell'emoglobina a seguito dell'ossigenazione**

Si noti che, a seguito dell'ossigenazione, un dimero scivola rispetto all'altro, attraverso un movimento di rotazione di 15° . [Fonte: 1A3N.pdb e 1LFO.pdb.]

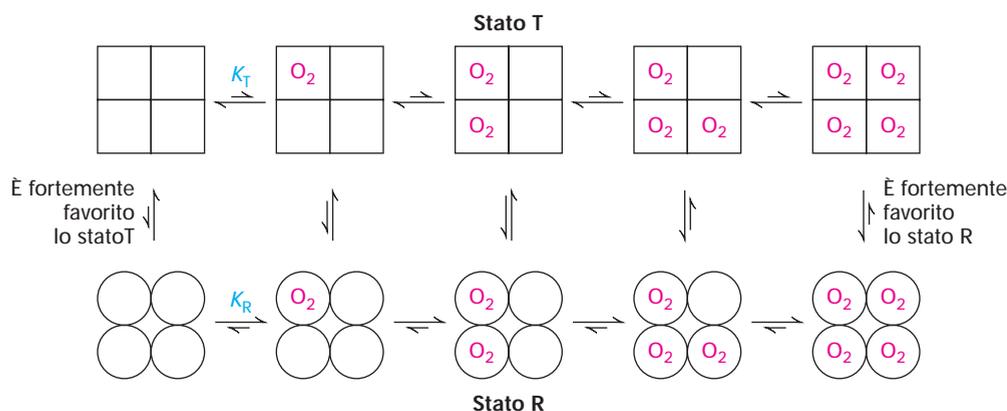


Figura A11 Modello concertato

Tutte le molecole si trovano o nello stato T o nello stato R. A ogni livello di ossigenazione corrisponde un equilibrio tra i due stati T e R. In assenza di ossigeno l'equilibrio è fortemente spostato verso la forma T. In presenza di ossigeno, quando tutti i siti sono legati all'ossigeno, l'equilibrio è fortemente spostato verso la forma R. Lo stato R ha una maggiore affinità per l'ossigeno rispetto allo stato T.

proprie. Quando l'emoglobina si trova nello stato R, i siti di legame dell'ossigeno sono in grado di legare il gas con maggiore affinità rispetto ai siti dell'emoglobina che si trova nello stato T. *Il legame dell'ossigeno a uno dei quattro siti induce una variazione conformazionale dell'emoglobina dallo stato T allo stato R, che a sua volta aumenta l'affinità per l'ossigeno degli altri siti.*

Per spiegare la cooperatività dell'emoglobina si può far ricorso a numerosi modelli

Per spiegare il meccanismo con cui i ligandi possono legarsi in modo cooperativo a proteine multimeriche, come l'emoglobina, sono stati proposti due modelli limite. Nel *modello concertato*, noto anche come *modello MWC*, dai nomi di Jacques Monod, Jeffries Wyman e Jean-Pierre Changeux, che per primi lo proposero, la proteina multimerica può esistere in due stati conformazionali: lo stato T e lo stato R. Il legame del ligando sposta l'equilibrio tra i due stati (figura A11). Quindi, man mano che il tetramero dell'emoglobina lega una molecola di ossigeno, aumenta la probabilità che assuma lo stato conformazionale R. Nella forma deossigenata l'emoglobina si trova quasi esclusivamente nello stato T. Però il legame dell'ossigeno in uno dei siti sposta l'equilibrio verso lo stato R. Quando una molecola assume la struttura quaternaria R, aumenta l'affinità per l'ossigeno dei suoi siti di legame, e quindi aumenta la probabilità che altre molecole di ossigeno si leghino ai siti liberi. Ciò spiega perché la curva di ossigenazione dell'emoglobina sale

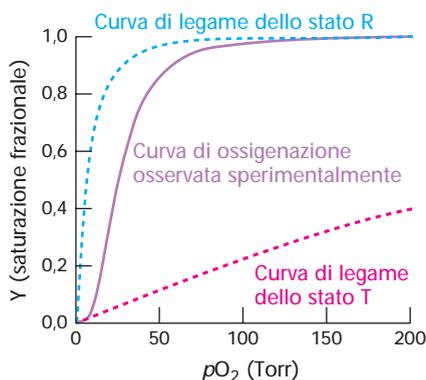


Figura A12 Transizione dallo stato T allo stato R

La curva di ossigenazione dell'emoglobina che si osserva sperimentalmente può essere considerata come la combinazione delle due curve di ossigenazione che si otterrebbero se tutte le molecole di emoglobina rimanessero o nello stato T o nello stato R. La curva sperimentale ha forma sigmoide perché le molecole di emoglobina si convertono dallo stato T allo stato R man mano che l'ossigeno si lega.

lentamente all'inizio, quando tutte le molecole si trovano nello stato T, diventa più ripida via via che aumenta la frazione delle molecole che si trovano nello stato R, e di nuovo si appiattisce, quando tutti i siti delle molecole allo stato R sono occupati dall'ossigeno (figura A12). L'insieme di questi eventi spiega la forma sigmoide della curva di ossigenazione dell'emoglobina, così importante ai fini di un trasporto efficiente dell'ossigeno.

Nel modello concertato ciascun tetramero può esistere solo in due stati: lo stato T e lo stato R. Nel *modello sequenziale*, alternativo al modello concertato, il legame di un ligando a un sito di una proteina multimerica aumenta l'affinità di legame dei siti vicini, senza indurre la completa conversione della proteina dallo stato T allo stato R (figura A13).

Il legame di tipo cooperativo dell'ossigeno viene descritto meglio dal modello concertato o dal

Figura A13 Modello sequenziale

Il legame di un ligando cambia la conformazione della subunità a cui si lega. La variazione conformazionale induce cambiamenti nelle subunità vicine, e la loro affinità per il ligando aumenta.



modello sequenziale? Nessuno dei due modelli da solo è in grado di descrivere compiutamente il comportamento dell'emoglobina. È necessario ricorrere a un modello combinato. Si può affermare che il comportamento dell'emoglobina segue il modello concertato, in quanto la struttura quaternaria dell'emoglobina con tre siti occupati dall'ossigeno è riconducibile in prevalenza allo stato R. Il rimanente sito non occupato ha un'affinità per l'ossigeno 20 volte superiore a quella che ha l'emoglobina completamente deossigenata per la prima molecola di ossigeno. Però il comportamento dell'emoglobina non segue fedelmente il modello concertato, perché quando si lega una sola molecola di ossigeno la struttura quaternaria è riconducibile in prevalenza allo stato T. Tuttavia l'affinità per l'ossigeno di questa molecola monossigenata è tre volte superiore a quella dell'emoglobina deossigenata, in accordo con il modello sequenziale. Questi dati sottolineano che il modello concertato e il modello sequenziale rappresentano casi limite ideali, ai quali i sistemi biologici possono avvicinarsi, ma che raramente raggiungono.

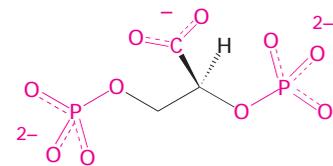
I cambiamenti strutturali a livello dei gruppi eme vengono trasmessi all'interfaccia $\alpha_1\beta_1-\alpha_2\beta_2$

Vediamo ora come il legame dell'ossigeno a un sito sia in grado di spostare l'equilibrio tra lo stato R e lo stato T del tetramero emoglobinico. Come si è visto per la mioglobina, il legame dell'ossigeno fa sì che ciascun atomo di ferro dell'emoglobina si sposti dall'esterno del piano nel piano della porfirina. Quando l'atomo di ferro si muove, insieme a esso si muove anche il residuo di istidina legato alla quinta valenza di coordinazione. Questo residuo di istidina fa parte di un' α -elica, che quindi si muoverà a sua volta (figura A14). La sua terminazione carbossilaterale già

ce nell'interfaccia tra i due dimeri $\alpha\beta$. Il cambio di posizione della terminazione carbossilaterale dell'elica favorisce la transizione dallo stato T allo stato R. In conseguenza, *la variazione strutturale a livello dello ione ferro in una subunità viene direttamente trasmessa alle altre*. Il riordinamento dell'interfaccia tra i due dimeri costituisce un meccanismo molecolare di comunicazione tra le subunità, che rende possibile la cooperatività del legame dell'ossigeno.

Il 2,3-bisfosfoglicerato ha un ruolo fondamentale nel determinare l'affinità dell'ossigeno per l'emoglobina nei globuli rossi

Perché l'emoglobina possa trasferire efficientemente l'ossigeno ai tessuti è importante che la forma T rimanga stabile, fino a che il legame dell'ossigeno la converte nella forma R. Però lo stato T dell'emoglobina è così instabile, che l'equilibrio sarebbe talmente spostato verso lo stato R, da non permettere il rilascio dell'ossigeno in condizioni fisiologiche. È quindi necessario l'intervento di un altro meccanismo, che stabilizzi lo stato T. Tale meccanismo venne scoperto confrontando le proprietà di legame dell'ossigeno dell'emoglobina all'interno dei globuli rossi con quelle dell'emoglobina altamente purificata (figura A15). L'emoglobina purificata lega l'ossigeno molto più saldamente dell'emoglobina intraeritrocitaria. Questa drastica differenza è dovuta alla presenza nei globuli rossi del *2,3-bisfosfoglicerato* (2,3-BPG; noto anche come 2,3-difosfoglicerato o 2,3-DPG).



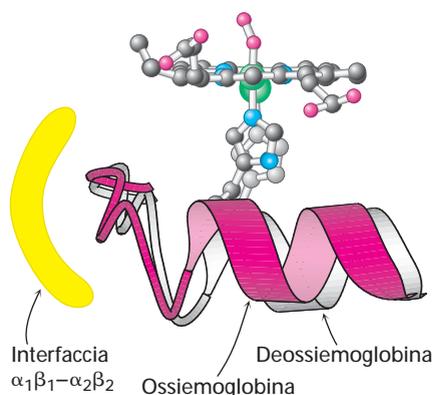
2,3-Bisfosfoglicerato
(2,3-BPG)

Questo composto fortemente anionico è presente nei globuli rossi a una concentrazione approssimativamente pari a quella dell'emoglobina (circa 2 mM). In assenza di 2,3-BPG l'emoglobina sarebbe un trasportatore di ossigeno estremamente inefficiente, perché potrebbe rilasciare nei tessuti soltanto l'8% del suo carico di ossigeno.

In che modo il 2,3-BPG diminuisce in modo così rilevante l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno? L'esame della struttura cristallina della deossiemoglobina in presenza di 2,3-BPG ha rivelato che una singola molecola di 2,3-BPG si

Figura A14 Modifiche conformazionali nell'emoglobina

Il movimento dello ione ferro che si verifica a seguito dell'ossigenazione porta il residuo di istidina legato al ferro verso l'anello porfirinico. Il movimento dell' α -elica a cui a sua volta è legata l'istidina modifica l'interfaccia tra i dimeri $\alpha\beta$, inducendo altre modificazioni strutturali. A scopo di confronto, la struttura della deossiemoglobina è mostrata in grigio, dietro quella dell'ossiemoglobina in colore.



lega al centro del tetramero, in una tasca che è presente solo nella forma T (figura A16). A seguito della transizione dallo stato T allo stato R la tasca si contrae e il 2,3-BPG è rilasciato. Perché la transizione dallo stato T allo stato R possa aver luogo, è necessario che i legami tra il 2,3-BPG e l'emoglobina siano rotti. In presenza di 2,3-BPG, un maggior numero di siti di legame per l'ossigeno deve essere occupato, per promuovere la transizione dallo stato T allo stato R; pertanto l'emoglobina rimane allo stato T di bassa affinità finché non viene raggiunta una più elevata concentrazione di ossigeno.

La regolazione dell'emoglobina da parte del 2,3-BPG è di notevole interesse, perché il 2,3-BPG non assomiglia in alcun modo all'ossigeno, la molecola sulla quale l'emoglobina esercita la sua funzione. Il 2,3-BPG viene denominato *effettore allosterico* (dal greco *allos*, «altro» e *stereos*, «struttura»). La regolazione da parte di molecole non correlate strutturalmente all'ossigeno è possibile, perché l'effettore allosterico si lega a un sito che è completamente distinto da quello a cui si lega l'ossigeno. Gli effettori allosterici vengono presi in considerazione anche nel capitolo 10, trattando la regolazione enzimatica.

■ Il legame del 2,3-BPG all'emoglobina ha altre importanti implicazioni fisiologiche. Il gene per la globina espresso dal feto umano differisce da quello espresso dall'adulto; il tetramero dell'*emoglobina fetale* è formato da due catene α e da due catene γ . La sequenza amminoacidica della catena γ , che è il prodotto di una duplicazione genica, è per il 72% identica alla sequenza

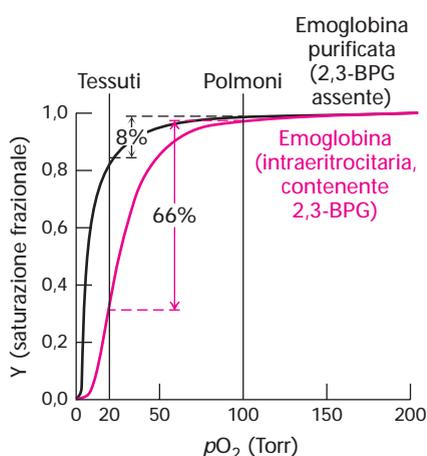


Figura A15 Curve di ossigenazione dell'emoglobina purificata e dell'emoglobina intraeritrocitaria a confronto

L'emoglobina purificata lega l'ossigeno più saldamente dell'emoglobina intraeritrocitaria. La differenza è dovuta alla presenza del 2,3-bisfosfoglicerato nei globuli rossi.

amminoacidica della catena β . Una differenza importante è la presenza di un residuo di serina in posizione 143 nella catena γ , che sostituisce una istidina presente nella stessa posizione nella catena β . Poiché l'istidina fa parte del sito di legame del 2,3-BPG, la rimozione di due cariche positive (una per ogni catena) riduce l'affinità del 2,3-BPG per l'emoglobina fetale. In conseguenza, l'affinità per l'ossigeno dell'emoglobina fetale è più alta di quella materna (figura A17). Tale differenza di affinità rende possibile il trasferimento dell'ossigeno dai globuli rossi materni a quelli fetali. Si tratta di un esempio che dimostra come la duplicazione genica e la specializzazione molecolare abbiano permesso la rapida soluzione di un problema biologico; nel caso specifico, il trasporto dell'ossigeno dalla madre al feto.

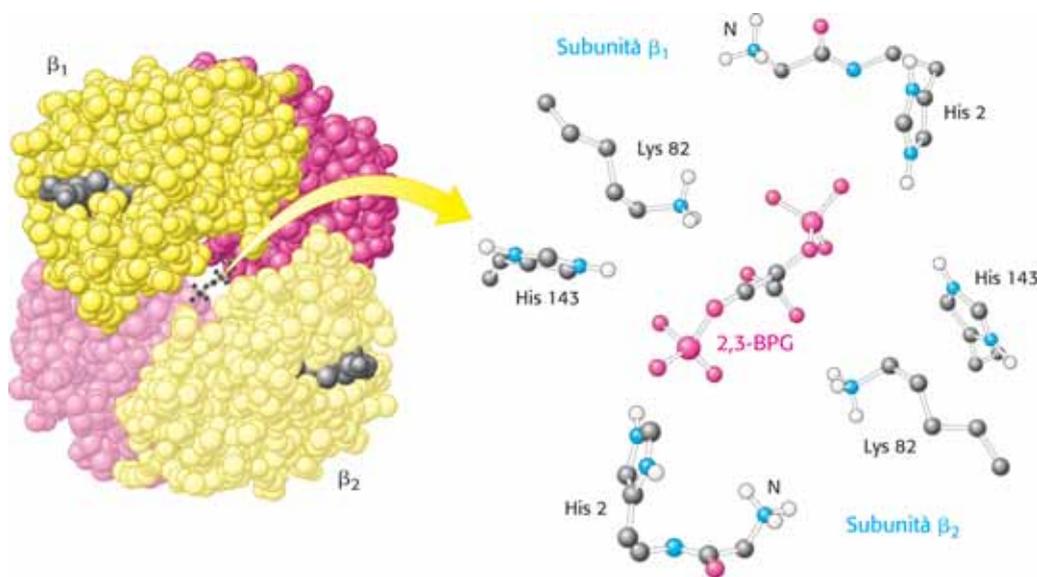
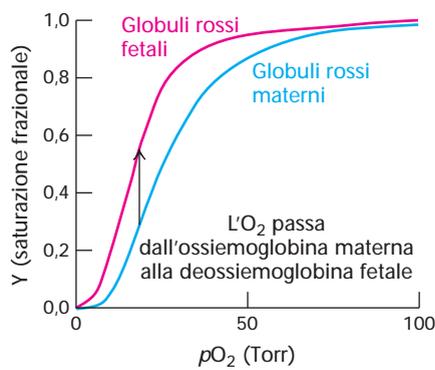


Figura A16 Legame del 2,3-BPG alla deossiemoglobina umana

Il 2,3-bisfosfoglicerato si posiziona nella cavità centrale della deossiemoglobina (a sinistra), dove interagisce con tre gruppi carichi positivamente, appartenenti a ciascuna delle catene β (a destra). [Fonte: 1B86.pdb.]

Figura A17 Affinità per l'ossigeno dei globuli rossi fetali

I globuli rossi fetali hanno maggiore affinità per l'ossigeno rispetto ai globuli rossi materni, perché l'emoglobina fetale non lega il 2,3-BPG con la stessa affinità dell'emoglobina materna.



A3 GLI IONI IDROGENO E IL BISSIDO DI CARBONIO PROMUOVONO IL RILASCIO DELL'OSSIGENO: L'EFFETTO BOHR

Abbiamo visto come il meccanismo cooperativo di rilascio dell'ossigeno dall'emoglobina permetta un'adeguata distribuzione dell'ossigeno ai tessuti, dove la pressione parziale dell'ossigeno è bassa. Ma l'emoglobina risponde anche ad altre molecole segnale, presenti nel suo ambiente fisiologico, che segnalano il bisogno di ossigeno. I tessuti a rapido metabolismo, come il muscolo in contrazione, producono ioni idrogeno e biossido di carbonio in notevole quantità. L'emoglobina è in grado di rispondere prontamente ai livelli elevati di questi due composti, in modo da rilasciare più ossigeno proprio dove ve ne è più bisogno. Come il 2,3-BPG, lo ione idrogeno e il biossido di carbonio sono *effettori allosterici*, che si legano all'emoglobina in siti distinti dai siti di legame dell'ossigeno. La regolazione del legame dell'ossigeno da parte degli ioni idrogeno e del biossido di carbonio va sotto il nome di *effetto Bohr*, dal nome di Christian Bohr, che per primo la descrisse nel 1904.

L'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno di-

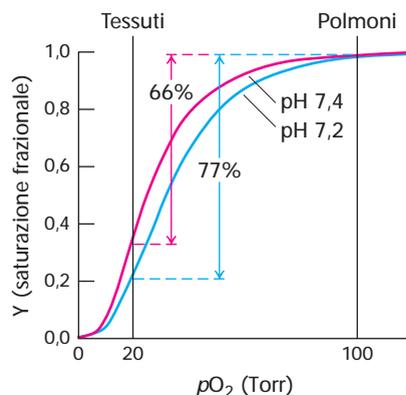


Figura A18 Effetto del pH sull'affinità per l'ossigeno dell'emoglobina

Una diminuzione del pH da 7,4 (curva rossa) a 7,2 (curva blu) risulta in un maggior rilascio di O₂ dall'ossiemoglobina.

minuisce al diminuire del pH, a partire dal valore fisiologico di 7,4 (figura A18). In conseguenza, man mano che l'emoglobina raggiunge distretti in cui il pH tende a diminuire, la sua tendenza a rilasciare ossigeno aumenta. Per esempio, il trasporto dell'ossigeno dai polmoni, dove il pH è 7,4 e la pressione parziale dell'ossigeno è di 100 Torr, al muscolo in contrazione, dove il pH è 7,2 e la pressione parziale dell'ossigeno è 20 Torr, risulta in un rilascio di ossigeno pari al 77% della capacità di trasporto totale. Se non vi fosse variazione di pH, la capacità di trasporto si ridurrebbe al 66%. Studi di carattere strutturale e chimico hanno permesso di chiarire molti aspetti responsabili dell'effetto Bohr. Almeno due sono i gruppi chimici responsabili: i gruppi α -amminici degli amminoacidi terminali delle catene α e i residui delle istidine β 146 e α 122. Per ognuno di essi il valore del pK_a è intorno a 7. Consideriamo l'istidina β 146, che occupa la terminazione carbossilica della catena β . Nella deossiemoglobina il gruppo carbossilico terminale dell'amminoacido β 146 forma un ponte salino con un residuo di lisina della subunità α dell'altro dimero $\alpha\beta$. Tale interazione blocca la catena laterale dell'istidina 146 in una posizione tale da poter formare un ponte salino con la carica negativa dell'aspartato 94 della stessa catena, purché il gruppo imidazolico del residuo di istidina sia protonato (figura A19).

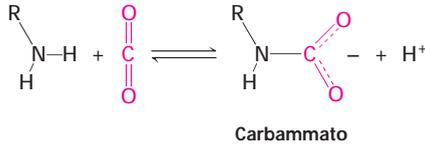
Anche gli altri gruppi partecipano alla formazione di legami salini presenti nella forma T. *La formazione dei ponti salini stabilizza lo stato T, favorendo in tal modo il rilascio dell'ossigeno.* A pH più elevati, la catena laterale dell'istidina non è protonata, e il ponte salino non si forma. Ma, man mano che il valore di pH si abbassa, la catena laterale dell'istidina β 146 si protona, si forma il ponte salino con l'aspartato β 94, e si stabilizza lo stato T.

Il biossido di carbonio, una molecola neutra, attraversa la membrana del globulo rosso e penetra nella cellula. Il trasporto è facilitato da trasportatori di membrana, che includono le proteine del tipo Rh. Il biossido di carbonio favorisce il rilascio dell'ossigeno con due meccanismi. Primo, la presenza di elevate concentrazioni di biossido di carbonio provoca una diminuzione del pH intraeritrocitario (figura A20). Il biossido di carbonio reagisce con l'acqua e forma acido carbonico, H₂CO₃. La reazione viene accelerata dall'*anidrasi carbonica*, una proteina enzimatica abbondante nei globuli rossi, che viene trattata diffusamente nel capitolo 9. L'acido carbonico è un acido forte, con un pK_a di 3,5. Quindi, una volta formatosi, si dissocia per formare

ione bicarbonato, HCO_3^- , e H^+ . Ne deriva un abbassamento del pH, che stabilizza lo stato T dell'emoglobina col meccanismo riportato sopra.

Il secondo meccanismo comporta una interazione diretta tra il biossido di carbonio e l'emoglobina, che stimola il rilascio dell'ossigeno. Si può ben apprezzare l'effetto del biossido di carbonio sull'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno, comparando le curve di ossigenazione in assenza e in presenza di biossido di carbonio alla pressione parziale di 40 Torr e a pH 7,2 (figura A21). In presenza di biossido di carbonio e alla pressione parziale di 40 Torr e a pH 7,2 la quantità di ossigeno rilasciata si avvicina al 90% della massima capacità di trasporto.

Il biossido di carbonio stabilizza la deossiemoglobina reagendo con i gruppi amminici terminali e formando così residui di *carbammato* carichi negativamente, diversamente dalle cariche neutre o positive dei gruppi amminici liberi.



I gruppi amminici terminali giacciono sull'interfaccia, tra i dimeri $\alpha\beta$ e i gruppi carichi negativamente del carbammato, e partecipano alla formazione di legami salini, che stabilizzano lo stato T, favorendo il rilascio dell'ossigeno. Questo processo costituisce anche un meccanismo per il trasporto del biossido di carbonio, ma solo per il 14% del totale del biossido di carbonio trasportato.

La maggior parte del biossido di carbonio rilasciata dagli eritrociti raggiunge i polmoni sotto forma di ione bicarbonato, HCO_3^- , prodotto per idratazione del biossido di carbonio all'interno degli eritrociti stessi (figura A22). L' HCO_3^- viene poi trasportato all'esterno da uno specifico trasportatore, localizzato sulla membrana eritrocitaria, che scambia l' HCO_3^- intracellulare con lo ione Cl^- extracellulare. Ne consegue un aumento della concentrazione sierica dell' HCO_3^- . In tal modo una notevole quantità di biossido di carbonio viene trasportata dai tessuti ai polmoni sotto forma di HCO_3^- . Nei polmoni il processo si inverte: lo ione HCO_3^- viene riconvertito in biossido di carbonio, che viene eliminato attraverso l'espirazione. In sintesi, il biossido di carbonio, generato dal metabolismo tissutale, viene convertito negli eritrociti in una forma che contribuisce ad abbassare il pH intracellulare, favorendo il rilascio dell'ossigeno, e che viene poi trasportato dal sangue fino ai polmoni, per essere espirato.

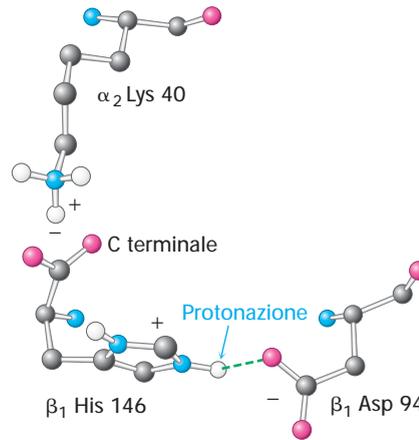


Figura A19 Le basi chimiche dell'effetto Bohr

Nella deossiemoglobina tre residui amminocidici formano due ponti salini che stabilizzano la struttura quaternaria nello stato T. La formazione di uno dei ponti salini dipende dalla presenza di un protone sull'anello imidazolico dell'istidina β 146. La vicinanza della carica negativa dell'aspartato β 94 nella deossiemoglobina favorisce la protonazione dell'istidina. Si noti che il ponte salino tra l'istidina β 146 e l'aspartato β 94 viene stabilizzato da un legame a idrogeno (linea verde tratteggiata).

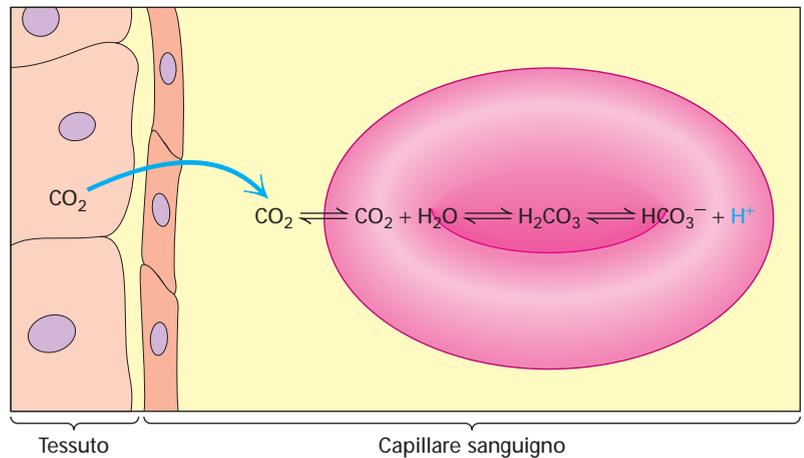


Figura A20 Biossido di carbonio e pH

Il biossido di carbonio diffonde dai tessuti ai globuli rossi. All'interno dei globuli rossi reagisce con l'acqua, per formare acido carbonico, attraverso una reazione catalizzata dall'anidrasi carbonica. L'acido carbonico si dissocia, formando HCO_3^- e H^+ , con conseguente abbassamento del pH intraeritrocitario.

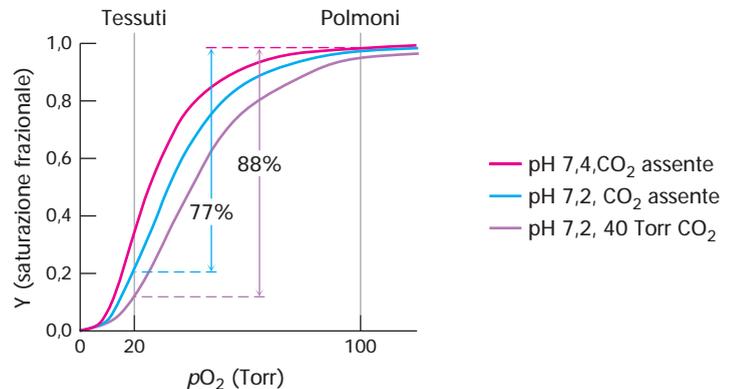
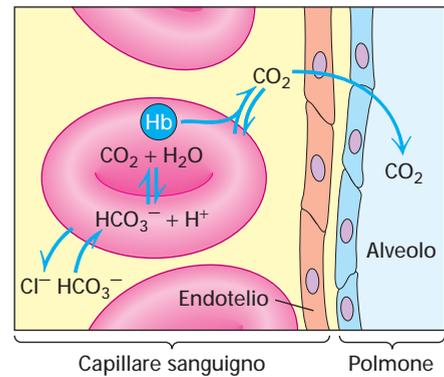
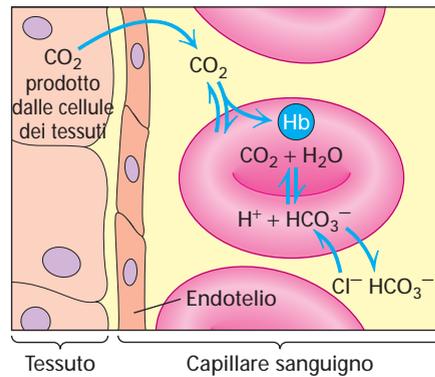


Figura A21 Effetti del biossido di carbonio

La presenza del biossido di carbonio diminuisce l'affinità per l'ossigeno al di sotto dell'effetto dovuto alla diminuzione del pH. Il trasporto dell'ossigeno dai tessuti ai polmoni viene così ulteriormente facilitato.

Figura A22 Trasporto di CO₂ dai tessuti ai polmoni

La maggior parte del biossido di carbonio viene trasportata ai polmoni sotto forma di ione HCO₃⁻ prodotto nei globuli rossi e quindi trasferito nel plasma. Una minor quantità viene trasportata dall'emoglobina, sotto forma di carbammato.



A4 LE MUTAZIONI NEI GENI CHE CODIFICANO PER LE SUBUNITÀ DELL'EMOGLOBINA SONO RESPONSABILI DI ALCUNE MALATTIE

Oggi, dopo il sequenziamento del genoma umano, siamo abituati a pensare che variazioni nella sequenza amminoacidica delle proteine, codificata dai geni, siano la causa di specifiche malattie. L'ipotesi che molte malattie possano essere causate da difetti molecolari fu avanzata da Linus Pauling nel 1949 (4 anni prima che Watson e Crick proponessero la doppia elica del DNA) per spiegare la patogenesi di una malattia denominata *anemia a cellule falciformi*. Il nome deriva dalla forma a falce degli eritrociti privati di ossigeno, che si osserva nei soggetti affetti dalla malattia (figura A23). Pauling propose che l'anemia falciforme potesse essere causata da una specifica variazione della sequenza amminoacidica di una delle due catene dell'emoglobina. Oggi sappiamo che l'ipotesi di Pauling è corretta. Infatti circa il 7% della popolazione umana è affetto da

forme patologiche, causate da una variazione della sequenza amminoacidica dell'emoglobina. Concluderemo questo capitolo trattando le due più importanti emoglobinopatie: l'anemia a cellule falciformi e la talassemia.

L'anemia a cellule falciformi risulta dall'aggregazione di molecole mutate di deossiemoglobina

■ I soggetti affetti da anemia a cellule falciformi presentano una serie di sintomi rilevanti. L'esame dei globuli rossi rivela la presenza di lunghi aggregati fibrosi di emoglobina (figura A24). Le fibre si estendono all'interno dei globuli rossi, distorcendoli. I capillari vengono ostruiti e il flusso ematico rallentato. Ne risulta un doloroso gonfiore alle estremità e un elevato rischio di infarto e di infezioni batteriche (conseguenza della cattiva circolazione). Le cellule falciformi non rimangono in circolo tanto a lungo quanto gli eritrociti normali, causando anemia.

Qual è il difetto molecolare associato all'anemia a cellule falciformi? Nel 1956 Vernon Ingram, utilizzando tecniche cromatografiche innovative, dimostrò che una semplice sostituzione amminoacidica nella catena β dell'emoglobina è responsabile della malattia, precisamente la sostituzione di un residuo di glutammato con un residuo di valina in posizione 6. La forma mutata viene denominata *emoglobina S* (HbS). Nei soggetti affetti da anemia a cellule falciformi, ambedue gli alleli del gene per la catena β dell'emoglobina (HbB) sono mutati. La sostituzione presente nell'HbS diminuisce sensibilmente la solubilità della deossiemoglobina, anche se non altera in modo evidente le proprietà dell'ossiemoglobina.

L'esame della struttura dell'emoglobina S rivela che il residuo di valina si trova sulla superficie dell'emoglobina allo stato T (figura A25). Questa nuova zona idrofoba interagisce con un'al-



Figura A23 Emazie falciformi

Immagine al microscopio elettronico a scansione, che mostra una emazia falciforme, accanto ad alcune emazie normali.

tra zona idrofoba, formata dalla Phe 85 e dalla Val 88 della catena β di una molecola di emoglobina adiacente, iniziando un processo di aggregazione. Un'analisi più approfondita ha dimostrato che una singola fibra di emoglobina S è formata dall'insieme di 14 filamenti di molecole di emoglobina S legate l'una all'altra. Come mai gli aggregati non si formano quando l'emoglobina S è ossigenata? L'emoglobina S ossigenata si trova nello stato S, e i residui Phe 85 e Val 88 delle catene β si trovano nascosti all'interno della molecola. Al residuo idrofobo di Val in posizione 6 della catena β viene quindi a mancare un partner con cui interagire, e il processo di formazione delle fibre non può essere innescato.

Nell'Africa occidentale circa l'1% della popolazione è affetto da anemia a cellule falciformi. Visto che la malattia ha conseguenze talvolta devastanti, come mai è così diffusa in Africa e in altre particolari zone? Ricordiamo che ambedue le copie del gene dell'HbB sono mutate nei soggetti affetti da anemia a cellule falciformi. Tuttavia i soggetti con una copia del gene HbB e una copia del gene HbS sono relativamente sani. Essi sono però portatori del *tratto per l'anemia falciforme*, perché possono trasmettere il gene dell'HbS. Questi soggetti portatori sono resistenti alla *malaria*, una malattia dovuta a un parassita, il *Plasmodium falciparum*, che è presente nel globulo rosso durante uno stadio del suo ciclo vitale. L'effetto devastante della malaria sulla salute e sulla possibilità riproduttiva di popolazioni che vivono in regioni dove storicamente la malaria ha avuto una diffusione endemica, ha favorito i portatori del tratto dell'anemia falciforme, aumentando così la prevalenza dell'allele HbS (figura A26).

La talassemia è causata da una sintesi sbilanciata delle catene emoglobiniche

■ L'anemia a cellule falciformi è causata dalla sostituzione di un singolo amminoacido in una delle catene dell'emoglobina. Invece la *talassemia*, l'altra emoglobinopatia a carattere ereditario largamente diffusa, è causata dalla perdita o dalla netta diminuzione di una singola *catena*. In conseguenza, il livello di emoglobina normale e la produzione di emoglobina nei globuli rossi sono notevolmente ridotti, con conseguente insorgenza di anemia, astenia, pallore diffuso e alterazioni funzionali a livello della milza e del fegato. La talassemia comprende diverse sindromi correlate. Nella α -talassemia, la catena α dell'emoglobina non è prodotta in sufficiente quantità. In conseguenza, si formano tetrameri emoglobinici

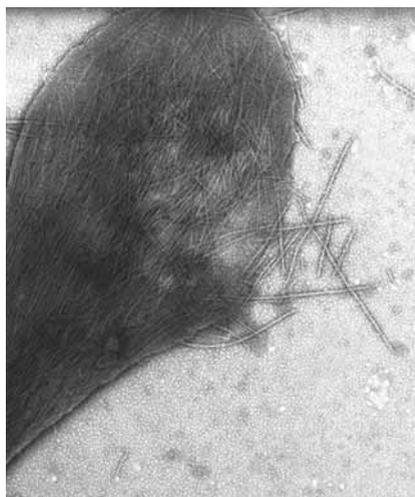


Figura A24 Fibre di emoglobina presenti nelle cellule falciformi

Fotografia al microscopio elettronico a scansione, che mostra un globulo rosso da cui fuoriescono fibre di emoglobina S. [Fonte: Per gentile concessione di Robert Josephs e Thomas E. Wellemis, University of Chicago.]

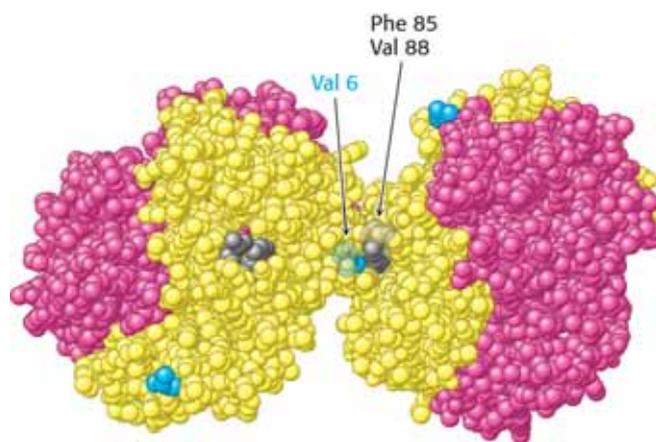


Figura A25 Emoglobina S deossigenata

L'interazione tra la Val 6 (in blu) della catena β di una molecola emoglobinica deossigenata e la zona idrofoba formata dalla Phe 85 e dalla Val 88 (in grigio) di una seconda molecola di emoglobina deossigenata provoca l'aggregazione di molecole di emoglobina. Il residuo della Val 6 esposto sulla superficie della catena β della seconda molecola di emoglobina partecipa a un'altra identica interazione, e così via. Si formano così lunghe fibre di emoglobina S. [Fonte: 2HBS.pdb.]

formati solo da catene β . Tali tetrameri, denominati *emoglobina H* (HbH), legano l'ossigeno, ma con una affinità abnormemente alta e in modo non cooperativo. Ne risulta un insufficiente rilascio di ossigeno nei tessuti. Nella β -talassemia sono le catene β dell'emoglobina a non essere prodotte in quantità sufficiente. In assenza di catene β , le catene α formano aggregati insolubili che precipitano all'interno dei globuli rossi immaturi. La diminuzione dei globuli rossi conduce ad anemia. La forma più grave di β -talassemia è chiamata *talassemia maior* o *anemia di Cooley* (*morbo di Cooley*).

Sia la α - sia la β -talassemia sono associate a vari tipi di alterazioni genetiche, e si manifestano con quadri clinici molto differenziati. Le for-

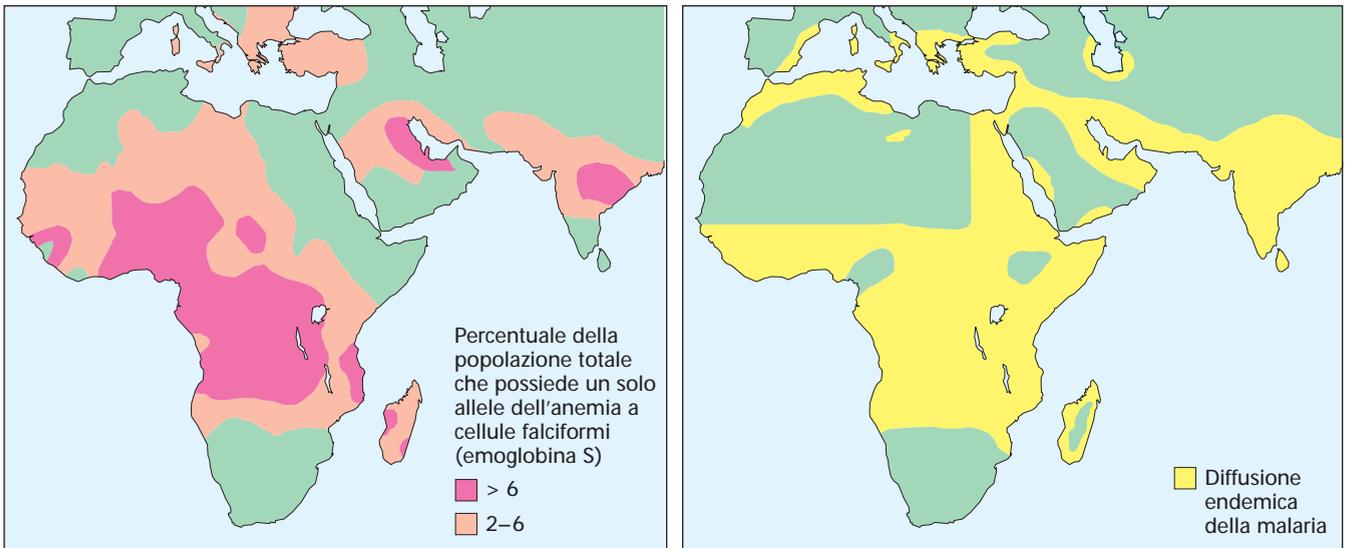


Figura A26 Tratto dell'anemia a cellule falciformi e malaria

Esiste una significativa correlazione tra le regioni ad alta frequenza dell'allele HbS e le regioni con alta incidenza della malaria.

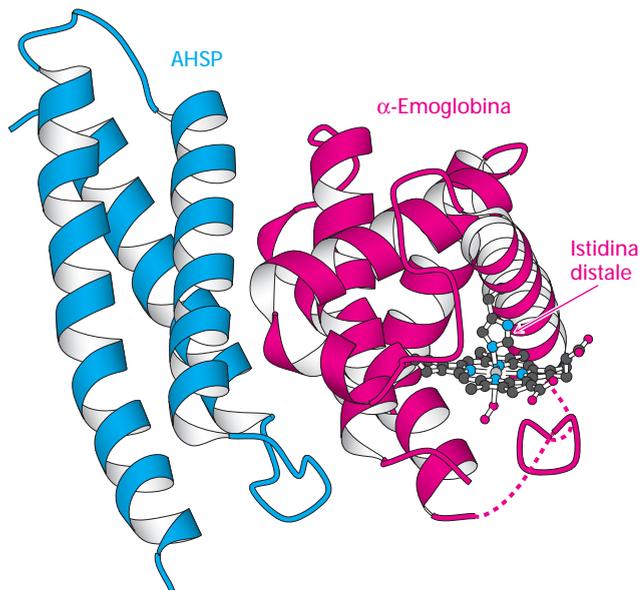


Figura A27 Stabilizzazione dell' α -emoglobina

Viene mostrata la struttura del complesso tra AHSP e α -emoglobina. In questo complesso l'atomo di ferro si lega all'ossigeno e all'istidina distale. Si noti che l'AHSP interagisce con l' α -emoglobina sulla stessa zona di interazione della β -emoglobina. [Fonte: 1Y01.pdb.]

me più gravi di α -talassemia risultano letali prima, o subito dopo la nascita. Però sono piuttosto rare. Se si considera il repertorio dei geni per l'emoglobina nel genoma umano, se ne trova la spiegazione. Normalmente l'uomo possiede quattro alleli per la catena α , anziché due, disposti in modo che due geni sono localizzati uno accanto all'altro alla terminazione di ciascun cromosoma 16. Pertanto la completa assenza della catena α richiede che siano alterati quattro alleli. La β -talassemia è più comune, perché normalmente abbiamo solo due alleli per la catena β , uno su ciascuna copia del cromosoma 11.

Normalmente le catene α dell'emoglobina non si accumulano

La presenza di quattro geni che esprimono la catena α , contro i due per la catena β , suggerisce che la catena α venga prodotta in eccesso (assumendo semplicisticamente che l'entità dell'espressione delle catene α da parte di ogni gene sia la stessa). Se l'ipotesi è corretta, perché l'eccesso di catene α non precipita? Una recente scoperta ha messo in evidenza un meccanismo che mantiene le catene α in soluzione. I globuli rossi producono una proteina di 11 kD, denominata *proteina stabilizzante l' α -emoglobina* (AHSP). Il complesso è solubile. La struttura cristallina del complesso tra l'AHSP e l' α -emoglobina mostra che l'AHSP interagisce sulla stessa faccia dell' α -emoglobina, dove interagisce la β -emoglobina (figura A27). L'AHSP si lega sia alla forma deossigenata sia alla forma ossigenata della catena α . Nel complesso con l'ossigeno legato è l'istidina distale, anziché l'istidina prossimale, che lega l'ossigeno.

L'AHSP ha la funzione di legare l' α -emoglobina, man mano che questa viene sintetizzata. Invece la β -emoglobina, man mano che viene prodotta, sposta l'AHSP, perché il complesso dimerico α -emoglobina- β -emoglobina è più stabile del complesso α -emoglobina-AHSP. Quindi l'AHSP previene l'accumulo e la precipitazione dell' α -emoglobina libera. Sono in corso ricerche intese a verificare se le mutazioni del gene che codifica l'AHSP giocano un ruolo nel modulare la gravità della β -talassemia.

Il genoma umano codifica anche per altre globine

■ In aggiunta a quelli per la mioglobina, per l' α -emoglobina e per la β -emoglobina, il genoma umano aploide contiene altri geni per le globine? Abbiamo già parlato dell'emoglobina fetale, che contiene una catena γ al posto della catena β . Ma durante lo sviluppo vengono espressi geni che codificano per altri tipi di subunità emoglobiniche, note come catena δ , catena ε e catena ζ .

Il recente sequenziamento del genoma umano ha rivelato la presenza di altre due globine. Entrambe sono proteine monomeriche, quindi più somiglianti alla mioglobina che all'emoglo-

bina. La prima, denominata *neuroglobina*, viene espressa soprattutto nel sistema nervoso centrale, e in particolare nella retina. La neuroglobina potrebbe avere un ruolo protettivo contro l'ipossia (apporto insufficiente di ossigeno). La seconda, denominata *citoglobina*, ha una distribuzione più ampia. Studi strutturali e spettroscopici hanno rivelato che nella neuroglobina e nella citoglobina sia l'istidina prossimale sia l'istidina distale vengono coordinate dal ferro nella forma deossigenata; ma a seguito dell'ossigenazione l'istidina distale si stacca. Ulteriori studi potranno chiarire il ruolo funzionale di questi due membri della famiglia delle globine.

SOMMARIO

A1 La mioglobina e l'emoglobina legano l'ossigeno a livello dell'atomo di ferro dell'eme

La mioglobina è una proteina formata in gran parte da α -eliche, alle quali si lega il gruppo prostetico eme. L'eme è formato da una componente organica, una protoporfirina che a sua volta è costituita da quattro anelli pirrolici con uno ione ferro centrale allo stato di ossidazione Fe^{2+} . Nella mioglobina lo ione ferro è coordinato con un residuo di istidina, denominato istidina prossimale. Uno degli atomi di ossigeno della molecola biatomica O_2 si lega a uno dei siti di coordinazione dello ione ferro. A causa del parziale trasferimento elettronico dal ferro all'ossigeno, il ferro si sposta nel piano della porfirina a seguito del legame dell'ossigeno. L'emoglobina è formata da quattro catene polipeptidiche: due catene α e due catene β . Ognuna di esse possiede una sequenza amminoacidica simile a quella della mioglobina. Anche il loro avvolgimento spaziale, a formare una struttura tridimensionale, è simile a quello della mioglobina. Il tetramero dell'emoglobina può essere considerato formato da due dimeri $\alpha\beta$.

A2 L'emoglobina lega l'ossigeno con un meccanismo cooperativo

La curva di ossigenazione della mioglobina descrive un semplice processo di equilibrio. La mioglobina si satura per il 50% a una pressione parziale di ossigeno di circa 2 Torr. La curva di saturazione dell'ossigeno dell'emoglobina ha forma a «S» (sigmoidale), indicando che l'ossigeno si lega in modo cooperativo. Il legame dell'ossigeno a uno dei siti di legame del tetramero emoglobinico influenza l'affinità per l'ossigeno degli altri siti. La cooperatività del legame e del rilascio dell'ossigeno aumenta significativamente l'efficienza del trasporto. Infatti l'entità del trasporto dell'ossigeno dai polmoni (dove la pressione parziale dell'ossigeno è di 100 Torr) ai tessuti (dove la pressione parziale è di 20 Torr) è pari al 66% della potenzialità massima (in altri termini, il 66% dell'ossigeno presente nell'ossiemoglobina formatasi nei polmoni viene rilasciato nei tessuti). Se la mioglobina fosse stata scelta per trasportare l'ossigeno, l'entità del trasporto sarebbe solo del 7%.

La struttura quaternaria dell'emoglobina cambia a seguito del legame con l'ossigeno. Quella della deossiemoglobina viene denominata stato T. Quella dell'ossiemoglobina viene denominata stato

R. I due dimeri $\alpha\beta$ ruotano approssimativamente di 15° l'uno rispetto all'altro durante la transizione dallo stato T allo stato R. La cooperatività della curva di ossigenazione può essere spiegata ricorrendo al modello concertato o al modello sequenziale. Nel modello concertato, ciascuna molecola di emoglobina assume o lo stato T, o lo stato R; l'equilibrio tra i due stati è determinato dal numero di siti di legame occupati dall'ossigeno. Il modello sequenziale, invece, ammette l'esistenza di strutture ibride intermedie. I cambiamenti strutturali che avvengono a livello del ferro legato alla porfirina in risposta al legame dell'ossigeno vengono trasmessi all'interfaccia tra i due dimeri, influenzando l'equilibrio tra lo stato T e lo stato R.

I globuli rossi contengono un trioso fosfato, il 2,3-bisfosfoglicerato, a una concentrazione approssimativamente uguale a quella dell'emoglobina. Il 2,3-BPG si lega saldamente allo stato T, ma non allo stato R, stabilizzandolo, e diminuendo l'affinità per l'ossigeno dell'emoglobina. L'emoglobina fetale lega l'ossigeno meglio dell'emoglobina dell'adulto, perché lega il 2,3-BPG più debolmente. Questa differenza tra le due emoglobine permette all'ossigeno di passare dal sangue materno a quello fetale.

A3 Gli ioni idrogeno e il biossido di carbonio promuovono il rilascio dell'ossigeno: l'effetto Bohr

L'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno è fortemente influenzata dal pH e dalla presenza di biossido di carbonio, un fenomeno noto come effetto Bohr. L'aumento della concentrazione degli ioni idrogeno, cioè la diminuzione del pH, diminuisce l'affinità per l'ossigeno dell'emoglobina, a causa della protonazione di alcuni residui di istidina. Una volta protonati, i residui di istidina contribuiscono a stabilizzare lo stato T. L'aumento della concentrazione del biossido di carbonio diminuisce l'affinità per l'ossigeno dell'emoglobina attraverso due meccanismi. Il biossido di carbonio viene convertito in acido carbonico, che a sua volta abbassa l'affinità per l'ossigeno dell'emoglobina diminuendo il pH intraeritrocitario. Oppure si lega ai gruppi amminoterminali dell'emoglobina, formando residui di carbammato. Le cariche negative del carbammato stabilizzano la deossiemoglobina per mezzo di interazioni ioniche. Poiché gli ioni idrogeno e il biossido di carbonio si producono attivamente nei tessuti a rapido metabolismo, l'effetto Bohr favorisce il rilascio dell'ossigeno nei distretti dove ce n'è più bisogno.

A4 Le mutazioni dei geni che codificano per le subunità dell'emoglobina sono responsabili di alcune malattie

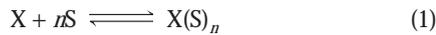
L'anemia a cellule falciformi è causata dalla sostituzione di un residuo di glutammato con uno di valina nella catena β dell'emoglobina. Si genera così una zona idrofoba sulla superficie della deossiemoglobina (stato T), che provoca la formazione di polimeri fibrosi. Le fibre alterano la forma dei globuli rossi, conferendo loro un aspetto a falce. L'anemia a cellule falciformi è stata la prima malattia di cui è stato possibile ricondurre l'insorgenza a un cambiamento nella sequenza amminoacidica di una proteina. Le varie for-

me di talassemia sono causate da una ridotta produzione della catena α o della catena β dell'emoglobina. Vengono prodotti tetrametri emoglobinici contenenti un solo tipo di subunità. Tali tetrametri sono caratterizzati da una diminuita capacità di rilascio dell'ossigeno e da una bassa solubilità, che provocano la lisi dei globuli rossi durante il loro sviluppo. I precursori dei globuli rossi normalmente producono un lieve eccesso di catene α rispetto alle catene β . Per prevenirne l'aggregazione, essi producono una proteina stabilizzante l' α -emoglobina, che si lega specificamente ai monomeri α , formando un complesso solubile.

APPENDICE Si possono proporre modelli di legame di tipo cooperativo in termini quantitativi: il grafico di Hill e il modello concertato

Il grafico di Hill

Un modo utile per descrivere quantitativamente il legame di tipo cooperativo, com'è quello dell'emoglobina, è stato sviluppato da Archibald Hill nel 1913. Consideriamo l'*ipotetico* equilibrio tra una proteina X e un ligando S:



dove n è una variabile che può assumere valori interi o frazionari. Il parametro n è una misura del grado di cooperatività del legame di S, anche se l'equazione 1 non si riferisce a un vero e proprio processo fisico. Per X = emoglobina e S = O₂, il massimo valore che n può assumere è 4. Questo valore potrebbe essere raggiunto se il legame dell'ossigeno con l'emoglobina fosse completamente cooperativo, cioè se la cooperatività fosse la massima possibile. Se invece il legame dell'ossigeno fosse totalmente non cooperativo, il valore di n sarebbe 1.

Analizzando l'equilibrio della reazione 1, si ottiene la seguente espressione per la saturazione frazionale, Y :

$$Y = \frac{[S]^n}{[S]^n + [S_{50}]^n}$$

dove $[S_{50}]$ è la concentrazione alla quale la saturazione del ligando X è pari al 50% (X è saturato per metà). Per l'emoglobina l'espressione diventa

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

dove P_{50} è la pressione parziale di ossigeno alla quale l'emoglobina è saturata per metà. L'espressione può essere così riordinata:

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

pertanto

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

Questa equazione predice che, riportando in un grafico $\log(Y/1-Y)$ in funzione di $\log(P_{50})$ (*grafico di Hill*), si otterrà una retta, la cui pendenza è n .

I grafici di Hill per la mioglobina e per l'emoglobina sono riportati nella figura A28. Il grafico di Hill risulta lineare per la mioglobina, con una pendenza pari a 1. Per l'emoglobina, invece, il grafico non è completamente lineare, perché la reazione di equilibrio su cui si basa il grafico di Hill non è pienamente corretta. Il grafico è comunque approssimativamente lineare nella sua porzione mediana, dove la pendenza è pari a 2,8. La pendenza, spesso denominata *coefficiente di Hill*, è una misura del grado di cooperatività di

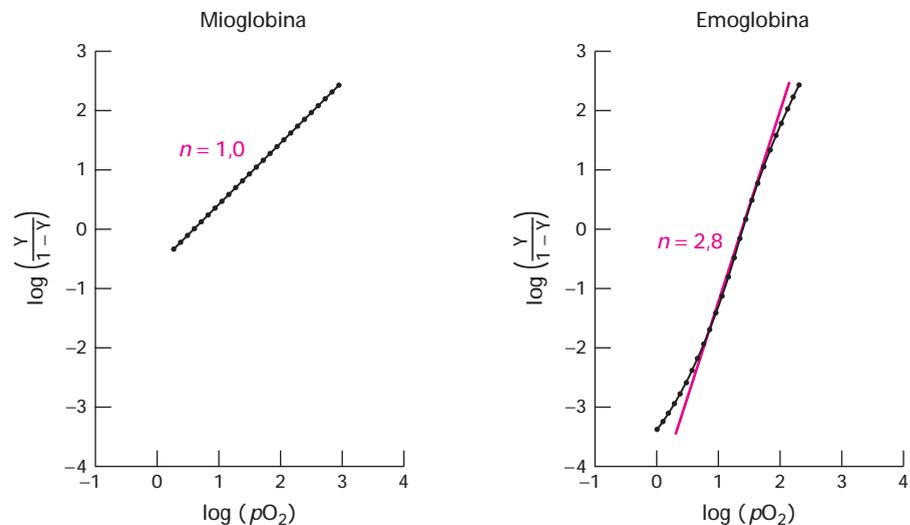


Figura A28 Grafico di Hill per la mioglobina e per l'emoglobina

legame dell'ossigeno. L'utilità del grafico di Hill sta nel fatto che esso fornisce un'idea quantitativa del grado di cooperatività di legame. Utilizzando l'equazione di Hill, e ponendo il valore del coefficiente di Hill pari a 2,8, si ottiene una curva che rassomiglia molto a quella dell'emoglobina (figura A29).

Il modello concertato

Il modello concertato può essere trattato in termini quantitativi. Sono richiesti solo quattro parametri: (1) il numero dei siti di legame nella proteina (si assume che siano equivalenti), (2) il rapporto tra le concentrazioni degli stati T e R in assenza di ligandi, (3) l'affinità per i ligandi dei siti della proteina allo stato R, e (4) una misura del rapporto tra l'affinità per i ligandi della proteina allo stato R e l'affinità per i ligandi della proteina allo stato T. Il numero dei siti di legame, n , può essere ricavato da altre informazioni. Per l'emoglobina, $n = 4$. Il rapporto tra le concentrazioni degli stati T e R in assenza di ligandi è una costante:

$$L = [T_0]/[R_0]$$

dove il pedice si riferisce al numero dei ligandi presenti (in questo caso, zero). L'affinità per l'ossigeno delle subunità nello stato R può essere valutata dal valore della costante di dissociazione della reazione di legame dell'ossigeno a un singolo sito dello stato R, K_R . Allo stesso modo l'affinità per l'ossigeno delle subunità nello stato T, può essere valutata dal valore della costante di dissociazione della reazione di legame dell'ossigeno a un singolo sito dello stato T, K_T . Definiremo il rapporto tra queste due costanti come

$$c = K_R/K_T$$

Questo rapporto è una misura di quanto più fortemente una singola subunità di una proteina allo stato R (subunità R) lega il ligando rispetto a una subunità della proteina allo stato T (subunità T). Si noti che $c < 1$, perché K_R e K_T sono costanti di dissociazione, e un legame forte corrisponde a un basso valore della costante di dissociazione.

Qual è il rapporto tra la concentrazione di una proteina allo stato T con un sito occupato da un ligando e la concentrazione della proteina allo stato R con un sito occupato da un ligando? Indichiamo la costante di dissociazione per un singolo sito nello stato R con K_R . Per una proteina con n siti vi sono n possibili siti dove il primo ligando può legarsi. Questo fattore statistico favorisce il legame del ligando a una proteina con n siti rispetto a una proteina con un singolo sito. Pertanto $[R_1] = n[R_0][S]/K_R$. Analogamente $[T_1] = n[T_0][S]/K_T$. Quindi

$$\frac{[T_1]}{[R_1]} = \frac{\frac{n[T_0][S]}{K_T}}{\frac{n[R_0][S]}{K_R}} = \frac{[T_0]}{[R_0]} \frac{K_R}{K_T} = cL$$

Una simile analisi rivela che, per stati con i ligandi legati, $[T_i]/[R_i] = c^i L$. In altre parole, il rapporto tra la concentrazione dello stato T e la concentrazione dello stato R viene ridotta di un fattore pari a c per ogni ligando legato.

Definiamo ora una scala conveniente per la concentrazione di S:

$$\alpha = [S]/K_R$$

Questa definizione è utile, perché è il rapporto tra la concentrazione di S e la costante di dissociazione che determina l'estensione del legame. Utilizzando questa definizione si vede che

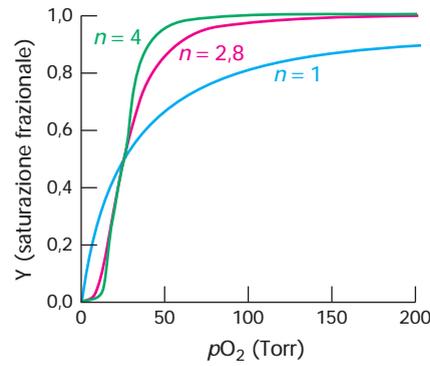


Figura A29 Curve di ossigenazione corrispondenti ad alcuni valori del coefficiente di Hill

La curva con numero di Hill pari a 2,8 ($n = 2,8$) è molto simile a quella dell'emoglobina.

$$[R_1] = \frac{n[R_0][S]}{K_R} = n[R_0]\alpha$$

Analogamente,

$$[T_1] = \frac{n[T_0][S]}{K_T} = ncL[R_0]\alpha$$

Qual'è la concentrazione delle molecole allo stato R con due ligandi legati? Di nuovo dobbiamo considerare il fattore statistico, cioè il numero di modi in cui un secondo ligando può legarsi a una molecola con un sito occupato. Questo numero è $n - 1$, che però va diviso per 2, perché non importa quale sia il «primo» e quale il «secondo» ligando. Quindi

$$\begin{aligned} [R_2] &= \frac{\left(\frac{n-1}{2}\right)[R_1][S]}{K_R} \\ &= \left(\frac{n-1}{2}\right)[R_1]\alpha \\ &= \left(\frac{n-1}{2}\right)(n[R_0]\alpha)\alpha \\ &= n\left(\frac{n-1}{2}\right)[R_0]\alpha^2 \end{aligned}$$

Possiamo derivare simili equazioni nel caso di i ligandi che si legano allo stato T.

Possiamo ora calcolare la saturazione frazionale, Y . Questa può essere considerata come la concentrazione dei siti con il ligando legato divisa per la concentrazione di tutti i potenziali siti di legame. Quindi,

$$Y = \frac{([R_1] + [T_1]) + 2([R_2] + [T_2]) + \dots + n([R_n] + [T_n])}{n([R_0] + [T_0] + [R_1] + [T_1]) + \dots + ([R_n] + [T_n])}$$

Sostituendo in questa equazione, troviamo

$$\begin{aligned} &n[R_0]\alpha + n[T_0]\alpha + 2\left(\frac{n-1}{2}\right)[R_0]\alpha^2 \\ &+ 2\left(\frac{n-1}{2}\right)c^2[T_0]\alpha^2 + \dots + n[R_0]^n + nc^n[T_0]\alpha^n \\ Y &= \frac{\dots}{n([R_0] + [T_0]) + n[R_0]\alpha + nc[T_0]\alpha + \dots + [R_0]\alpha^n + c^n[T_0]\alpha^n} \end{aligned}$$

Sostituendo $[T_0] = L[R_0]$ e sommando, si ottiene

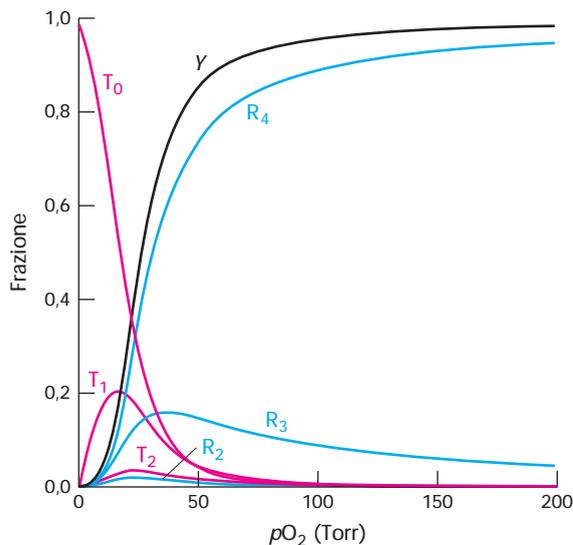


Figura A30 Curve di legame dell'ossigeno basate sul modello concertato

Saturazione frazionale (Y) in funzione di pO_2 : $L = 9000$; $c = 0,014$; e $K_R = 2,5$ Torr. Vengono mostrate la frazione di molecole allo stato T, con zero, una e due molecole di ossigeno legate (T_0 , T_1 e T_2) e la frazione di molecole allo stato R con due, tre e quattro molecole di ossigeno legate (R_2 , R_3 e R_4). Il valori delle frazioni di molecole in altre forme (T_3 e T_4 , R_0 e R_1) sono troppo bassi per poter essere mostrati.

$$Y = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L(1+c\alpha)^n}$$

Possiamo ora utilizzare questa equazione per verificare se è in accordo con la curva di ossigenazione dell'emoglobina, utilizzando diversi valori per i parametri L , c e K_R (con $n = 4$). Una eccellente corrispondenza si ottiene ponendo $L = 9000$, $c = 0,014$ e $K_R = 2,5$ Torr (figura A30).

Insieme con la saturazione frazionale, vengono anche mostrate le concentrazioni delle specie T_0 , T_1 , T_2 , R_2 , R_3 e R_4 . Le concentrazioni delle altre specie sono molto basse. La possibilità di ottenere informazioni sulle concentrazioni delle singole specie costituisce un'importante differenza tra l'equazione di Hill e l'analisi del modello concertato. L'equazione di Hill fornisce soltanto il valore della saturazione frazionale, mentre l'analisi del modello concertato fornisce i valori delle concentrazioni delle singole specie. Nel nostro caso l'analisi fornisce il valore del rapporto tra le concentrazioni dello stato T e dello stato R a ogni stato di legame. Il rapporto varia da 9000 a 126 a 1,76 a 0,025 a 0,00035, quando sono legate zero, una, due, tre o quattro molecole di ossigeno. Il rapporto costituisce una misura quantitativa della popolazione di molecole di emoglobina che passa dallo stato T allo stato R.

Anche il modello sequenziale può essere formulato in termini quantitativi. Però la formulazione richiede più parametri, e inoltre, anche utilizzando diversi set di parametri, si ottengono spesso curve teoriche che descrivono bene la curva sperimentale di saturazione dell'ossigeno.

TERMINI CHIAVE

anemia a cellule falciformi (p. 12)

anidraasi carbonica (p. 10)

anione superossido (p. 3)

2,3-bisfosfoglicerato (p. 8)

carbammato (p. 11)

catena α (p. 4)

catena β (p. 4)

citoglobina (p. 15)

coefficiente di Hill (p. 16)

curva di legame dell'ossigeno (p. 4)

dimero $\alpha\beta$ (p. 4)

effetto Bohr (p. 10)

eme (p. 2)

emoglobina fetale (p. 9)

emoglobina H (p. 13)

emoglobina S (p. 12)

grafico di Hill (p. 16)

istidina distale (p. 3)

istidina prossimale (p. 2)

malaria (p. 13)

metmioglobina (p. 3)

modello concertato (modello MWC) (p. 7)

modello sequenziale (p. 7)

neuroglobina (p. 15)

pressione parziale (p. 4)

proteina stabilizzante l' α -emoglobina (AHSP) (p. 14)

protoporfirina (p. 2)

ripiegamento globinico (p. 4)

risonanza magnetica nucleare per immagini (fMRI) (p. 3)

saturazione frazionale (p. 4)

sigmoide (p. 5)

stato R (p. 6)

stato T (p. 6)

talassemia (p. 13)

talassemia maggiore (morbo di Cooley) (p. 13)

LETTURE CONSIGLIATE

Da dove cominciare

Perutz, M. F. (1978). Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci. Am.* 239(6):92-125.

Perutz, M. F. (1980). Stereochemical mechanism of oxygen transport by haemoglobin. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 208:135-162.

Kilmartin, J. V. (1976). Interaction of haemoglobin with protons, CO_2 , and 2,3-diphosphoglycerate. *Brit. Med. Bull.* 32:209-222.

Struttura

Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H.,

Phillips, D. C. (1958). A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 181:662-666.

Shanan, B. (1983). Structure of human oxyhaemoglobin at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 171:31-59.

Frier, J. A., Perutz, M. F. (1977). Structure of human foetal deoxyhaemoglobin. *J. Mol. Biol.* 112:97-112.

Perutz, M. F. (1969). Structure and function of haemoglobin. *Harvey Lect.* 63:213-261.

Perutz, M. F. (1962). Relation between structure and sequence of haemoglobin. *Nature* 194:914-917.

Interazione dell'emoglobina con gli effettori allosterici

- Benesch, R., Beesch, R. E. (1969). Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by haemoglobin. *Nature* 221:618-622.
- Fang, T. Y., Zou, M., Simplaceanu, V., Ho, N. T., Ho, C. (1999). Assessment of roles of surface histidyl residues in the molecular basis of the Bohr effect and of β 143 histidine in the binding of 2,3-bisphosphoglycerate in human normal adult haemoglobin. *Biochemistry* 38:13423-13432.
- Arnone, A. (1992). X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. *Nature* 237:146-149.

Modelli di cooperatività

- Monod, J., Wyman, J., Changeux, J. P. (1965). On the nature of allosteric interactions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* 12:88-118.
- Koshland, D. L., Jr., Nemethy, G., Filmer, D. (1966). Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5:365-385.
- Ackers, G. K., Doyle, M. L., Myers, D., Daugherty, M. A. (1992). Molecular code for cooperativity in haemoglobin. *Science* 255:54-63.

Anemia a cellule falciformi e talassemia

- Herrick, J. B. (1910). Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch. Intern. Med.* 6:517-521.
- Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J., Wells, L. C. (1949). Sickle cell anemia: A molecular disease. *Science* 110:543-548.
- Ingram, V. M. (1957). Gene mutation in human haemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* 180:326-328.

- Eaton, W. A., Hofrichter, J. (1990). Sick cell haemoglobin polymerization. *Adv. Prot. Chem.* 40:63-279.
- Weatherall, D. J. (2001). Phenotype genotype relationships in monogenic disease: Lessons from the thalassemias. *Nat. Rev. Genet.* 2:245-255.

Altre globine e proteine leganti le globine

- Kihm, A. J., Kong, Y., Hong, W., Russell, J. E., Rouda, S., Adachi, K., Simon, M. C., Blobel, G. A., Weiss, M. J. (2002). An abundant erythroid protein that stabilizes free α -haemoglobin. *Nature* 417:758-763.
- Feng, L., Zhou, S., Gu, L., Gell, D. A., Mackay, J. P., Weiss, M. J., Gow, A. J., Shi, Y. (2005). Structure of oxidized α -haemoglobin bound to AHSP reveals a protective mechanism for haem. *Nature* 435:697-701.
- Burmester, T., Haberkamp, M., Mitz, S., Roesner, A., Schmidt, M., Ebner, B., Gerlach, F., Fuchs, C., Hankeln, T. (2004). Neuroglobin and cytoglobin: Genes, proteins and evolution. *IUBMB Life* 56:703-707.
- Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T. L., Roesner, A., Schmidt, M., Weich, B., Wystub, S., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Bolognesi, M., De Sanctis, D., Marden, M. C., Kiger, L., Moens, L., Dewilde, S., Nevo, E., Avivi, A., Weber, R. E., Fago, A., Burmester, T. (2005). Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *J. Inorg. Biochem.* 99:110-119.
- Burmester, T., Ebner, B., Weich, B., Hankeln, T. (2002). Cytoglobin: A novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol. Biol. Evol.* 19:416-421.
- Zhang, C., Wang, C., Deng, M., Li, L., Wang, H., Fan, M., Xu, W., Meng, F., Qian, L., He, F. (2002). Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of a rat neuroglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290:1411-1419.

PROBLEMI

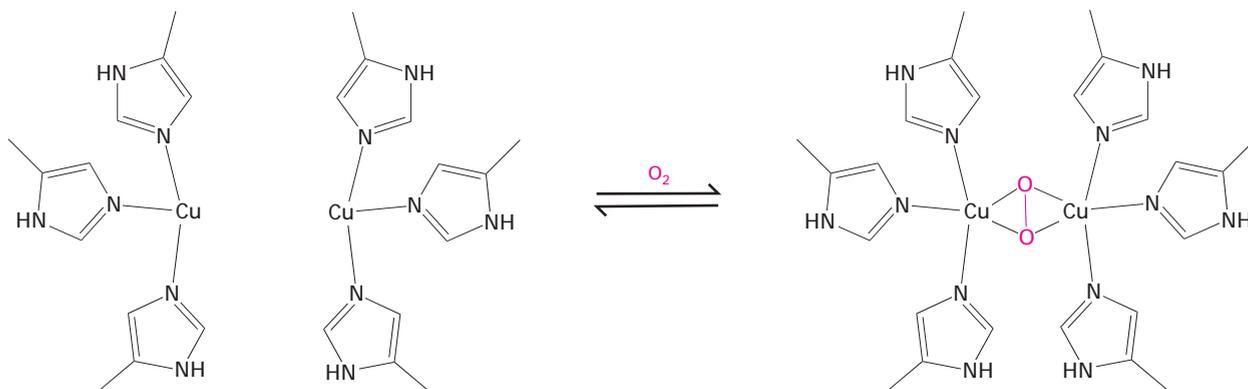
1. *Esplorando la biosfera.* La prima struttura proteica che è stata determinata è quella della mioglobina di capodoglio. Perché il muscolo di capodoglio è una sorgente ricca in mioglobina?

2. *Trasporto dell'ossigeno ad alta quota.* Immaginate di stare scalando una montagna e che la pressione parziale dell'ossigeno sia ridotta a 75 Torr. Calcolate la percentuale della capacità di trasporto dell'ossigeno, assumendo che il valore del pH, sia dei tessuti sia del sangue, sia 7,4 e che la concentrazione dell'ossigeno nei tessuti sia di 20 Torr.

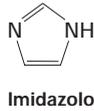
3. *Adattamento alle alte quote.* Dopo un periodo di uno o più giorni ad alta quota (dove la pressione parziale dell'ossigeno è pari a 75

Torr), la concentrazione del 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG) aumenta nei globuli rossi. Qual è l'effetto dell'aumento della concentrazione del 2,3-BPG sulla curva di ossigenazione dell'emoglobina? E perché tale aumento favorisce l'adattamento alle alte quote?

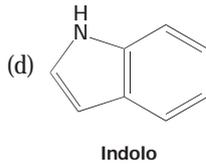
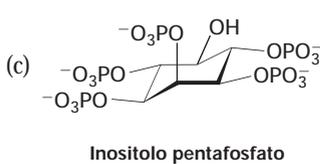
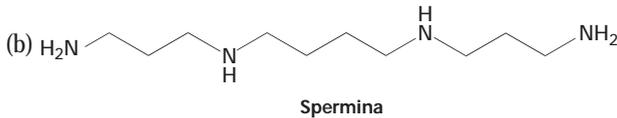
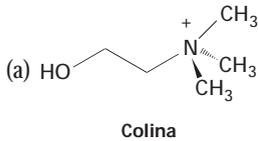
4. *Un altro trasportatore di ossigeno.* Gli artropodi, come le aragoste, possiedono trasportatori di ossigeno che differiscono nettamente dall'emoglobina. Il loro funzionamento non è basato sulla presenza dell'eme, ma su quella di composti che forniscono una coppia di ioni rame(I). Le variazioni strutturali che accompagnano il legame dell'ossigeno vengono mostrate qui sotto. Come potrebbero essere utilizzate per facilitare il legame cooperativo dell'ossigeno?



5. **Una disconnessione.** Usando la tecnica della mutagenesi mirata è stata ottenuta una emoglobina in cui i residui di istidina prossimale di ambedue le catene α e β sono sostituiti con un residuo di glicina. L'anello imidazolico dell'istidina può essere rimpiazzato, aggiungendo imidazolo libero in soluzione. Vi aspettate che una emoglobina così modificata mostri cooperatività per il legame con l'ossigeno? Spiegate la vostra risposta.



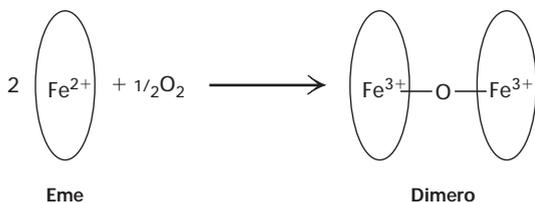
6. **Sostituzioni efficaci.** I globuli rossi di alcuni uccelli non contengono 2,3-bisfosfoglicerato. Tra i composti indicati qui sotto (a-d), quale pensate che potrebbe svolgere lo stesso ruolo del 2,3-bisfosfoglicerato? Spiegate brevemente perché.



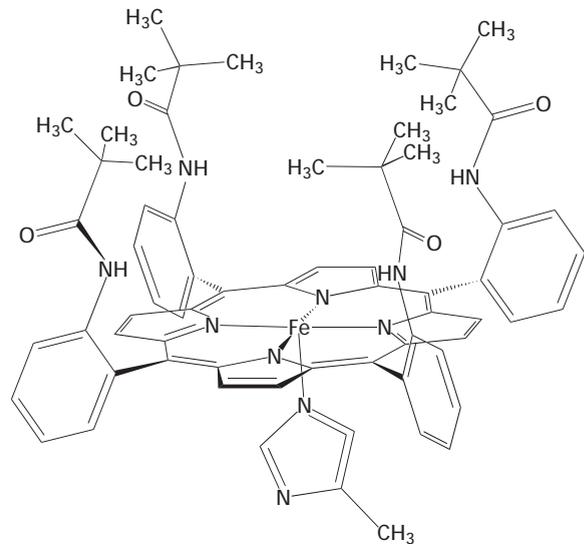
7. **Curve teoriche.** (a) Servendovi dell'equazione di Hill, disegnete la curva di ossigenazione di una ipotetica emoglobina dimerica, con $n = 1,8$ e $P_{50} = 10$ Torr. (b) Ripetete utilizzando il modello concertato con $n = 2$, $L = 10000$, $c = 0,01$, e $K_R = 10$ Torr.

8. **Effetto dei parassiti.** Il metabolismo del *P. falciparum* nei globuli rossi produce sostanze acide. Quale effetto potrebbe avere la presenza di acidi sulla capacità di trasportare l'ossigeno dei globuli rossi? E sulla possibilità di formare cellule falciformi?

9. **La porfirina «a palizzata».** Se l'eme libero viene esposto all'ossigeno, si forma rapidamente e irreversibilmente una specie dimerica dell'eme, contenente un ponte ossigeno.



I chimici hanno progettato e sintetizzato uno speciale derivato dell'eme, costituito da una porfirina cosiddetta «a palizzata», che lega reversibilmente l'ossigeno, senza formare specie dimeriche.



Complesso porfirinico «a palizzata»

Su che base è stata progettata la molecola, e quale potrebbe essere una possibile spiegazione della reversibilità del legame con l'ossigeno?

Problema sull'interpretazione dei dati

10. **Ossigenazione di una emoglobina primordiale.** Le lamprede sono organismi primitivi, i cui antenati si differenziarono dagli antenati dei pesci e dei mammiferi circa 400 milioni di anni fa. Il sangue delle lamprede contiene una emoglobina correlata strutturalmente con l'emoglobina dei mammiferi. Però l'emoglobina delle lamprede è monomerica allo stato ossigenato. I dati di ossigenazione per l'emoglobina delle lamprede sono i seguenti:

pO_2	Y	pO_2	Y	pO_2	Y
0,1	0,0060	2,0	0,112	50,0	0,889
0,2	0,0124	3,0	0,170	60,0	0,905
0,3	0,0190	4,0	0,227	70,0	0,917
0,4	0,0245	5,0	0,283	80,0	0,927
0,5	0,0307	7,5	0,420	90,0	0,935
0,6	0,0380	10,0	0,500	100	0,941
0,7	0,0430	15,0	0,640	150	0,960
0,8	0,0481	20,0	0,721	200	0,970
0,9	0,0530	30,0	0,812		
1,0	0,0591	40,0	0,865		

(a) Riportate i dati in un grafico per ricavare la curva di ossigenazione. A che pressione parziale di ossigeno corrisponde il 50% di saturazione? Osservando la curva si può giudicare se il legame è di tipo cooperativo?

(b) Costruite un grafico di Hill utilizzando i dati della tabella. Si può concludere che il legame dell'ossigeno è di tipo cooperativo? Che cos'è il grafico di Hill?

(c) Ulteriori studi hanno rivelato che l'emoglobina delle lamprede allo stato deossigenato forma oligomeri, soprattutto dimeri. Proponete un modello che spieghi la cooperatività che si osserva nell'emoglobina di lampreda.