

Modulo 3

CdS in Medicina e chirurgia , Odontoiatria e
protesi dentaria 2025-26

Una proteina in azione: l'emoglobina



Heart of Steel, la struttura dell'emoglobina.
Julian Voss-Andreae, 2005, esposta a Lake
Oswego, in Oregon.

Mioglobina ed emoglobina: esempi di funzione di una proteina

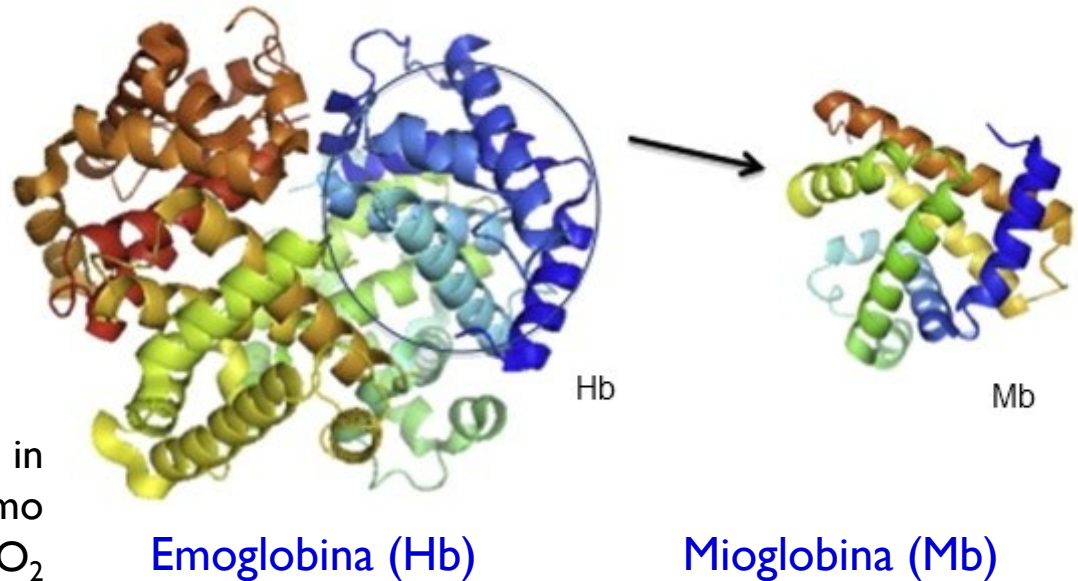
La **mioglobina (Mb)** e l'**emoglobina (Hb)** sono tra le proteine meglio caratterizzate. Le prime di cui è stata risolta la struttura tridimensionale.

Entrambe cruciali nella evoluzione dalla vita anaerobica a quella aerobica.

L'ossigeno (O_2) ha bassa solubilità in acqua (nel sangue = 3ml/L). Il consumo nell'uomo a riposo è circa 250 ml di O_2 /min.

Necessaria una via per legare O_2 e trasportarlo in sufficiente quantità ai tessuti.

Mioglobina e l'emoglobina si sono evolute a questo fondamentale scopo.



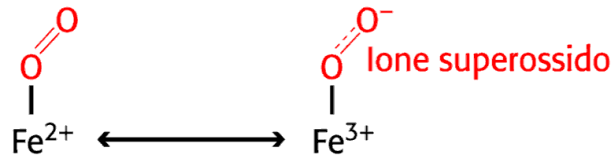
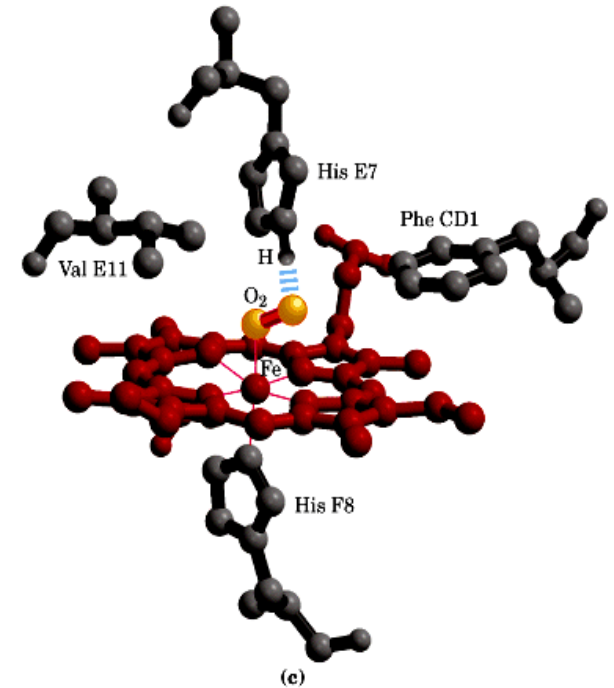
La Hb è un tetramero composto da 4 subunità, tutte simili al monomero della Mb.



Affinità per l'ossigeno e competizione con il CO

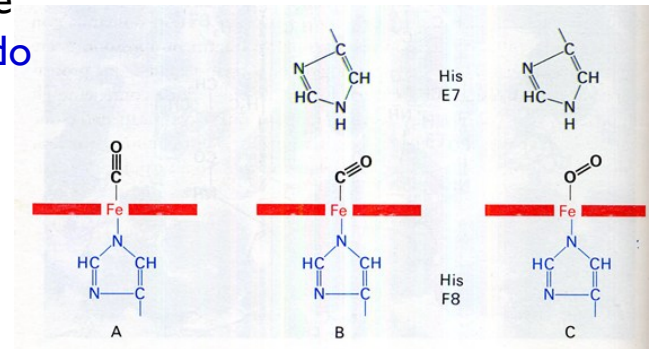
L'istidina distale (**His E7**) formando un legame H con O_2 stabilizza il complesso e impedisce il rilascio di anione superossido O_2^-

Prevenzione Ossidazione: La tasca proteica evita l'ossidazione Fe^{2+} a Fe^{3+} (**Metamioglobina**), forma incapace di legare l'ossigeno.



La struttura che si forma con O_2 legato al ferro è descritta dalla combinazione di due strutture di risonanza:

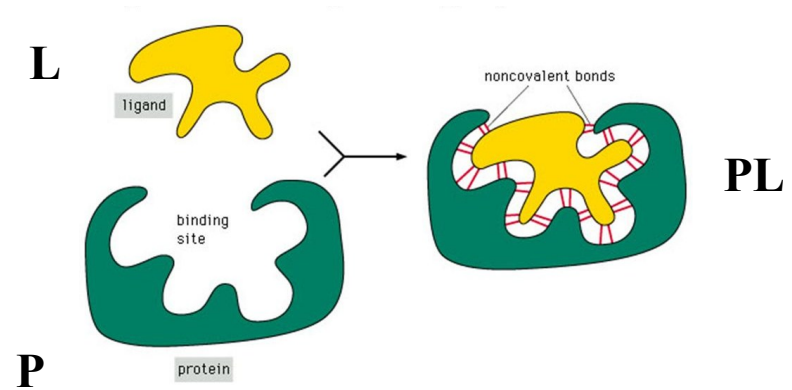
Nella mioglobina, His E7 ostacola il legame lineare del **monossido di carbonio (CO)**.



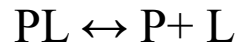
Riduzione Tossicità: l'azione di E7 riduce l'affinità della Mb per il CO di circa 500 volte rispetto all'eme libero, favorendo il legame fisiologico dell'ossigeno (che si lega con un angolo di 120°).

Il legame reversibile di una proteina con un ligando

- ▶ La funzione delle proteine globulari si basa sul legame reversibile con molecole specifiche dette ligandi (L): **piccole** molecole ma anche altre macromolecole.
- ▶ **Sito di legame:** Il sito in cui avviene il contatto tra la proteina P con il ligando L. Il sito è specifico per dimensione, forma, carica e idrofobicità.
- ▶ **Specificità:** Solo il ligando corretto stabilisce interazioni deboli sufficienti a formare il complesso PL



L'interazione è governata da un equilibrio chimico:



Costante di Dissociazione (K_d): indica la tendenza del complesso a dissociarsi

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (1)$$

piccola K_d (10⁻⁹ a 10⁻¹² M) = **Alta affinità**, legame forte e stabile.

grande K_d (10⁻³ a 10⁻⁶ M) = **Bassa affinità**, legame debole e labile.

Curva di saturazione (legame dell'O₂, ossigenazione) della mioglobina

Il legame reversibile dell'ossigeno alla mioglobina segue una cinetica di saturazione semplice, descritta dal parametro $Y = \text{grado di saturazione}$ (saturazione frazionale).

Y rappresenta la frazione di siti di legame occupati dall'ossigeno rispetto al totale :

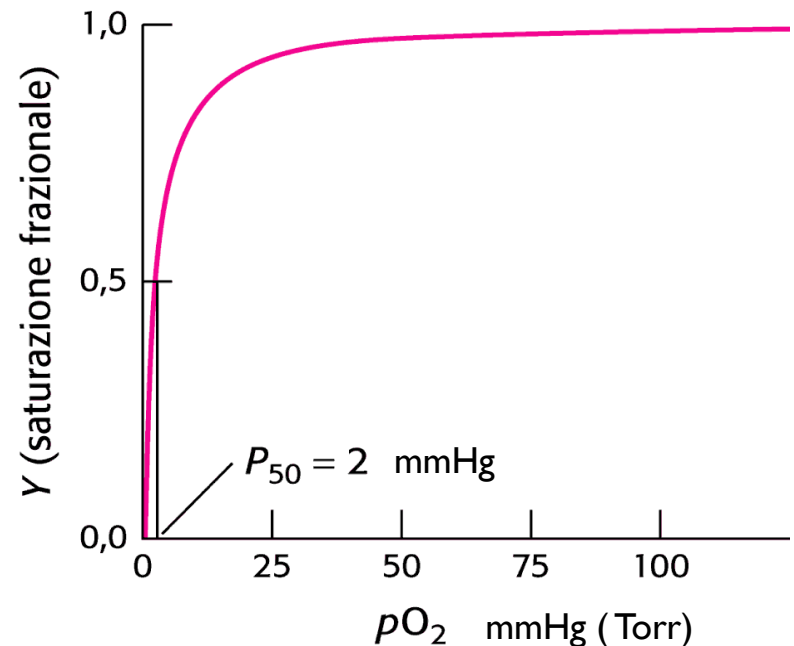
$$K_d = \frac{[Mb][O_2]}{[MbO_2]} \quad (1)$$

$$Y = \frac{\text{Mb legata all'O}_2}{\text{Mb totale}} = \frac{[MbO_2]}{[MbO_2] + [Mb]} \quad \text{con } 0 \leq Y \leq 1$$

Ricavando $[MbO_2]$ dall'equazione 1, e utilizzando la pressione parziale (pO_2) per l'ossigeno, si ottiene:

$$Y = \frac{pO_2}{pO_2 + K_d} \quad (\text{Equazione iperbole rettangolare})$$

Sostituendo K_d con P_{50} : è la pressione parziale di O₂ alla quale il 50% dei siti è saturato ($Y = 0,5$)

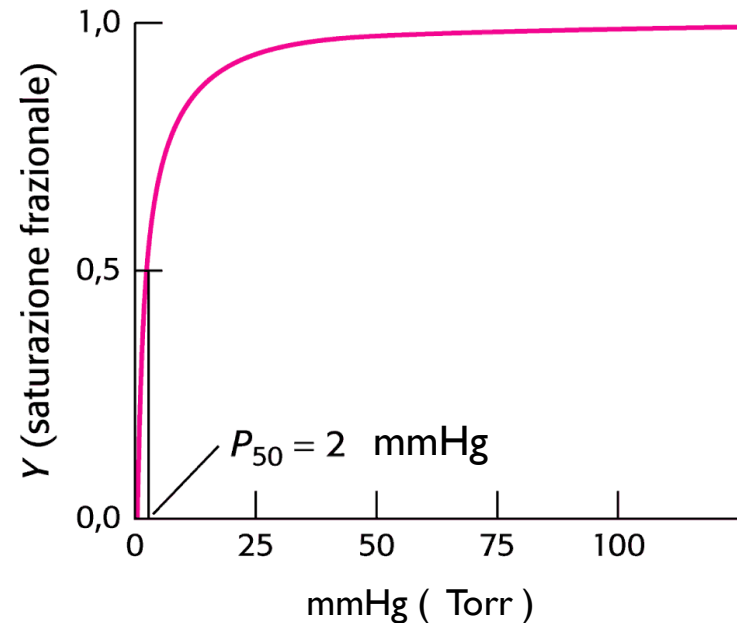


Significato di P_{50} e rilevanza fisiologica

$$Y = \frac{pO_2}{pO_2 + K_d}$$

La P_{50} è la pressione parziale di O_2 alla quale il 50% dei siti è saturato ($Y = 0,5$).

P_{50} è l'equivalente della K_d per indicare l'affinità tra ossigeno e mioglobina. Un valore piccolo indica affinità elevata.



P_{50} per la mioglobina $\approx 2 \text{ mm Hg}$ (2 Torr)

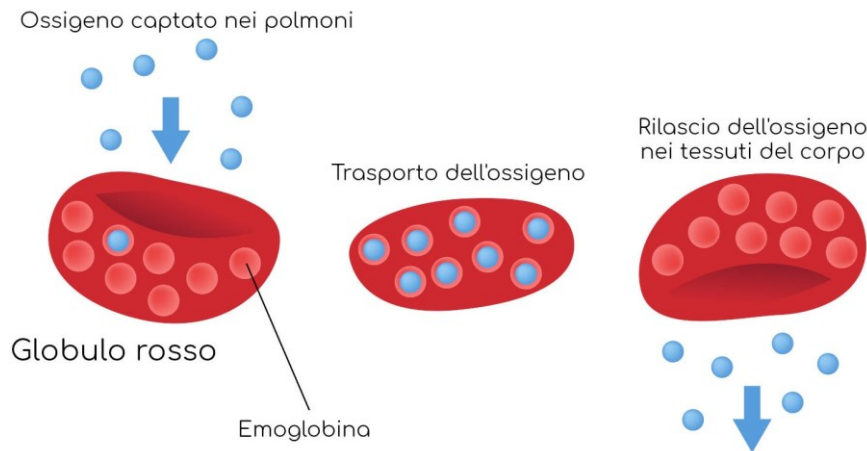
In ambito fisiologico, nei tessuti muscolari $pO_2 \sim 20 \text{ mm Hg}$.

A questa pressione: $Y = 20 / 20 + 2 \approx 0,91$. Mb è quasi del tutto (91%) saturata dall' O_2 .

Significato funzionale: L'alta affinità permette alla Mb di "sequestrare" efficacemente l' O_2 rilasciato dall'emoglobina capillare, agendo come una **riserva intracellulare** pronta all'uso durante lo sforzo muscolare intenso.

L'emoglobina è contenuta negli eritrociti

L'ossigeno nei vertebrati è trasportato quasi esclusivamente dall' **emoglobina (Hb)** contenuta nei globuli rossi.



A differenza della mioglobina, l'emoglobina deve essere in grado di **legare** l'ossigeno nei polmoni e **rilasciarlo** efficacemente nei tessuti periferici.

Caratteristiche: cellule a forma biconcava (6-9 micron), prive di nucleo e mitocondri, ciclo vitale di circa 120 giorni.

Concentrazione nel sangue: $\sim 5 \times 10^6 / \text{mm}^3$. L'Hb costituisce il 30% del peso secco dell'eritrocita. Il 70% del ferro corporeo dell'organismo è contenuto nei gruppi EME dell'emoglobina.



Architettura molecolare dell'emoglobina

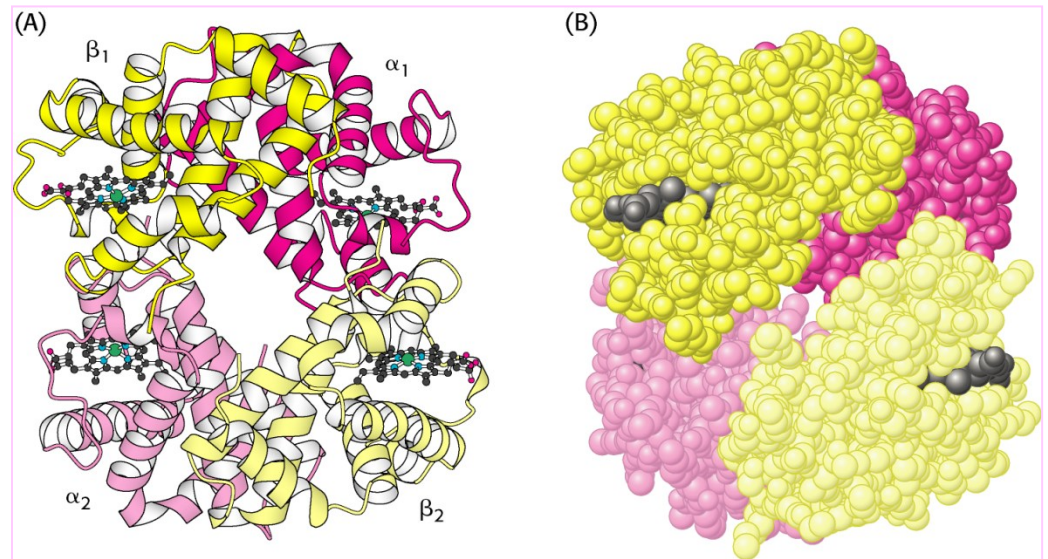
L'emoglobina è un **tetramero allosterico** composto da due dimeri identici ($\alpha\beta$). Ogni subunità possiede un **gruppo eme**.

Struttura **Quaternaria:**
Configurazione $\alpha_1\beta_1$ - $\alpha_2\beta_2$, con forti interazioni tra i due dimeri.

Interazioni dinamiche ai contatti $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ (fondamentali per la cooperatività).

Omologia strutturale: Nonostante solo il 25% di identità di sequenza con la Mb, l'Hb mantiene lo stesso **ripiegamento globinico**.

I residui chiave per il legame all'ossigeno e la regolazione sono altamente conservati.



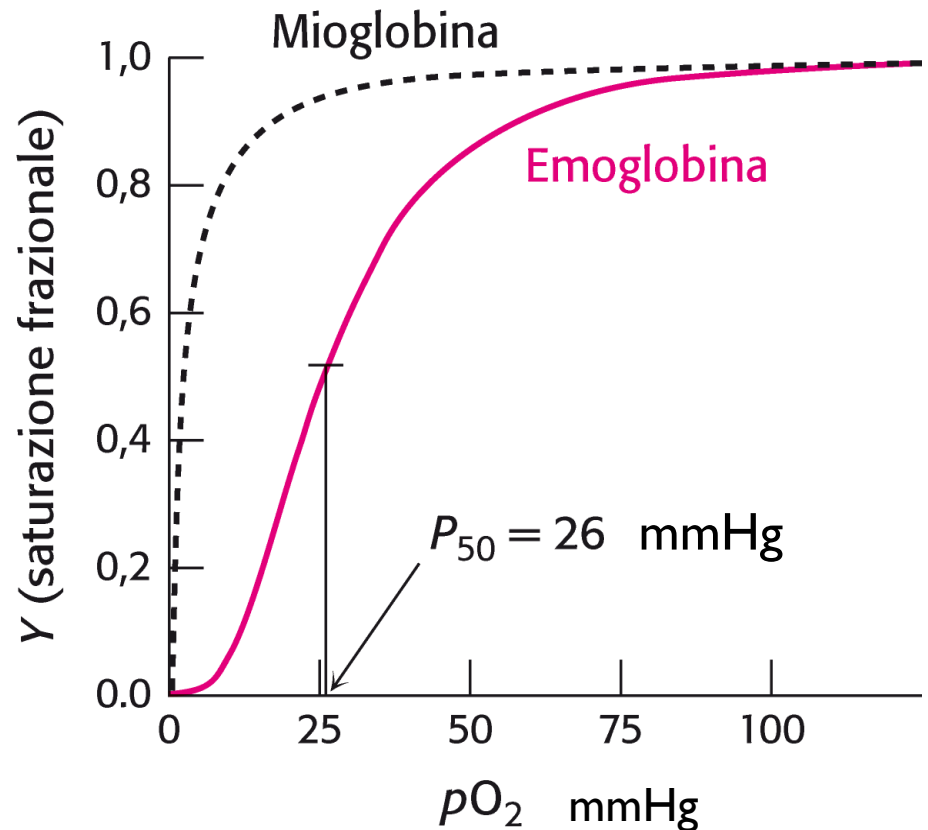
Il tetramero $\alpha_2\beta_2$ della Hb

Siti di Legame: 4 gruppi eme, distanziati tra loro (3-4 nm), che comunicano tramite cambiamenti conformazionali

Cooperatività del legame all' O₂ e curva di dissociazione sigmoide

L'emoglobina (Hb) è una molecola **molto più complessa** e sensibile a fattori esterni della mioglobina.

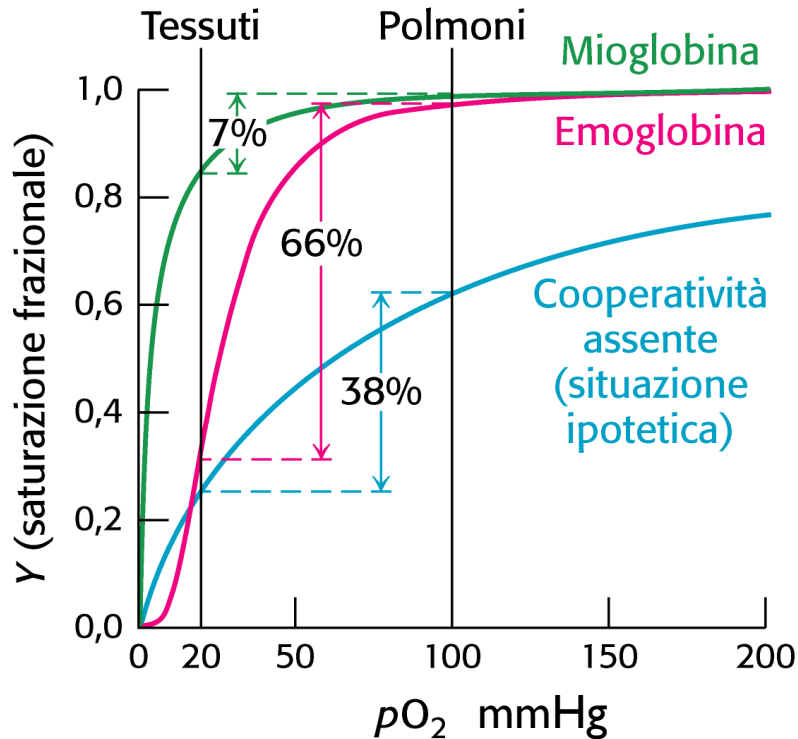
- ▶ La curva di legame dell'O₂ all'Hb ha una forma **sigmoide**.
- ▶ Curva sigmoide: a basse pO₂ Y ha valori bassi, ad elevate pO₂ Y si porta verso 1. Suggestisce che i legami ai 4 siti EME non sono tra loro indipendenti: il legame al primo sito facilita il legame ai successivi. Il legame dell'ossigeno all'Hb è un **processo cooperativo**:
- ▶ P₅₀ **Hb ~ 26 mmHg**. >> della P₅₀ di Mb (2 mmHg): Hb lega l'O₂ con minor affinità rispetto alla Mb: bassa affinità iniziale, ideale per il rilascio.



Confronto tra le curve di dissociazione di Mb e Hb

Significato fisiologico della cooperatività

La cooperatività rende l'Hb un trasportatore estremamente efficiente rispetto a un sistema non cooperativo o alla Mb.



Capacità di scarico (rilascio di ossigeno):

Hb: - Polmoni Y = 98% (~ 100 mmHg)
- Tessuti Y = 32% (~ 20 mmHg)

Efficienza: (variazione di Y) = 98% - 32% = 66%

L'emoglobina è un trasportatore efficiente (scarica il 66% dell'ossigeno legato).

Confronti teorici:

Hb senza cooperatività

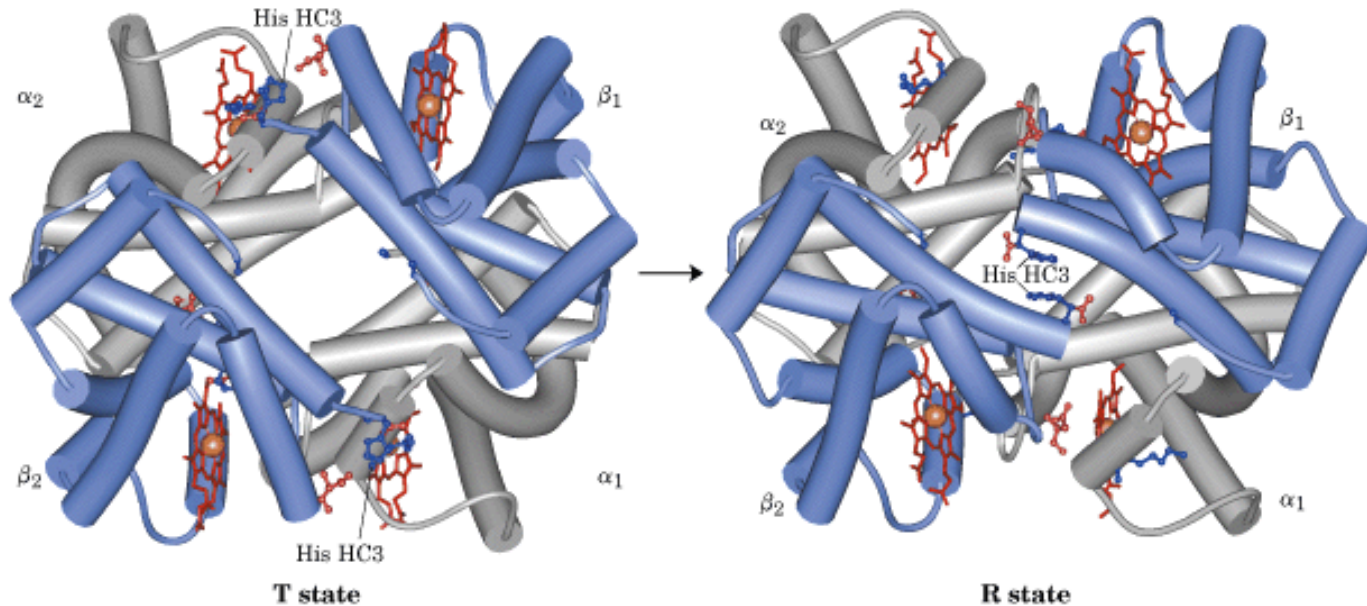
Efficienza: 63% - 25% = solo 38%

Mioglobina: rilascerebbe solo il 7% (troppo affine, non "molla" l'ossigeno ai tessuti).

La cooperatività, la transizione tra la bassa affinità e uno stato ad alta affinità rende più efficiente il trasporto dell'ossigeno ed è il motore che permette la sopravvivenza dei tessuti periferici. tra i siti di legame spiegiamola a livello molecolare:

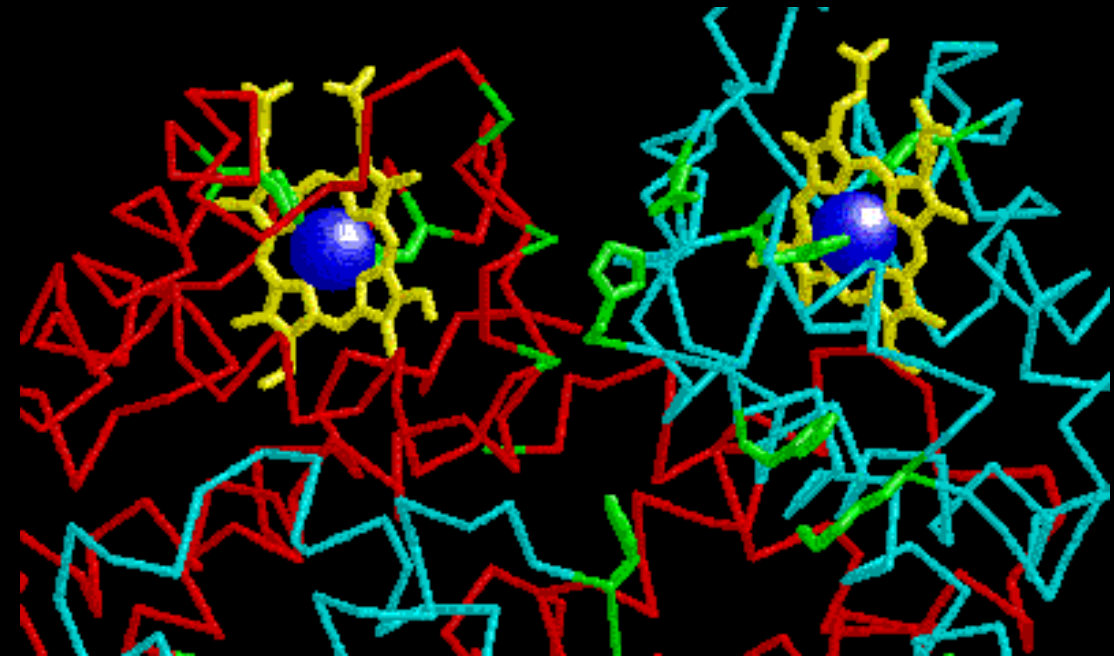
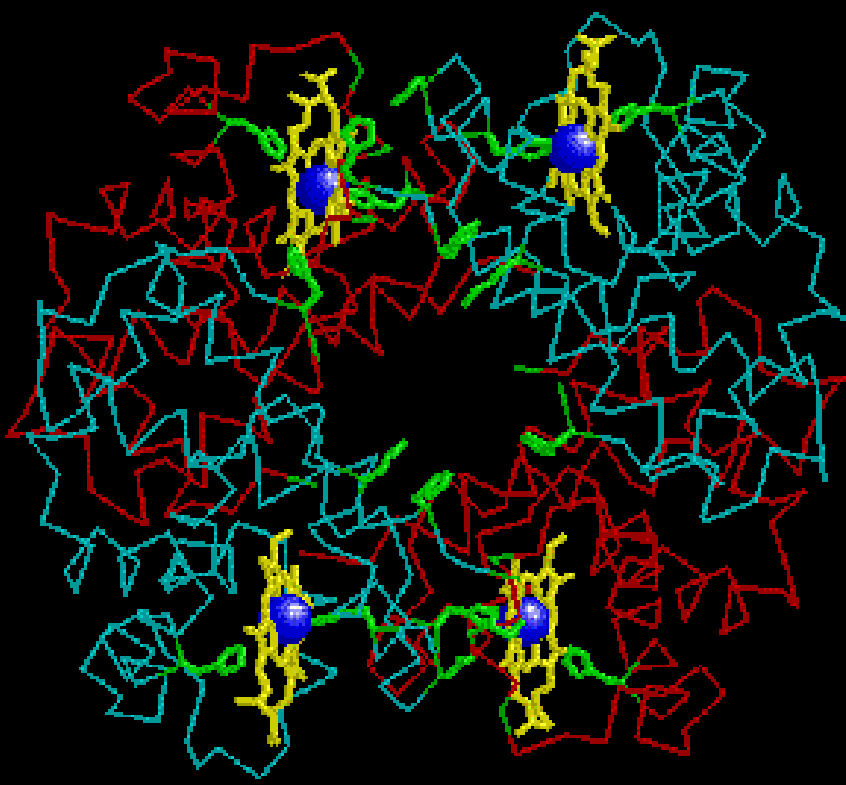
Transizione tra le conformazioni T ed R dell'emoglobina

L'analisi strutturale ai raggi x evidenzia che l'Hb esiste in un equilibrio dinamico tra due conformazioni alternative (stati strutturali) con affinità opposte all'ossigeno: stato R (relaxed) e stato T (tense).

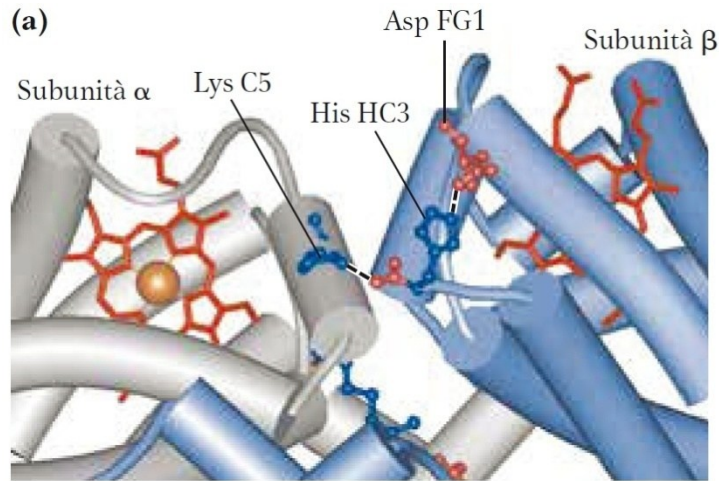


Stato T (Tense - Teso): Conformazione a bassa affinità per l' O_2 . Caratterizzato da una tasca centrale ampia tra le subunità β . Stabile in assenza di ligando (deossiemoglobina).

Stato R (Relaxed - Rilassato): Conformazione ad alta affinità per l' O_2 . Le subunità $\alpha\beta$ scivolano e ruotano l'una sull'altra (di circa 15°). La tasca centrale si restringe; i dimeri $\alpha_1\beta_1$ - $\alpha_2\beta_2$ sono più compatti.



Stabilizzazione dello Stato T e Transizione

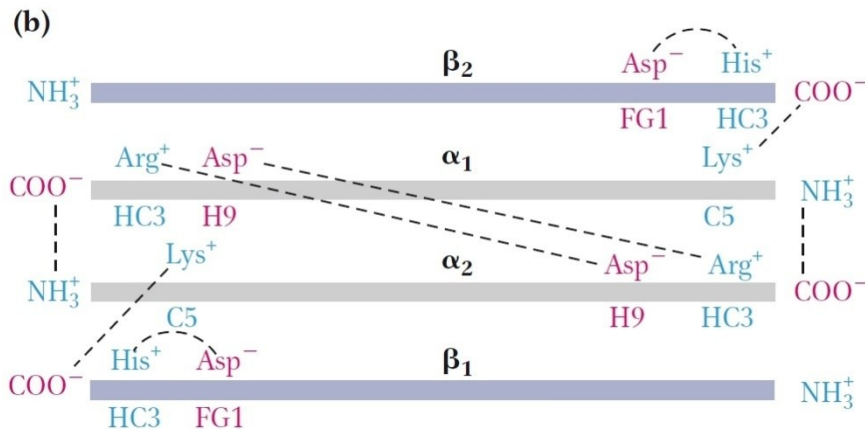


La stabilità dello Stato T dipende da una rete di **legami ionici** (ponti salini) che vengono scardinati dal legame con l'ossigeno: esempio:

Interazioni elettrostatiche cruciali tra le interfacce dei dimeri:

COO⁻ (β) con Lys C5 (α)

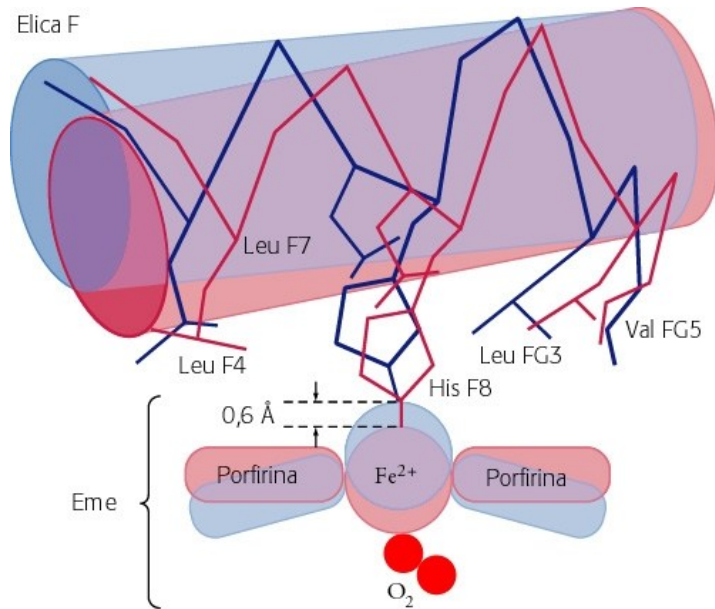
His HC3 (β) con Asp FG1 (β). Questi legami fungono da "molle" che mantengono la proteina in una forma rigida e poco affine



Transizione T→R: il legame dell'O₂ fornisce l'energia necessaria per rompere i ponti salini. La rottura dei legami ionici in una subunità destabilizza l'intero tetramero, favorendo il passaggio globale alla forma R. Risultato: Più O₂ si lega, più la transizione verso lo stato ad alta affinità è favorita (cooperatività).

Meccanismo di Trasmissione del Segnale

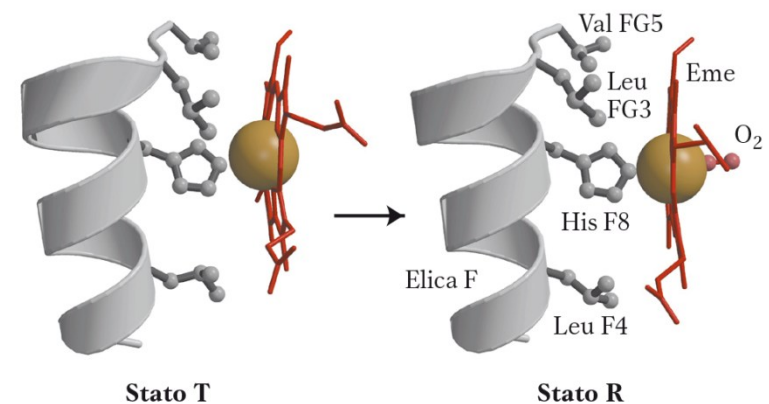
Come il legame dell'O₂ sull'atomo di Ferro si propaga all'intera proteina.



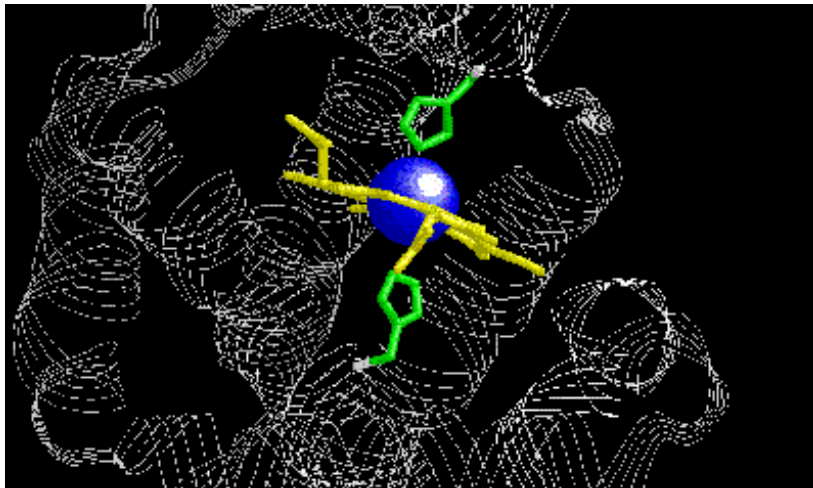
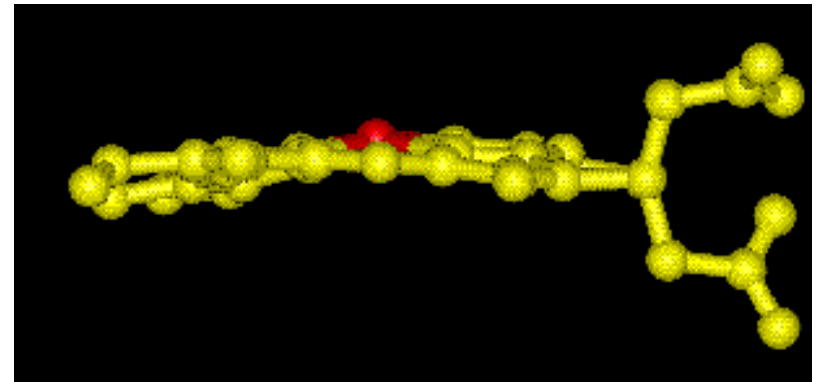
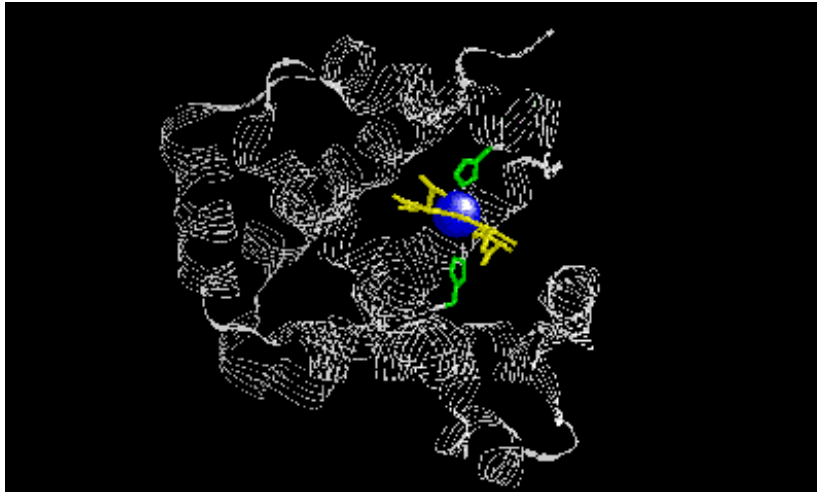
Blue: deossiHb, rosso ossiHb.

Il riarrangiamento dell'interfaccia tra dimeri si trasmette alle altre subunità favorendo la transizione **T** → **R** di tutto il tetramero.

- Il movimento del Fe²⁺ in seguito al legame di un O₂ porta l'His F8 nel piano della porfirina.
- Il movimento del Fe²⁺ trascina con se HisF8 e questa sposta l'intera elica F che agisce come una leva. L'estremità dell'elica F si trova all'interfaccia tra i dimeri αβ.
- il suo movimento altera i contatti tra le subunità.



Variazioni conformazionali del legame dell'ossigeno ad una subunità di emoglobina



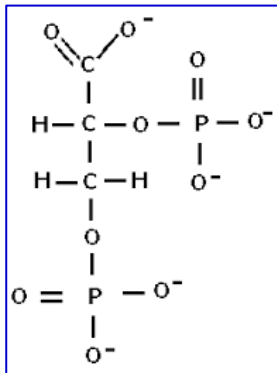
L'affinità per l'ossigeno nella Hb viene modulata da regolatori: il 2,3-BPG

L'emoglobina è una proteina allosterica: il legame dell'ossigeno è modulato da **molecole che stabilizzano lo Stato T** (bassa affinità), favorendo il rilascio di O_2 ai tessuti.

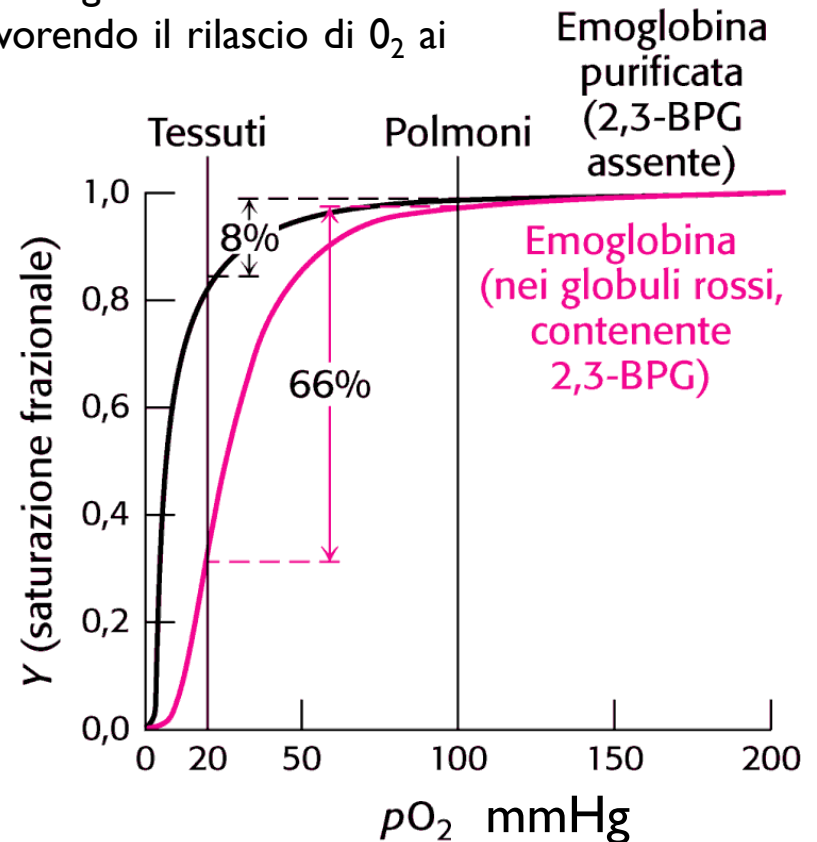
Il **2,3 bisfosfoglicerato (2,3-BPG)** è un **regolatore** (eterotropico) dell'emoglobina all'interno del globulo rosso.

Meccanismo: È una molecola carica negativamente che si lega alla tasca centrale dell'Hb (tra le β) solo nello Stato T.

Agisce come un "cuneo" che blocca l'Hb nella conformazione a bassa affinità rendendo difficile la transizione allo stato R



2,3 bisfosfoglicerato (2,3BPG)



Rilevanza clinica: Senza 2,3-BPG, l'Hb sarebbe troppo affine all'ossigeno e non lo rilascerebbe. La concentrazione di 2,3-BPG aumenta in alta quota (acclimatazione) o in caso di ipossia per facilitare l'ossigenazione dei tessuti aumentando il rilascio

L'emoglobina fetale HbF ha maggior affinità per l'O₂ rispetto all'emoglobina dell'adulto

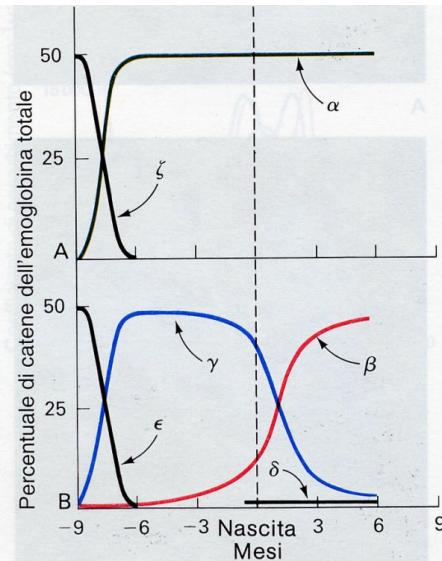


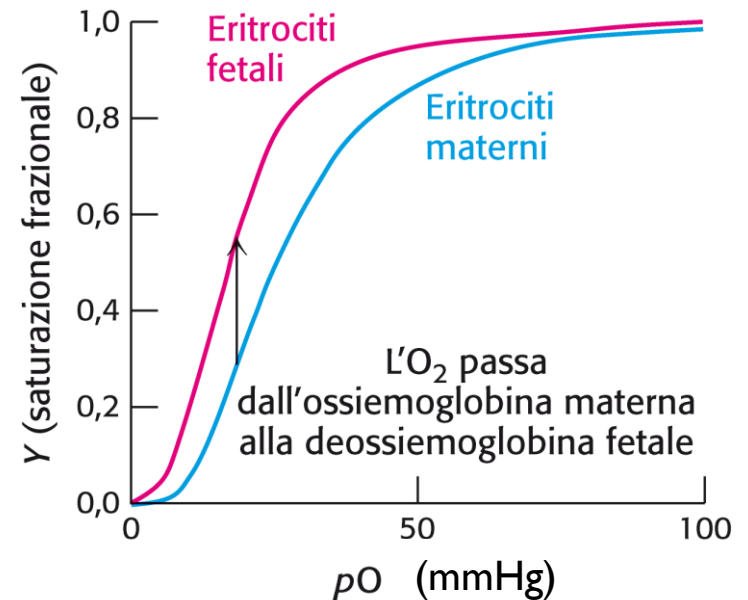
Figura 7.15
Espressione dei geni dell'emoglobina durante lo sviluppo dell'uomo. (A) Geni α e ζ ; (B) geni β , γ , δ ed ϵ .

Il feto deve "estrarre" l'ossigeno dal sangue materno. Per farlo, la sua emoglobina deve avere un'affinità per l'O₂ maggiore rispetto a quella della madre.

HbF presenta due cariche positive in meno nella tasca centrale, per cui lega meno saldamente il 2,3-BPG

2,3-BPG stabilizza lo Stato T, il fatto che si leghi male alla HbF mantiene quest'ultima più facilmente nello stato ad alta affinità (R), con curva di dissociazione spostata a sin.

Durante la vita fetale sono espresse catene globiniche alternative alle catene α e β , con caratteristiche differenti. Negli ultimi sei mesi la forma più comune è il tetramero $\alpha_2\gamma_2$ (emoglobina F).

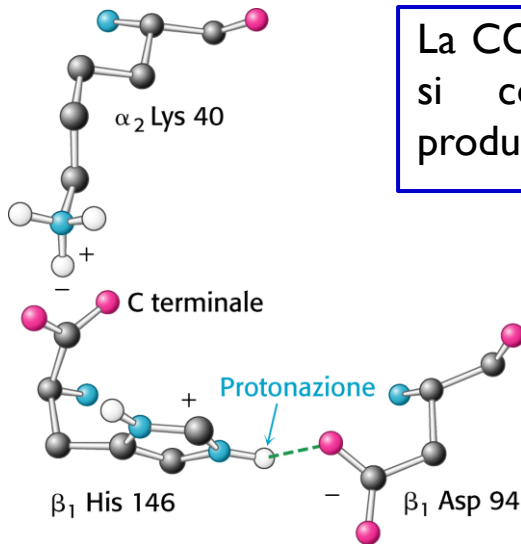


Significato fisiologico: alla pO₂ della placenta, l'ossigeno si stacca dalla HbA materna (meno affine perché legata al BPG) e si lega alla HbF (più affine perché "insensibile" al BPG).

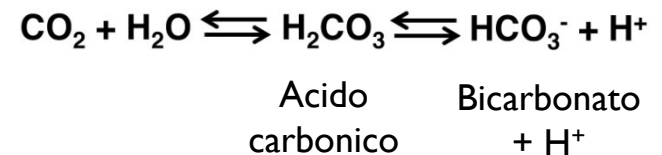
L'effetto Bohr favorisce lo stato T dell'emoglobina

L'affinità dell'emoglobina diminuisce all'aumentare dell'**acidità** e della concentrazione di anidride carbonica (effetto Bohr).

Nei tessuti metabolicamente attivi si il pH scende e si producono **H⁺** e **CO₂**.



La CO₂ generata dal catabolismo si converte in bicarbonato producendo H⁺



L'effetto Bohr è causato dall'aumento della [H⁺] che determina la **protonazione** di numerosi residui amminoacidici:

Alcuni esempi:

l'Istidina 146 (HC3) delle catene β forma un legame ionico con Asp 94 solo quando l'istidina è protonata.

NH₂ – terminali delle catene α, formano legami ionici con le estremità C-terminali delle catene β solo se protonati.

La formazione dei **ponti salini** (ionici) stabilizza lo stato T. L'innalzamento del pH causa la deprotonazione dei gruppi coinvolti e la rottura di questi legami favorendo la forma R.

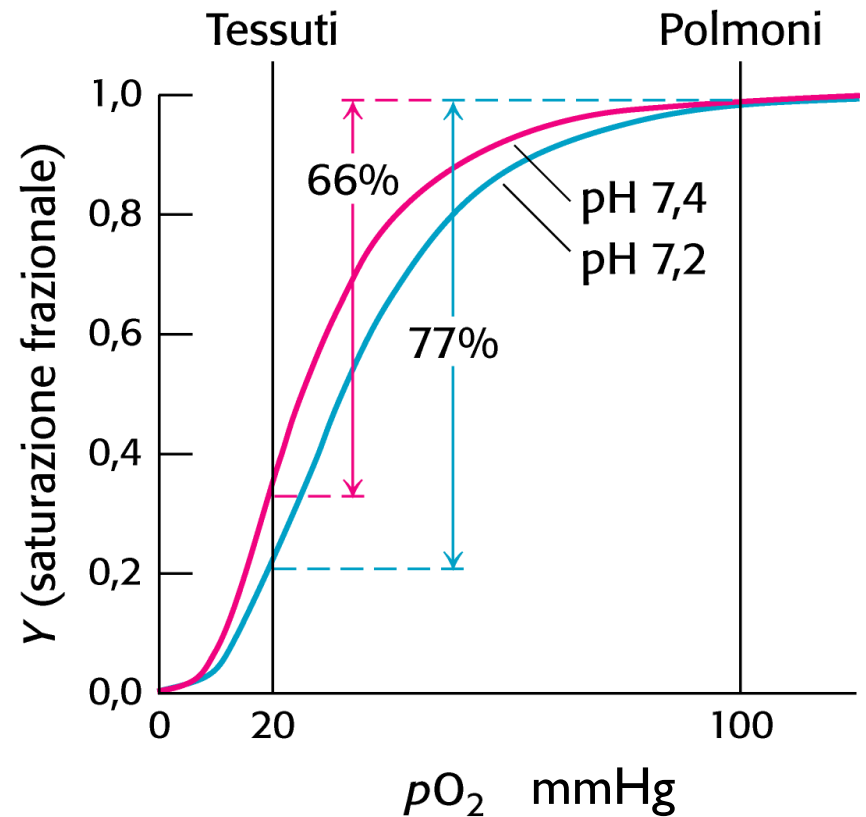
L'effetto Bohr fa aumentare il rilascio di ossigeno

H^+ e CO_2 sono quindi **effettori allosterici** che diminuiscono l'affinità della Hb per O_2 stabilizzando la conformazione (stato) T.

La riduzione dell'affinità dell' Hb per O_2 determina uno spostamento verso dx della curva di dissociazione e un maggior rilascio di ossigeno migliorando l'efficienza di trasporto.

Efficienza: (variazione di Y) = 77% (con effetto bohr) - 66% = 11%

Significato fisiologico: rilasciare maggiori quantità di ossigeno dove c'è ne più bisogno, ovvero nei tessuti.



Trasporto della CO₂ ed effetto Bohr

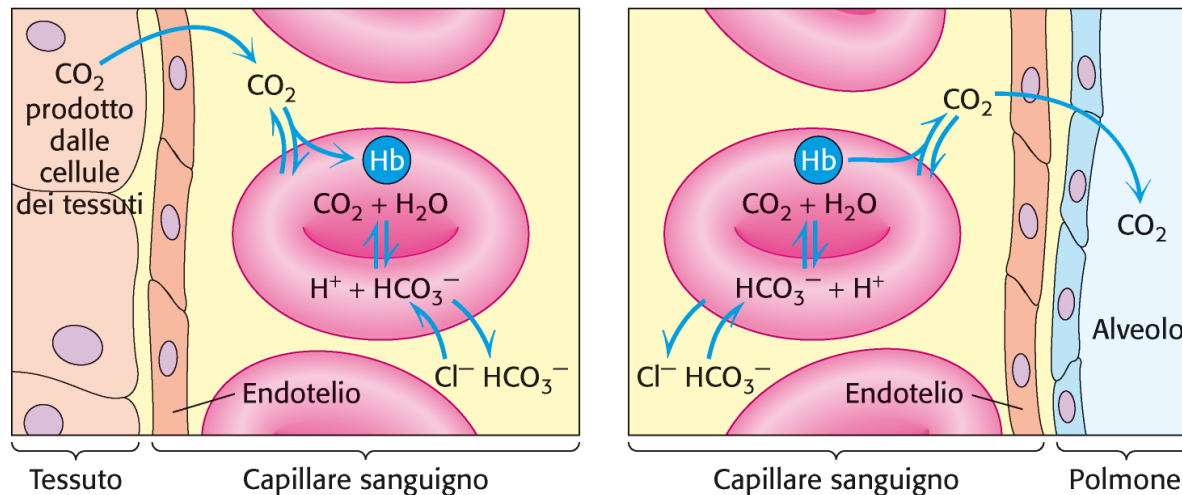
La CO₂ prodotta dal metabolismo tissutale deve essere rimossa per evitare l'acidosi. Il suo trasporto avviene in due forme : 1) come **ione HCO₃⁻** (~ 80-85%), 2) legata all'Hb (~15-20%).

1) Come **ione HCO₃⁻** disciolto nel sangue. La CO₂ diffonde negli eritrociti dove l'enzima **anidrasi carbonica** accelera la reazione di conversione della CO₂ :

Il rilascio di protoni (**H⁺**)
abbassa il pH intracellulare e
contribuisce all'**effetto Bohr** .



Anidrasi carbonica



A livello polmonare avviene il processo inverso con conversione dello **ione HCO₃⁻ + H⁺** in CO₂ che viene espulsa

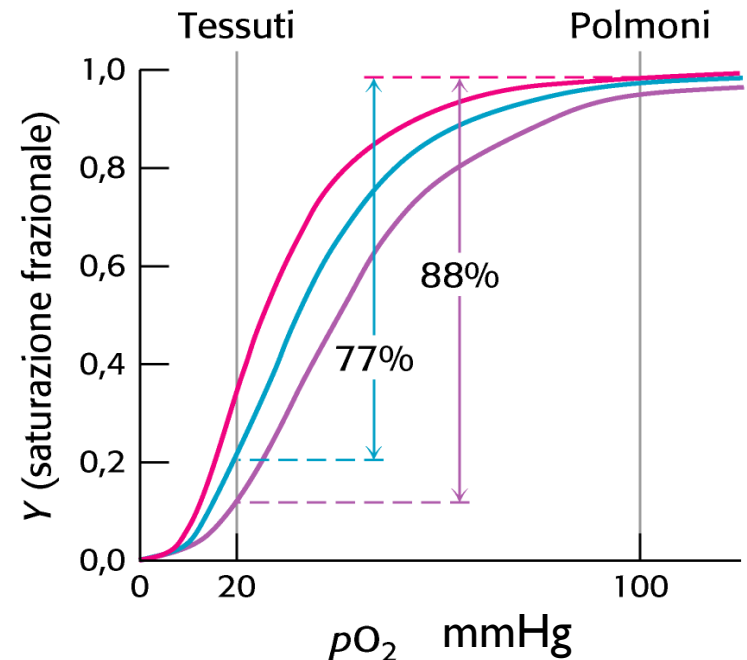
La CO₂ si lega direttamente: la carbaminoemoglobina

Una parte di CO₂ (15-20%) reagisce spontaneamente con i gruppi **amminici N-terminali** delle 4 catene globiniche: forma **residui di carbammato (carbaminoemoglobina)**.



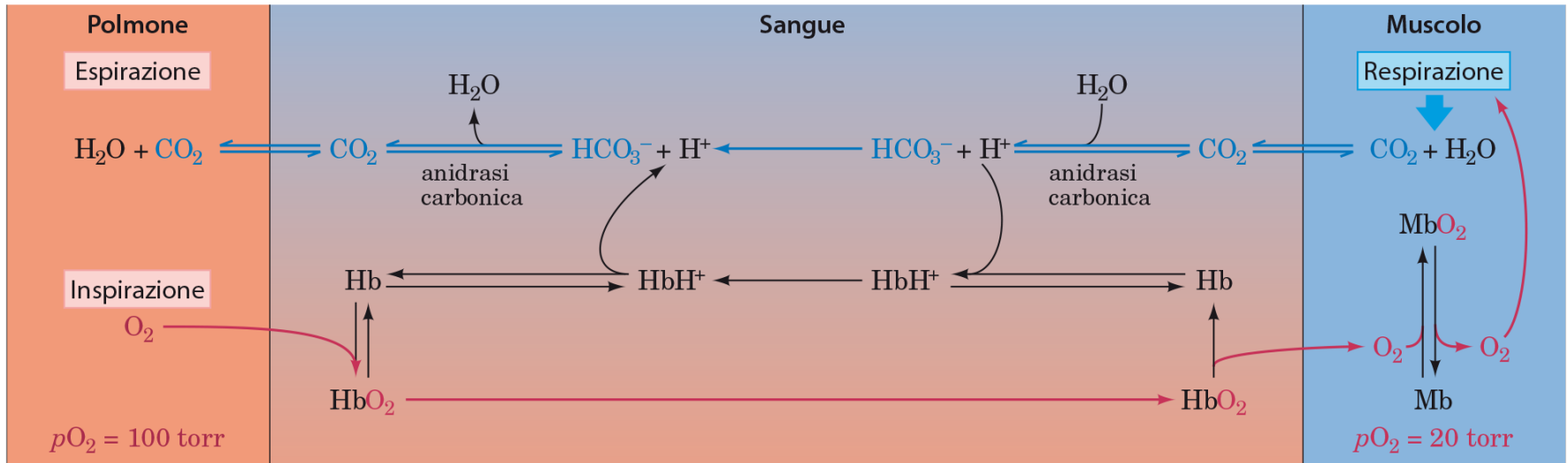
La carbammilazione contribuisce alla formazione di legami ionici **stabilizzando forma T**. La CO₂ legata viene rilasciata a livello alveolare dove è elevata pO₂ che sposta l'equilibrio verso lo **Stato R**. Inoltre dalla reazione di formazione dei carbammati si genera H⁺

- pH 7,4, CO₂ assente
- pH 7,2, CO₂ assente
- pH 7,2, CO₂ 40 Torr



Ciclo del trasporto dell'ossigeno e della CO₂ tra polmone e tessuti (muscolo)

Il sistema garantisce un accoppiamento perfetto tra domanda e offerta di ossigeno.



A livello Alveolare (Polmone):

pO₂ ↑ forza la transizione verso lo **Stato R**.
La conformazione R distrugge i siti di legame per H⁺ e CO₂
CO₂ e H⁺ vengono riformate e rilasciate nell'aria espirata, mentre l'Hb si ricarica di O₂

A livello Tissutale (muscolare)

pCO₂ ↑ e pH ↓ (acido lattico/H⁺) spingono l'Hb verso lo **Stato T**.
L'Hb "scarica" l'ossigeno (curva spostata a **destra**) e "carica" CO₂ e H⁺.
• Il bicarbonato esce dall'eritrocita

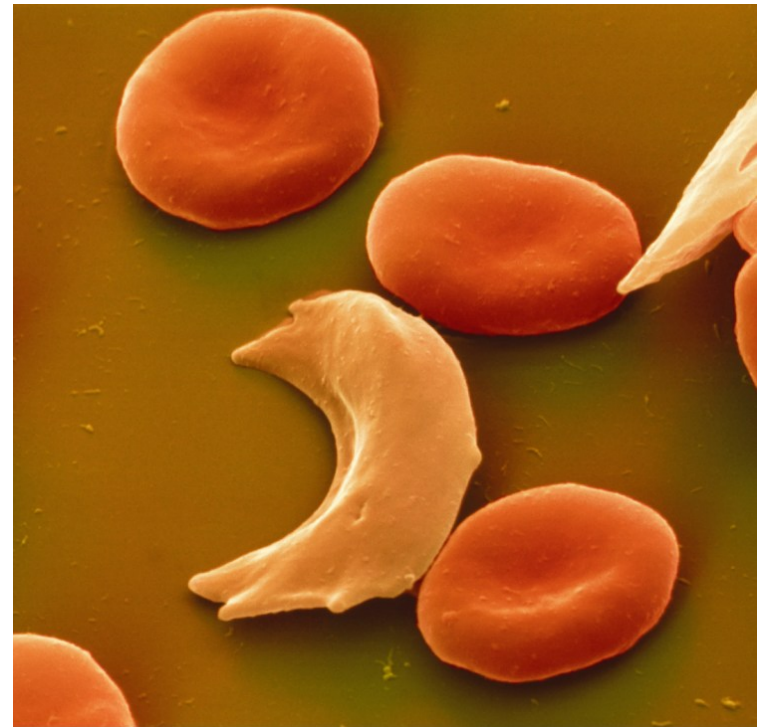
Le mutazioni possono alterare la struttura e la funzione dell'HB

Le emoglobinopatie sono tra le malattie genetiche più studiate. Sono note oltre 1000 di Hb, 90% dei casi dovute a singole sostituzioni amminoacidiche (mutazioni puntiformi).

5% della popolazione mondiale è portatrice di una variante.

L'anemia falciforme: causata da sostituzione Glu(6) → Val nelle catene β porta ad una proteina con caratteristiche anormali. Emoglobina risultante: HbS (**emoglobina S**).

Pietra miliare della medicina: nel 1956 l'HbS fu la prima patologia in cui una anomalia genetica venne correlata ad una specifica variazione amminoacidica di una proteina (malattia molecolare).

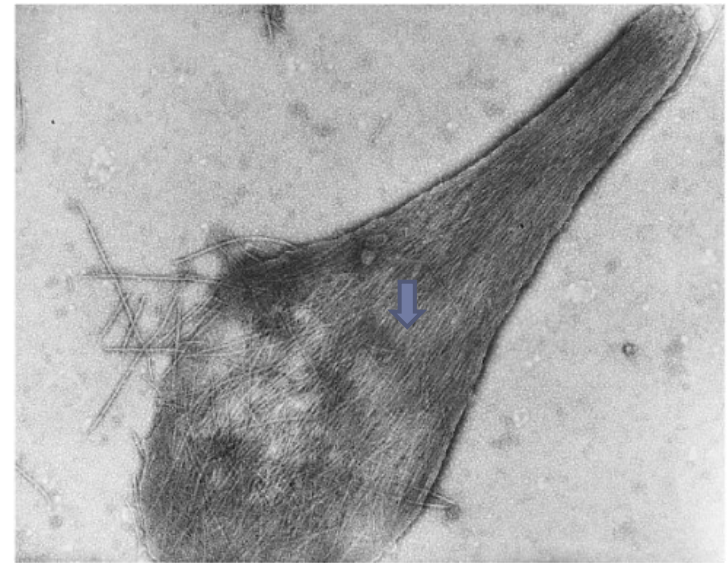
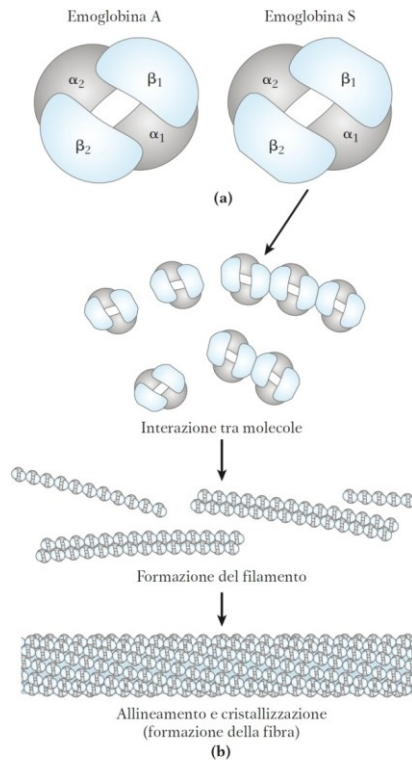
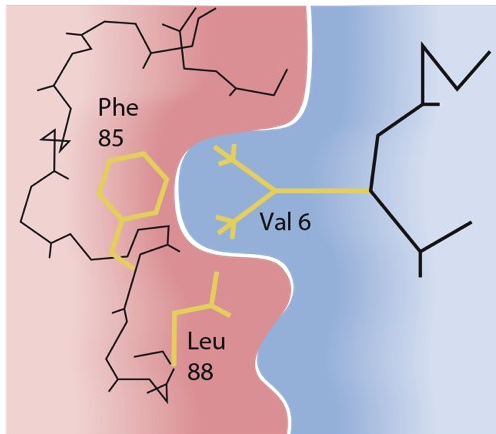
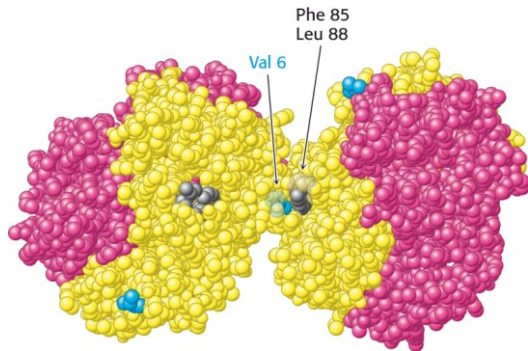


Eritrociti normali e a falce



Patogenesi Molecolare dell'HbS

La mutazione sostituisce un amminoacido idrofilico (**Glu**) con uno idrofobico (**Val**) sulla superficie della proteina, alterandone la solubilità. Nello stato deossigenato (T), Val6 si interagisce in una zona idrofobica di una subunità β adiacente. Questo contatto innesca una polimerizzazione che da luogo a **lunghe fibre di Hb insolubili**.



Le fibre dell' HbS distorcono l'eritrocita (forma a falce), danneggiando le fragili membrane che vanno incontro lisi determinando **anemia emolitica**.

Anomalie funzionali dell'Hb umana causate da mutazioni puntiformi

RESIDUO	SOSTITUZIONE	NOME COMUNE	COMMENTO
<i>Variazioni dell'affinità per l'O₂</i>			
CE3(35) α	His → Arg	Fort de France	p1/2↓; stabilizzazione di R
G2(95) α	Pro → Ser	Rampa	p1/2↓; stabilizzazione di R
HC3(141) α	Arg → <His	Suresnes	p1/2↓; stabilizzazione di R
E18(74) β	Gly → Asp	Sepherds Bush	p1/2↓; stabilizzazione di R
G4(102) β	Ans → Thr	Kansas	p1/2↓; stabilizzazione di R
<i>Perdita dell'eme e precipitazione</i>			
H19(136) α	Leu → Pro	Bibba	instabile; segmento H distorto
CD1(42) β	Phe → Ser	Hammersmith	instabile; perdita dell'eme
<i>Molecole con Fe (III)</i>			
E7(58) α	His → Tyr	M Boston	Fe(III) legato a Tyr invece che His
CD1(42) β	Ala → Asp	Seattle	stabilizzazione del Fe(III) con Asp
<i>Forma a falce degli eritrociti</i>			
A3(6) β	Glu → Val	S	Val β 6 si incastra tra Phe β 85 e Leu β 88 di un altro tetramero
GH4(121) β	Glu → Lys	O Arab	il residuo 121 β è vicino al 6 β