

I pigmenti respiratori,
proteine che legano e trasportano
l'ossigeno

“La respirazione è una forma di combustione del tutto analoga a quella di una candela”

(Antoine Lavoisier 1743-1794)

La maggior parte degli esseri viventi respira ossigeno. Perché?

Due considerazioni

1. Dalla combustione delle sostanze organiche si può ottenere molta energia perché il potenziale redox O_2/H_2O è molto positivo ($\Delta G = nF \Delta E$)
2. I processi biochimici avvengono in soluzione acquosa ma la solubilità dell' O_2 è bassa, 0.0092 g/L

Si è dovuto evolvere un sistema
che rendesse biodisponibile
l'ossigeno: un sistema di proteine
per la cattura, il trasporto e l'utilizzo
dell'ossigeno molto efficiente

INCREMENTO DI SOLUBILITA' nel sangue umano

Senza proteine di trasporto = 7.15 mg/L

Con proteine di trasporto, emoglobina = 357 mg/L

Fattore = 50

Compatibile con la combustione di 8000 kJ/giorno
che richiede 572 g di ossigeno

Per le reazioni che coinvolgono
direttamente l'ossigeno si veda
più avanti la respirazione
mitocondriale

I pigmenti respiratori sono presenti in quasi tutti i gruppi tassonomici

mammiferi

uccelli e rettili

pesci e anfibi

lombrichi e molluschi

insetti e ragni

protozoi

piante leguminose

Diversità molecolare dei *pigmenti respiratori*

Mioglobina	Ferro-eme	rosso
-------------------	-----------	-------

Emoglobina	Ferro-eme	rosso
-------------------	-----------	-------

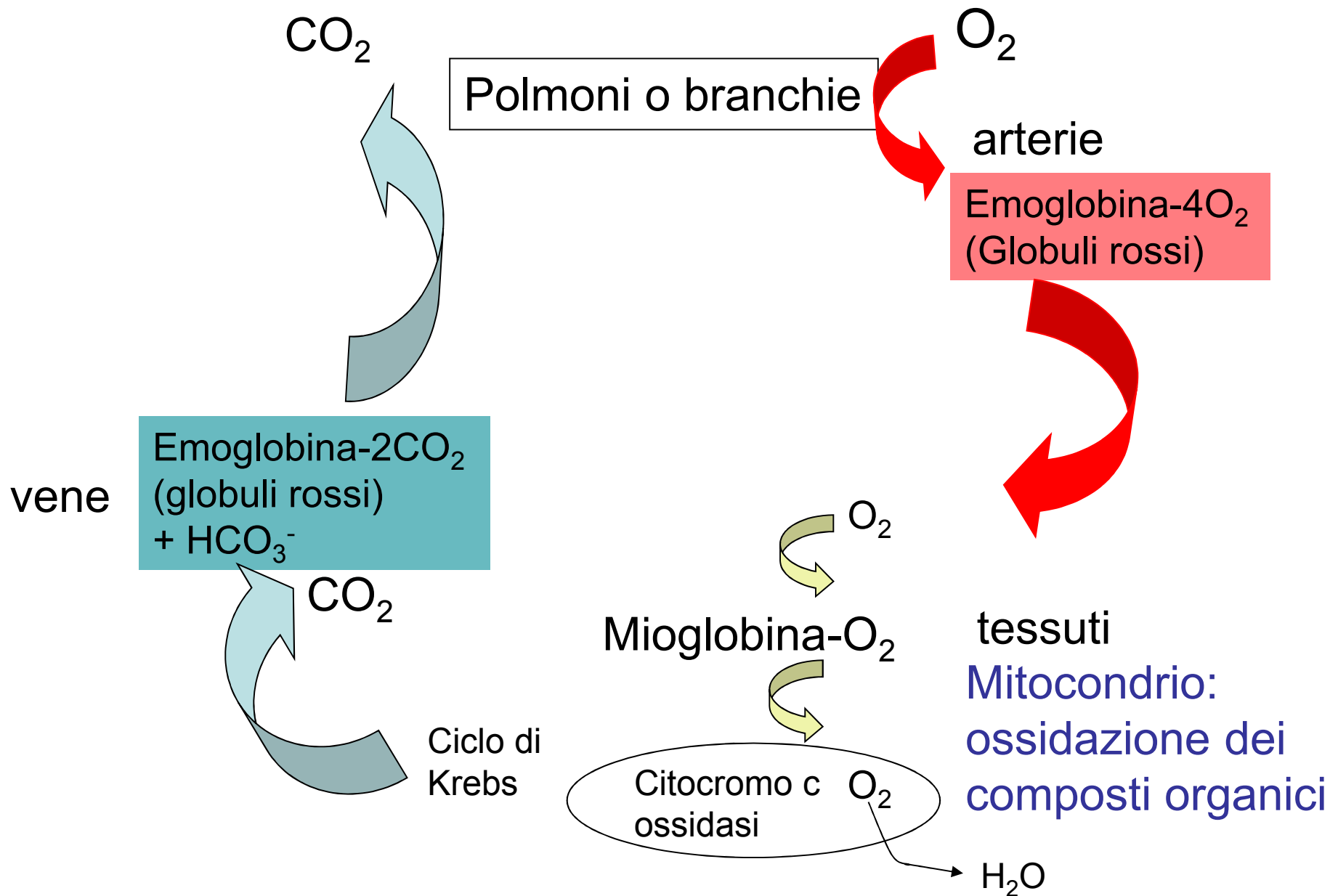
Clorocruorina	Ferro-eme	verde
----------------------	-----------	-------

Emocianina	Rame	blu
-------------------	------	-----

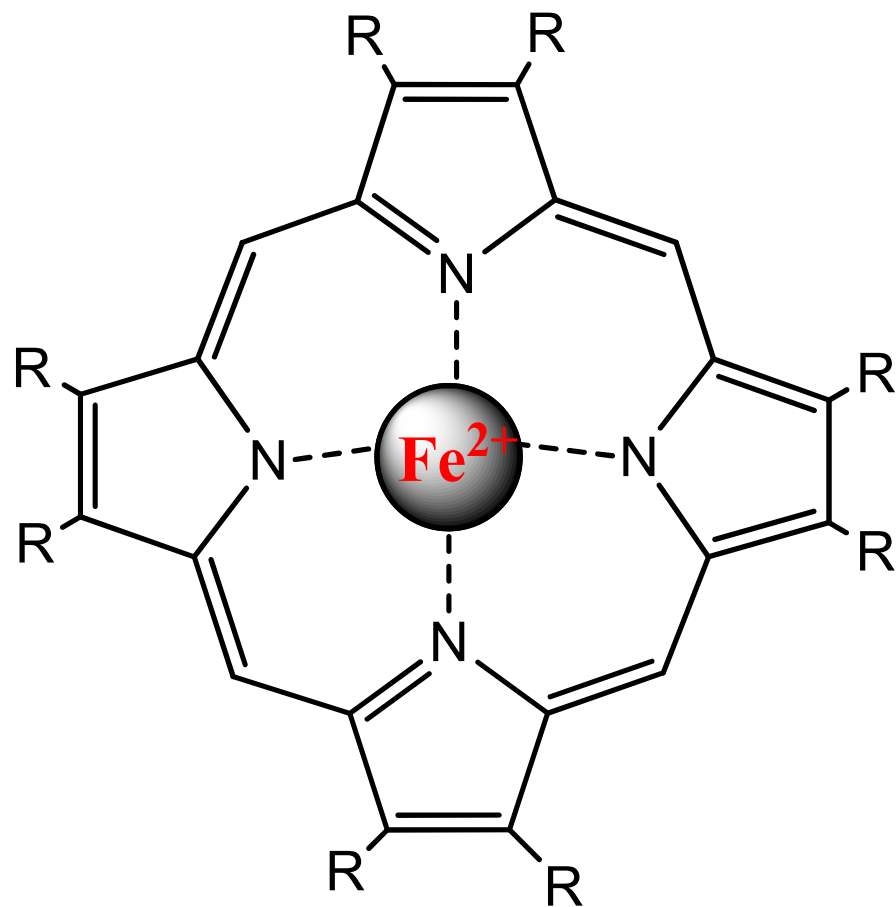
Emeritrina	Ferro-non eme	rosso
-------------------	---------------	-------

I pigmenti respiratori che
contengono ferro

Scambi respiratori e trasporto dei gas nei vertebrati



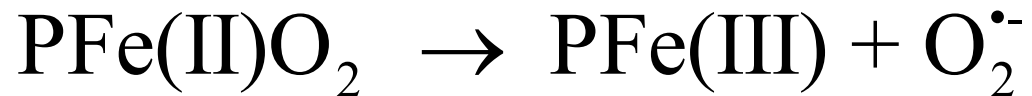
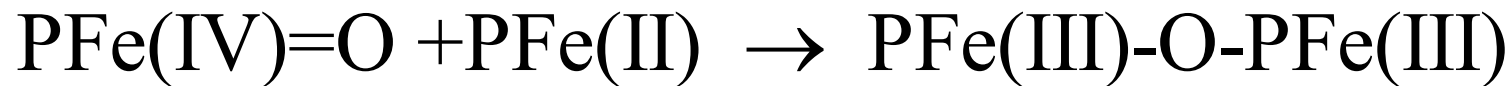
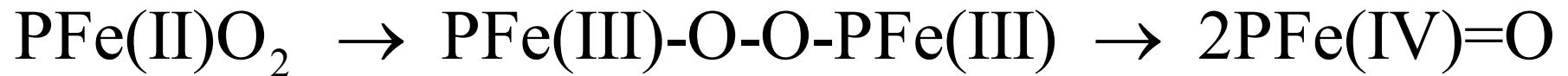
- E' noto che il Fe^{2+} porfirinico può legare l' O_2 in modo *reversibile* ma in ambiente acquoso è facilmente ossidato a Fe^{3+} e in questa forma non lega più l' O_2



porfirina

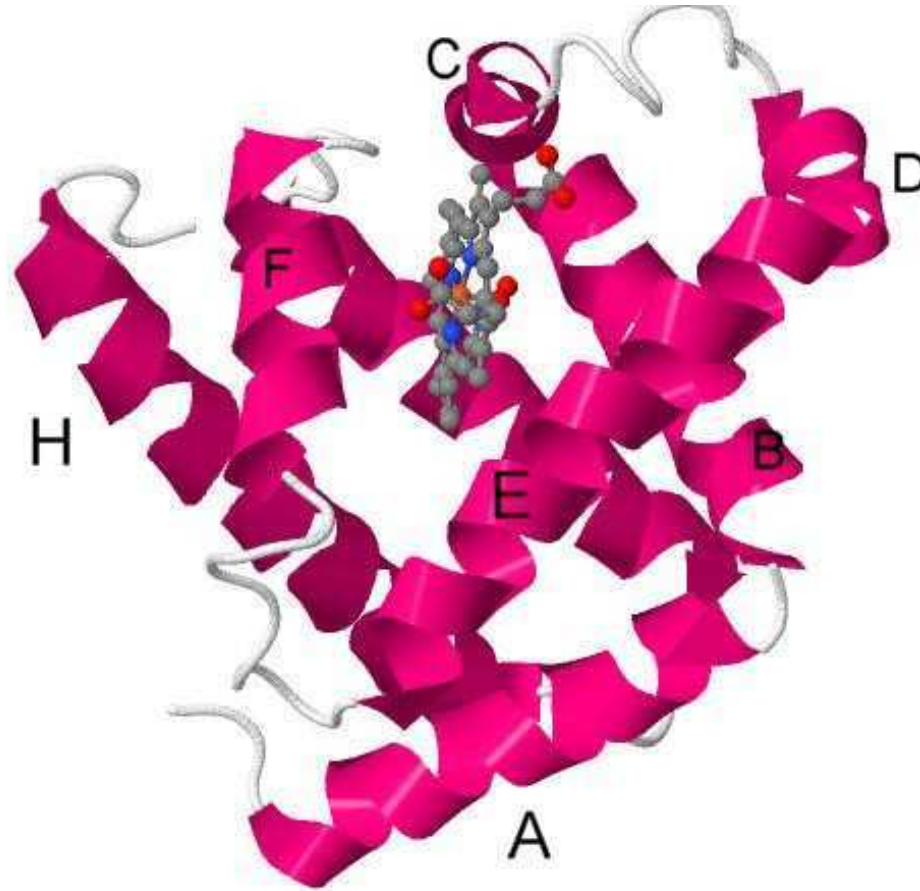
Reazioni della porfirina (PFe) in acqua

1. Ossidazione e dimerizzazione
2. Ossidazione con produzione di superossido

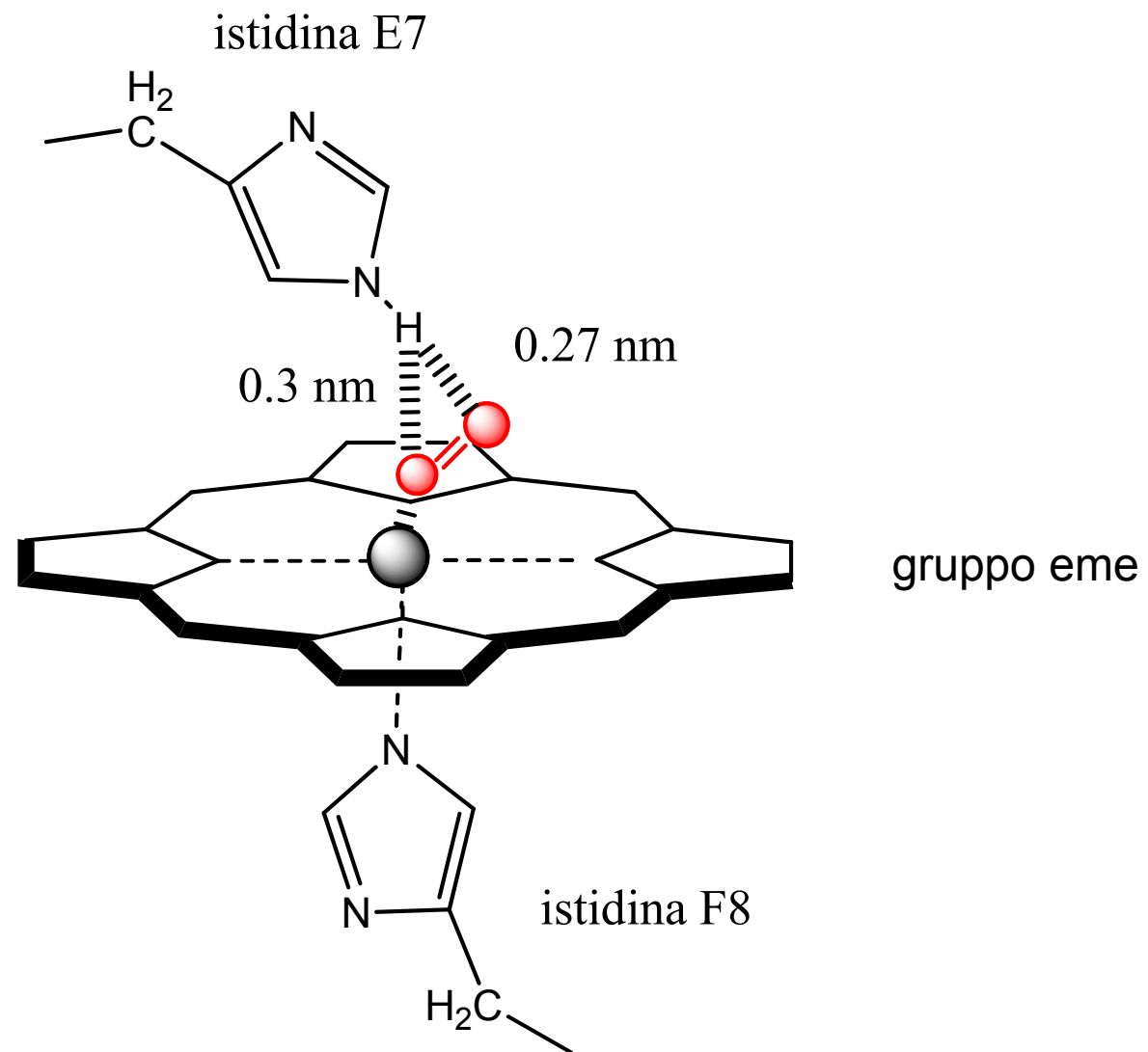


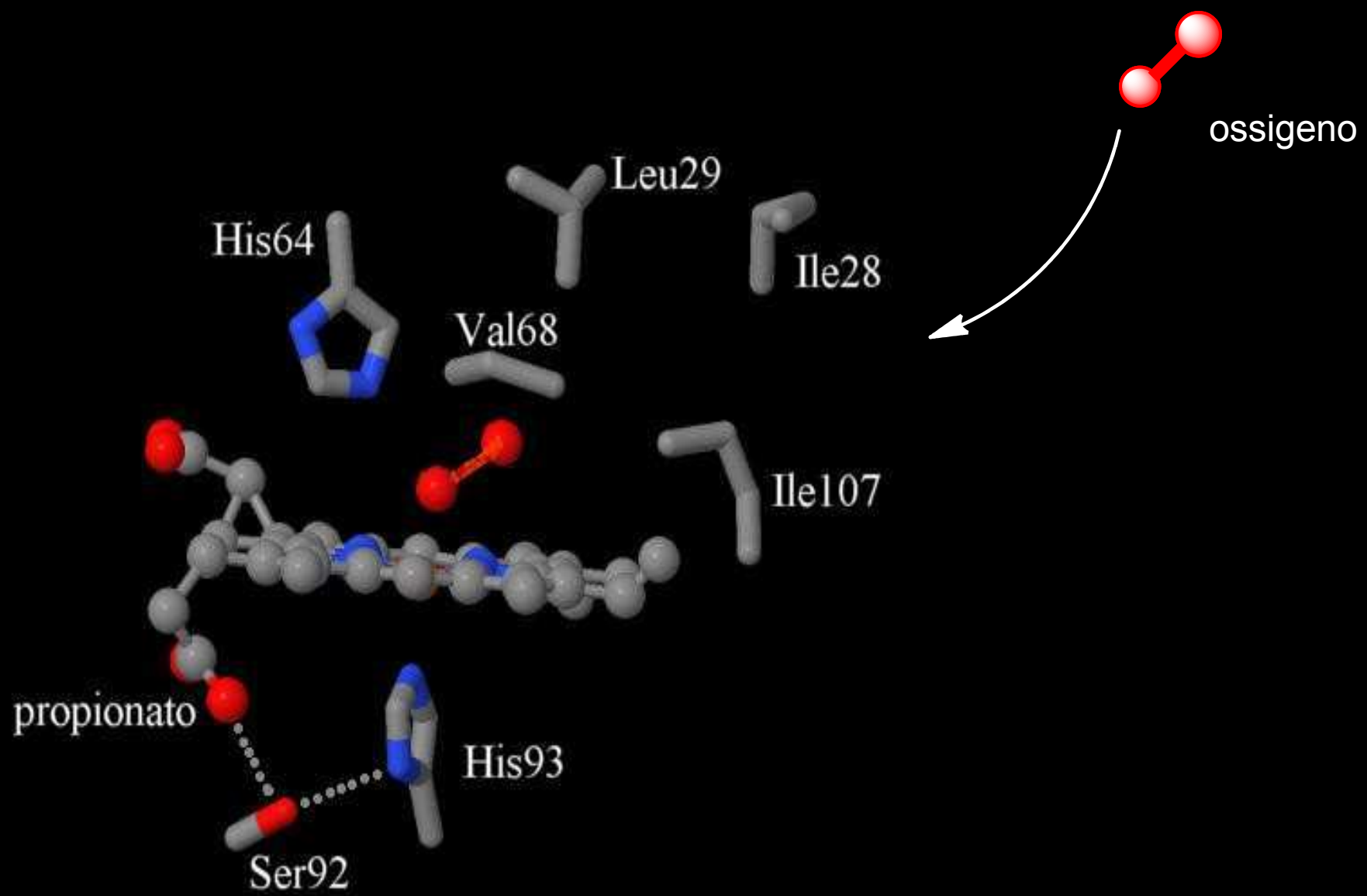
- Le proteine possono garantire un ambiente in cui il Fe^{2+} legghi l' O_2 senza essere ossidato in quantità significative

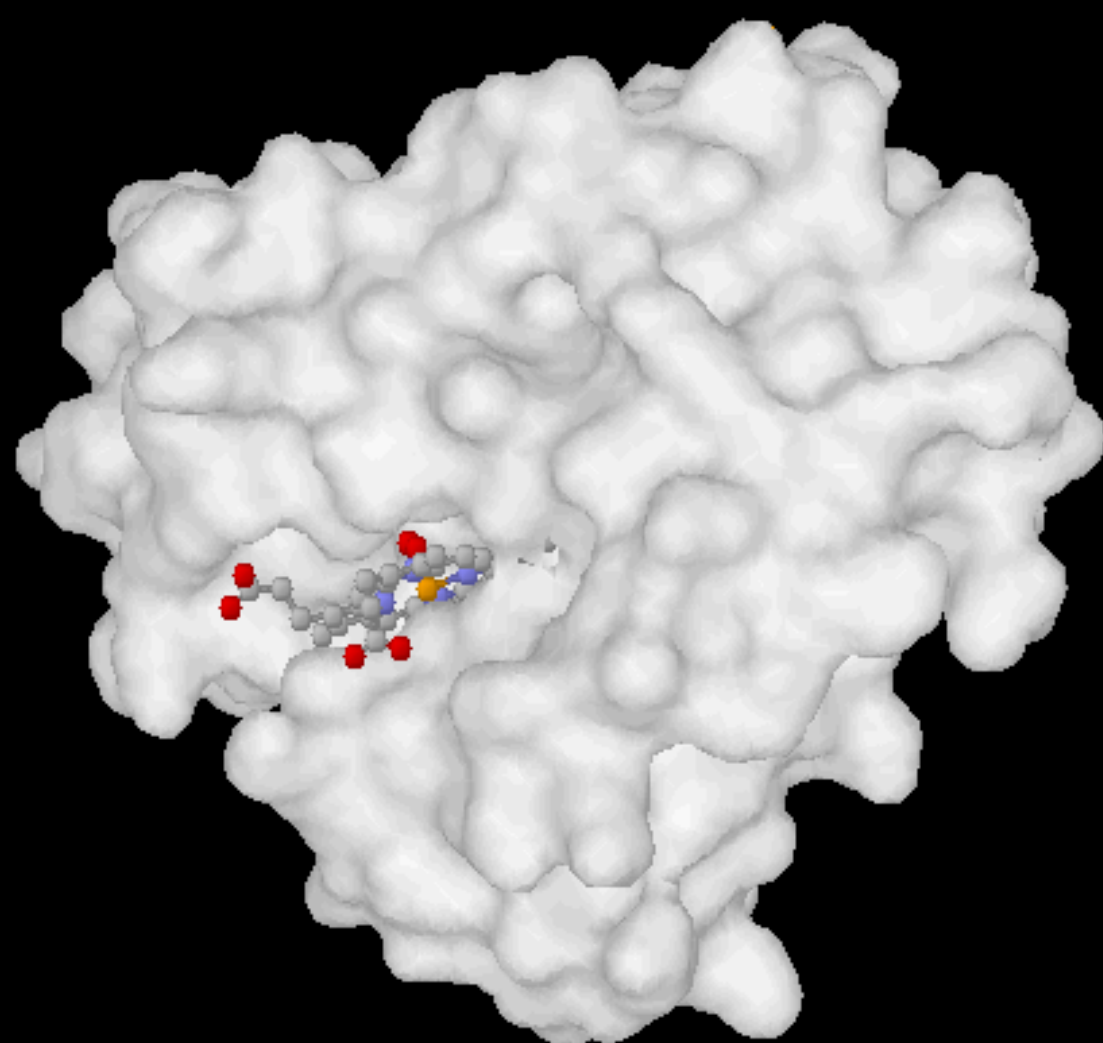
Struttura della mioglobina



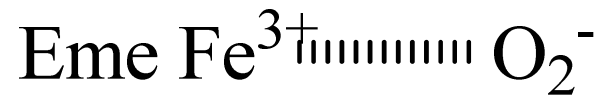
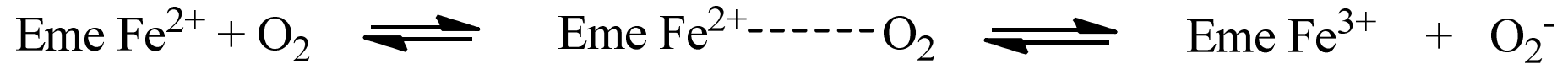
153 aminoacidi, 8 segmenti di alfa-elica
Peso Molecolare = 17.000







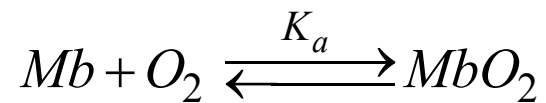
L'ambiente idrofobico impedisce l'ossidazione
del Fe^{2+} da parte dell'ossigeno molecolare



stabile



Favorita in ambiente
acquosa (alta costante
dielettrica dell'acqua)



$$K_a = \frac{[MbO_2]}{[Mb][O_2]}$$

$$\theta = \frac{[\text{siti occupati}]}{[\text{siti totali}]} = \frac{[MbO_2]}{[MbO_2] + [Mb]}$$

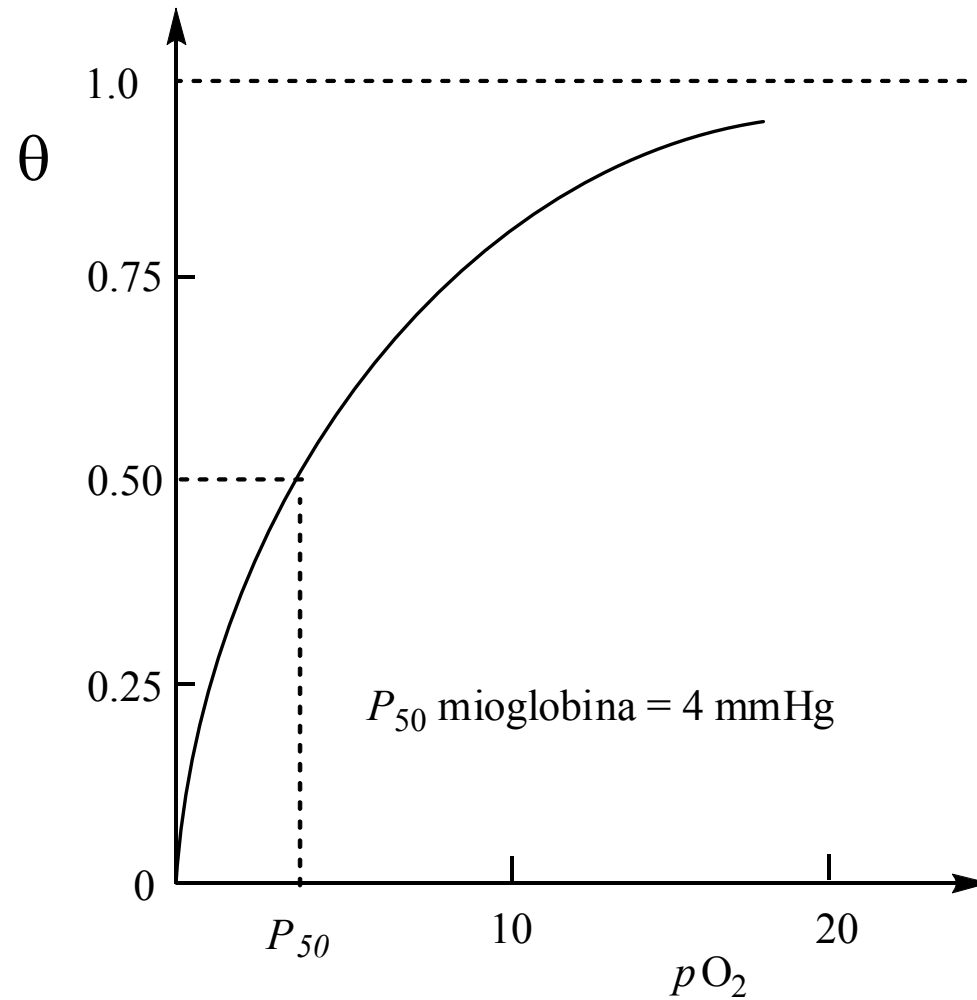
$$\theta = \frac{K_a [Mb][O_2]}{K_a [Mb][O_2] + [Mb]}$$

$$\theta = \frac{K_a [O_2]}{K_a [O_2] + 1} = \frac{[O_2]}{[O_2] + 1/K_a}$$

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + K_d}$$

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

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



altra unità di misura il pascal (Pa):
 1 mmHg = 1.3×10^{-3} Pa, quindi 5.2 kPa

L'emoglobina

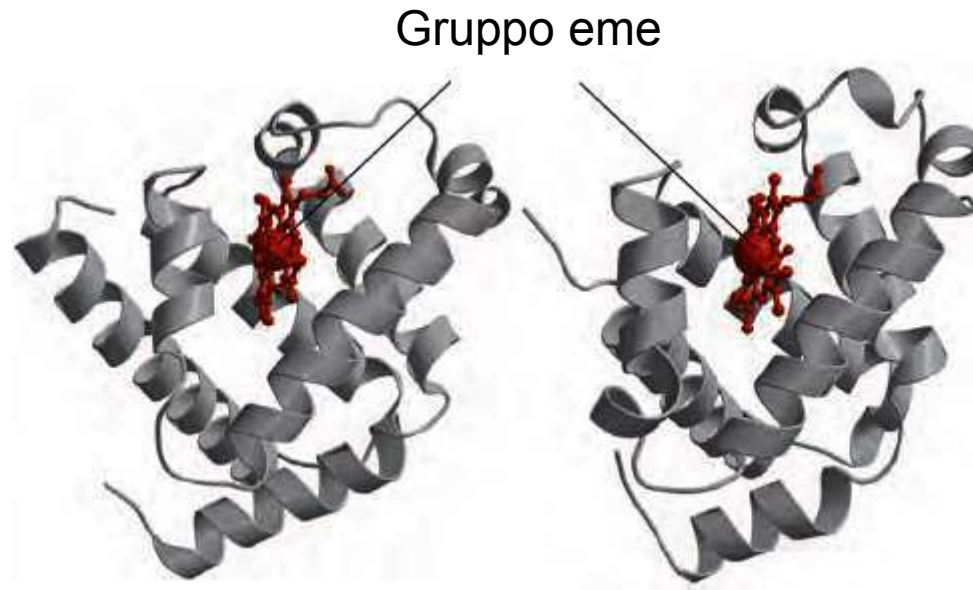
PM = 64.000

4 subunità:

2 α (141 aa)

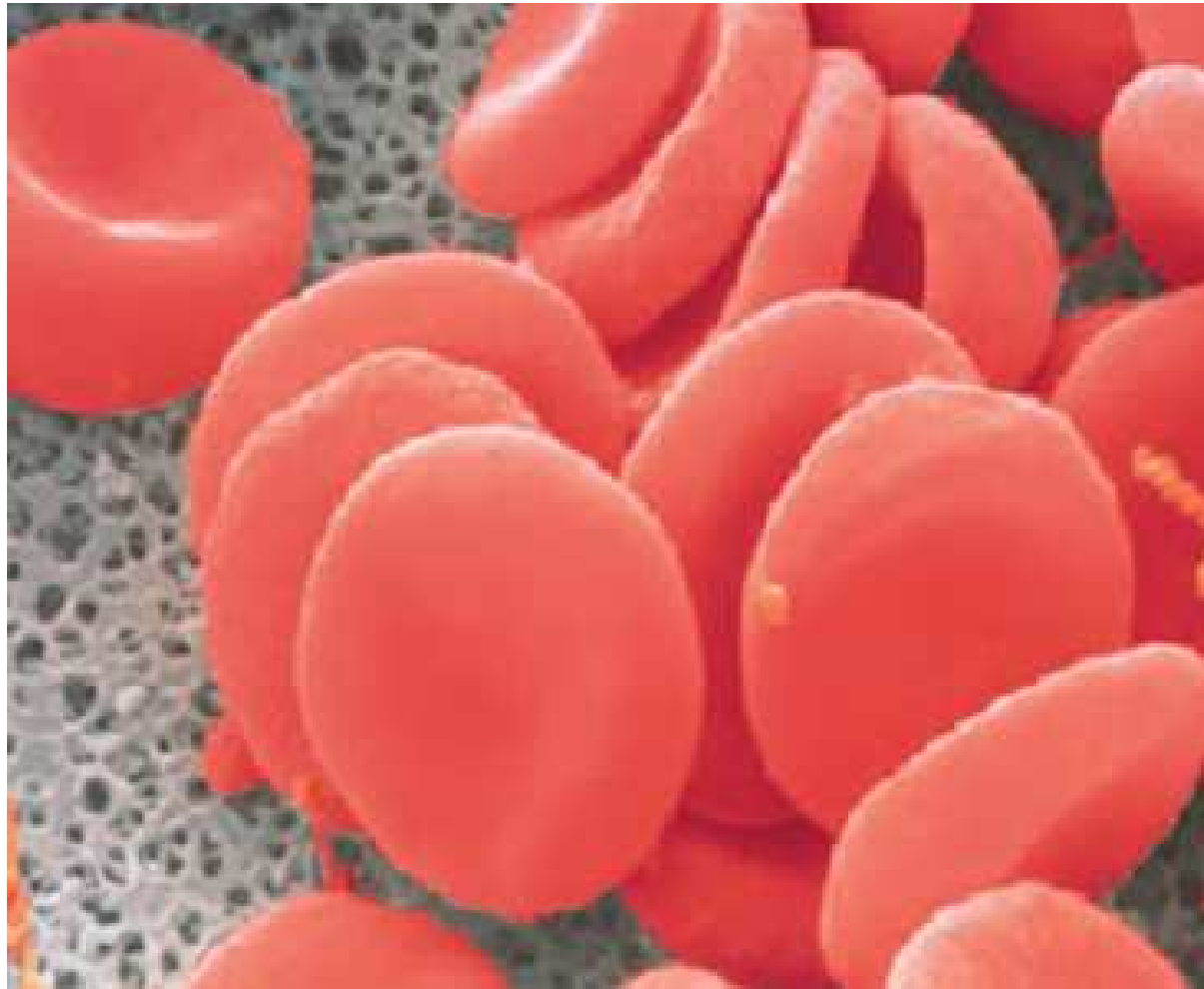
2 β (146 aa)

Ogni subunità
lega 1 molecola
di O₂



Mioglobina

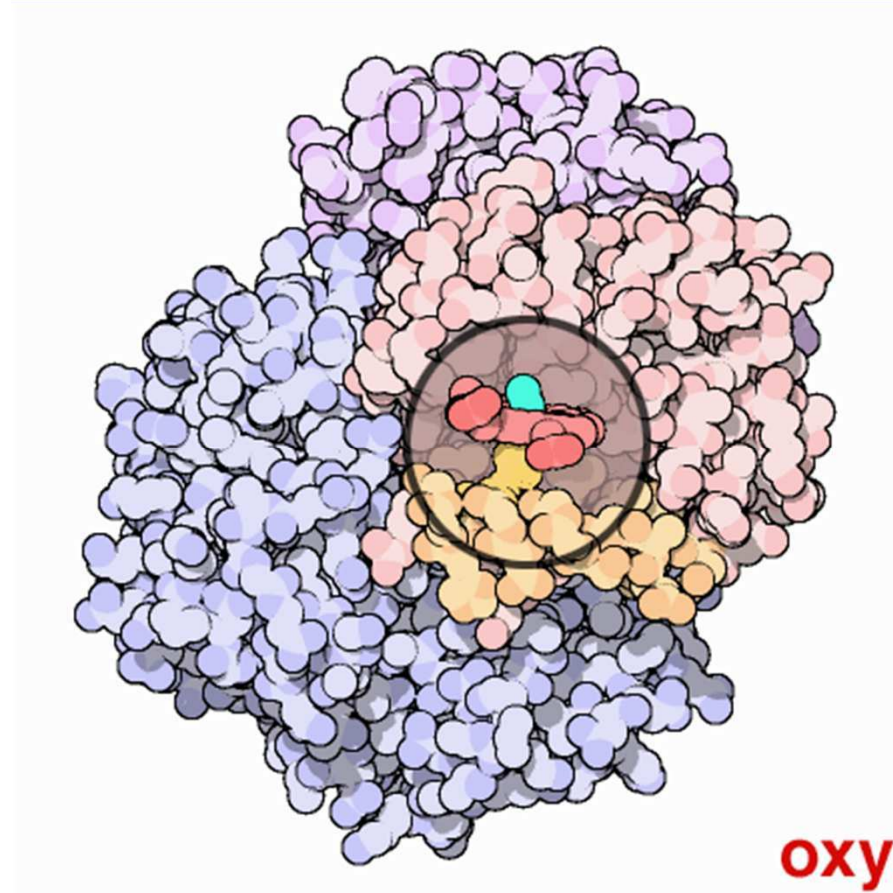
Subunità β dell'emoglobina



Nei vertebrati l'emoglobina è confinata nei globuli rossi
Nell'uomo la concentrazione complessiva è 160 g/L
(2.5 mM oppure 10 mM per sito di ossigeno).
Tuttavia in molte classi di organismi si trova libera

L'emoglobina è una proteina allosterica

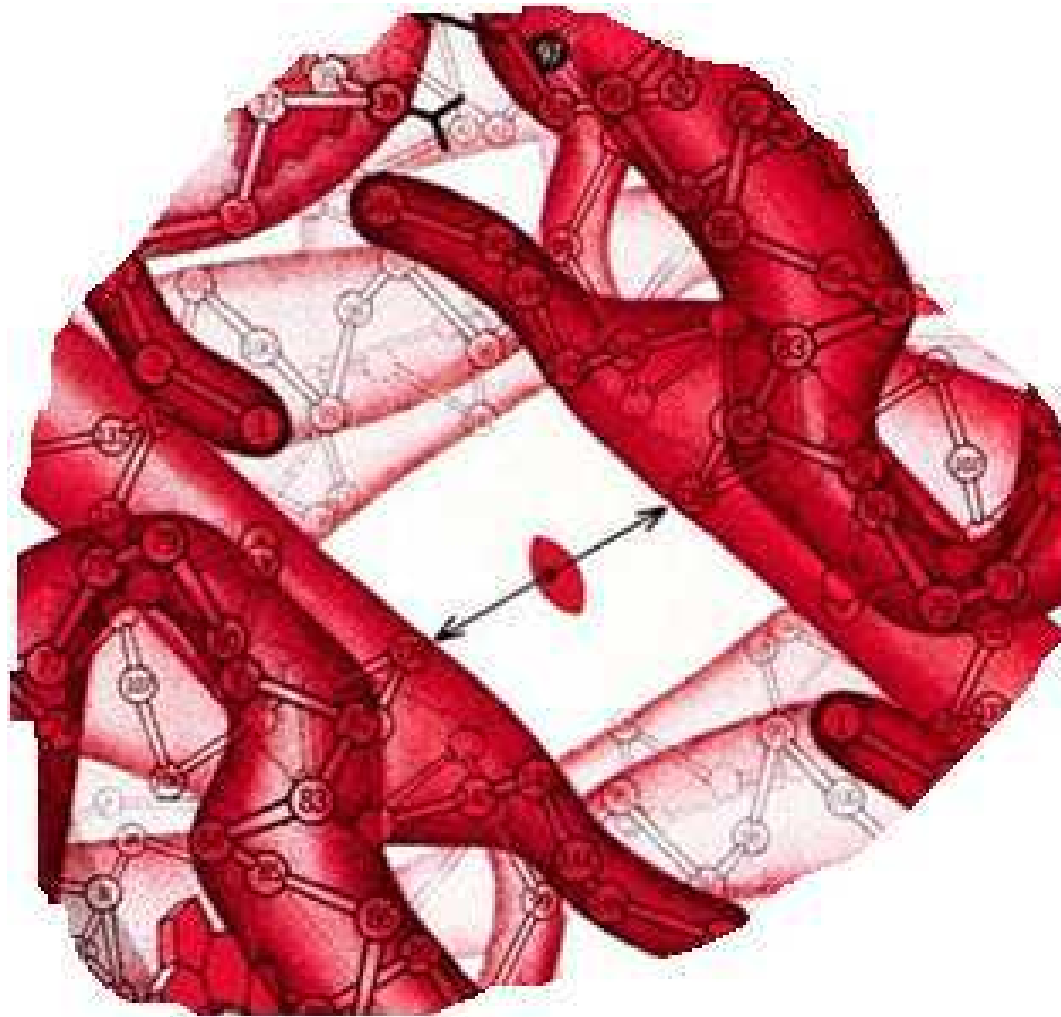
(*allosterico* = altra conformazione)



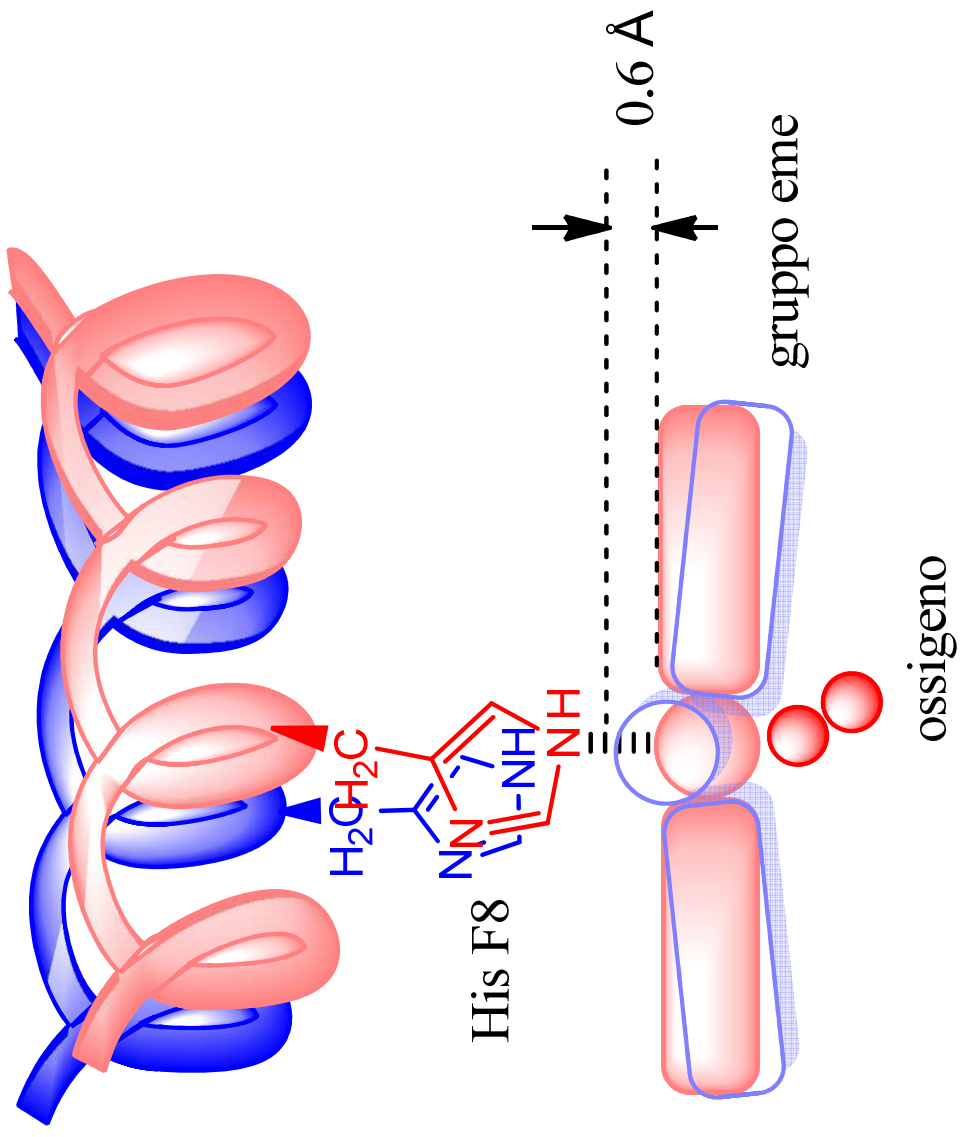
EMOGLOBINA FORMA TESA - DEOSSIGENATA



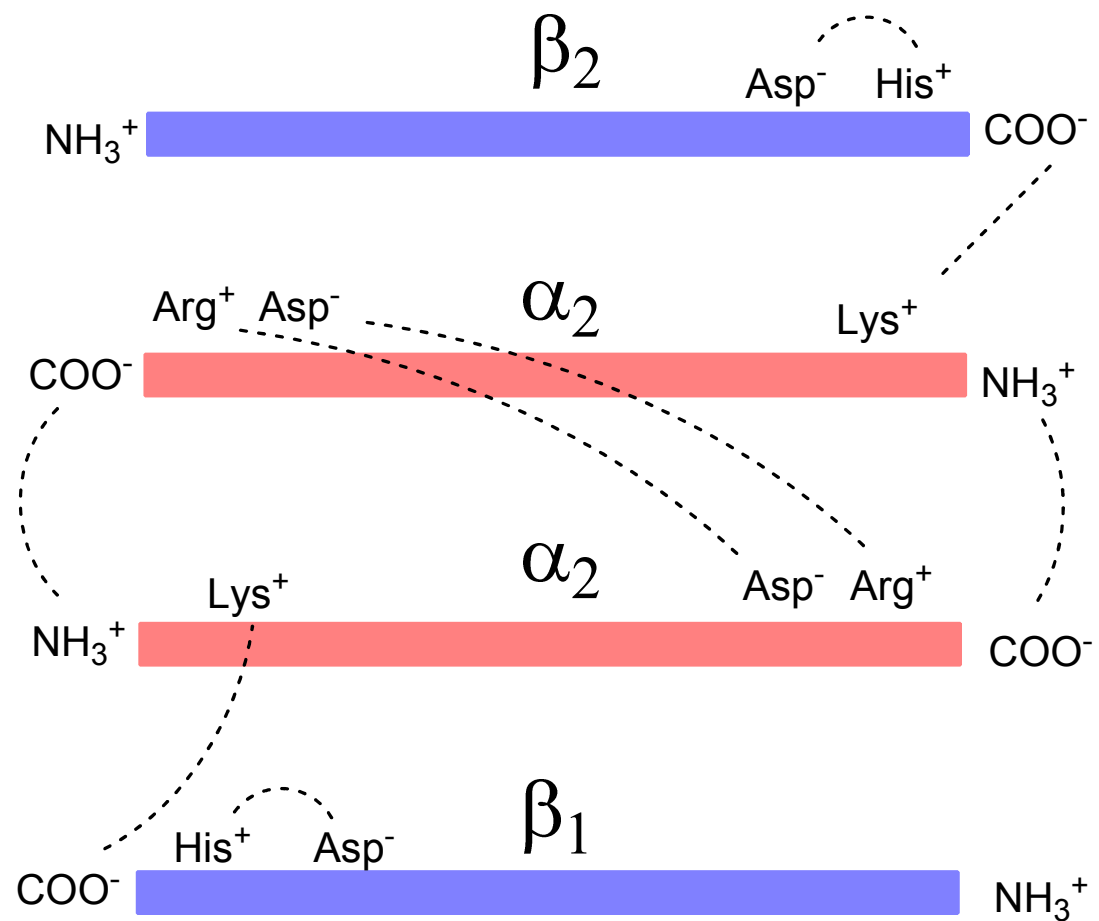
EMOGLOBINA FORMA RILASSATA - OSSIGENATA



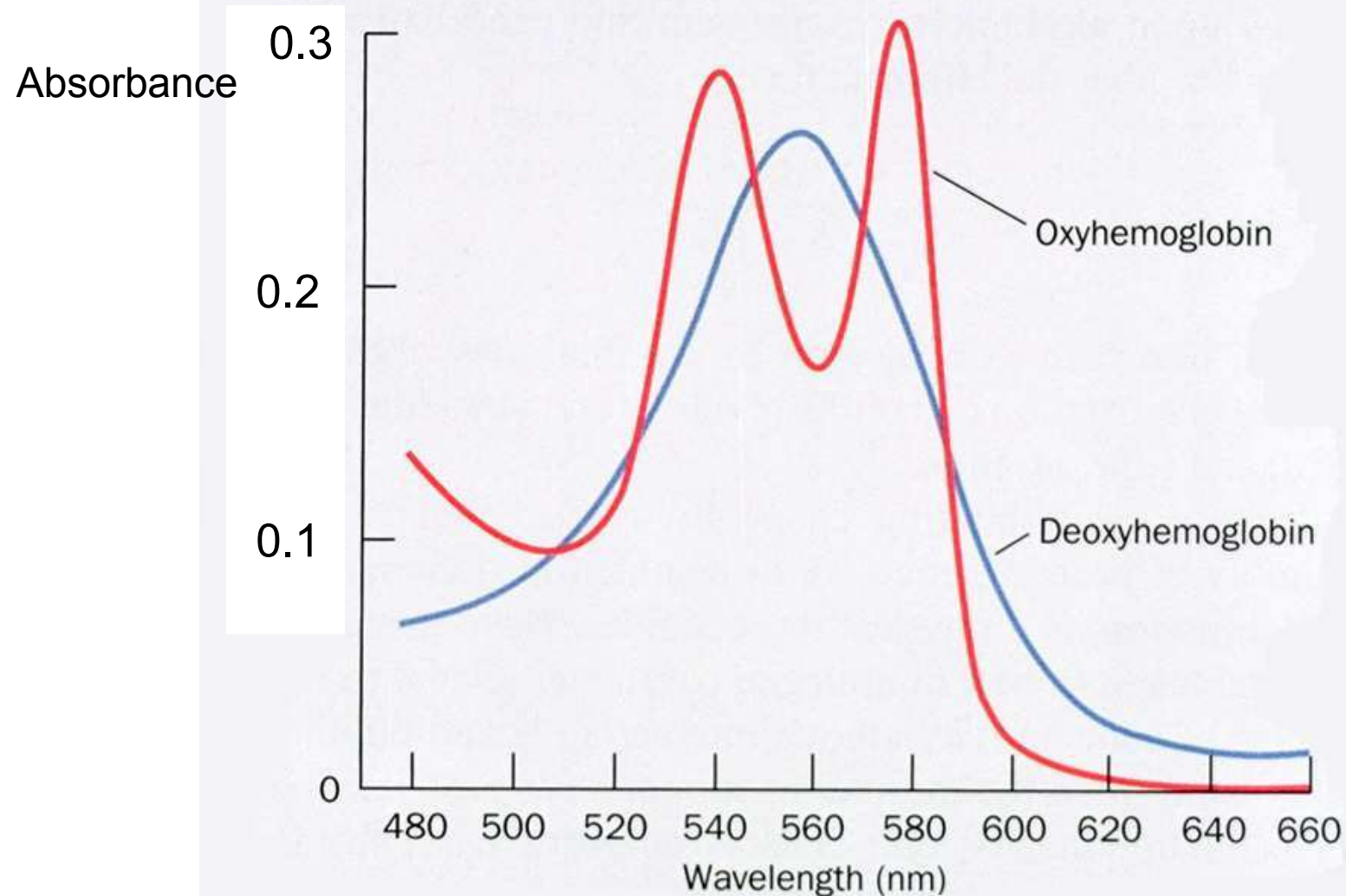
Elica F

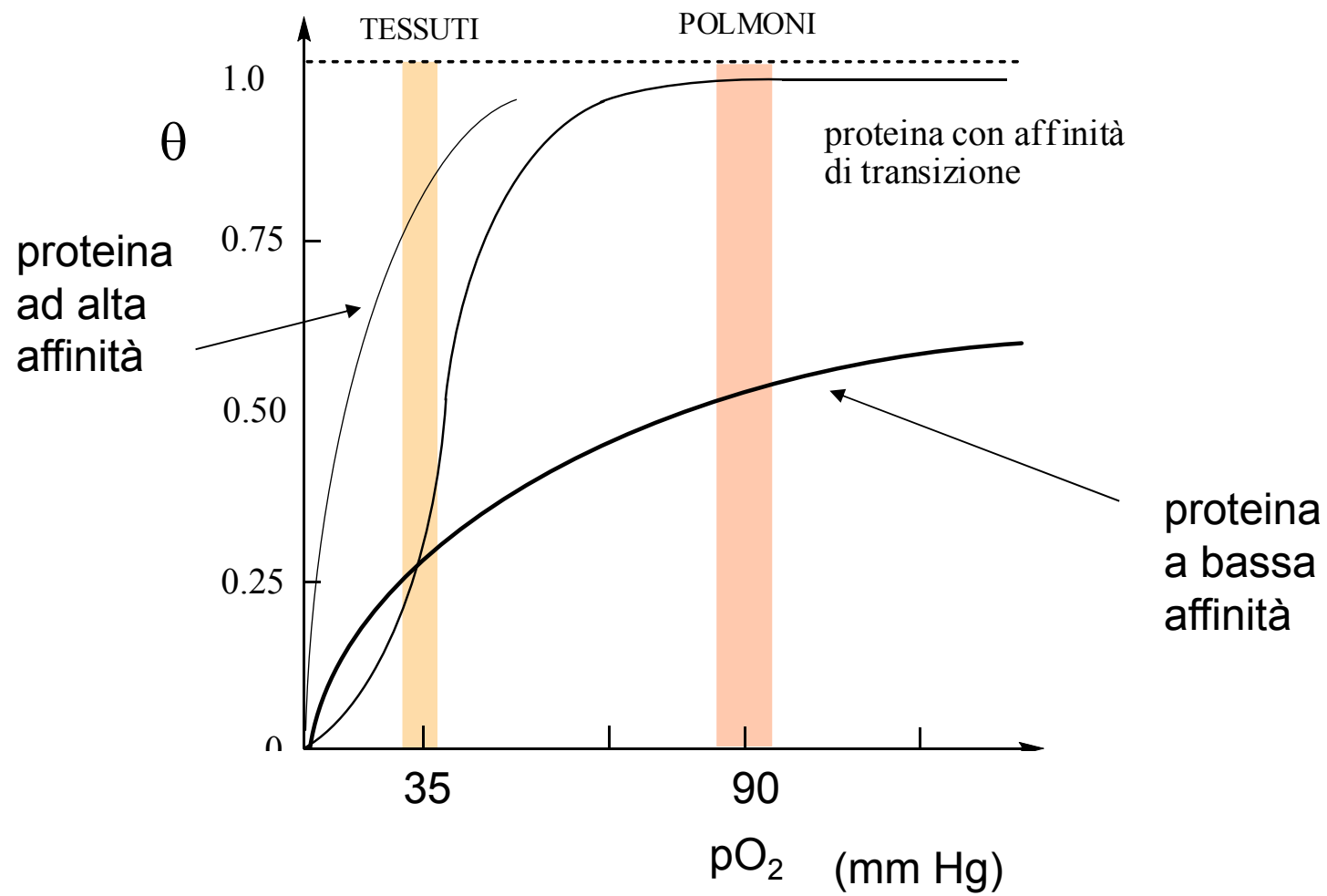


Ponti salini che saltano nella forma rilassata

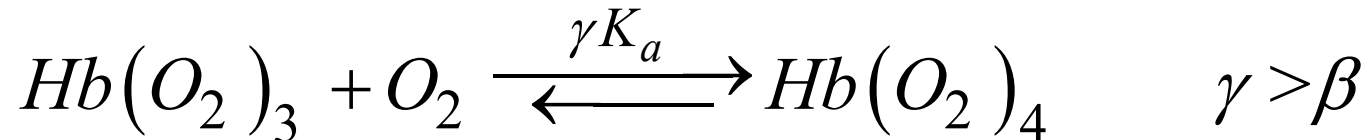
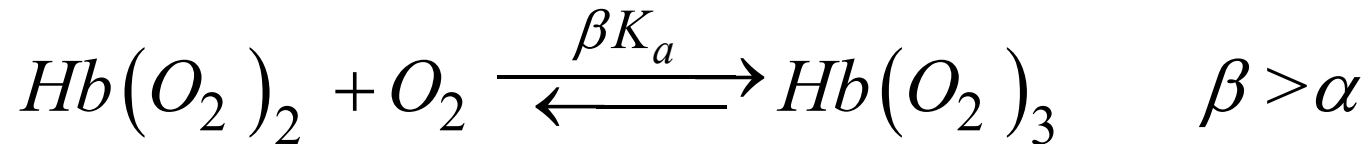
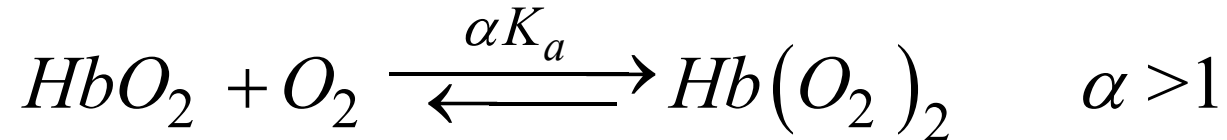
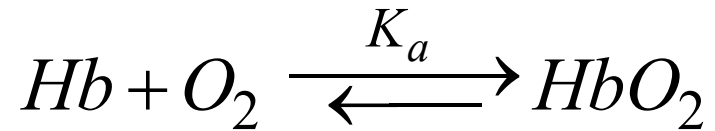


Spettri di assorbimento di ossiHb e deossiHb

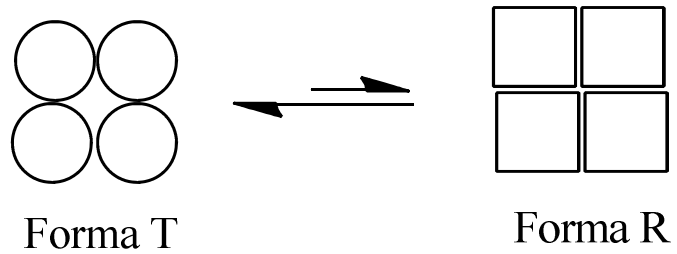




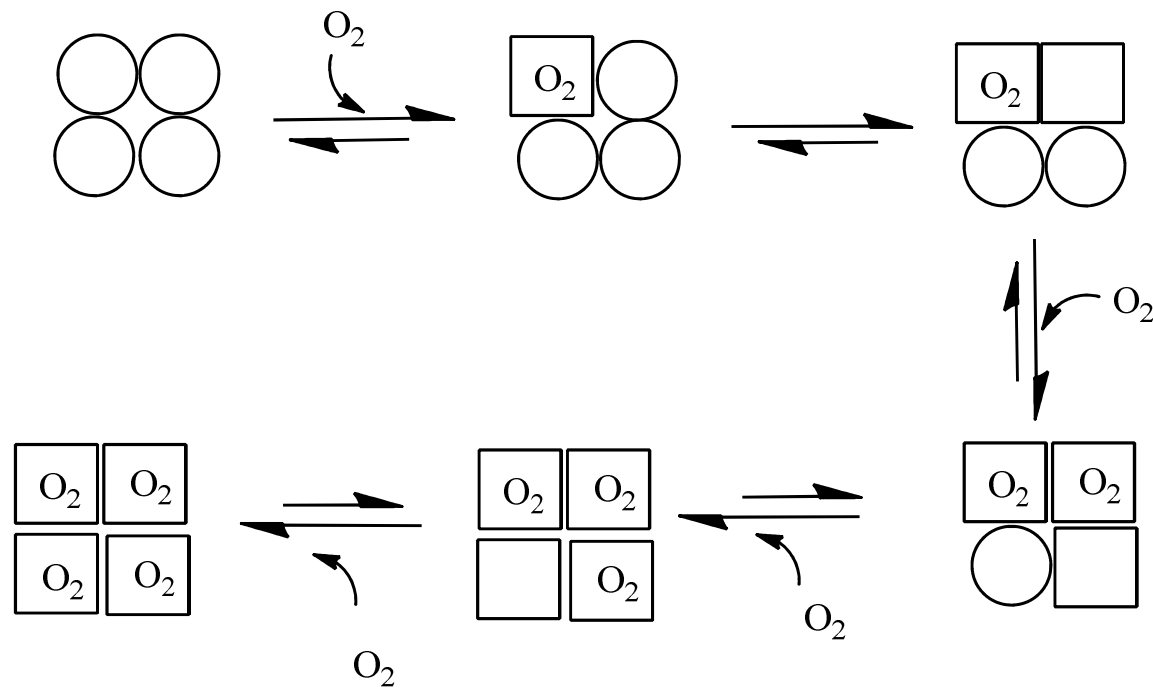
L'emoglobina (Hb) lega 4 molecole di O_2 in 4 reazioni con costante di associazione K_a (affinità) crescente



In assenza di ossigeno:



Forma T, deossigenata
Forma R, ossigenata



L'ossigeno sposta
l'equilibrio verso
la forma *R*

Equazione di saturazione dell'emoglobina

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

Dove n = *coefficiente di Hill*

Per l'emoglobina n è compreso tra 2.5 e 3

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

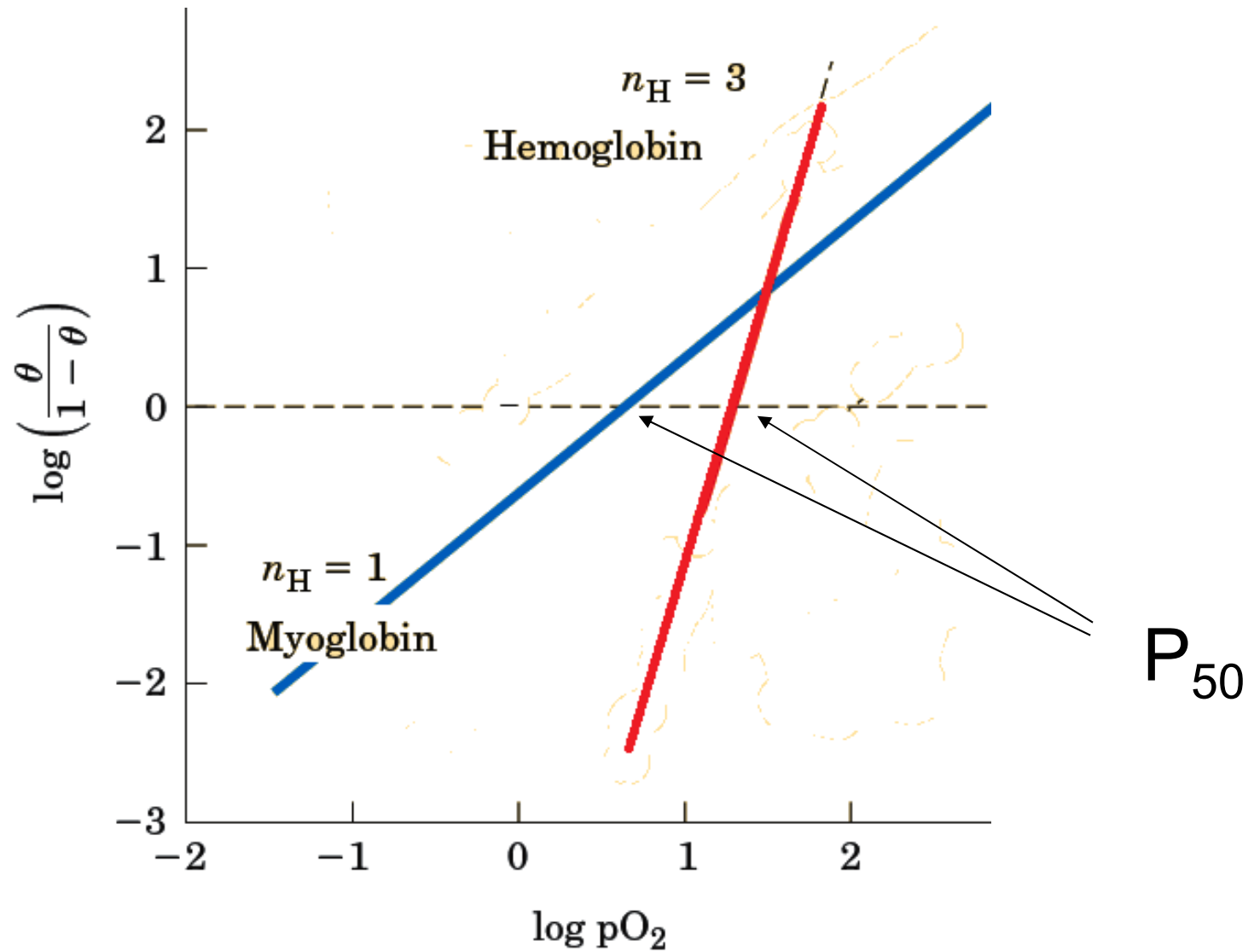
Equazione di Hill

Quando $\theta = 0.5$, l'equazione diventa:

$$n \log pO_2 = \log P_{50}$$

$$pO_2^n = P_{50}$$

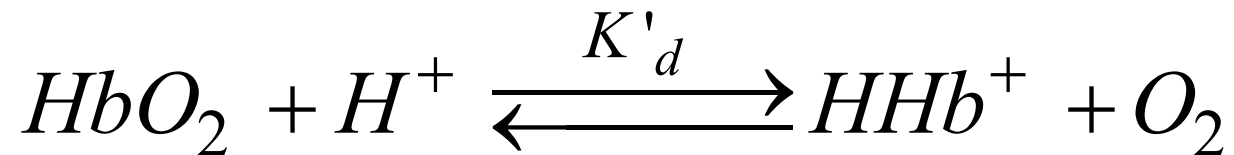
Grafico di Hill



Tre fattori che influenzano il legame dell'O₂ all'emoglobina

- pH
- 2,3-bisfosfoglicerato (o analoghi)
- monossido di carbonio

Effetto del pH (effetto Bohr)

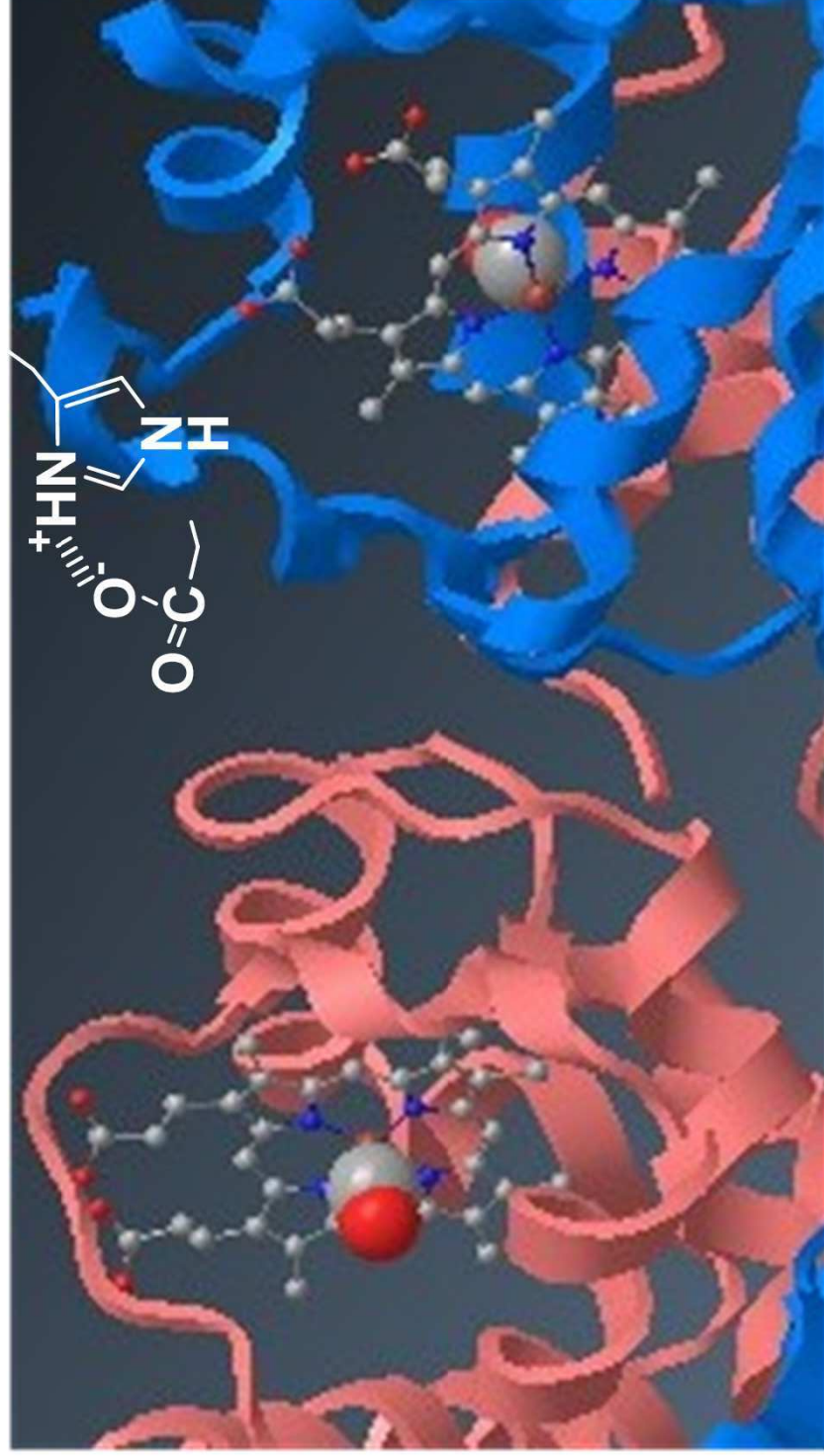


Il metabolismo dei tessuti produce ioni H^+ per effetto della liberazione di CO_2 dovuto ai processi ossidativi a carico delle sostanze organiche.

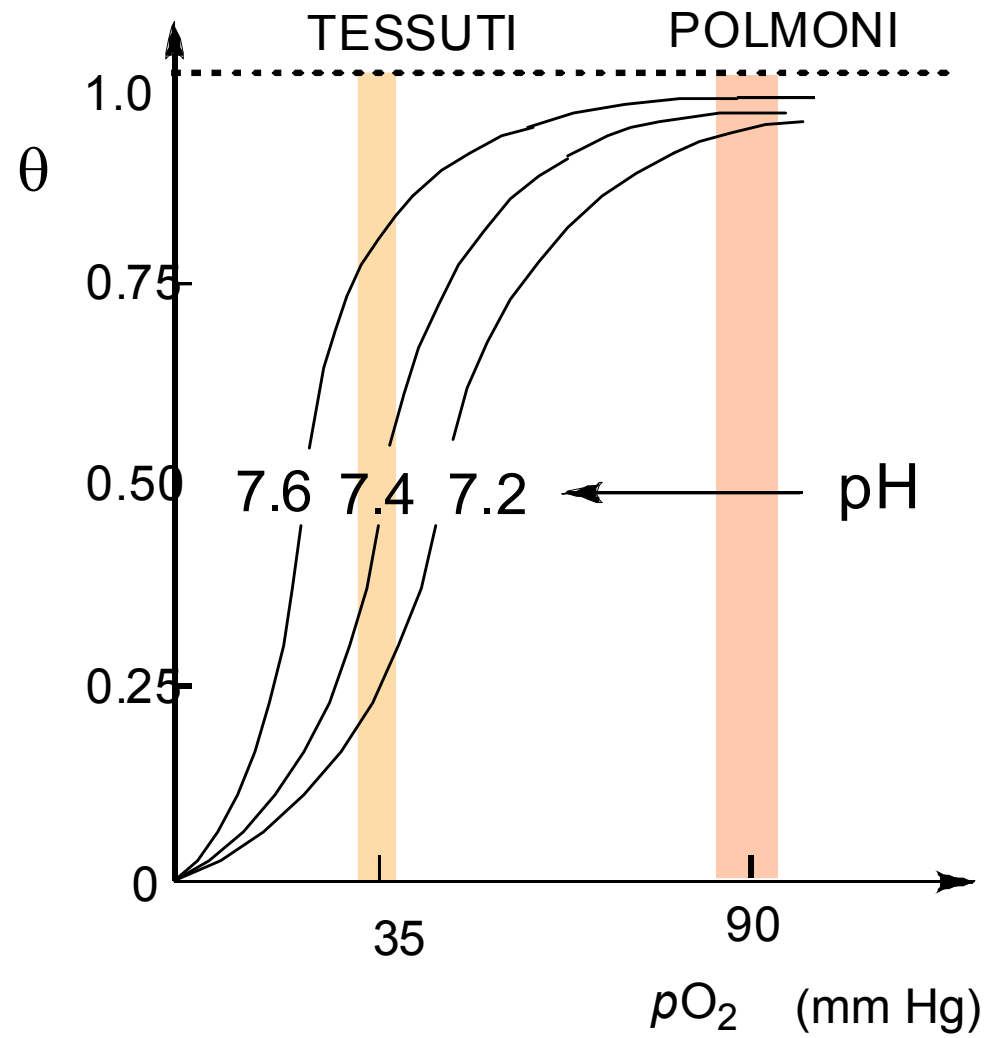
La CO_2 viene idratata dall'enzima anidrasi carbonica (100.000 volte più veloce della reazione spontanea) ad acido carbonico che poi si dissocia:



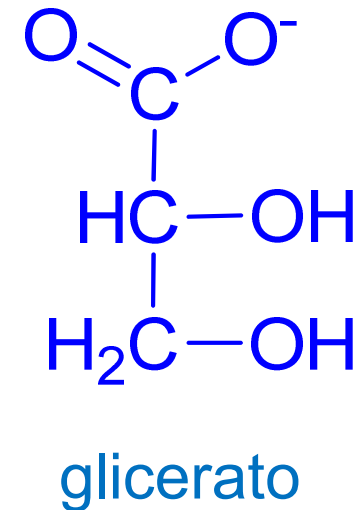
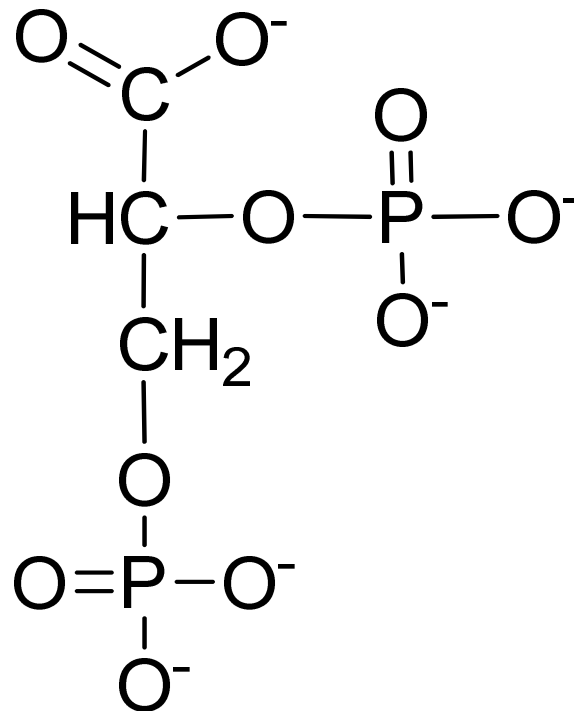
L'istidina della catena β è il C-terminale (His 146); essa viene protonata per effetto Bohr. In questo modo può poi fare un ponte salino con l'aspartato (Asp 94), trasformandosi nella forma T, tesa, a bassa affinità per l'ossigeno (vedi anche diapositiva 29)



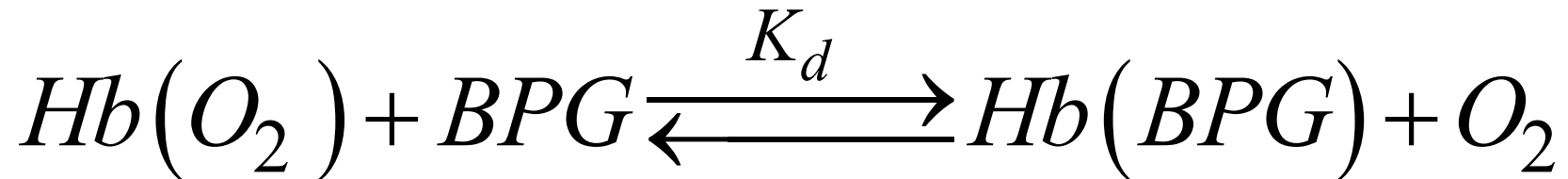
Effetto Bohr



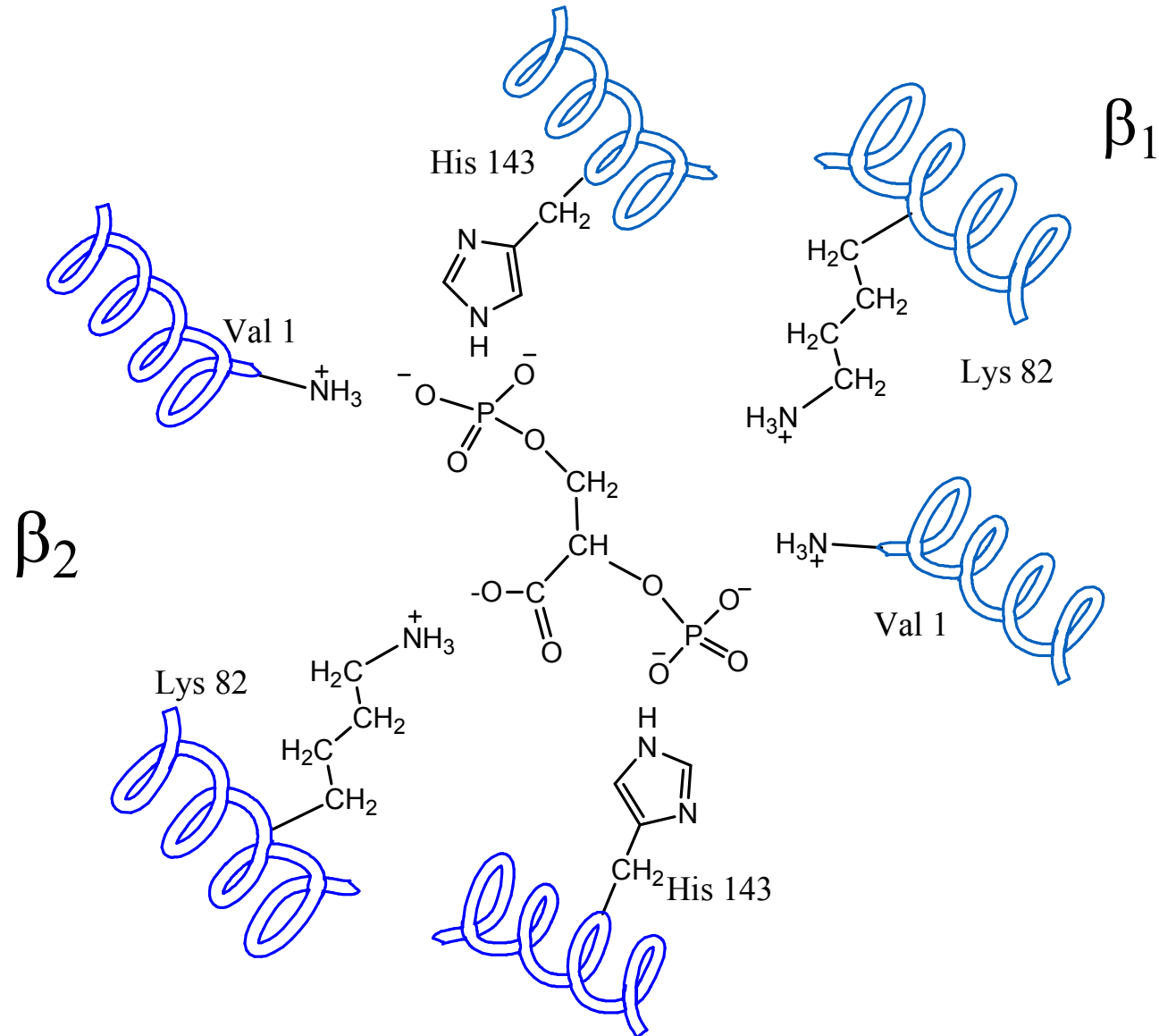
Il 2,3-bisfosfoglicerato (BPG)



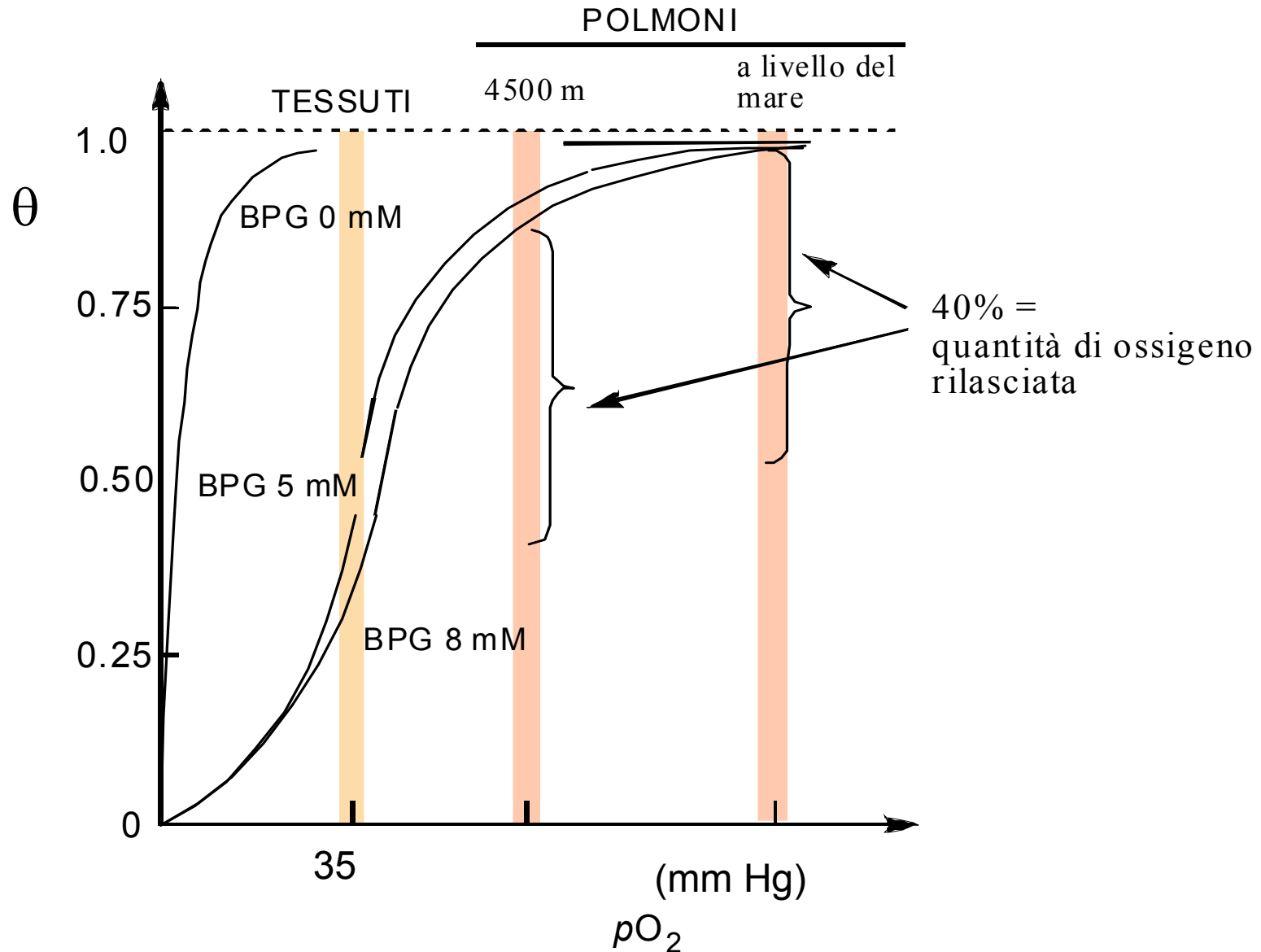
Il legame del BPG all'emoglobina sposta l'equilibrio verso la forma T, deossigenata:

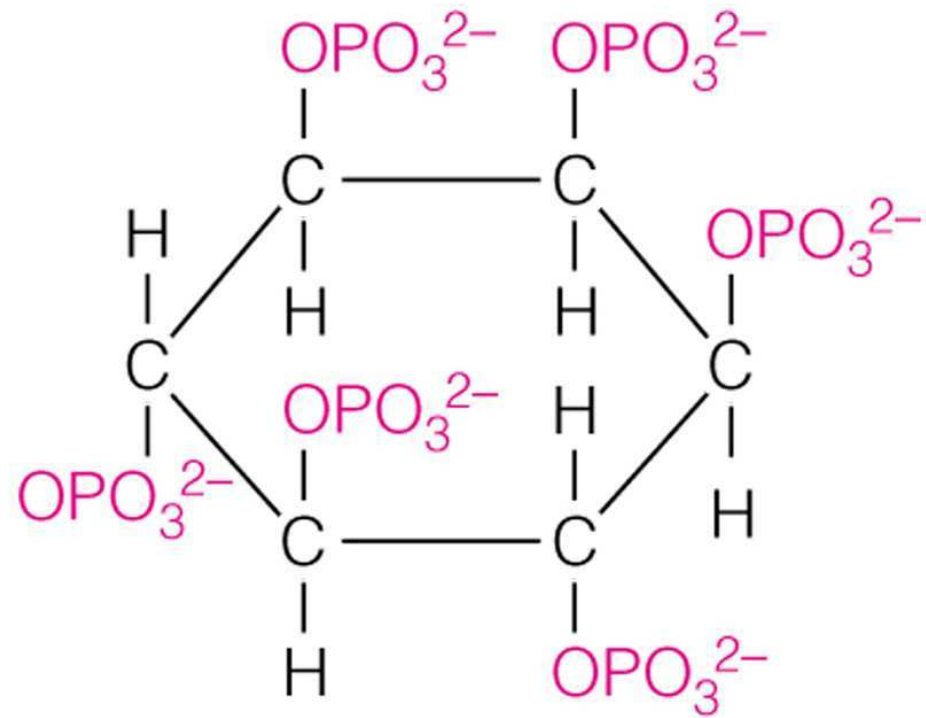


Il BPG si lega nella zona centrale dell'emoglobina



Variazioni della concentrazione di BPG regolano l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno

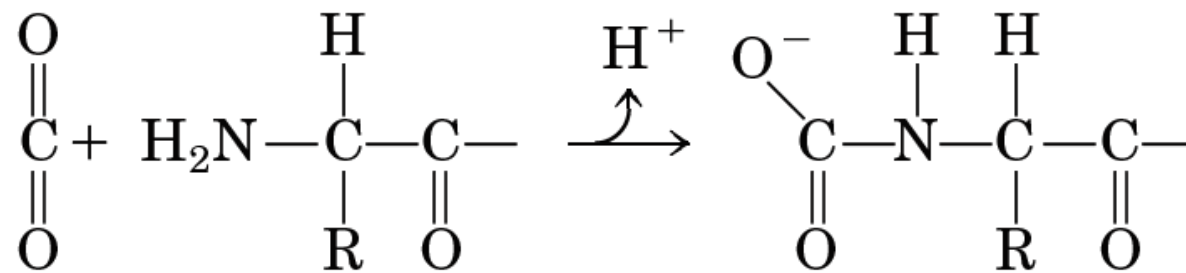
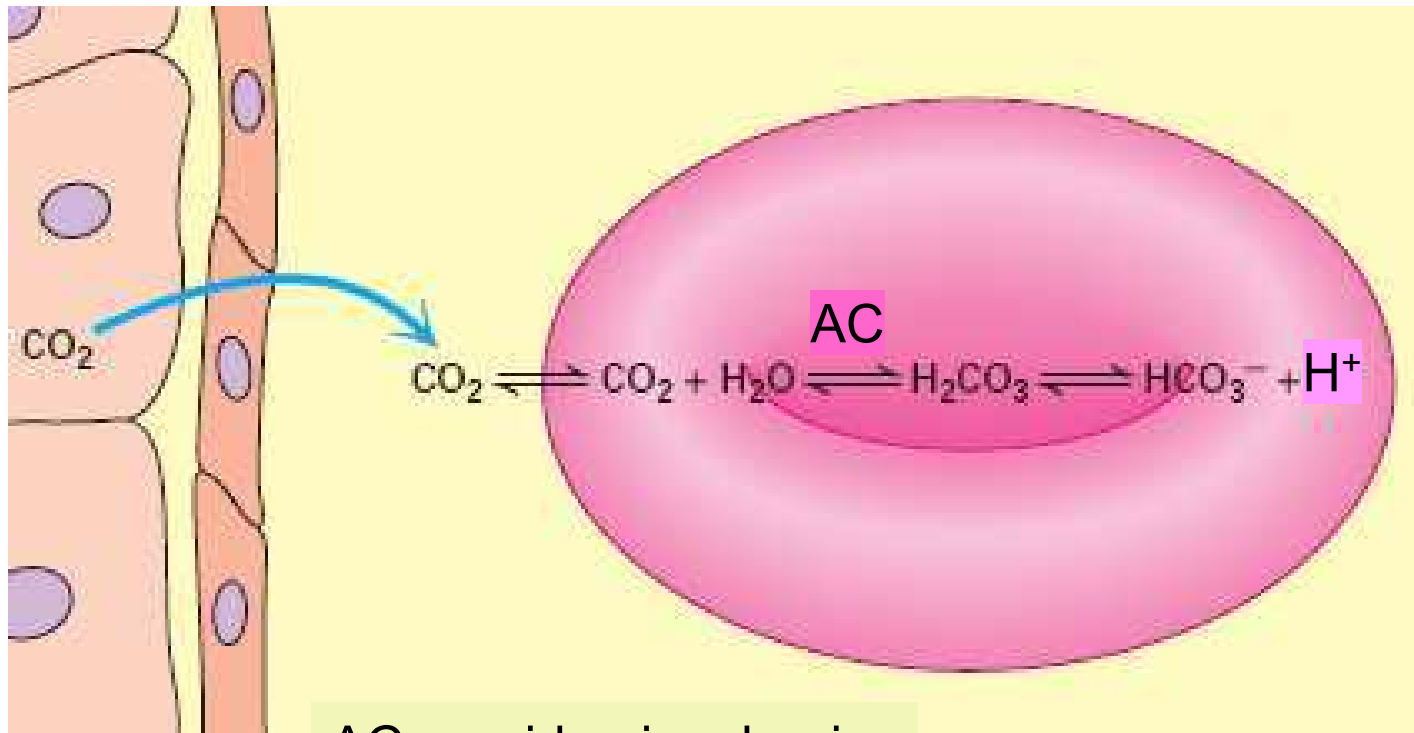




Inositolo esafosfato o acido fitico
(sangue degli uccelli)

L'emoglobina fetale ($\gamma_2\alpha_2$) ha una minore affinità per il BPG poiché la struttura primaria della subunità γ l'istidina 143 è sostituita da una serina: ciò riduce l'intensità di legame con il BPG, rendendo la molecola più affine all'ossigeno.

Trasporto dell'anidride carbonica

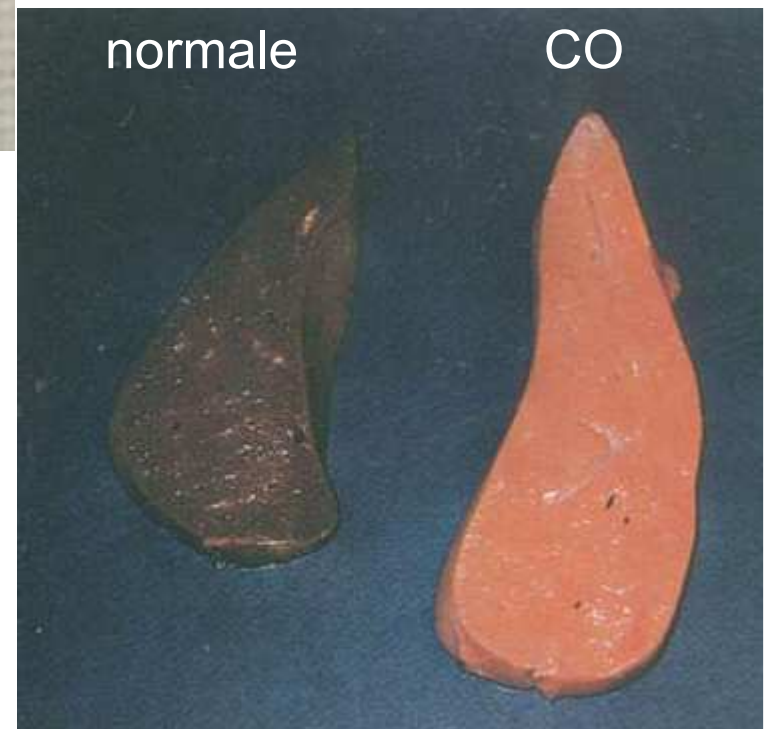


N-terminale della catena globinica dell'emoglobina



Avvelenamento da
monossido di carbonio

fegato

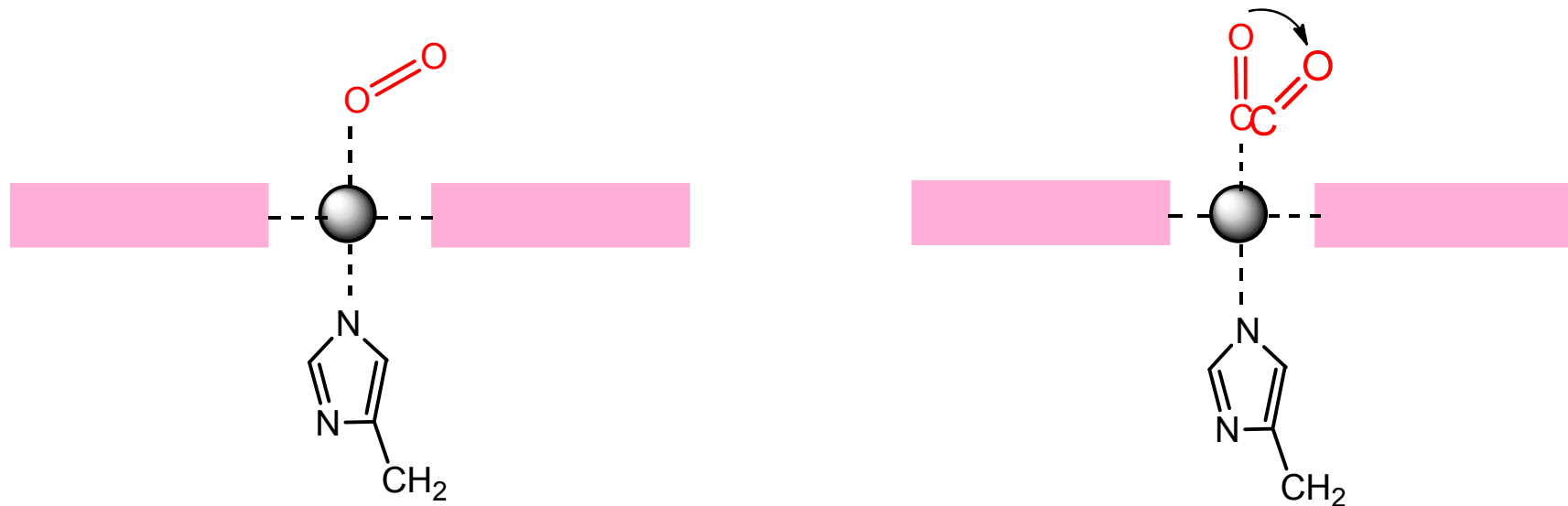


Il monossido di carbonio

ha un'affinità per l'eme libero 20.000 volte maggiore di quella dell'O₂

Nell'eme globinico:

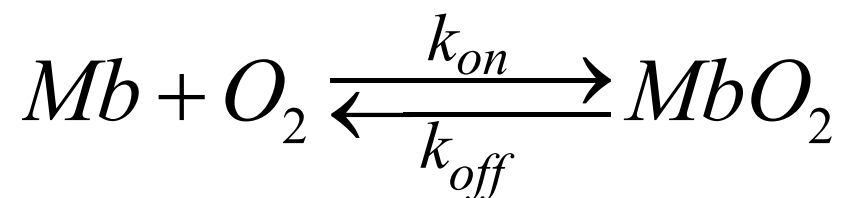
Il CO ha un'affinità solo 200 volte maggiore di O₂



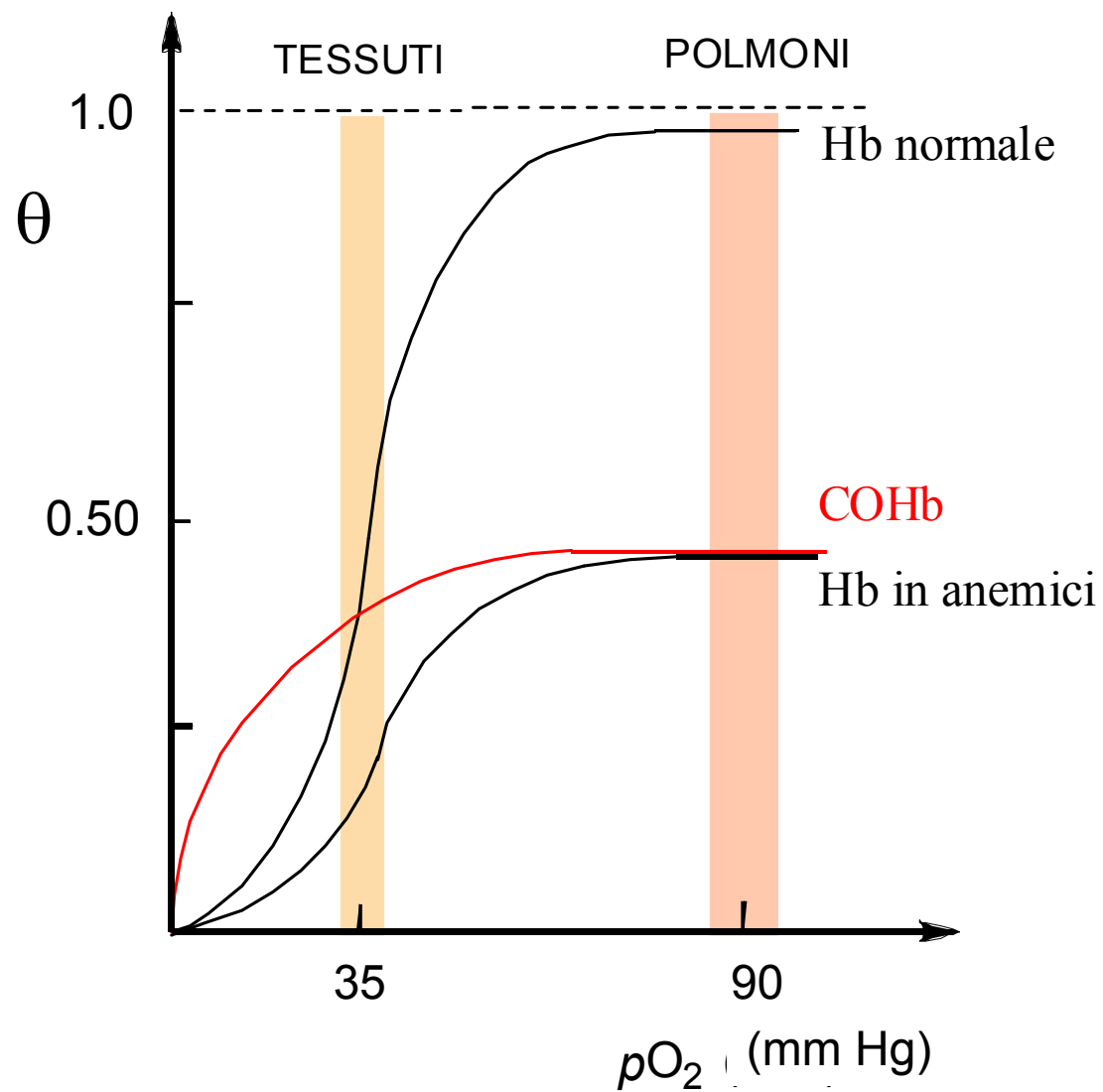
Ossigeno e monossido di carbonio possono legarsi entrambi all'eme libero: il secondo con affinità 20.000 volte superiore al primo, ma mantiene il suo asse perpendicolare al piano dell'eme. Nell'eme globinico ciò non è possibile e il monossido riduce la sua affinità di 100 volte.

Parametri cinetici del legame dell'O₂ e del CO ad alcune emoglobine

Proteina	$k_{on} (\mu M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_{O_2} (\mu M^{-1})$	$K_{CO} (\mu M^{-1})$	K_{CO}/K_{O_2}
Mb balena	17	15	1.1	27	25
<i>Ascaris</i> Hb	1.5	0.004	370	11	0.03
LegHb	130	5.6	23	2200	96
<i>Chironomus</i> Hb	120	300 (pH 5.6)	0.4	60	150
		125 (pH 9.7)	1.0	490	490



Monossido di carbonio ed emoglobina



Metaemoglobine

- L'ossidazione a Fe^{3+} muta l'Hb in metaemoglobina
- Cause: eccesso di agenti ossidanti (perossidi, chinoni) oppure ridotta attività di enzimi in grado di ripristinare il Fe^{3+} a Fe^{2+} (metaemoglobina reduttasi)

Nel globulo rosso un po' di metamoglobina si forma sempre per reazione diretta con l'ossigeno:



metamioglobina e
metaemoglobina

Nelle forme meta- si lega acqua anziché ossigeno

Tipica delle carni cotte (la denaturazione sposta His e l'ossidazione del ferro è più facile); il colore rosa del roastbeef è dovuto a un derivato dell'eme con entrambe le His che occupano i siti del ferro

Salatura porta a NO-Mb (rosso acceso)

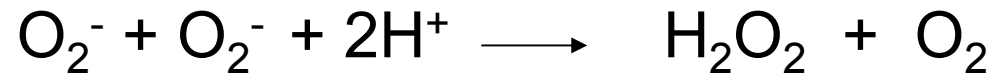
Oppure per azione di specie reattive dell'ossigeno
(reazione di Fenton)



I radicali ossidrilici sono molto pericolosi
provocano perossidazione lipidica

Enzimi protettivi per il superossido

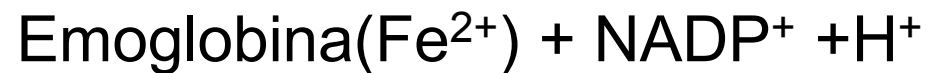
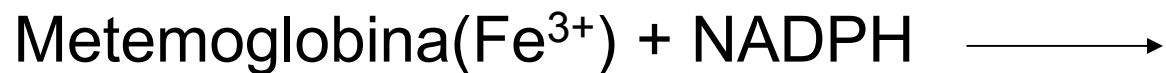
Superossido dismutasi



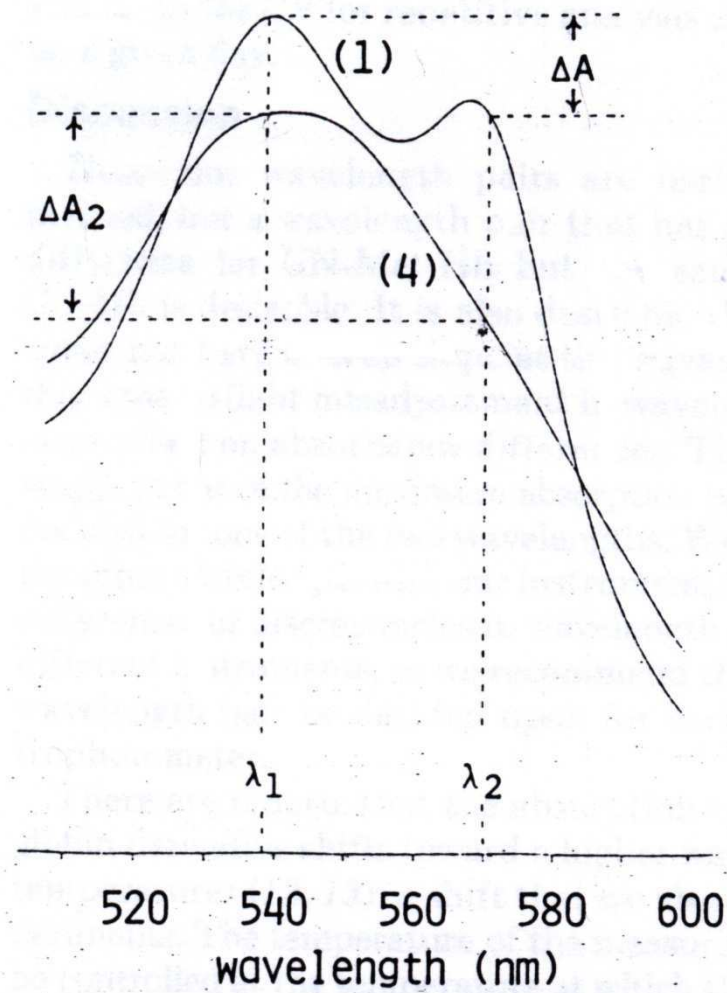
Catalasi



metemoglobina reduttasi:

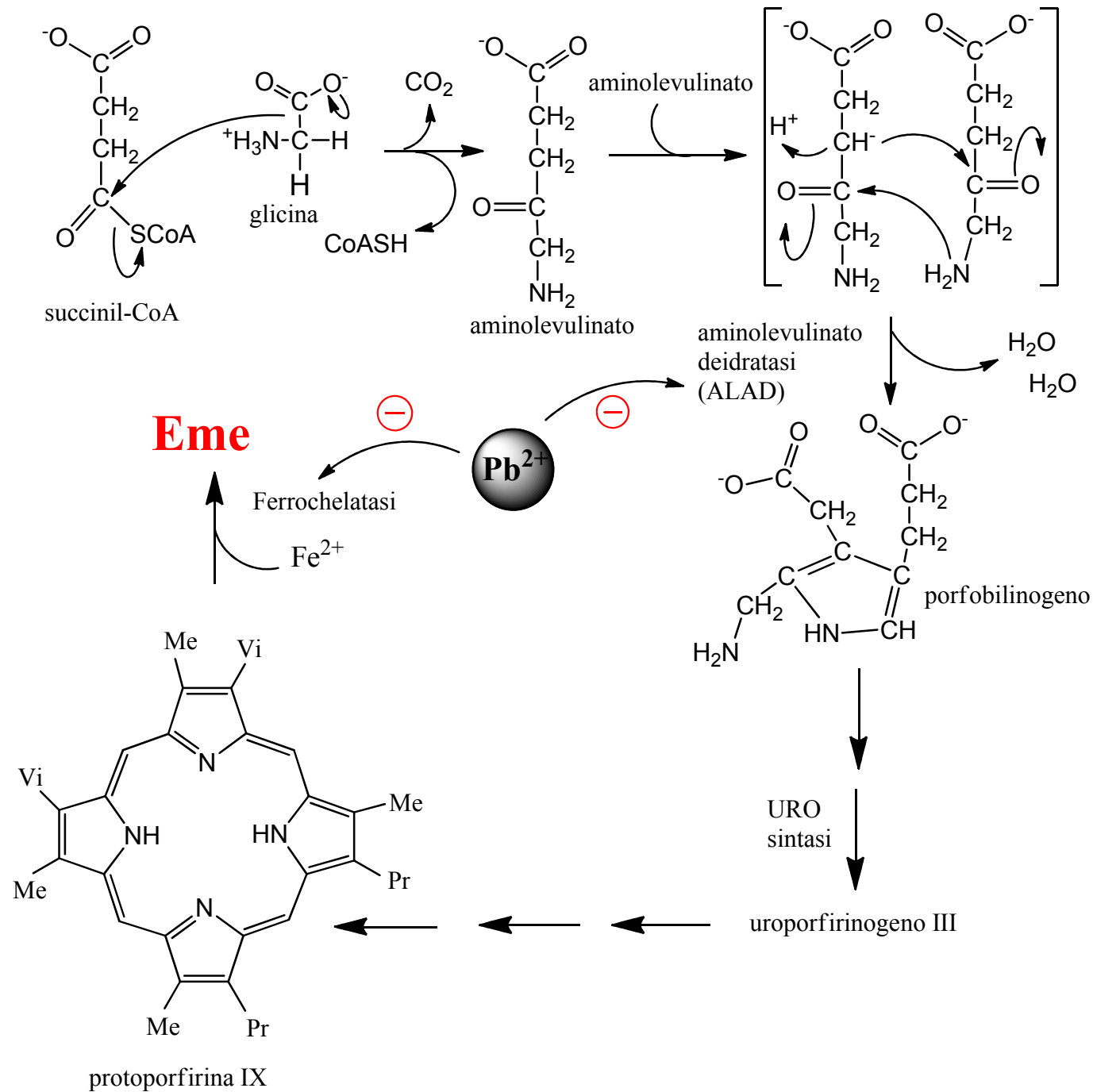


Determinazione della metaemoglobina (MetHb)



(1) Hb

(4) MetHb



L'eritrocruorina
degli anellidi
(*Sabella spallanzanii*)

$p_{50} = 145 \text{ mmHg}$
 $p_{50}(\text{dodecamero})$
 $= 58 \text{ mmHg}$

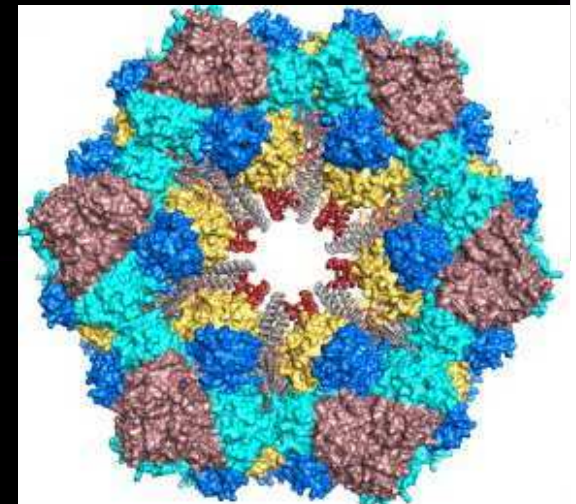
$n \text{ di Hill} = 1.7$

Il gruppo eme ha
un formile al posto
di un vinile

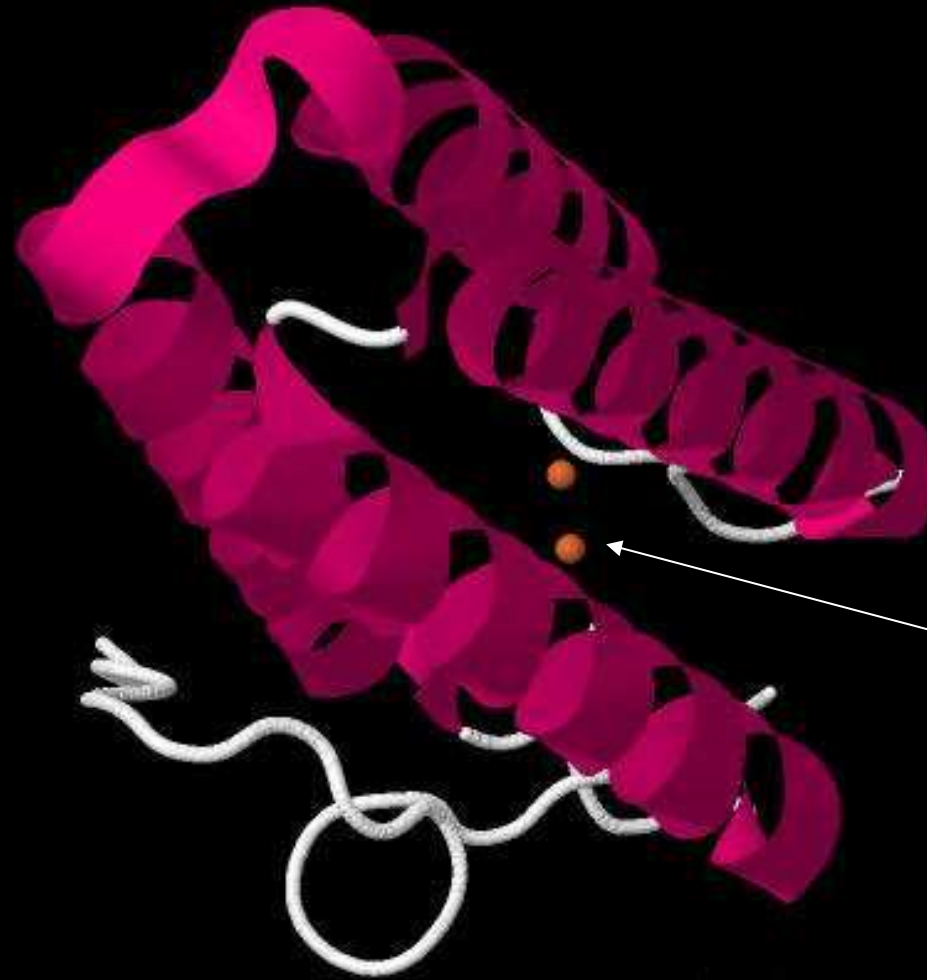


dodecamero

Pigmento extracellulare
composto da 144 catene di
emoglobina e 36 polipeptidi
linker, organizzato in 12
dodecameri di Hb e 3 linker.
Peso complessivo 3.6 milioni
di dalton



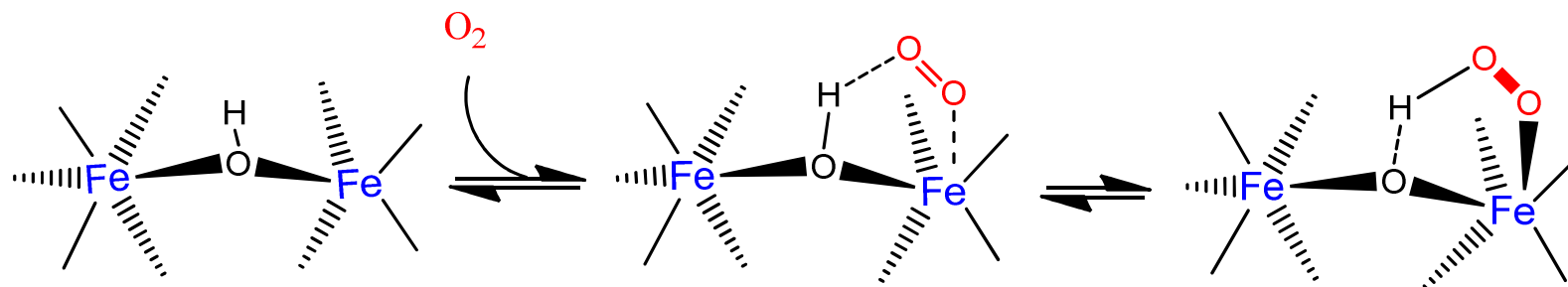
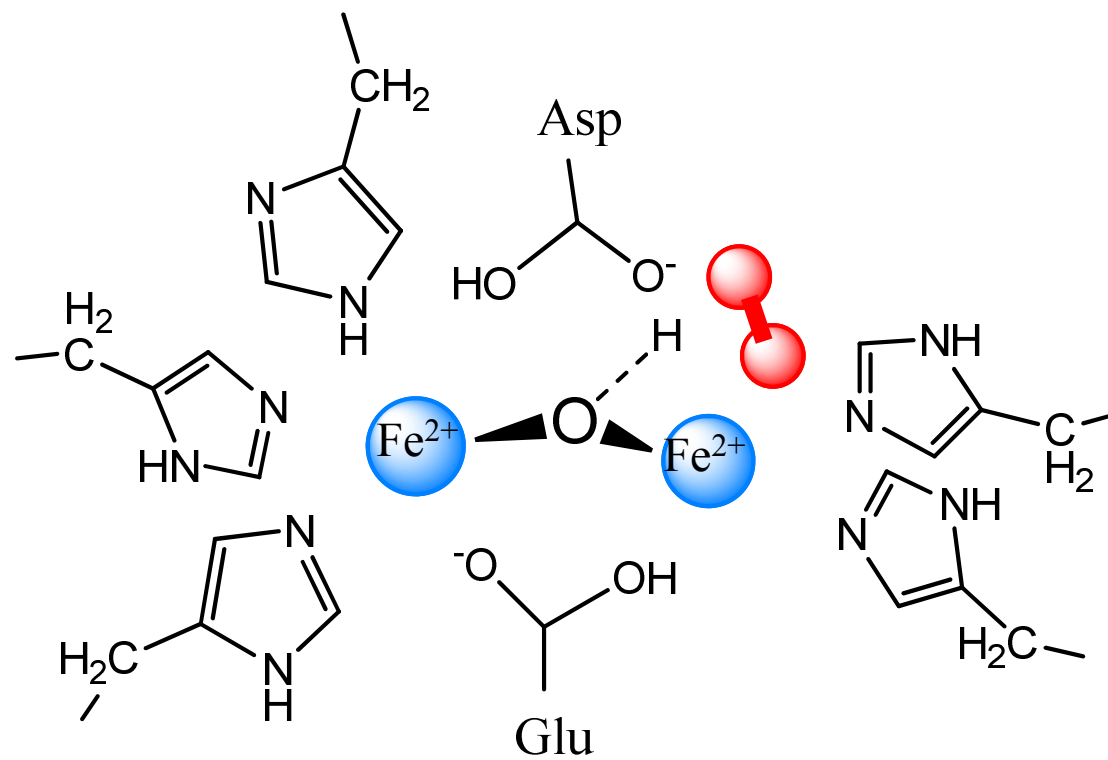
L'emeritina dei
Sipunculidi

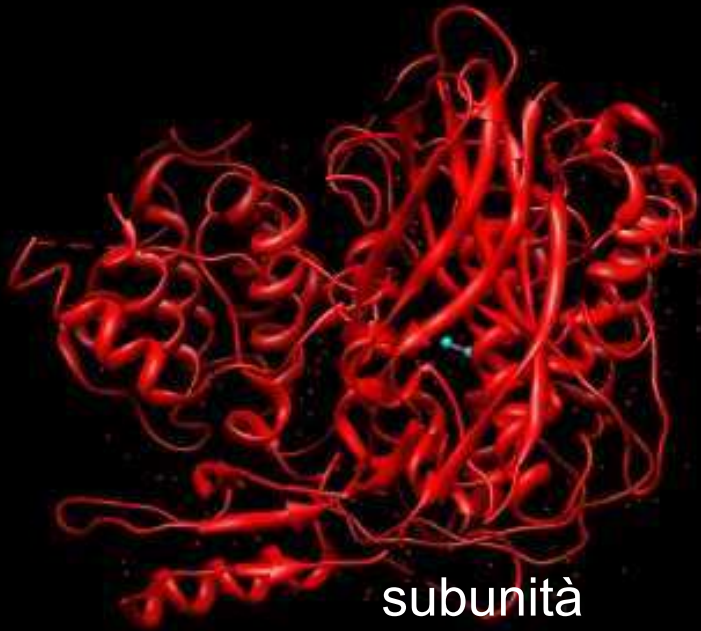


Fe²⁺



Legame dell'ossigeno all'emeritrina





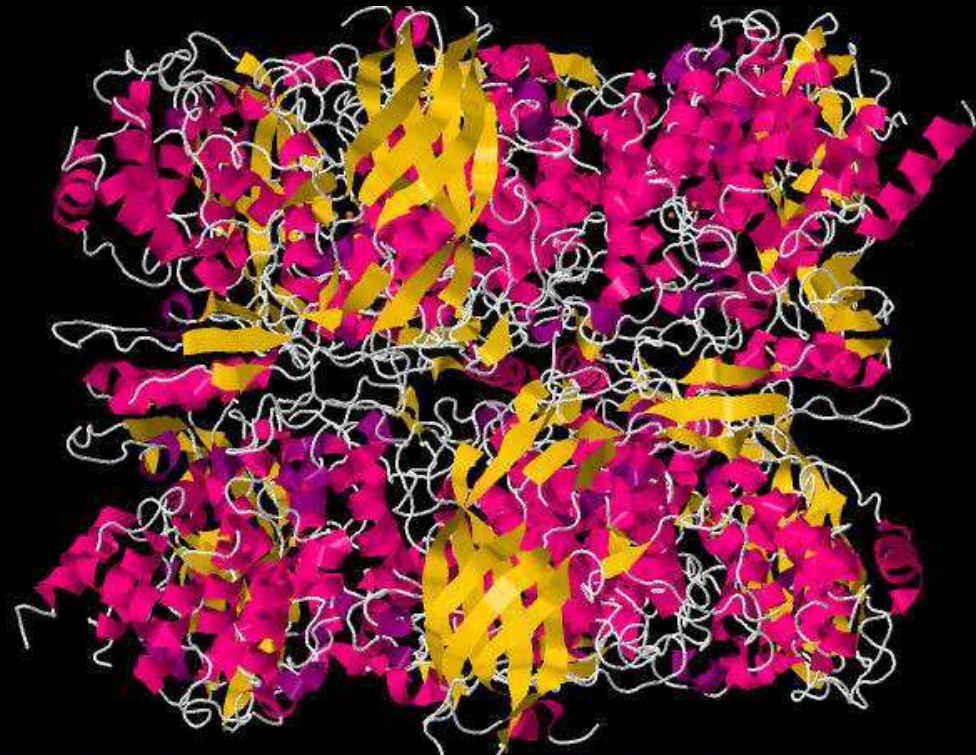
subunità



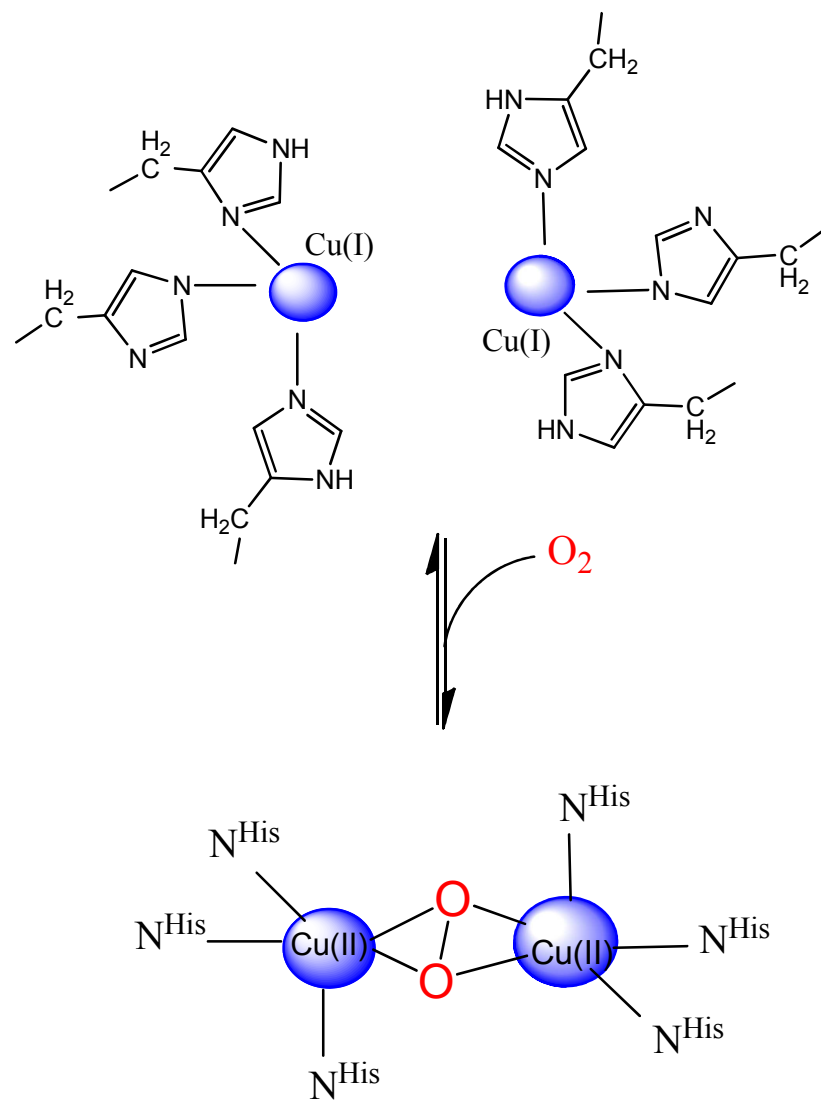
Panulirus interruptus
aragosta spinosa della California

Emocianina

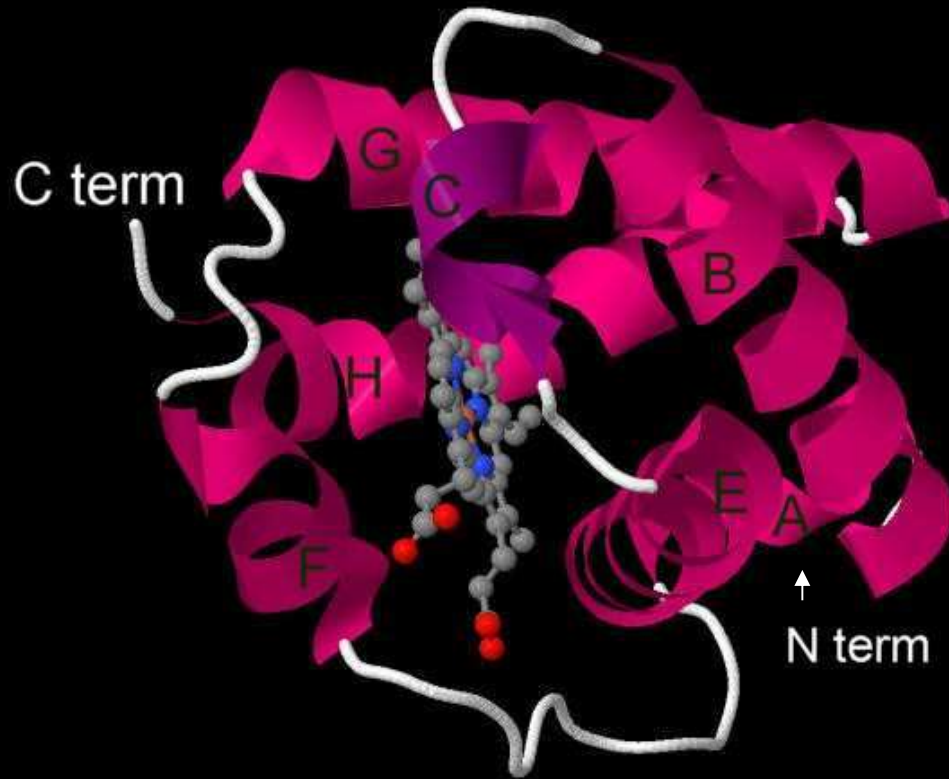
Modulazione allosterica:
n di Hill tra 1.6 e 3; aumento di
pH, CO_2 , lattato aumentano
l'affinità per O_2 ;
aumento di temperatura
provoca diminuzione della
affinità.
Non ha affinità per il CO.



Il pigmento emocianina contiene rame

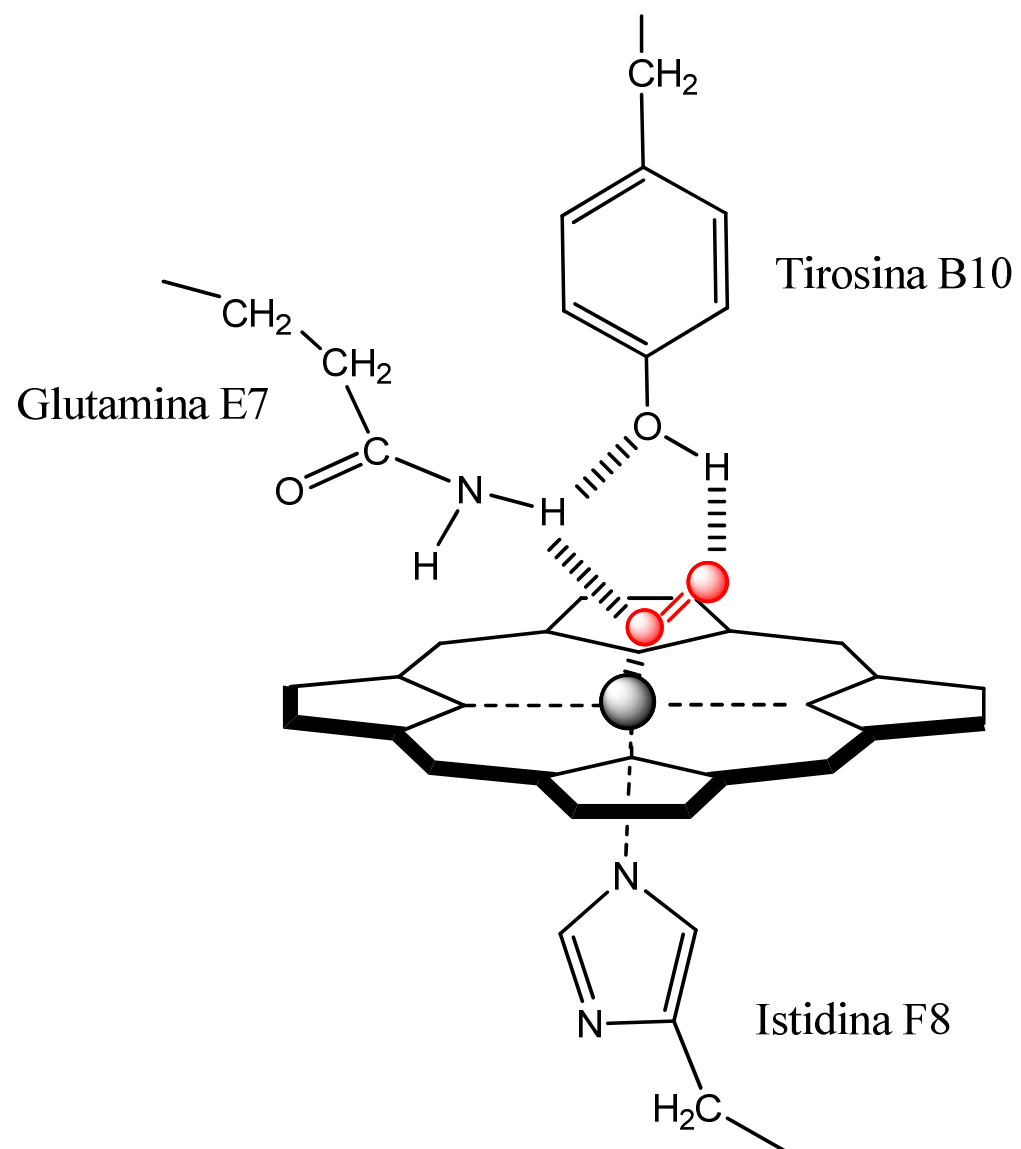


Emoglobine tronche (*Mycobacterium*, *Paramecium*, *Chlamidomonas*,...)

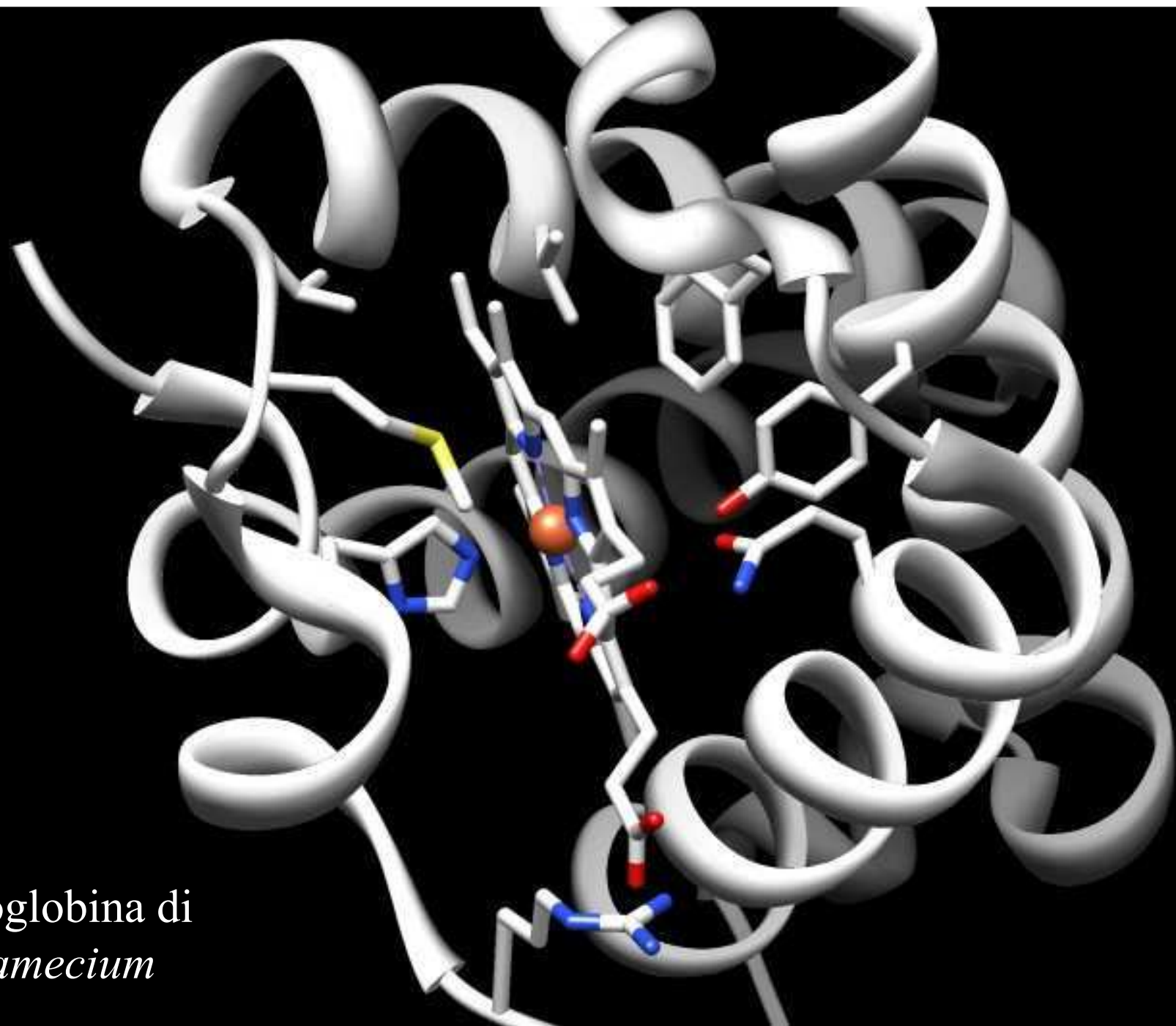


116 aminoacidi
p50 = 0.49 mmHg

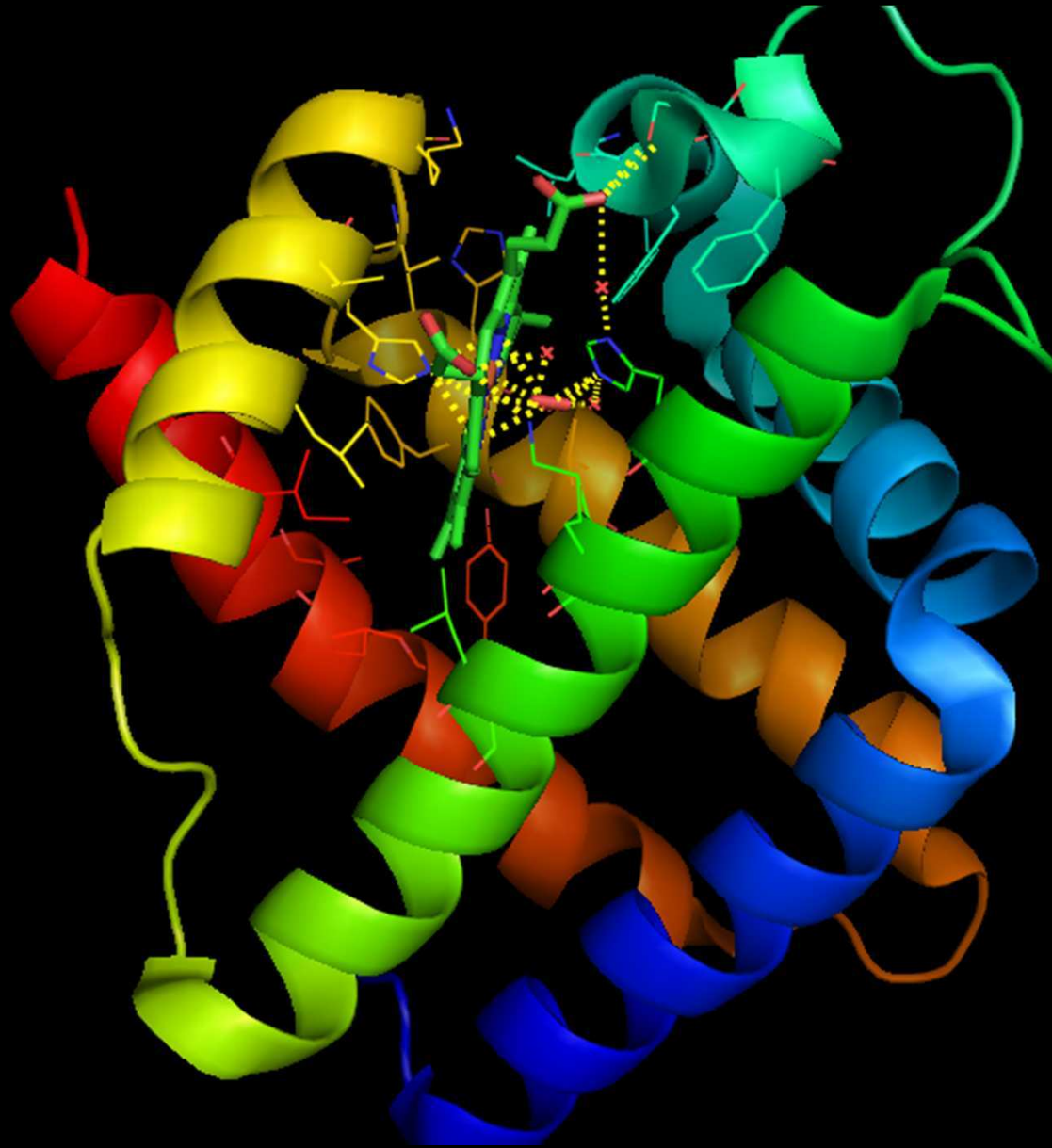
Chlamidomonas Hb:
121 aminoacidi
p50 = 0.005 mmHg



Emoglobina ad alta affinità (*Paramecium*, *Ascaris*)



Emoglobina di
Parametium



La leghemoglobina

La leghemoglobina è sintetizzata dalle radici delle leguminose dopo infezione da *Rhizobium*. Ha il ruolo di sottrarre l'ossigeno dal mezzo intracellulare così da evitare la inattivazione della nitrogenasi batterica, l'enzima che fissa l'azoto atmosferico in ammonio