

Chimica Biologica

A.A. 2010-2011

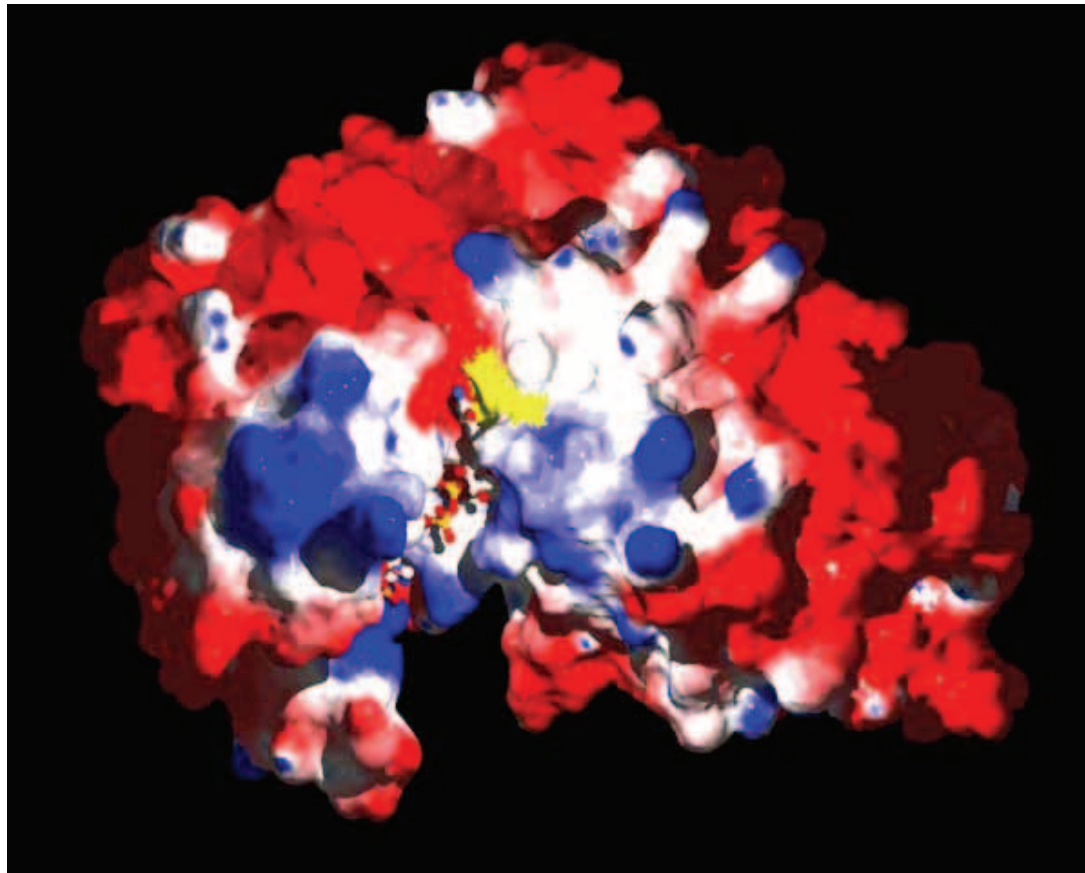
**Rapporto Struttura/Funzione
delle Proteine**

Interazioni proteina-ligando come base della funzione di molte proteine

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

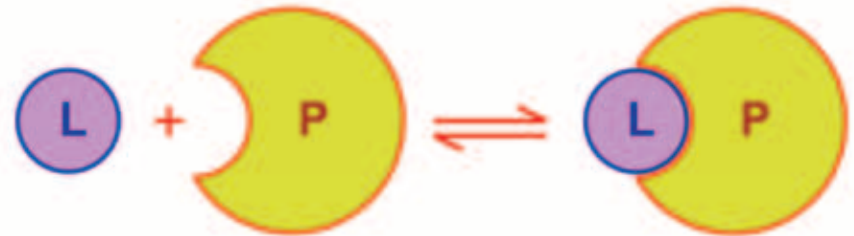


Struttura 3D di un complesso enzima-substrato



Interazione proteina-ligando

L'interazione proteina-ligando è in genere governata dal seguente **equilibrio chimico**:



che può essere descritto quantitativamente dalle equazioni:

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

K_a : costante di associazione tra P e L

K_d : **costante di dissociazione** di PL

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

Significato della K_d di un complesso binario

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

$$[P]_{Tot} = [P] + [PL]$$

$$[P] = [P]_{Tot} - [PL]$$

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

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

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

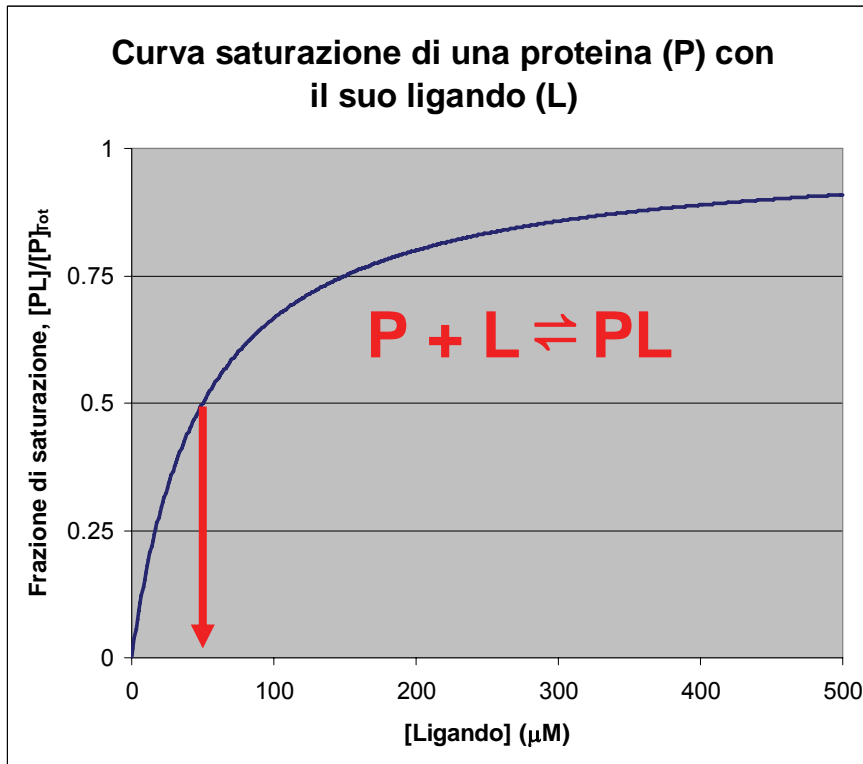
\Rightarrow

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

Frazione di saturazione θ (teta) in funzione della concentrazione di ligando libero

K_d è la “*concentrazione di semisaturazione*” di L libero

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



La **frazione di saturazione** (θ) di P (frazione di P complessata) varia al variare di $[L]$, per effetto della *legge dell'azione di massa*

Curva iperbolica (*iperbole equilatera*)

\Rightarrow asintoti perpendicolari

K_d di alcune proteine per il loro ligando

Some Protein Dissociation Constants

Protein	Ligand	K_d (M)*
Avidin (egg white) [†]	Biotin	1×10^{-15}
Insulin receptor (human)	Insulin	1×10^{-10}
Anti-HIV immunoglobulin (human) [‡]	gp41 (HIV-1 surface protein)	4×10^{-10}
Nickel-binding protein (<i>E. coli</i>)	Ni^{2+}	1×10^{-7}
Calmodulin (rat) [§]	Ca^{2+}	3×10^{-6}
		2×10^{-5}

⇒ più la K_d è bassa, più l'interazione proteina-ligando è *forte*

**Struttura/Funzione e
Regolazione nella famiglia
delle globine:**

Mioglobina ed Emoglobina

La superfamiglia delle Globine

- proteine che legano reversibilmente ossigeno molecolare (o diossigeno: O₂)
- **Mioglobina (Mb)** e **Emoglobina (Hb)** sono i più importanti membri di questa famiglia di proteine tra loro omologhe (e strutturalmente simili)

Mioglobina:

- proteina monomerica (153 aa, capodoglio)
- intracellulare (muscoli dei vertebrati)

Emoglobina:

- proteina tetramerica a₂b₂ (umana)
 - 2 catene a 141 a.a.
 - 2 catene b 146 a.a.
- intracellulare (eritrociti)

Ruolo di Hb e Mb nel trasporto di O₂

- il **metabolismo aerobico** richiede l'apporto di O₂ ai tessuti
 - in organismi piccoli (fino ad alcuni millimetri) la diffusione dall'esterno attraverso i tessuti è sufficiente
 - organismi più grandi hanno un **sistema circolatorio**
 - l'O₂ ha una **bassa solubilità in acqua** ($\sim 10^{-4}$ M nel sangue)
- ⇒ apposite **proteine trasportatrici** di ossigeno ne **aumentano la solubilità** nei fluidi circolanti

Ruolo di Hb e Mb nel trasporto di O₂

- queste proteine possono essere in soluzione (in alcuni invertebrati) o concentrate in cellule specializzate (**eritrociti** nei vertebrati)
- nei vertebrati la proteina trasportatrice di O₂ del sangue è l'**emoglobina (Hb)**
- cellule che richiedono grossi apporti di O₂ (come le **cellule muscolari**) contengono la **mioglobina (Mb)**, che:
 - aumenta la **solubilità effettiva** intracellulare di O₂ accelerandone la **diffusione** e consentendo, in alcuni casi, una forma di **immagazzinamento** di O₂


Es: nei muscoli dei mammiferi acquatici la concentrazione di Mb è ~10 volte superiore a quella dei mammiferi terrestri)
 - ratti knocked out normali → Mb non necessaria ai muscoli in normali condizioni metaboliche

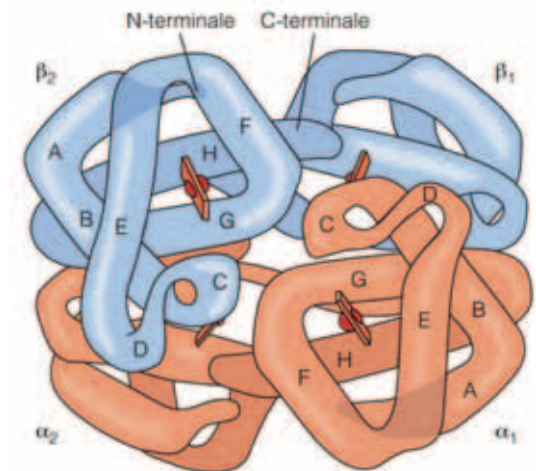
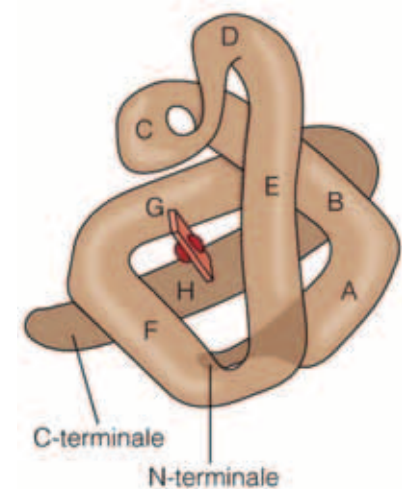
Requisiti di una sostanza trasportatrice di O₂

- una sostanza deputata al trasporto di O₂ deve:
 - **legarlo e rilasciarlo** in modo opportuno
 - **impedire che reagisca con altre sostanze**
- le **proteine** non hanno gruppi funzionali adatti a fungere da siti di legame per l'O₂
- alcuni ioni di **metalli di transizione** nei loro stati di ossidazione più bassi (Cu⁺, Fe²⁺) legano fortemente l'O₂ ma sono soggetti a venirci ossidati
- le proteine trasportatrici di ossigeno sono **proteine coniugate** contenenti **Fe eminico** (gruppo **eme**)
 - lo ione ferroso dell'eme (Fe²⁺) lega l'O₂
 - la componente proteica crea un ambiente idrofobico in cui il Fe²⁺ non può essere ossidato a Fe³⁺

Proteine coniugate

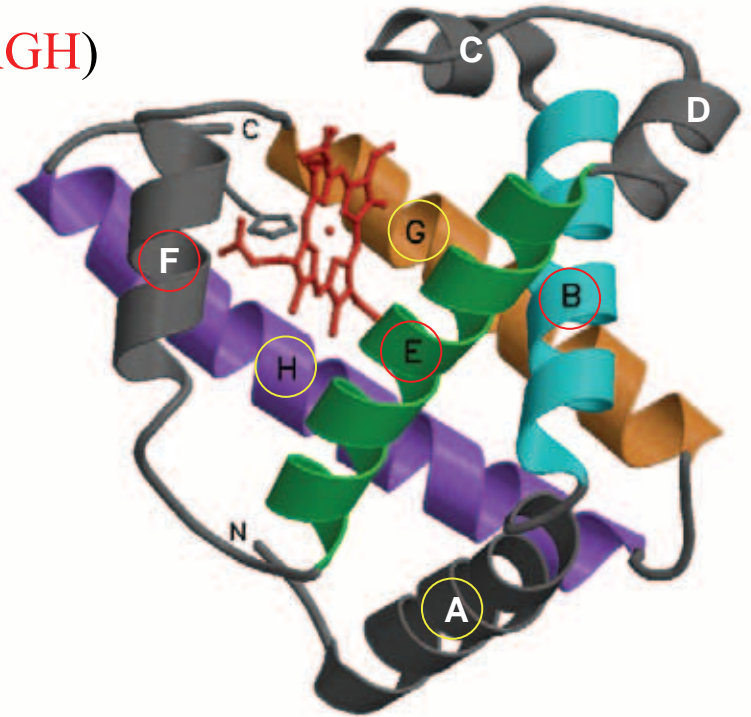
- proteine che contengono una porzione **non peptidica**
- quando la porzione non peptidica è una sostanza organica stabilmente legata alla componente proteica viene detta **gruppo prostetico**

Oloproteina  **Apoproteina**
Gruppo prostetico



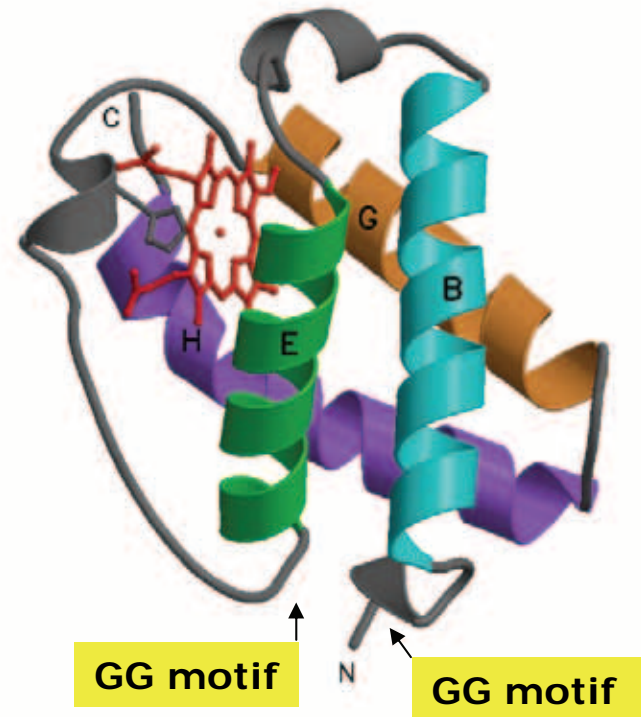
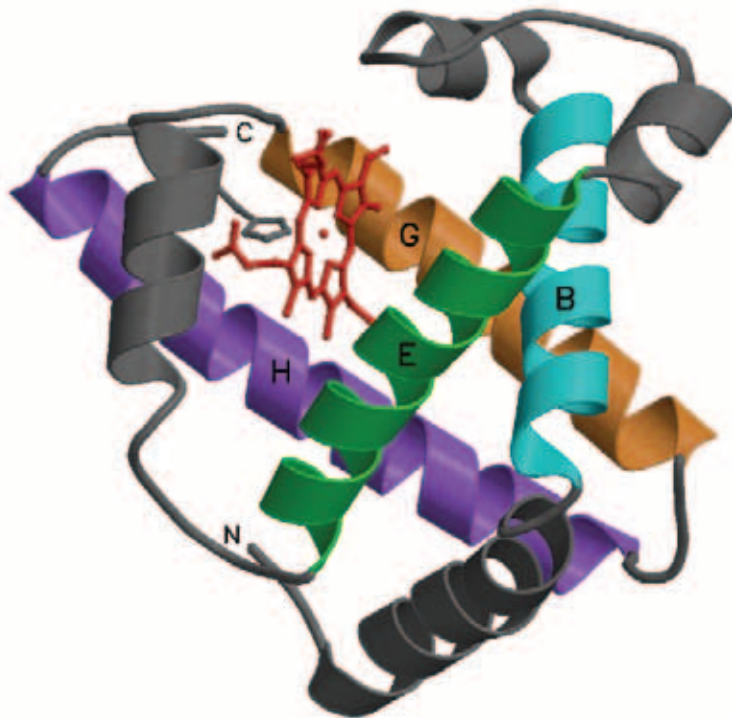
Mioglobina

- Struttura (Kendrew, 1959, Mb di capodoglio)
(prima struttura determinata col metodo dei raggi X)
- 153 residui
- 8 α -eliche (A-H), sandwich 3-su-3 (**BEF-AGH**)
- prototipo strutturale per le globine
- gruppo eme legato in **tasca idrofobica**
fra **elica E** ed **F**



Emoglobine troncate (2/2 Hb)

- le prime 2 strutture (da *P.caudatum* e *C.eugametos*) determinate nel 2000
EMBO Journal (2000) **19**, 2424-2434
- eme stabilizzato da sandwich di 2 eliche su 2 eliche (2/2 Hb)
GENE (2007) **398**, 2-11



Mioglobina

Eme:

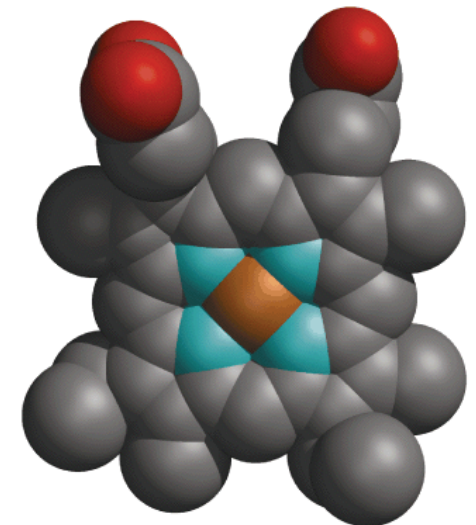
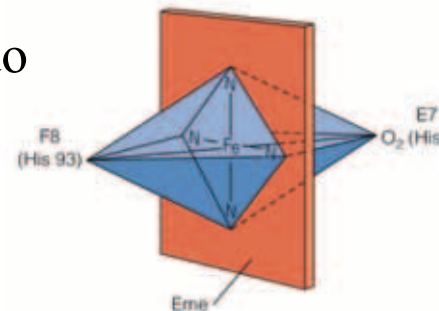
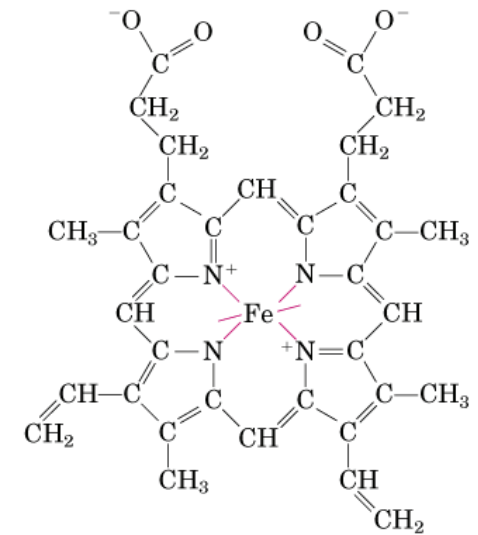
- derivato porfirinico con 4 anelli pirrolici (A-D) uniti da ponti metinici (anello tetrapirrolico)

- eme = Fe-protoporfirina IX

la **componente organica** dell'eme è la **protoporfirina IX**, composto appartenente alla classe delle porfirine

- sistema coniugato (legami Fe-N equivalenti)

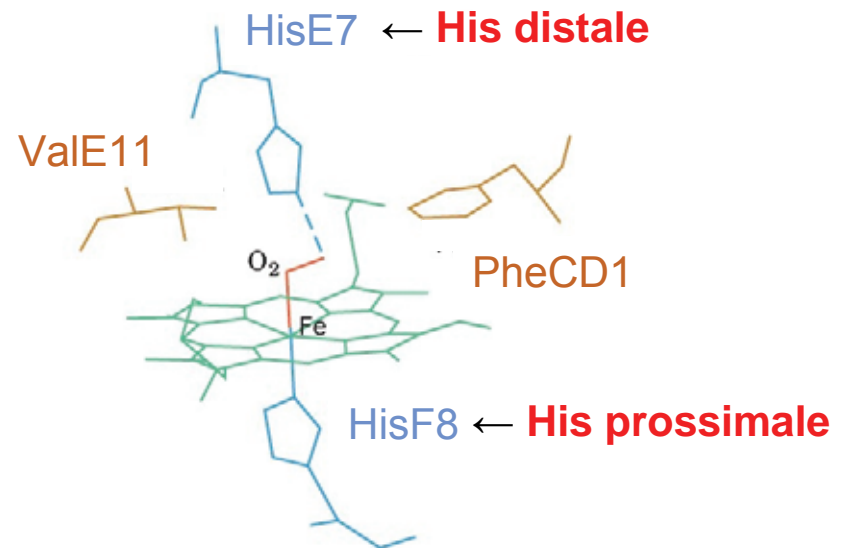
- lo ione Fe^{2+} accetta 6 legami di coordinazione ordinati secondo i vertici di un ottaedro



Mioglobina

Eme:

- Fe(II) coordinato a 4N della porfirina e ad N della catena laterale **HisF8**
- O₂ sesto ligando di Fe(II) stabilizzato da **HisE7** (inclinazione 60°)
- eme in corretta posizione per interazione con ValE11 e PheCD1

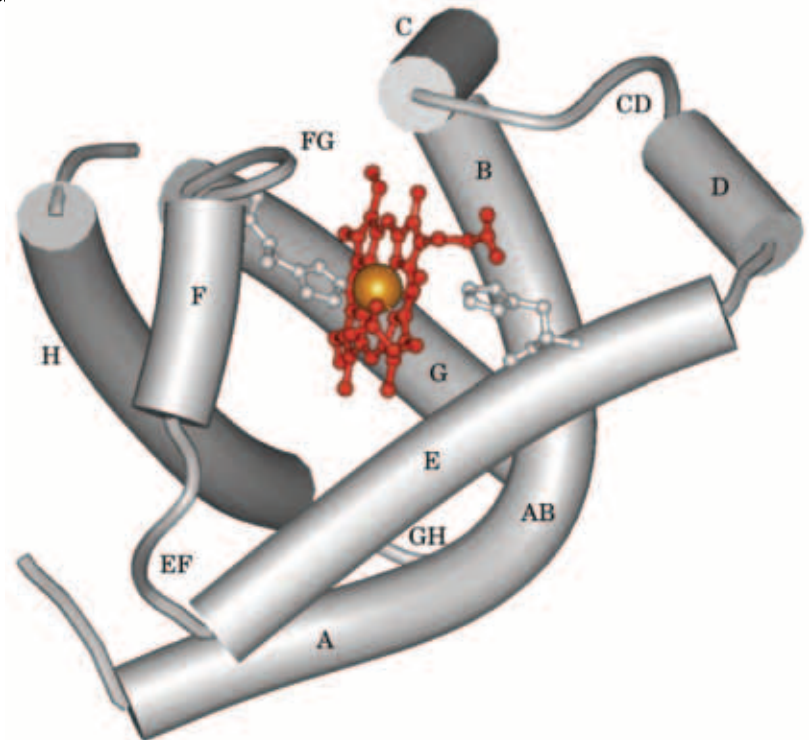


Nomenclatura dei residui nelle globine

- nelle globine (struttura **tutta α**), le α eliche sono indicate sequenzialmente dal N- al C-terminale della catena polipeptidica con **lettere** dalla **A** alla **H**
- i tratti di connessione (anse) tra due eliche adiacenti sono indicati con le due lettere identificative di ciascuna elica
- i residui sono indicati sulla base della loro posizione in un'elica o in un'ansa

Esempi:

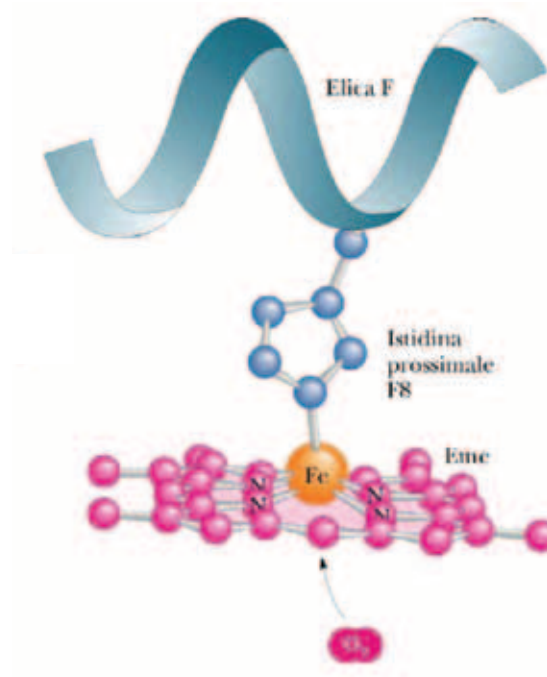
- AB è l'ansa tra elica A e B
- E7 è il settimo residuo dell'elica E
- FG5 è il quinto residuo dell'ansa che connette le eliche F e G



Struttura terziaria della Mb

Mioglobina

Eme:

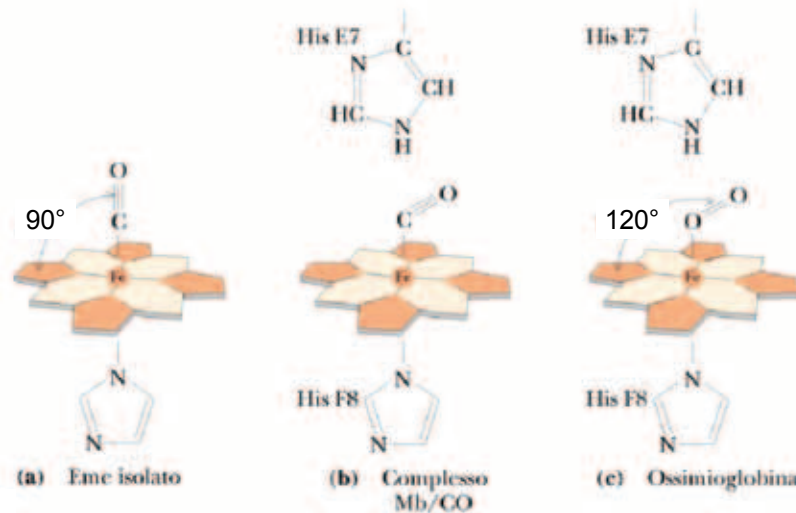


- deossimioglobina: Fe(II) fuori dal piano dell'eme di 0.055 nm (struttura a cupola)
- ossimioglobina: Fe(II) fuori dal piano dell'eme di 0.026 nm
- **cambiamenti** non rilevanti biologicamente per Mb ma **fondamentali per la regolazione allosterica di Hb**

Mioglobina

- O₂ ossida irreversibilmente Fe(II) di un **eme isolato** a Fe(III), forma ionica che non può legare O₂ (ematina): Fe(II) → Fe(III) o Fe²⁺ → Fe³⁺
- la parte proteica della Mb (e della Hb) impedisce l'ossidazione dell'eme e rende possibile il legame reversibile di O₂
- l'ossigenazione altera lo stato elettronico dei complessi Fe(II)-eme (rosso scuro → sangue venoso, rosso scarlatto → sangue arterioso)
- al di fuori della cellula Fe(II) (forma ferrosa) può essere ossidato lentamente a Fe(III) (forma ferrica) dare **metamioglobina** e **metaemoglobina** (colore marrone scuro → carne vecchia/sangue secco)
- **CO**, NO, H₂S possono legarsi al gruppo eme delle proteine (con affinità maggiori di O₂) → **tossicità** (Hb: affinità per CO 200 volte maggiore di O₂)

Mioglobina



- eme isolato: affinità per CO 25000 volte maggiore di O₂
- Mb: affinità per CO 250 volte maggiore di O₂
- HisE7 impedisce formazione legame lineare fra Fe e CO

⇒ diminuita affinità per CO rispetto a eme isolato

Cinetica di legame O₂ per Mb:

- legame reversibile di O₂ a Mb:



costante di dissociazione
$$K = \frac{[\text{Mb}][\text{O}_2]}{[\text{MbO}_2]}$$

La dissociazione dell'O₂ da Mb può essere caratterizzata mediante la sua “**saturatione frazionale Y_{O₂}**”

$$Y_{\text{O}_2} = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}] + [\text{MbO}_2]} = \frac{[\text{O}_2]}{K + [\text{O}_2]} \quad \text{frazione di siti di legame di O}_2 \text{ occupati}$$

essendo O₂ un gas
[O₂] come pO₂

$$Y_{\text{O}_2} = \frac{p\text{O}_2}{K + p\text{O}_2} \quad p\text{O}_2 = \text{pressione parziale (tensione ossigeno)}$$

Cinetica di legame O₂ per Mb:

- la solubilizzazione dei gas nei liquidi è governata dalla **legge di Henry**:

$$P = kC$$

dove

P è la pressione del gas sulla soluzione

C è la concentrazione del gas nella soluzione

k è una costante tipica di ciascun gas che correla la pressione del gas sulla soluzione e la sua concentrazione, ad esempio:

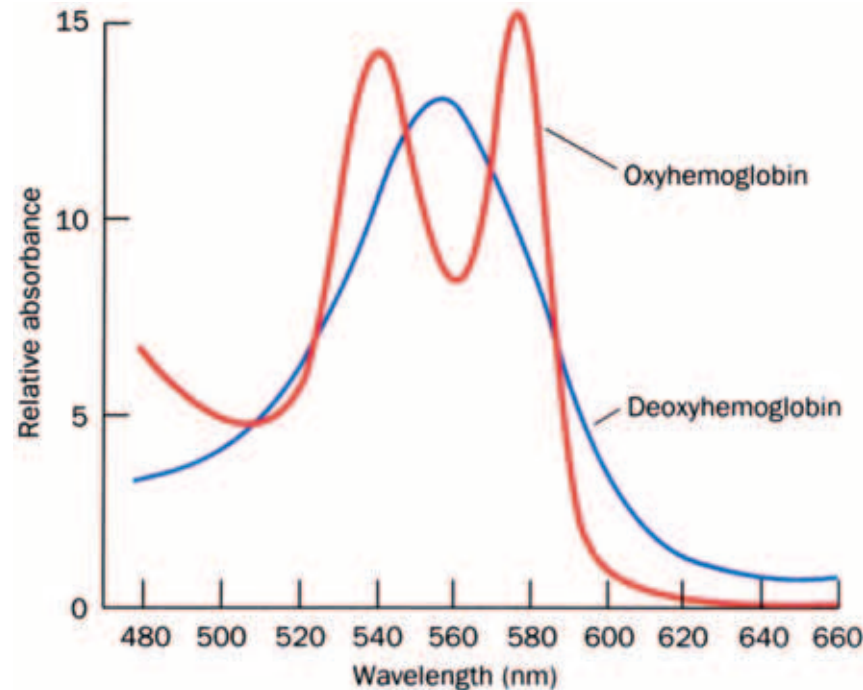
$$\text{O}_2 : k = 4.34 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{atm/mol (a } T = 298 \text{ K)}$$

- un aumento di T, provocando aumento dell'energia cinetica del gas, provoca una diminuzione di solubilità per l'effetto di allontanamento delle molecole gassose dalla fase liquida

- ogni gas, così come specificato nell'argomento relativo alla **Legge delle pressioni parziali**, entra in soluzione o si libera indipendentemente da ciò che fanno gli altri gas presenti

Cinetica di legame O₂ per Mb:

- il legame dell'O₂ alla Mb (o alla Hb) può essere studiato con metodi spettroscopici (spettrofotometria)



Cinetica di legame O_2 per Mb:

$$Y_{O_2} = \frac{pO_2}{K + pO_2} \quad \text{iperbole rettangolare}$$

- a bassi pO_2 si lega poco O_2 a Mb
- all'aumentare di pO_2 aumentano i siti occupati da O_2
- a pO_2 elevati si ha saturazione (tutti i siti sono occupati)
- la pendenza della curva aumenta al diminuire di K
- quando $K = pO_2 \Rightarrow Y_{O_2} = 0.5$ (Mb è saturata al 50% da O_2)
- operativamente la costante di dissociazione K può essere definita come: $K = p_{50}$ (per Mb $p_{50} = 2.8$ torr)
- alle pO_2 fisiologiche nel sangue (100 torr arterie, 30 torr vene) Mb è sempre saturata \Rightarrow Mb molto efficace per favorire il passaggio di O_2 dai capillari alle cellule muscolari

