

RIASSUNTI OLIVA-STARITA

Biochimica Classica

I seguenti riassunti sono stati eseguiti per velocizzare lo studio della materia e sono tratti interamente dal Lehninger, sulla base degli argomenti spiegati nell'anno 2020.

Comprendono i paragrafi necessari per lo studio di:

- **CAPITOLO 5** - LA FUNZIONE DELLE PROTEINE
- **CAPITOLO 6** – GLI ENZIMI
- **CAPITOLO 12** – BIOSEGNALAZIONE
- **CAPITOLO 13** – BIOENERGETICA
- **CAPITOLO 14** – GLICOLISI, GLUCONEOGENESI E VIA DEL PENTOSIO FOSFATO
- **CAPITOLO 15** – REGOLAZIONE DI GLICOLISI E GLUCONEOGENESI, METABOLISMO DEL GLICOGENO E SUA REGOLAZIONE
- **CAPITOLO 16** – CICLO DELL'ACIDO CITRICO
- **CAPITOLO 17** – CATABOLISMO DEGLI ACIDI GRASSI
- **CAPITOLO 18** – OSSIDAZIONE DEGLI AMMINOACIDI E PRODUZIONE DI UREA
- **CAPITOLO 19** – FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA
- **CAPITOLO 21** – BIOSINTESI DEI LIPIDI
- **CAPITOLO 22** – BIOSINTESI DI AMMINOACIDI, NUCLEOTIDI E MOLECOLE CORRELATE → questo capitolo non è stato riassunto sufficientemente, quindi si consiglia di affiancare il libro durante lo studio della biosintesi dei nucleotidi e confrontare con il nuovo programma.
- **CAPITOLO 23** – REGOLAZIONE ORMONALE (23.1)

Per eventuali errori o consigli di integrazione, potete scrivere ad Emanuela Oliva.

CAPITOLO 5 – LA FUNZIONE DELLE PROTEINE

Principi basilari sulla funzione delle proteine

- Esse richiedono il legame reversibile con altre molecole, che vengono definite “**ligandi**”, e possono essere di qualsiasi tipo, anche un'altra proteina. Ciò consente all'organismo di rispondere velocemente e reversibilmente a variazioni ambientali e metaboliche;
- Il ligando si lega alla proteina nel **sito di legame**, che è complementare per dimensione, forma, carica, carattere idrofobico/filico. Per questo motivo la proteina discrimina il suo ligando tra migliaia di molecole. I siti di legame possono essere molteplici per diversi ligandi. Gli enzimi hanno una speciale funzione proteica, si legano a ligandi detti **substrati** e il sito di legame viene definito **sito attivo**.
- Le proteine sono flessibili, consentono modificazioni conformazionali garantite da vibrazioni molecolari o movimenti dei residui amminoacidici. Quando un ligando si lega alla sua proteina, determina un suo cambiamento conformazionale che ne determina una maggiore affinità, ciò è definito **adattamento indotto**;
- In un sistema con più subunità, un cambiamento conformazionale può influenzare tutte le altre subunità;

Le proteine che legano l'ossigeno

Sono le proteine maggiormente studiate e meglio caratterizzate.

- *Perché sono necessarie?*

L'ossigeno, in quanto gas, si diffonde in maniera inefficiente nei tessuti, solo per pochi millimetri. Nessuna proteina ha catene laterali che possano legarlo reversibilmente, ma è una proprietà di alcuni metalli di transizione come ferro e rame. Dunque si sfrutta il ferro:

Al suo stato libero però crea specie di ossigeno molto reattive come radicali ossidrilici che possono danneggiare il DNA o altre molecole, dunque nelle proteine viene catturato in modo da renderlo meno reattivo, come per esempio in un gruppo prostetico chiamato **EME** (dove per “gruppo prostetico” si intende un composto che resta permanentemente legato ad una proteina). L'eme è costituito da un composto molto complesso ad anello, detto **protoporfirina**, che si lega al ferro nel suo stato di ossidazione ferroso (Fe^{2+}): esso ha 6 legami di coordinazione, 4 con la protoporfirina (gli azoti impediscono al Fe^{2+} di passare allo stato Fe^{3+} che lega irreversibilmente O_2), mentre gli altri due sono perpendicolari ad essa e sono impegnati con l'ossigeno e con un atomo di azoto dell'His (E8 nella mioglobina) di una catena laterale. Quando il ferro si lega all'ossigeno cambia le sue proprietà elettroniche: così si distinguono il sangue venoso e quello arterioso.

Il ferro si lega anche ad altre molecole come CO e NO (ossido di azoto), anche con maggior affinità di quanto si leghe all'ossigeno.

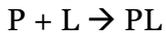
- *Quali sono?*

Queste proteine sono le globine, una famiglia molto vasta, che condivide sommariamente la stessa struttura primaria e terziaria, ed hanno il compito di trasportare e immagazzinare ossigeno. Esistono almeno quattro diversi tipi di globine:

- **Citoglobina:** monomerica, presente in elevata concentrazione in molti tessuti, ha una funzione ancora incognita ma pur sempre adibita al trasporto;
- **Neuroglobina:** monomerica, ampiamente espressa nei neuroni, protegge il cervello da ipossia ed ischemia;
- **Emoglobina:** tetramerica, trasporta l'ossigeno nel torrente circolatorio;
- **Mioglobina:** monomerica, favorisce la diffusione dell'ossigeno nel tessuto muscolare. Essa ha 153 residui amminoacidici e contiene una molecola di eme. La catena polipeptidica è composta da 8 strutture ad α elica collegata da numerosi ripiegamenti.

- **Descrizione quantitativa del legame proteina ligando:**

Il legame reversibile di una proteina col suo ligando può essere descritto dall'equazione:



La cui costante di equilibrio K_a (di associazione) sarà, date k_a e k_d (che corrispondono alle costanti di velocità delle reazioni di associazione e dissociazione, rispettivamente di secondo e primo ordine):

$$1. K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{k_a}{k_d}$$

Quando la concentrazione del ligando è molto alta rispetto a quella della proteina, la formazione del complesso PL non influenza più la concentrazione di ligando, ossia [L] resta costante.

Considerando l'equilibrio dal punto di vista della frazione di siti di legame θ :

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

Sostituendo l'espressione della K_a a [PL]

$$\theta = \frac{K_a[L][P]}{K_a[L][P] + [P]} = \frac{K_a[L]}{K_a[L] + 1} = \frac{[L]}{[L] + \frac{1}{K_a}}$$

Un'equazione di questo tipo descrive un'iperbole. (vd grafico 5.4 a)

Significa che il numero di siti di legame occupati aumenta asintoticamente quando [L] aumenta.

Il valore di [L] quando θ è 0,5, cioè metà dei siti sono occupati, è $\frac{1}{K_a}$.

Riprendendo la prima equazione, possiamo scrivere che:

$$2. \Theta = \frac{[L]}{[L] + K_d}$$

Quando [L]= K_d , la metà dei siti di legame sono occupati. Quando è minore di K_d abbiamo pochi siti di legami occupati, dunque per avere una completa saturazione dovremmo avere valori di [L] molto maggiori di K_d .

Dunque, per definizione, K_d è la concentrazione molare di ligando a cui metà dei siti di legame disponibili è occupata dal legame. Quando più la proteina è affine per il ligando, minore sarà la concentrazione di [L] necessaria per avere la metà dei siti di legame occupati.

Una K_d bassa indica un'alta affinità.

Per l'ossigeno, essendo un gas, conviene utilizzare la sua pressione e la pressione parziale per quanto riguarda la K_d perché essa rappresenta $[O_2]_{0,5}$, poiché è più complesso misurare la concentrazione di un gas disciolto in soluzione.

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

- **Come si legano all' O_2 ?**

Il legame di un ligando con la sua proteina dipende dalla geometria degli orbitali ibridi di ogni ligando e dalla struttura della proteina. Nella mioglobina vi è un residuo di Hys E7 presente sullo stesso lato dell'eme in cui si lega l'ossigeno, eppure non raggiunge i legami di coordinazione del ferro, ma può interagire con altri ligandi, per questo viene detto "distale", per distinguerlo dall'Hys prossimale che invece lega il ferro. Infatti l'Hys E7 interagisce con l' O_2 con un legame a idrogeno e impedisce il legame lineare di una molecola di CO, diminuendone l'affinità.

L'ossigeno per legarsi all'eme necessita movimenti molecolari molto rapidi che permettano la formazione di cavità transitorie che sfrutta per entrare ed uscire dalla proteina, che dunque non è rigida. La principale fluttuazione che rende possibile ciò è la rotazione della catena laterale in cui è presente l'Hys distale.

- L'emoglobina

Caratteristiche generali:

L'emoglobina è una proteina quasi sferica, con un diametro di 5,5 nm, formata da 4 subunità, ognuna di esse associate ad un gruppo prostetico eme. Ci sono diversi tipi di emoglobine, di cui la più importante è la A (presente nell'adulto), che è formata da due tipi di catene polipeptidiche: due α e due β ; esse condividono strutture terziarie molto simili, anche con la stessa mioglobina. La struttura quaternaria è caratterizzata da interazioni molto forti tra le quattro subunità: nell'interfaccia $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ i legami sono così forti per prevenire effetti denaturanti, ma in generale su tutte le interfacce prevalgono legami idrofobici, legami a idrogeno e ponti salini che tengono salda la struttura.

LEGAME CON L'OSSIGENO

Variazione strutturale (stato T ed R):

L'emoglobina presenta due conformazioni: uno stato T (teso) e uno R (rilassato).

L'ossigeno si lega ad entrambi gli stati, ma con maggior affinità per lo stato R, il quale viene stabilizzato dal legame stesso. Lo stato T è, dunque, quello prevalente della deossiemoglobina, ed è stabilizzato da un gran numero di interazioni ioniche sulle interfacce $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$. Quando l'ossigeno entra in contatto con una delle subunità dello stato T, vi è una variazione conformazionale che la converte nello stato R. I monomeri $\alpha\beta$ con cui si sarà legato, scivolano l'uno sull'altro, ruotando e "chiudendo" la tasca tra le subunità β .

Nello stato T, il gruppo eme protrude leggermente verso l'Hys distale, ma quando si lega all'O₂ assume una conformazione più planare, per cui il ferro si allontana dalla Hys E7 e dall'elica ad essa legata.

Meccanismo cooperativo:

L'emoglobina deve legare in modo efficace l'ossigeno nei polmoni, dove la pO₂ è di circa 13,3kPa, e rilasciarlo nei tessuti dove la pO₂ è di circa 4 kPa. La mioglobina non sarebbe adatta a questo ruolo perché non è sensibile a variazioni di [O₂], visto l'andamento iperbolico della loro affinità. L'emoglobina, mediante la sua transizione da stato R a stato T e la presenza di più subunità, risolve questo problema, risultando avere una curva di legame con O₂ sigmoideale (vd 5.12). Il legame di O₂ con una sola subunità modifica l'affinità delle subunità adiacenti. La prima molecola di O₂ si lega ad una subunità di deossiemoglobina con poca affinità, generando una modificazione conformazionale che viene comunicata alle altre subunità, rendendo più facile l'interazione con queste e la transizione dallo stato T a quello R. Dunque, interagendo con una subunità favorisce il legame a tutte le altre subunità. Questo tipo di legame è detto **cooperativo**. L'emoglobina quindi è una **proteina allosterica** perché il legame dell'ossigeno ad un sito determina modificazioni conformazionali a carico degli altri siti di legame. (Quando il ligando è il modulatore, la modulazione si dice omotropica. Quando il modulatore è una molecola diversa, è definita come eterotropica. Si possono avere anche più modulatori).

Equazione di Hill:

Il legame cooperativo viene descritto qualitativamente tramite questa equazione, detta di Hill.

Dati n siti di legame, avremo: $P + nL \rightarrow PL_n$

E otteniamo: $K_a = \frac{[PL_n]}{[P][L]^n}$ e $\theta = \frac{[L]^n}{[L]^n + Kd}$

Risolvendo e applicando il logaritmo a entrambi i termini dell'equazione si ha:

Mettendo in evidenza $[L]^n$

$$\theta = \frac{1}{\left(\frac{Kd}{[L]}\right)^n + 1}$$

Formula inversa

$$\left(\frac{Kd}{[L]}\right)^n + 1 = \frac{1}{\theta} \quad \left(\frac{Kd}{[L]}\right)^n = \frac{1}{\theta} - 1$$

$$\left(\frac{Kd}{[L]}\right)^n = \frac{1+\theta}{\theta} \quad \text{invertire ed applicare log} \quad \log\left(\frac{Kd}{[L]}\right)^n = \log\frac{1+\theta}{\theta}$$

Avendo applicato il logaritmo, si ottiene che:

$$n \log[L] - \log(Kd) = \log\frac{1+\theta}{\theta}$$

Il grafico di questa equazione, detto grafico di Hill, è di $\log\frac{1+\theta}{\theta}$ in funzione di $[L]$. “n” corrisponde alla pendenza della funzione ed è indicata con n_H (coefficiente di Hill), una misura del grado di cooperatività. Se n_H è minore di 1, vi è cooperatività negativa, ossia una molecola di ligando impedisce il legame delle altre; se è maggiore di 1 vi è cooperatività; se è uguale a 1 non vi è cooperatività. Il limite teorico viene raggiunto quando $n_H = n$, cioè quando tutti i siti di legame saranno occupati dalla proteina, ma ciò non è possibile.

Per l'emoglobina, l'equazione diventa: $n \log(pO_2) - \log(P_{50}) = \log\frac{1+\theta}{\theta}$

Modelli di legame cooperativo:

I due modelli non si escludono a vicenda, ma il primo può essere considerato il caso limite del secondo.

Modello WMC o modello concertato: Le subunità di proteina che legano i ligandi cooperativamente sono tutte identiche, ma devono esistere in più conformazioni e tutte insieme passano da uno stato di transizione all'altro.

Modello sequenziale: Il legame del ligando induce una modifica conformazionale in una sola subunità, che a sua volta induce una variazione simile nella subunità vicina rendendo maggiore la sua affinità per il ligando.

LEGAME CON H^+ , CO_2 e BPG (tutti inibiscono il legame con O_2)

L'emoglobina può trasportare anche altri prodotti della respirazione cellulare, come H^+ e CO_2 , dai tessuti ai polmoni e ai reni, dove sono escreti.

La CO_2 , prodotta nei mitocondri, siccome non è molto solubile in acqua potrebbe formare bollicine nel sangue, per questo viene subito idratata in forma di bicarbonato dall'anidrasi carbonica, enzima molto abbondante negli eritrociti: $CO_2 + H_2O \rightarrow H^+ + HCO_3^-$.

Aumentando la concentrazione di ioni H^+ , aumenta il pH, che influenza profondamente il legame dell' O_2 con l'emoglobina, ovvero otteniamo che il legame di H^+ e CO_2 con l'emoglobina è inversamente proporzionale al legame con l' O_2 . A condizioni di pH relativamente basso e di alta $[CO_2]$, l'affinità per l'ossigeno diminuisce ed è rilasciato nei tessuti, mentre CO_2 e H^+ si legano all'emoglobina. Questo fenomeno è detto effetto Bohr.

L' O_2 si lega ai gruppi ferrosi dei gruppi eme, gli H^+ si legano alle catene laterali dei residui, che, quando sono protonati, favoriscono lo stato T. La CO_2 si lega all'estremità N-terminale formando residui carbamminoterminali, che generano ponti salini e stabilizzano lo stato T e favoriscono il rilascio di ossigeno. Invece il **2,3-bisfosfoglicerato** (BPG) è presente in grandi quantità negli eritrociti, riducendo l'affinità dell'emoglobina per l' O_2 . Esso si lega tra le subunità β dello stato T, ricca di gruppi carichi positivamente che interagiscono con le sue cariche negative, stabilizzando lo stato teso (motivo per cui l'emoglobina fetale non ha subunità β , ma γ). Una sola molecola si lega a tutte e quattro le subunità. Il BPG si lega in un sito distante dall' O_2 in base alla pO_2 nei polmoni, infatti svolge una funzione fondamentale quando vi sono basse pO_2 (a quote elevate), in modo tale da diminuire l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno e farlo rilasciare nei tessuti in livelli normali nonostante la pO_2 sia bassa. In casi di ipossia, i livelli di BPG aumentano.