

Transport

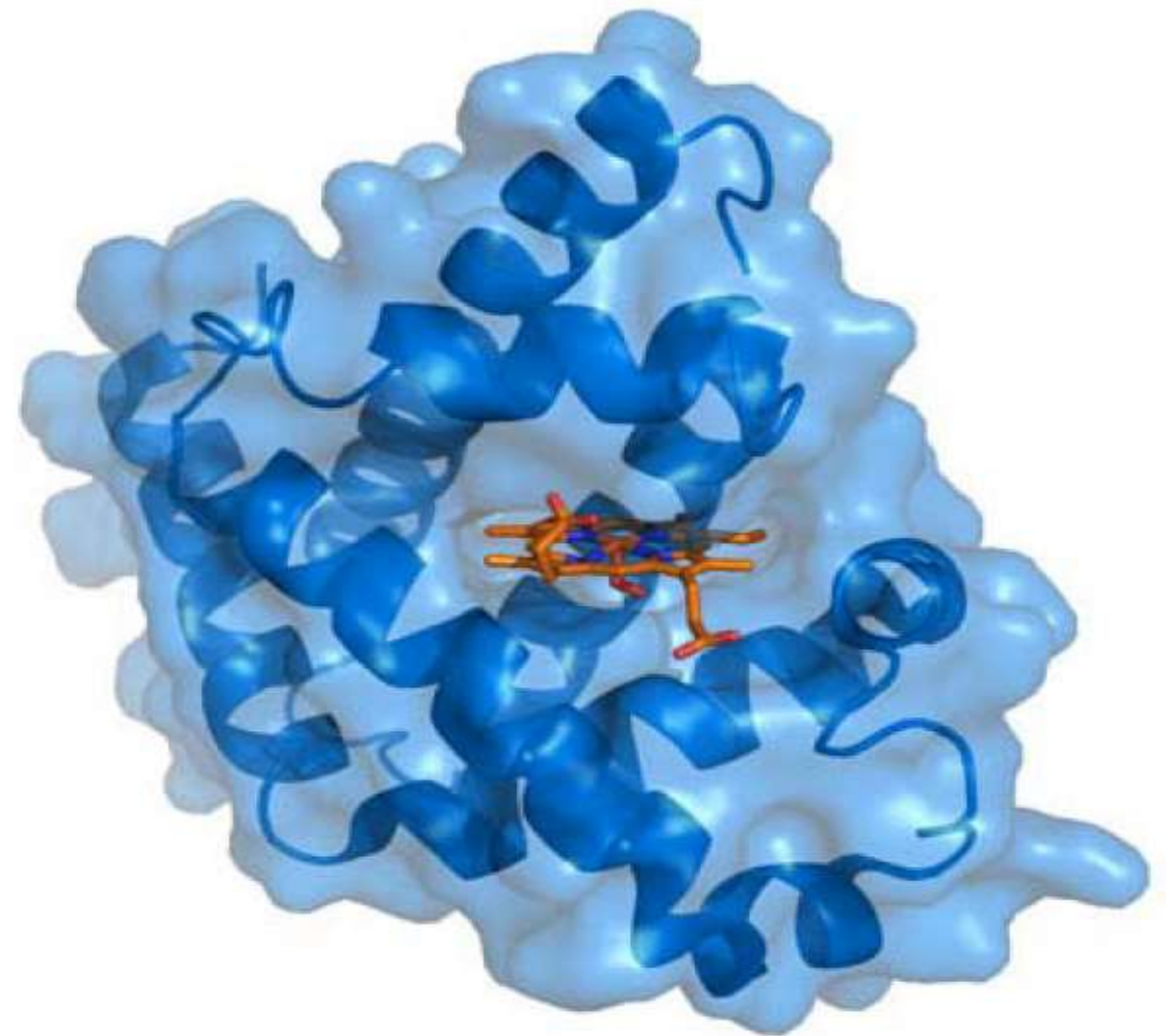
- Proteine globulare
- Sunt molecule sferice compacte și îndeplinesc roluri de
 - Proteine transportoare
 - Receptori
 - Enzime
- Mioglobina si hemoglobina
 - Rol in transportul oxigenului

Mioglobina

- Este o proteină globulară, alcătuită dintr-un singur lanț polipeptidic, care conține **153 de aminoacizi**
- Are o grupare prostetică, reprezentată de **hem**
- Fixează **O₂** și îl **stochează**
- Este o proteină specifică **fibrelor musculare miocardice și scheletice**
- Se întâlnește la toate vertebratele, unde colorează mușchii în roșu sau **cenușiu închis**
- Este eliberată în circulație după **lezarea musculară, ischemie, inflamatie**
- Tumorile epiteliale (ex. Cancer mamar, ovarian, pulmonar și de colon) în stadiul incipient, exprimă o cantitate mare de mioglobina (Flonta et al, American Journal of Pathology, 2009)

Mioglobina

- ansamblul este stabilizat prin două molecule de histidină situate deasupra (Hys 64) și sub planul nucleului porfirinic (Hys 93).
- mioglobina se găsește la nivelul mușchiului cardiac și în mușchii scheletici.
- roluri cel mai important fiind acela de rezervor de oxigen intracelular, legând oxigenul în condiții de aerobioză și cedându-l celulei în condiții de efort muscular crescut (anaerobioză)

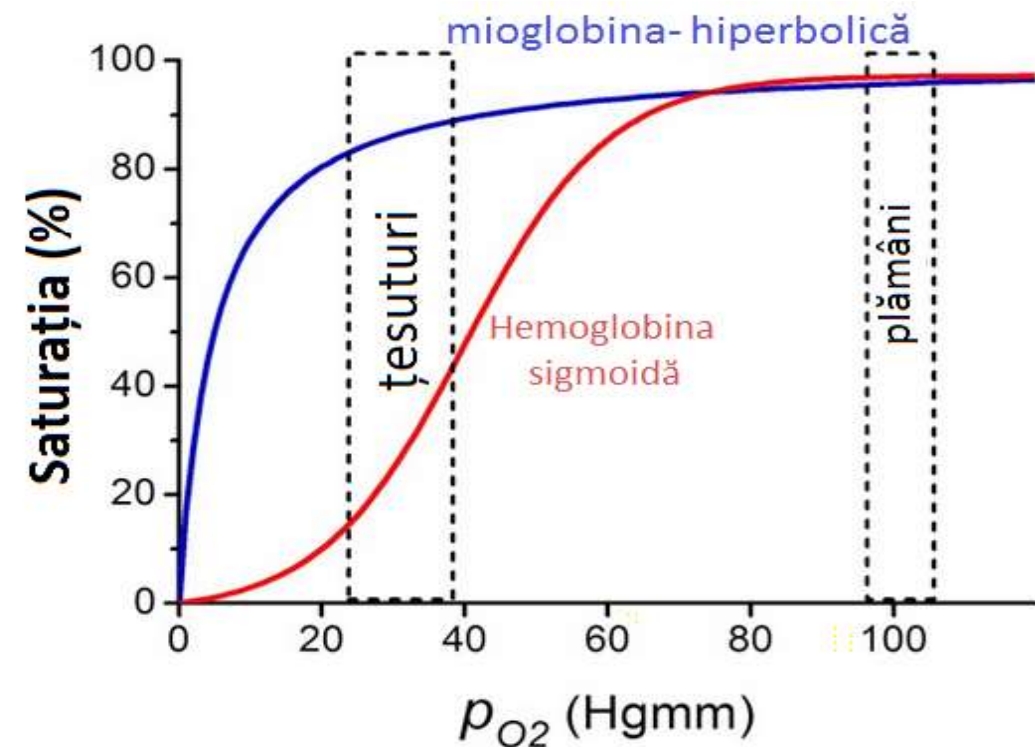


Rolul fiziologic al mioglobinei

- Mioglobina este eliberată în sânge prin alterarea celulei musculare, fiind eliminată prin rinichi și constituie un indicator al masei musculare afectate.
- Mioglobina este toxică pentru rinichi putând duce la apariția insuficienței renale acute.

Rolul fiziologic al mioglobinei

- Curba de legare a oxigenului - hiperbolică,
- Curba de legare a oxigenului a hemoglobinei -sigmoidă.
- mioglobina se saturează cu oxigen la presiuni parțiale de oxigen mai mici decât hemoglobina
- molecula de mioglobină este adaptată la condiții de anaerobioză care pot apărea în cursul unui travaliu muscular prelungit .



Hb versus Mb

- **Hb** carry O_2 to tissues where it is released
 - Releases quickly in tissues where pO_2 is lower
- **Mb** store O_2 in the muscle, make it available to cells
 - Releases very little in tissues

Reference: Science 255 54 (1992)

Hemoglobina (Hb)

- Proteina globulara tetramerica
- Cromoproteina
- Se gaseste in eritrocite
- Formata din
 - Hem
 - Globina
- Rol in:
 - Transportare O₂ de la plaman la tesuturi
 - Transportare CO₂ de la tesuturi la plaman
 - Contribuie la mentinerea constanta a echilibrului acido-bazic din sange (are capacitate mare de tamponare)
- Legarea O₂ de hemoglobina este influentata de
 - H⁺, CO₂
 - Acidul 2.3-difosfogliceric

Hemoglobin and oxygen transport

In the lungs, there is an abundance of O₂ so oxygen is picked up by the hemoglobin.

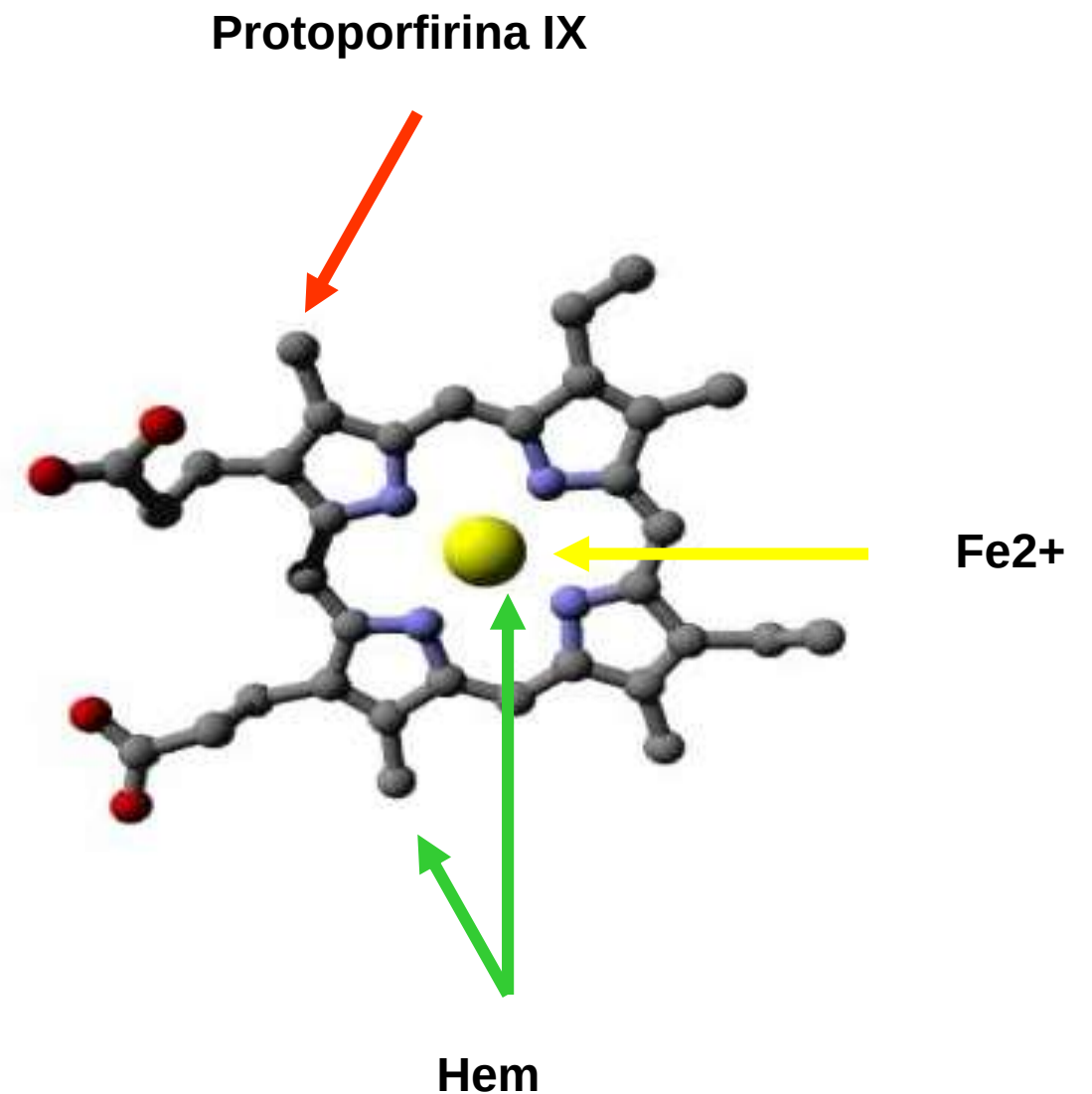
$$\text{Hb} + 4 \text{O}_2 \longrightarrow \text{Hb}(\text{O}_2)_4$$

When blood reaches the cells, there is a lack of O₂ so oxygen is given up by the hemoglobin.

$$\text{Hb} + 4 \text{O}_2 \longleftarrow \text{Hb}(\text{O}_2)_4$$

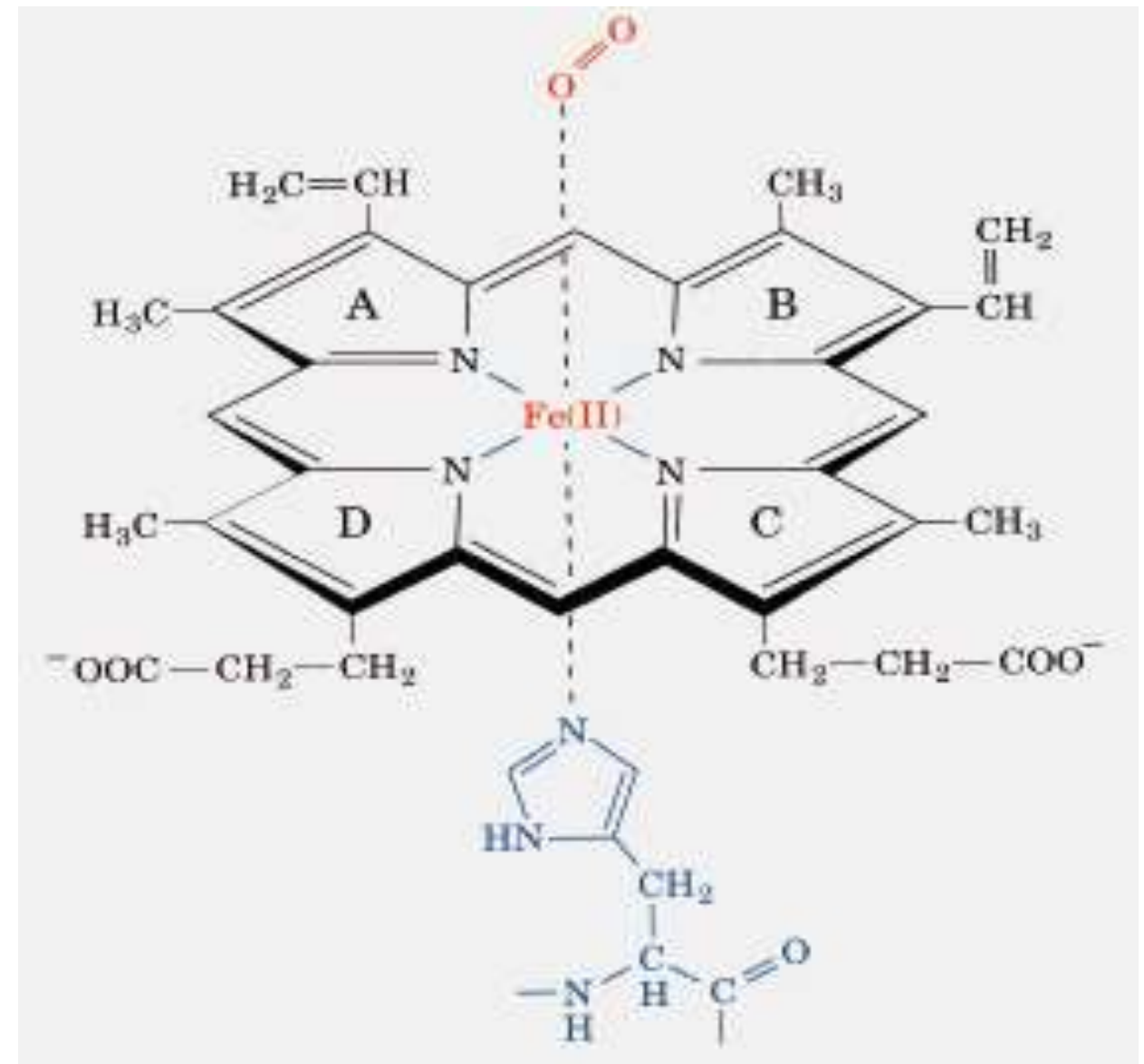
Hem

- Hemul este grupa prostetica a Mb si Hb
- Mb posedea o grupare hem
- Hb posedea 4 grupari hem
- Hemul este alcatuit din
 - Protoporfirina IX :(4 heterocicluri pirolice legate prin punti metinice)
 - Fe^{2+} , are 6 valente:
 - 4 valente satisfacute de protoporfirina si
 - 2 valente perpendiculare pe planul protoporfirinei la care se pot lega diferiti liganzi (O_2 , CO , NO)



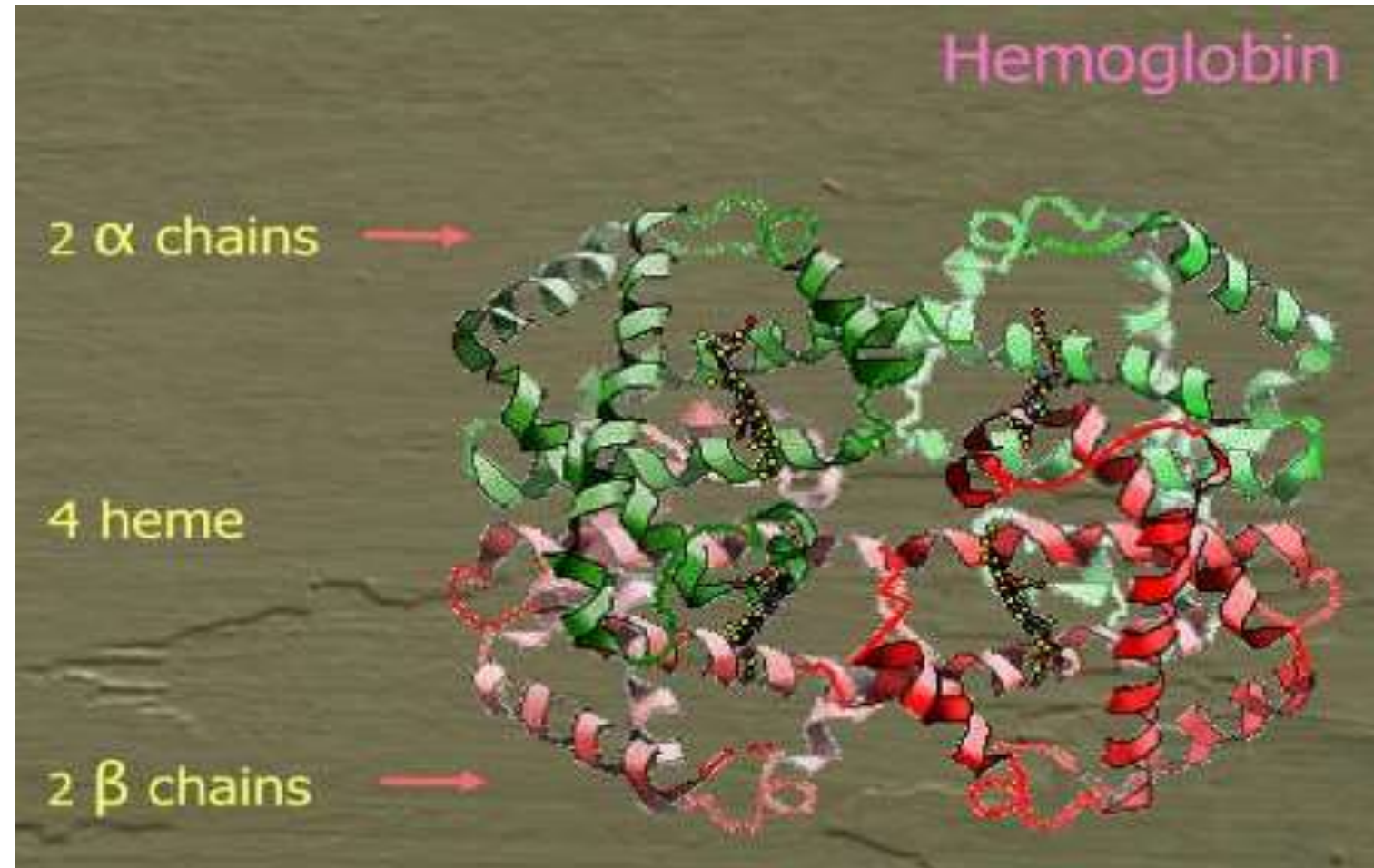
Hem-ul din hemoglobină

- **protoporfirina IX**
- **fier**
 - **protoporfirina IX** este alcătuită din patru nuclee pirolice legate între ele prin patru punți metilenice, atomul de fier fiind situat în centrul nucleului porfirinic.
 - **fierul** se găsește în hemoglobină sub formă bivalentă (Fe^{2+} ; fier feros).
 - **fierul** este legat prin patru legături coordinative la azotul nucleului pirolic și prin alte 2 legături la componenta proteică a hemoglobinei.

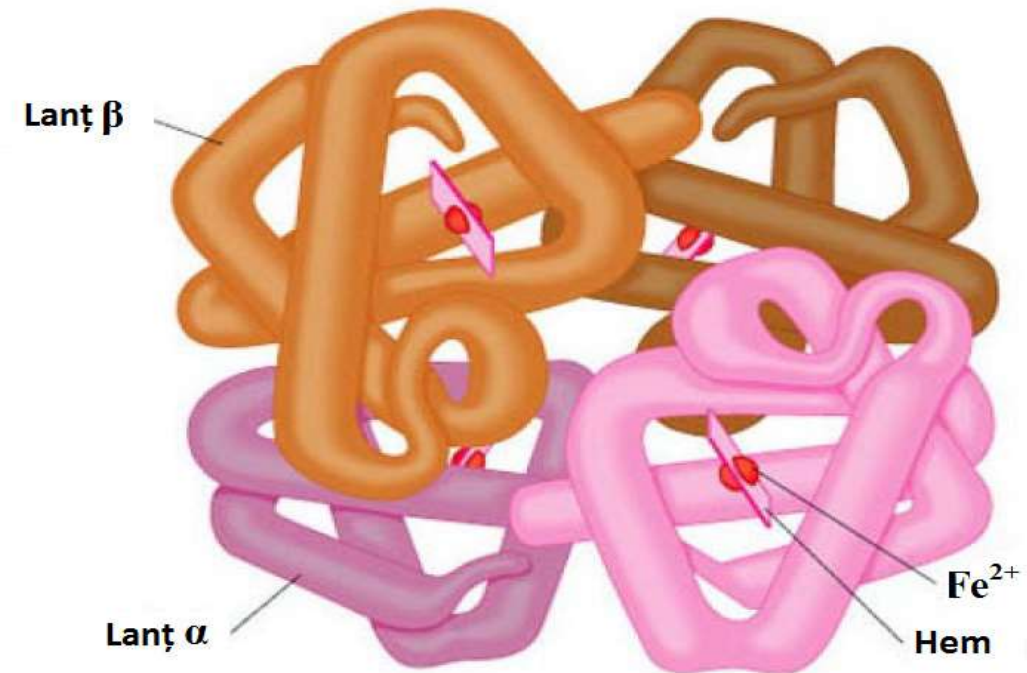


Globina

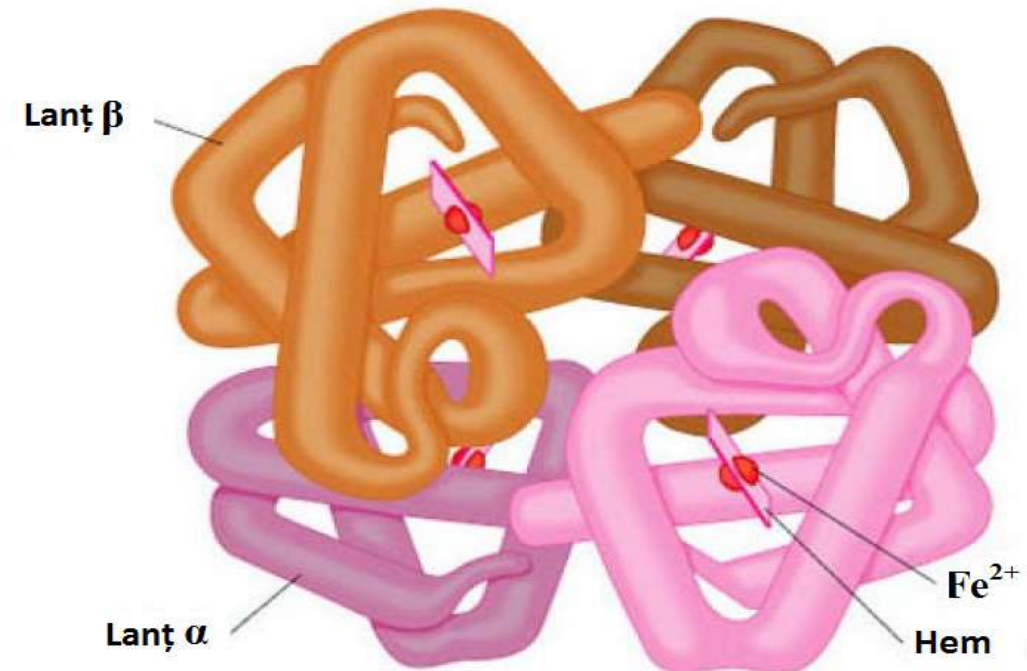
- Proteina globulara
- Prezenta in toate proteinele transportoare de oxigen
- In Hb si Mb, globina se asociaza necovalent cu molecula de hem
- Are rol de a proteja interactia hemului cu oxigen



- **hemoglobina** este un tetramer alcătuit din patru lanțuri polipeptidice de globină.
- cele două perechi de lanțuri diferă între ele prin structura lor primară, adică prin secvența și numărul aminoacizilor constituenți.
- structura globinei diferă, fiind cunoscute mai multe tipuri de lanțuri polipeptidice care intră în alcătuirea hemoglobinei fiziologice: ζ , ϵ , α , β , γ , δ .



- Legarea hemului de globina se face prin intermediul histidinei din poziția 92 și 63 din lanțurile β și 87 și 58 de pe lanțurile α .
- Inelul imidazolic din pozițiile 92 și 87 se leagă direct la atomul de fier, celelalte 2 legături se realizează prin intermediul unei molecule de apă, această legătură labilă permitând legarea oxigenului de atomul de Fe^{2+} .
- Aminoacizii situați în regiuni învecinate legăturii dintre hem și globină sunt invariabili.



Funcțiile hemoglobinei

- transportor al gazelor sanguine
- când oxigenul este eliberat, oxihemoglobina (HbO_2) devine hemoglobină redusă (HbA).
- Fixarea oxigenului se face la nivelul fierului din structura hemului (histidina din poziția 63 și 58), fiecare atom de fier fixează câte un atom de oxigen cu viteze diferite datorită fenomenului de cooperativitate dintre monomeri.
- Astfel că legarea oxigenului la unul dintre monomeri, determină schimbări conformaționale care facilitează legarea oxigenului la celelalte unități monomerice.

Valorile fiziologice ale hemoglobinei

Hemoglobina g/dl

barbati

13,0-17,0

femei

12,0-15,5

Valorile patologice ale hemoglobinei

Anemie: Scăderea nivelului de hemoglobină (Hb) din sânge sub valorile de referință pentru vârsta și sexul unei persoane duce la anemii

usoara: Hb = 11 – 8 g/dl, Ht = 39 – 30 %;

medie: Hb = 8 – 6 g/dl; Ht = 30-22 %;

severa: Hb = 6 – 2 g/dl, Ht = 22 – 10 %.

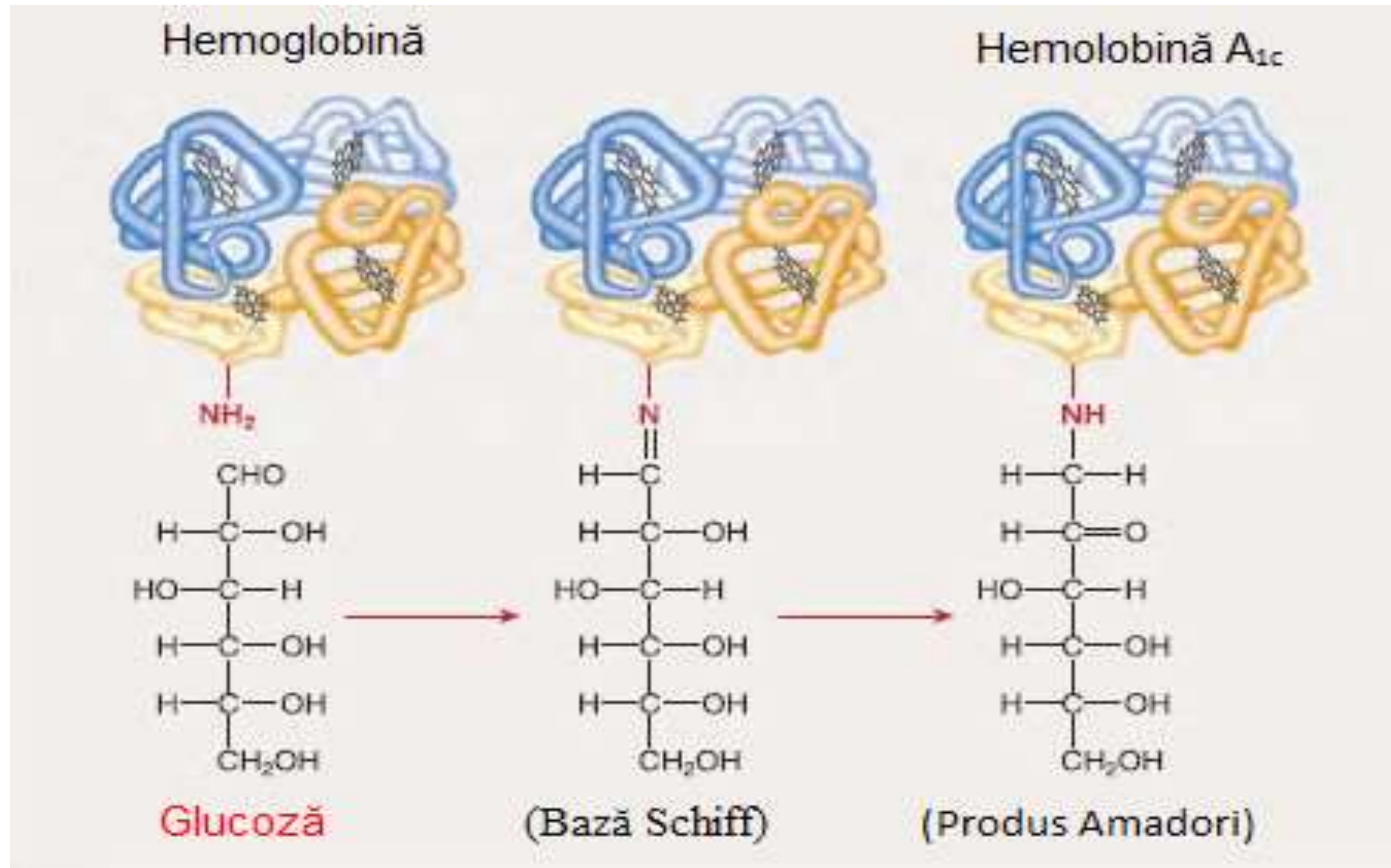
Hemoglobine fiziologice

- Tipuri
 - **HbE embrionara** : pana la 3 luni de la fertilizare
 - **HbF fetala**:
 - 3-8 luni ale fatului
 - Este mult mai eficienta in transportul oxigenului comparativ cu Hb adulta
 - **HbA adulta**: exista doua izoforme HbA1si HbA2
- Caracteristici:
 - pl caracteristic fiecărei forme
 - Mobilitata electroforetica caracteristica

Hemoglobine patologice

- **1. Hb glicata (HbA1c)**
- Se obtine prin legarea glucozei la **valina** catenei β
- In conditii de hiperglicemie, moleculele proteice sufera un proces de **glicozilare ne-enzimatica proportional cu nivelul glicemiei sanguine si cu durata mentinerii acesteia.**

Hemoglobina glicata



Hemoglobine patologice

1. Hb glicata (HbA1c)

Astfel, **cresterea HbA1c** este proportionala cu nivelul mediu al glucozei sangvine in cursul ultimelor 3-4 luni anterioare testarii (corespunzatoare duratei medii de viata a eritrocitelor, 120 zile.)

Cresterea procentului de hemoglobina glicozilata apare de obicei dupa o crestere sustinuta a glicemiei, de aproximativ **3 saptamani**.

Sunt necesare cel putin **4 saptamani** pentru ca procentul de hemoglobina glicozilata sa scada, dupa o reducere sustinuta a glicemiei.

Hemoglobine patologice

1. Hb glicata (HbA1c)

Este utila in:

- a. **monitorizareaa tratamentului** hipoglicemiant in diabetul zaharat.
- b. Poate diferentia o hiperglicemie pe termen scurt de o hiperglicemie pe fondul prezentei diabetului zaharat

HbA1c < 7% Control metabolic bun

HbA1c 7-10 % Control metabolic inadecvat

HbA1c > 14 % Diabet necontrolat

Hemoglobine patologice

- **2. Carboxihemoglobina (HbCO)** retinerea CO de hemoglobina
 - 10-50% HbCO produce: cefalee, tulburari psihice, greata, voma, accelerarea pulsului, coma
 - 50-60%:convulsii
 - 60-70%: soc anafilactic, insuficienta respiratorie, risc deces
 - 80-90% doza letala (deces f rapid)

Hemoglobine patologice

- **3. Methemoglobina (MetHb)**
- MetHb este **forma oxidata** a Hb (Oxidarea Fe^{2+} la Fe^{3+}) , cu o afinitate mare pentru **O₂** (nu poate elibera O₂ la tesuturi)
- MetHb formata in eritrocite (>1%), este continuu redusa la Hb de un sistem enzimatic de reductaze : methemoglobin reductazele I si II; vitamina C, forma redusa a glutathionului (GSH)
- **Methemoglobinemia**: este o boala caracterizata de cresterea cantitatii de MetHb in sange si are ca efect lezarea membranei eritrocitare
 - **Methemoglobinemia congenitala**, este o boala genetica autosomal-recesiva care apare
 - ca defect al sistemului enzimatic de reductaze
 - Existenta unor forme anormale de hemoglobina care nu pot fi reduse de sistemul enzimatic de reductaze
 - **Methemoglobinemia dobandita**: formarea excesive de MetHb datorata anumitor
 - Agenti antibacterieni (sulfamide) etc
 - Substante chimice cu efect oxidativ : benzocaina, nitriti, nitrati etc

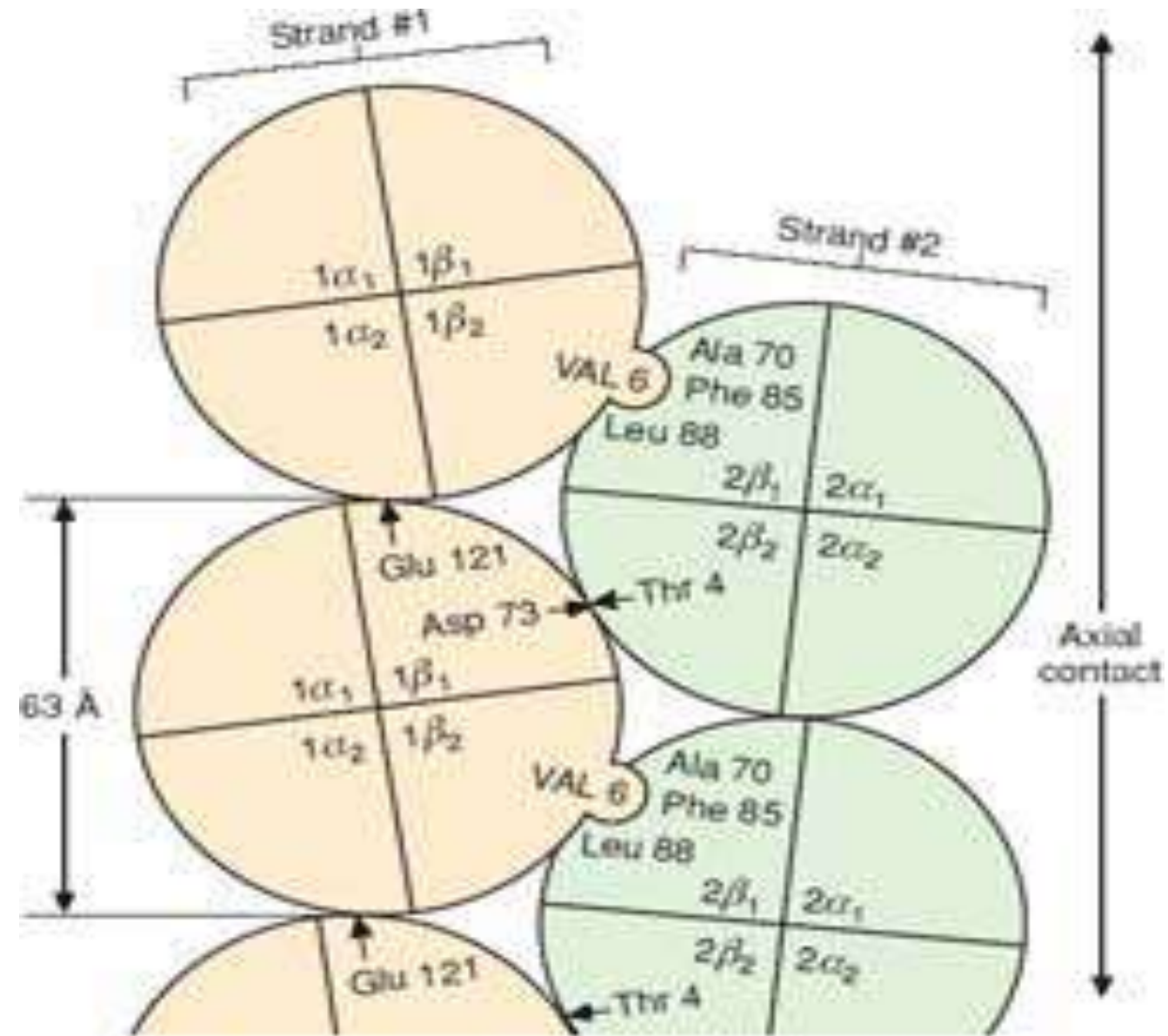
Hemoglobine patologice

- Hemoglobinopatiile sunt boli ereditare datorate **sintezei defectuoase a lanțurilor proteice** din structura hemoglobinei.
- Pot fi grupate în defecte genetice:
 - calitative (siclemia)
 - cantitative (talasemiile).

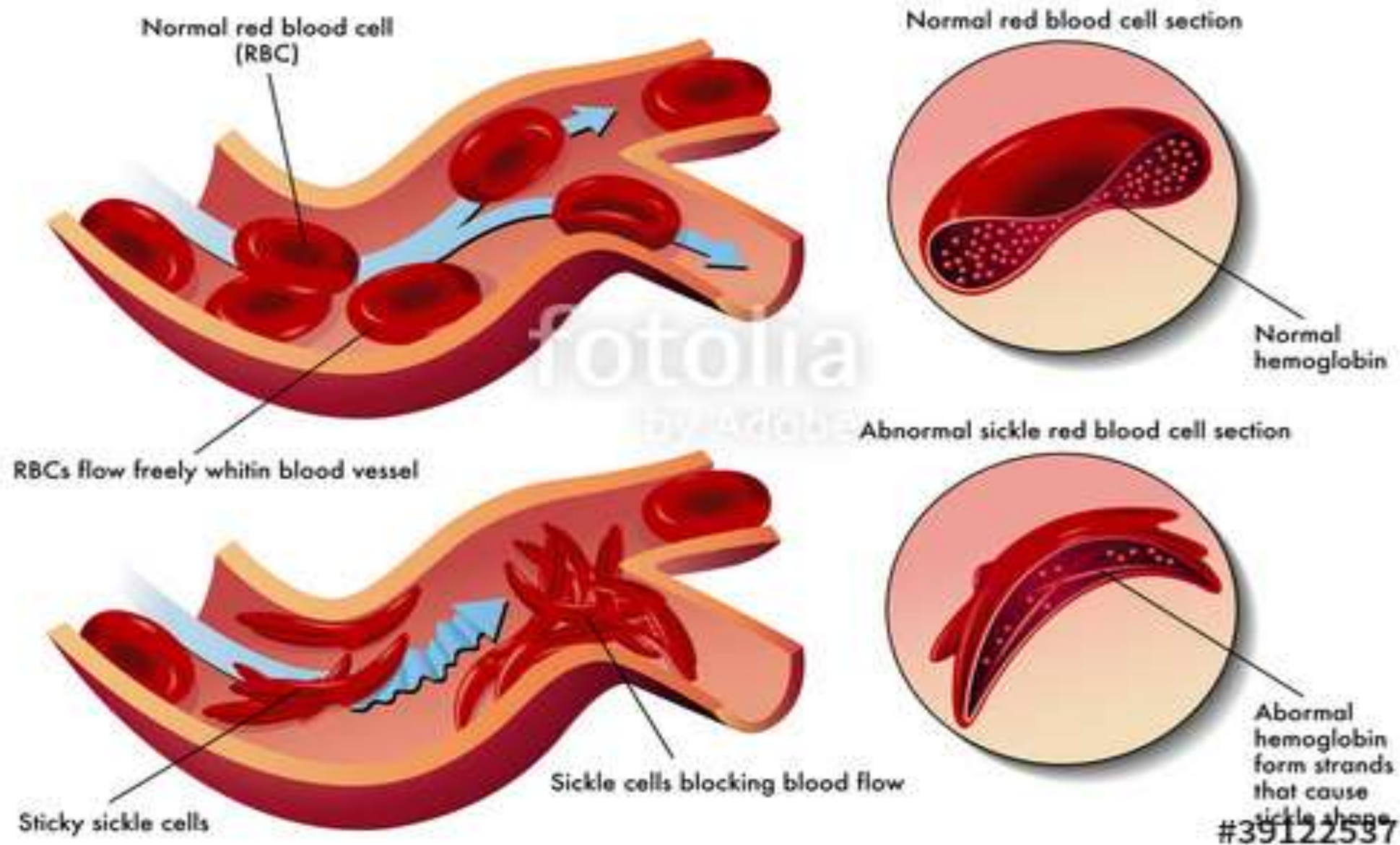
Hemoglobine patologice

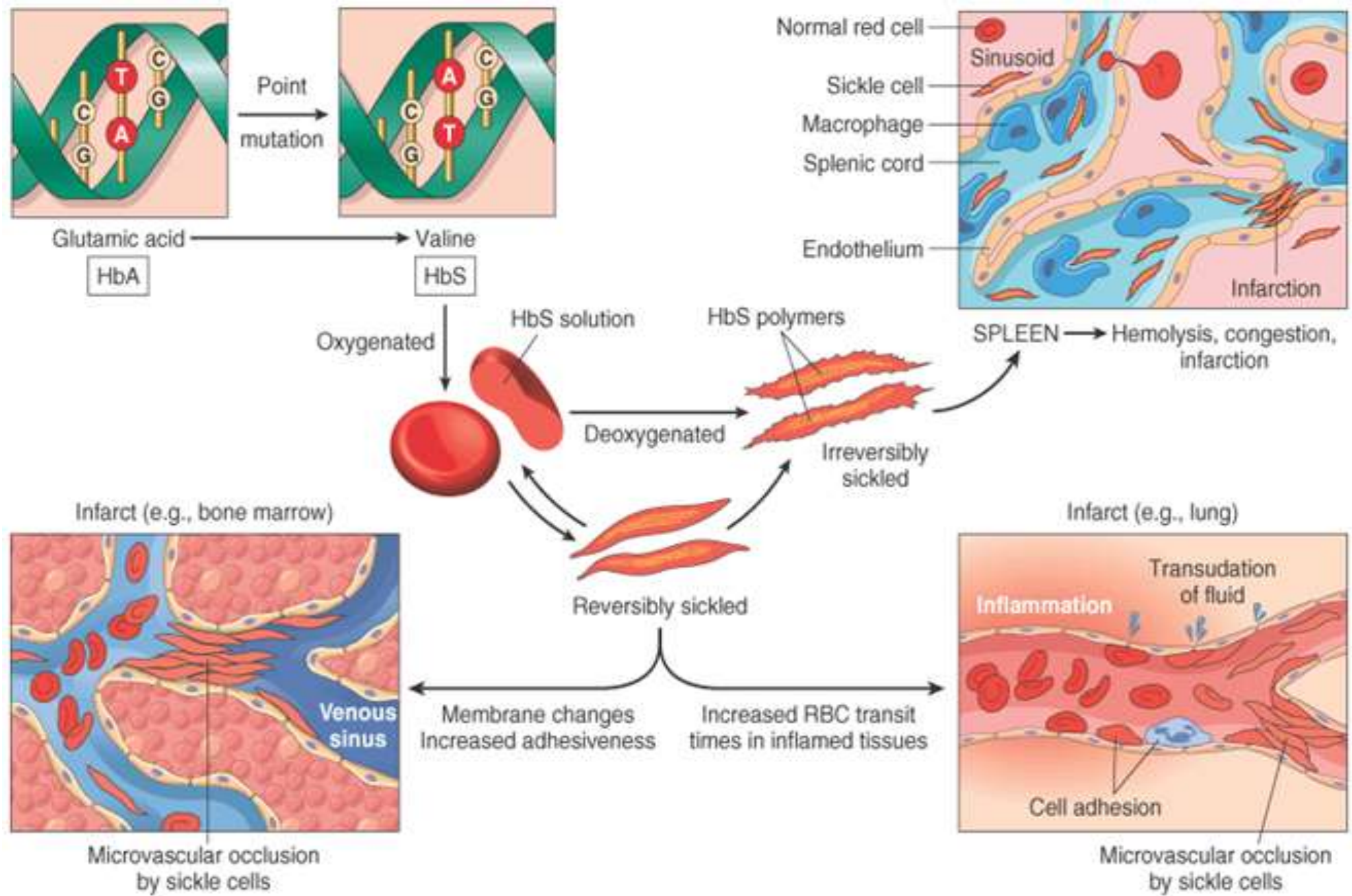
- **Siclemia** –mutații în structura hemoglobinei ce modifică structura cuaternară, și în consecință solubilitatea și capacitatea de a lega oxigenul.
- **hemoglobina S** - înlocuirea unui singur aminoacid cu altul în structura hemoglobinei, și anume acidul glutamic este înlocuit cu valina în poziția 6 a lanțului beta.
- HbS caracterizează siclemia și are o migrare electroforetică diferită de hemoglobina normală.
- Hematiile au o formă modificată, sunt hematii “în seceră”.
- Manifestările clinice sunt reprezentate de crizele vasoocluzive datorate polimerizării HbS în fibre lungi ce obturează vasele.

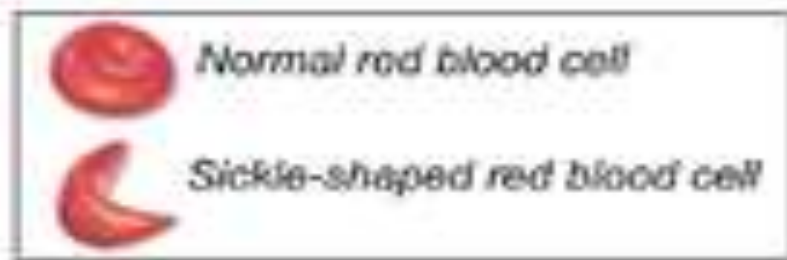
Sickle cell anemia



Sickle-Cell Anemia







Hemoglobine patologice

4. Hemoglobinopatii sau talasemii

Talasemiile sunt afecțiuni congenitale determinate de defecte la nivelul genelor implicate în sinteza lanțurilor alfa, respectiv beta ale Hb și se manifestă prin **microcitoză** (micșorarea în dimensiuni a globulelor roșii) și sunt însoțite de anemie.

Alfa talasemia

Beta talasemia

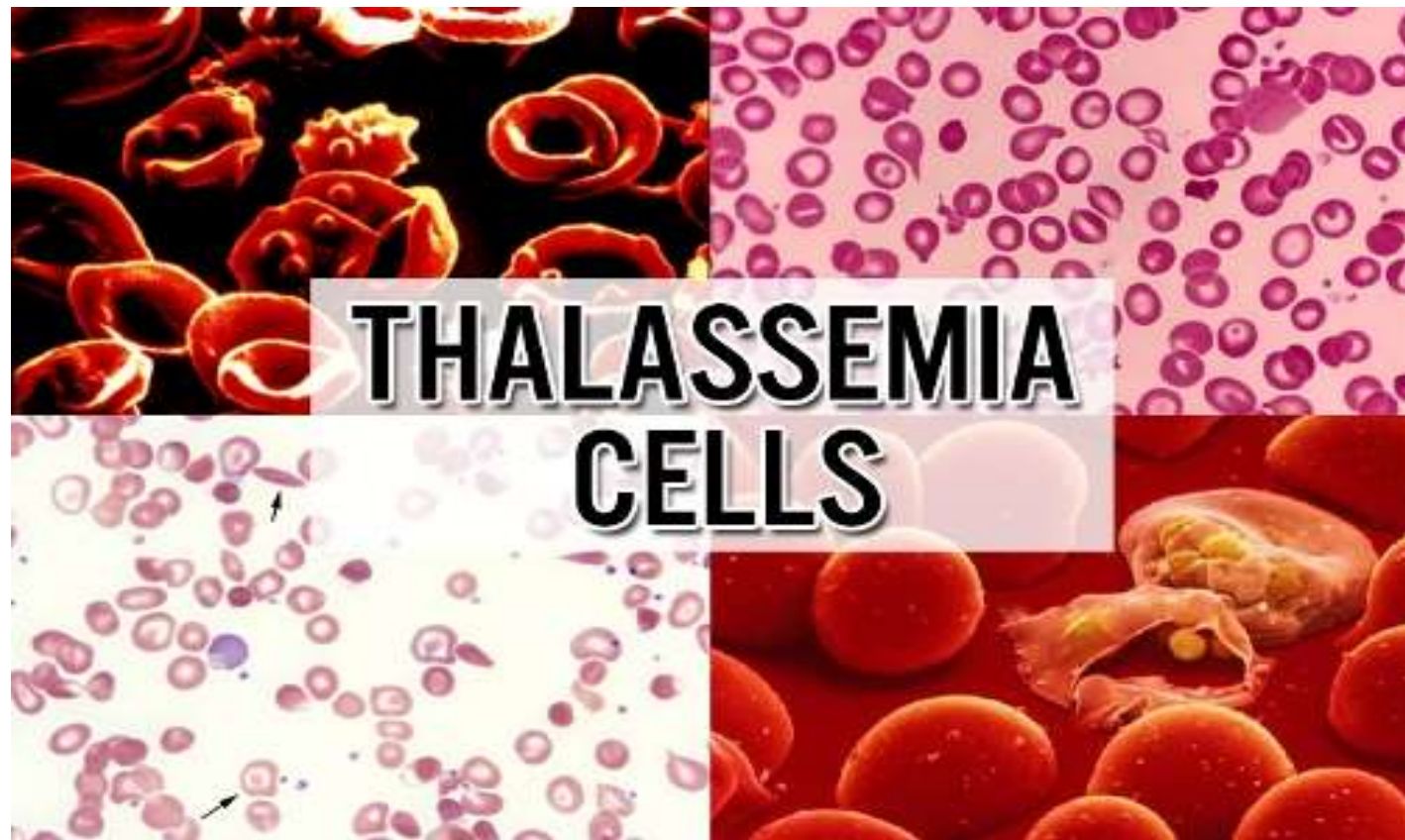
Diagnosticul talasemiei se poate efectua prin electroforeza hemoglobinei din sânge și prin analiza mutațiilor genetice

Hemoglobine patologice

- **Talasemia majoră** (boala Cooley)
- sintezei deficitare ereditare a unuia dintre lanțurile polipeptidice din structura hemoglobinei.
- homozigotii -forma severă de boală – talasemia majoră,
- heterozigoții - formă minoră

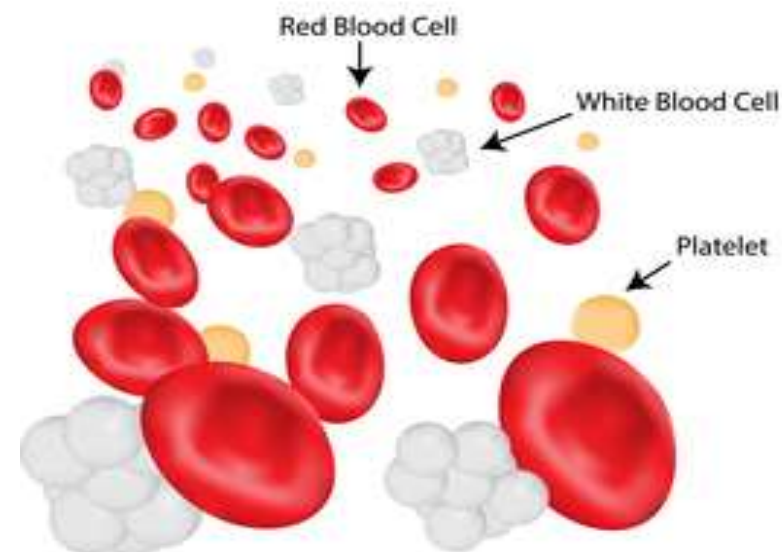
Hemoglobine patologice

- **Beta-talasemia** este cea mai comună, în care este blocată formarea lanțului beta.
- eritrocite anormale, cu predominanța hemoglobinei A2 și HbF
- hemoliza hematiilor în vivo,
- anemie hipocromă
- hepatosplenomegalie cu sfârșit letal

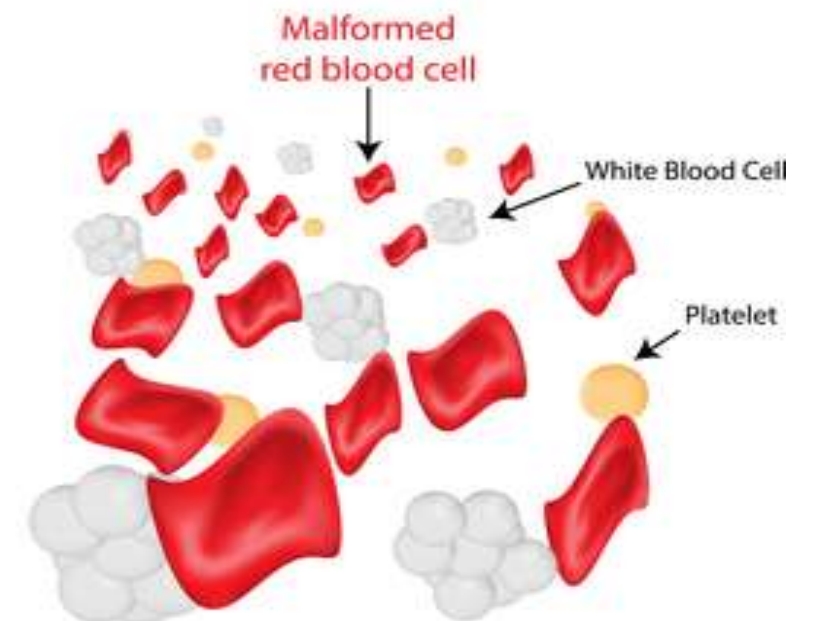


Thalassemia

Normal



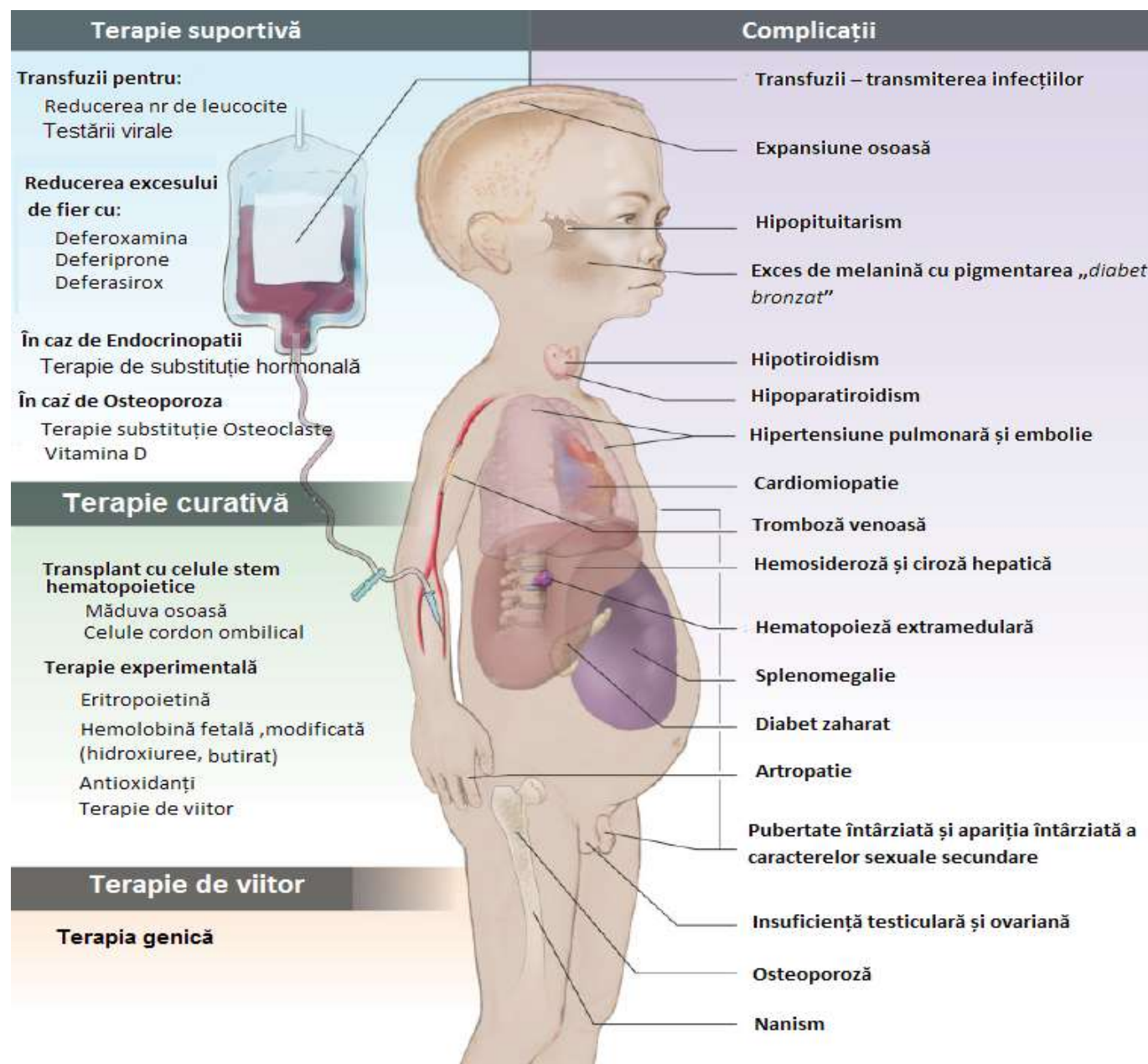
Thalassemia



Hemoglobine patologice

- Terapia curentă - transfuzii, reducerea excesului de fier sau curativă cu celule stem hematopoietice izolate din măduva osoasă.
- În prezent se experimentează cu eritropoietină, administrare de hemoglobină fetală sau antioxidanți.
- Terapia genică ar urma să corecteze defectele genetice dar rămâne deocamdata o opțiune pentru viitor.

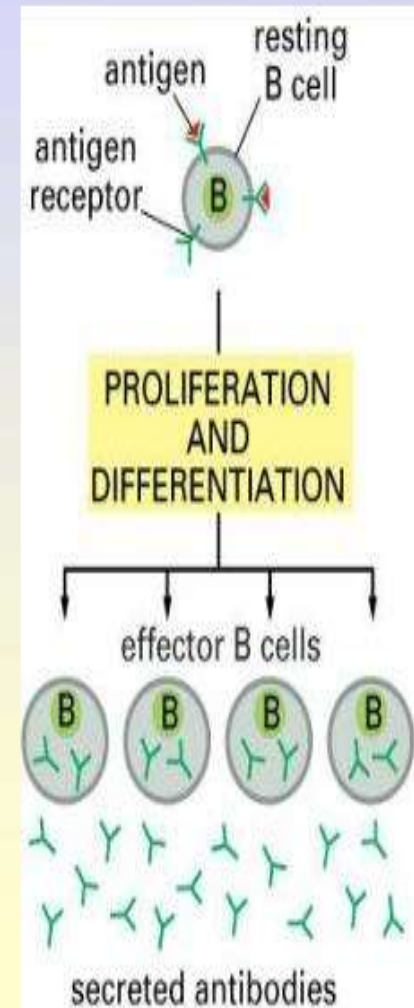
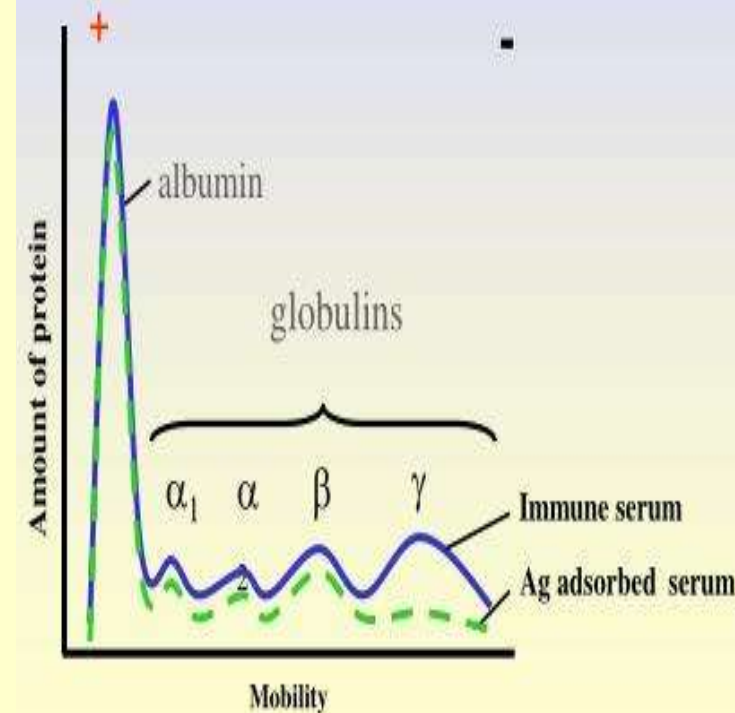
Hemoglobine patologice



IMUNOGLOBULINELE (ANTICORPII)

- Ig sunt molecule glicoproteice produse de **limfocitele B– Anticorpi (Ac)**
- Ac sunt activați ca răspuns la prezența unui antigen (Ag)
- Se disting **Ig membranare** (B cell receptor-BCR)
- Ig **solubile (secretate)**. Ac solubili sunt glicoproteine **plasmatic** din fracția γ –globulinelor care circulă în sânge și pătrund în țesuturi.
- Sunt eficienți contra bacteriilor, toxinelor microbiene și virusurilor, în poziție extracelulară.
- Ac au proprietatea de a recunoaște și a se combina cu Ag complementar, atât *in vivo*, cât și *in vitro*.

IMUNOGLOBULINELE = Molecule glicoproteice produse de plasmocite (limfocite B activate) ca răspuns la un imunogen
= **ANTICORPI**

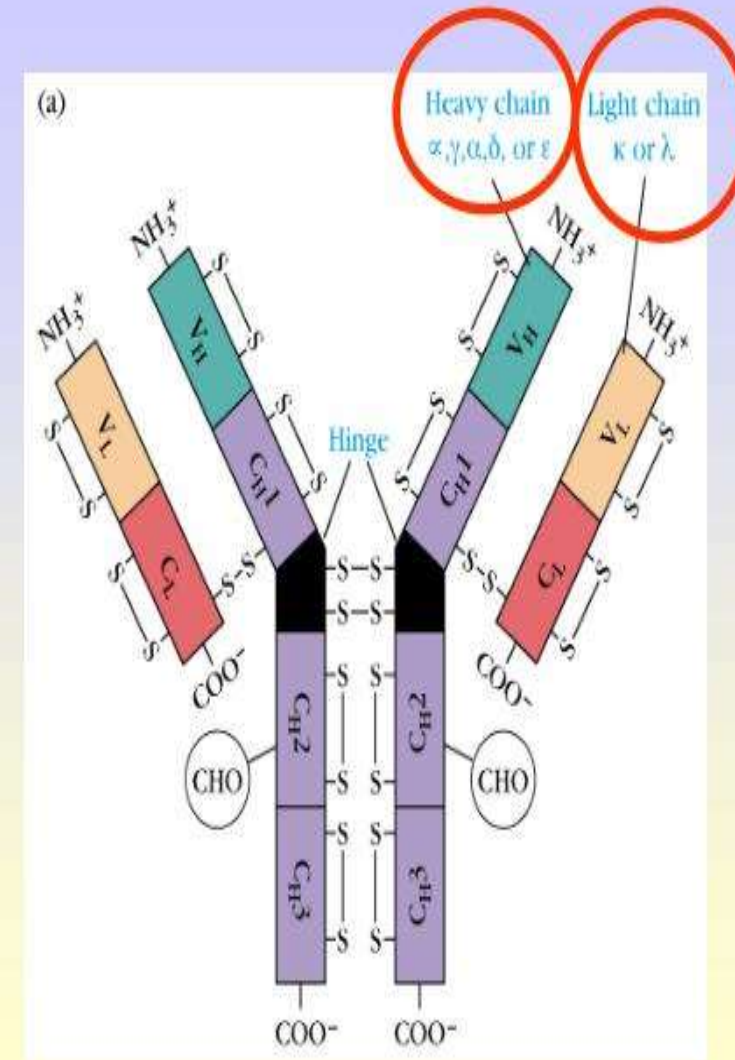


STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE MUNOGLOBULINELOR

- UNITATEA DE STRUCTURĂ a Ig este constituită din
 - 2 lanțuri glicoproteice ușoare L (*Light*) identice
 - 2 lanțuri grele H (*Heavy*), legate între ele prin punți disulfidice.
- Se disting 5 clase (izotipuri) de Ig: **IgG, IgA, IgM, IgD, IgE**, cu 5 clase de lanțuri H diferite: (γ , α , μ , δ , ϵ)
- În componența lanțurilor se disting
 - regiuni variabile V (aminoterminal) și
 - regiuni constante C (carboxilterminale).
- Catena L este constituită dintr-un domeniu V și unul C, iar
- Catena H conține un domeniu V și 3-4 domenii C.

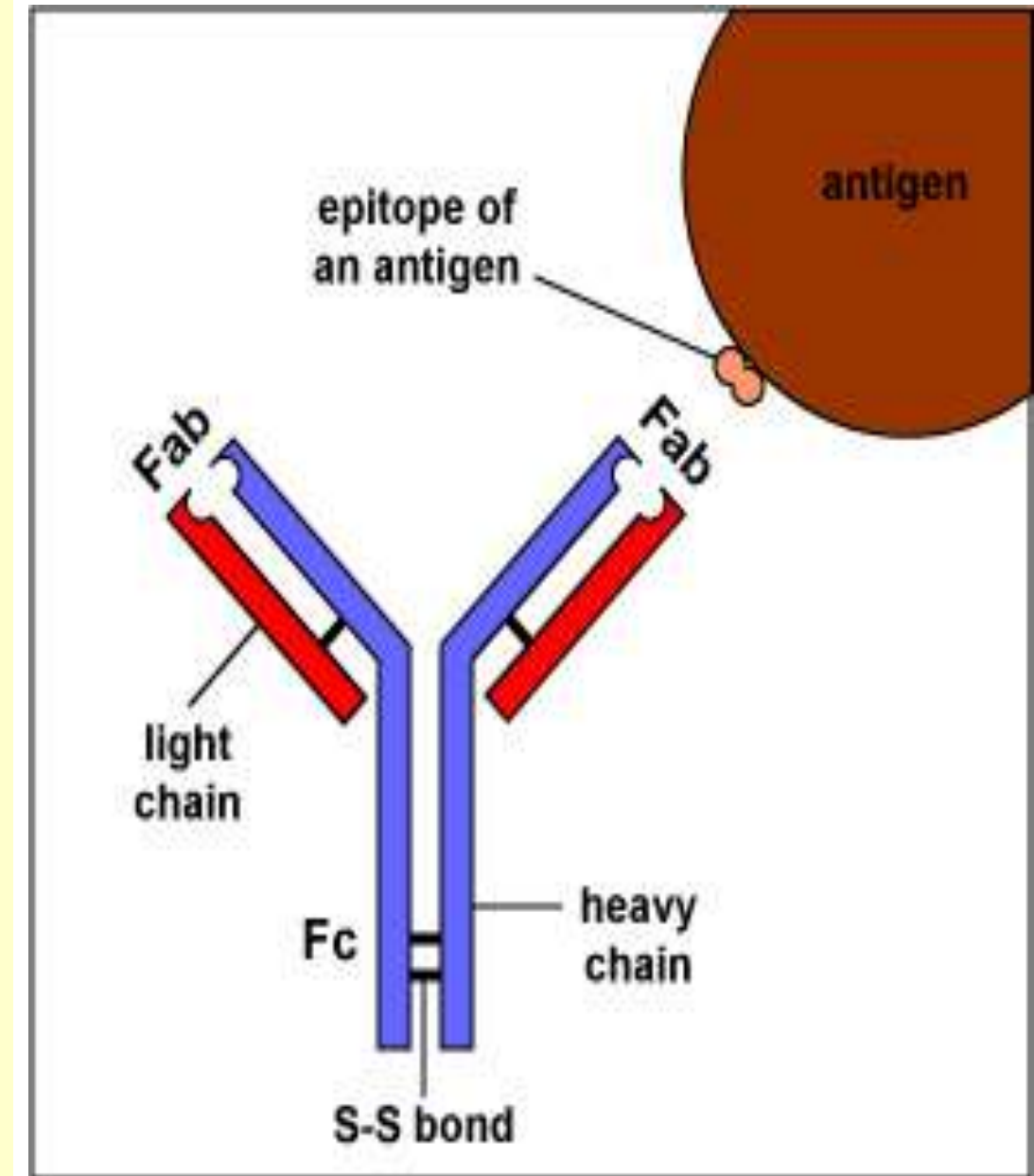
STRUCTURA

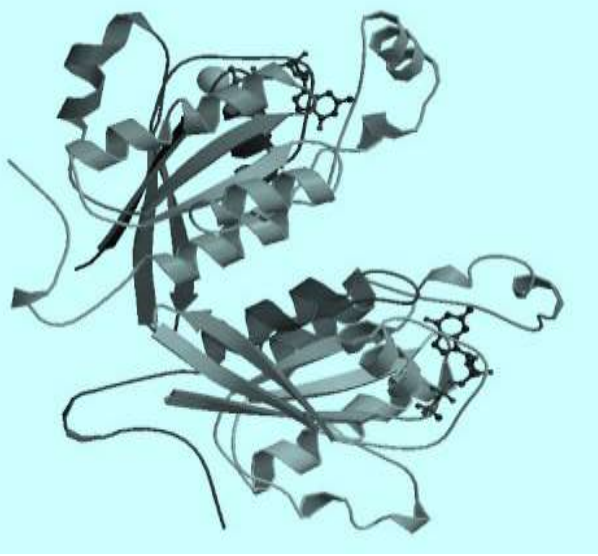
- 2 lanțuri grele (Heavy)
- 2 lanțuri ușoare (Light)
- Punți disulfidice
 - Între lanțuri
 - În cadrul lanțului



STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE MUNOGLOBULINELOR

- IG sunt constituite din trei fragmente diferite structural, ele având particularitățile functionale distincte:
 - **doua fragmente identice Fab** (*ab - antigen binding*)
 - sunt constituite din extremitatea NH_2 terminala a lanturilor grele (H) si câte un lant usor (L), :
 - functia fragmentelor Fab este aceea de a recunoaste si a **angaja legaturi cu Ag**, aceasta fiind realizata prin intermediul situsului combinativ antigenic situat la extremitatea N-terminala a ambelor lanturi (H si L);
 - **un fragment Fc** (*c = cristalizabil*)
 - este constituit în exclusivitate din jumatatea COOH terminala a lanturilor grele;
 - acest fragment este purtatorul specificitatilor antigenice caracteristice fiecărei clase si subclase imunoglobulinice,
 - purtatorul situsului de **activare a complementului**





Proteomic definition

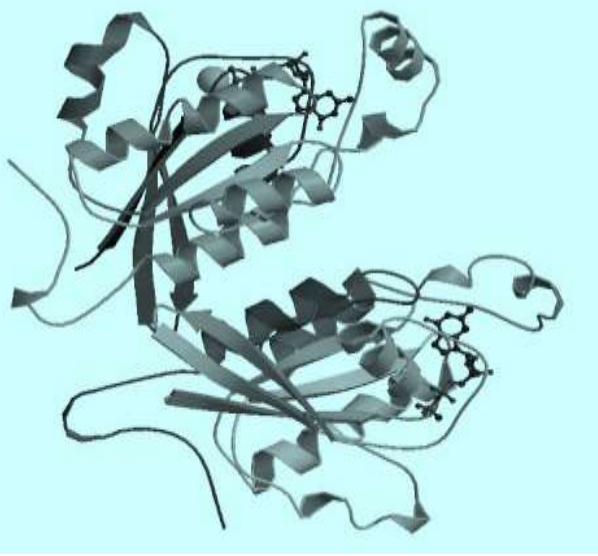
“Proteomic is a science that focuses on the study of proteins: their roles, their structures, their localization, their interactions, and other factors.”

www.lexicon-biology.com

Genomics $\Rightarrow$ Transcriptomics $\Rightarrow$ Proteomics

- Proteins define the function of cells, tissues, and the whole organism
- Every cell contains an equivalent set of genes, but not every cell expresses the same genes
- Each gene can give rise to multiple proteins, either through combinatorial/alternative splicing, processing, or posttranslational modification (PTM)
- There is no direct correlation between mRNA abundance and steady state protein levels

> 30,000 human genes but approx. 1,2 million proteins



Kinds of Proteomics

- **1. Expressional Proteomics**

The analysis of global or organism wide changes in protein expression

- **2. Structural Proteomics**

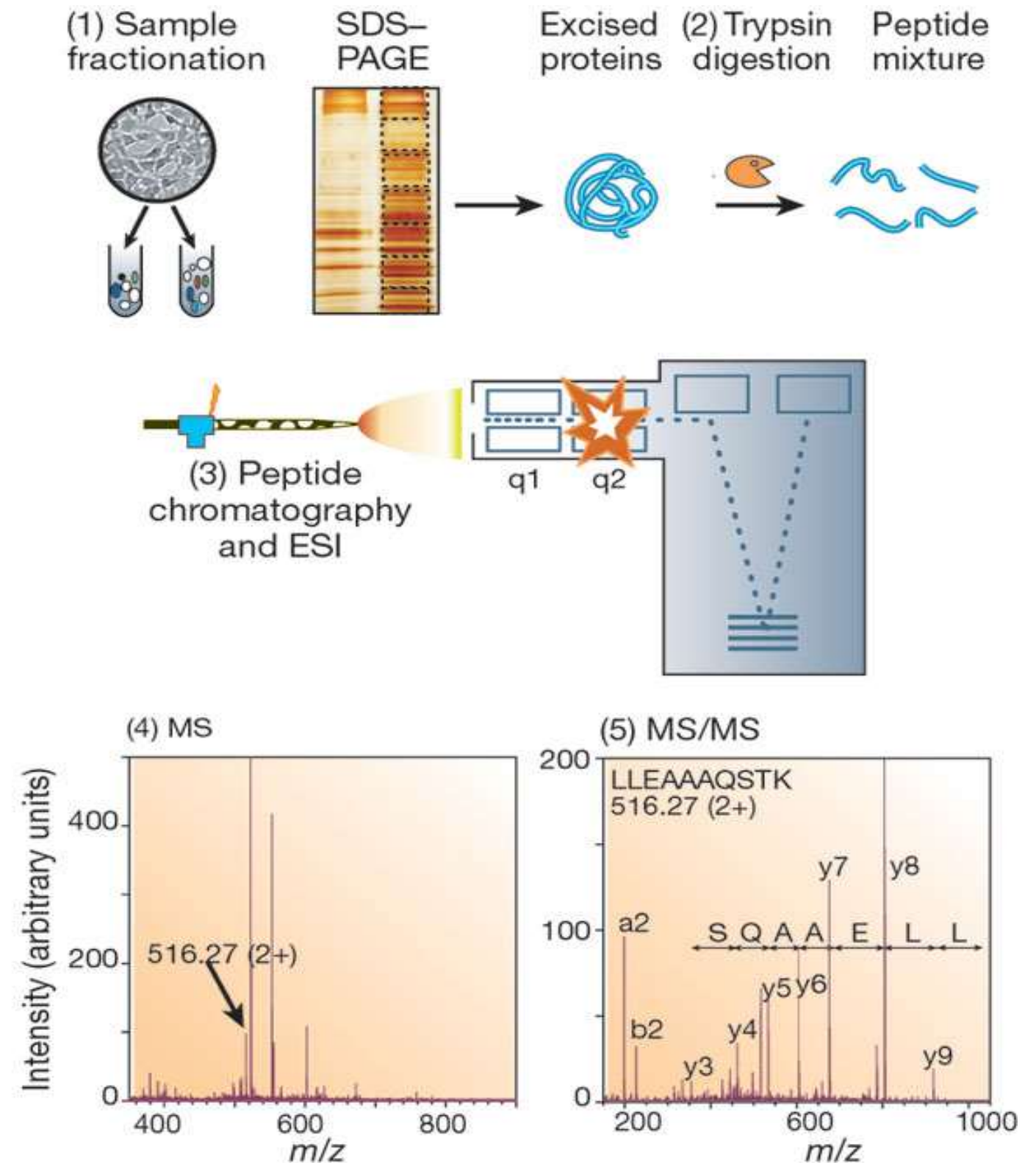
The high throughput, or high volume expression and structure determination of proteins by Xray, NMR or computer based methods

- **3. Functional Proteomics**

The identification of protein functions, activities or interactions at a global or organism wide scale

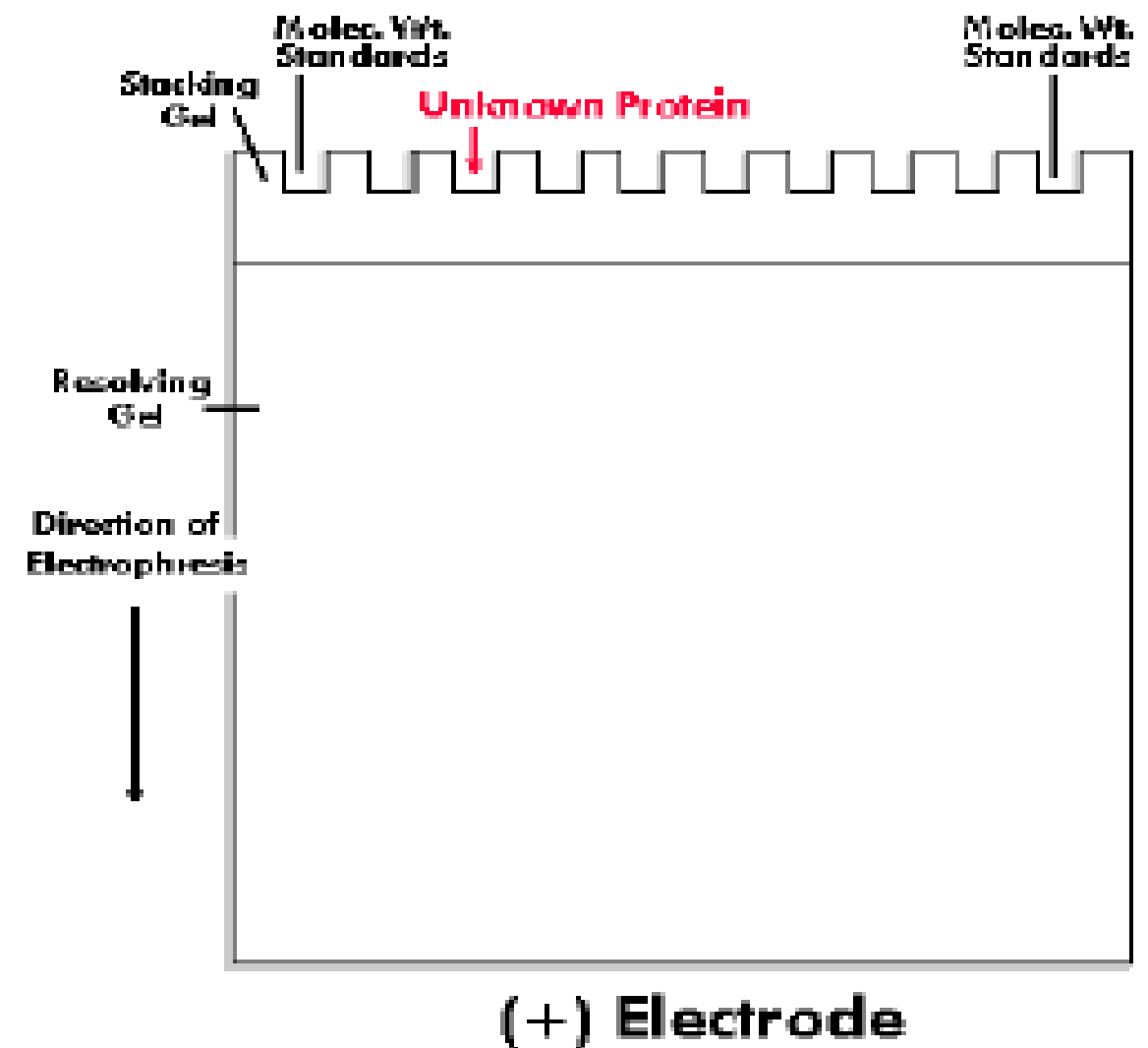
Technology

- 1-D and 2-D gel electrophoresis
 - Separations based on either charge or size
- Mass Spectrometry
 - Accurate size (mass) determinations
- Using genomic information & informatics



1D Gel Electrophoresis SDS-PAGE 1

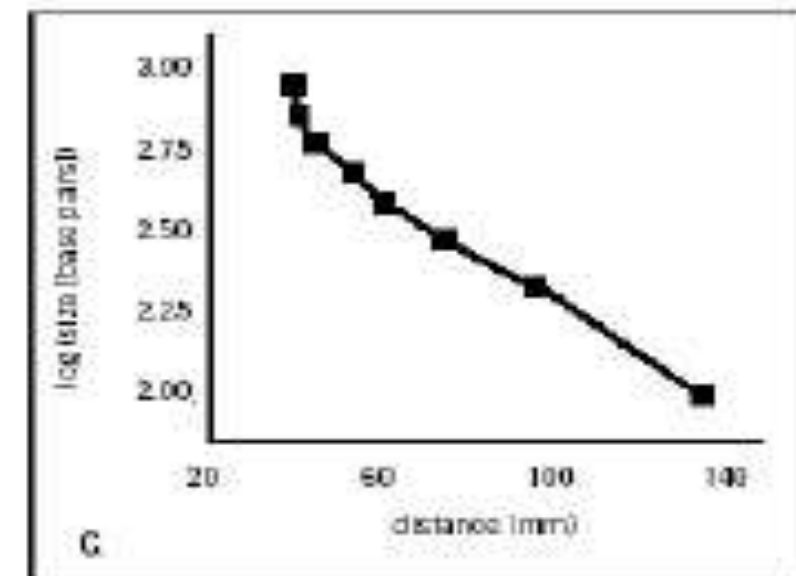
- ♦ Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
- ♦ Proteins are denatured in SDS. Negatively charged SDS coats the polypeptide evenly *circa* 1 SDS per 1.5-2.0 peptide bonds
- ♦ The charge density of the denatured protein is then independent of polypeptide length.
- ♦ Protein samples are loaded in individual wells at top of polyacrylamide gel



1D Gel Electrophoresis SDS-PAGE 2

♦ Theory

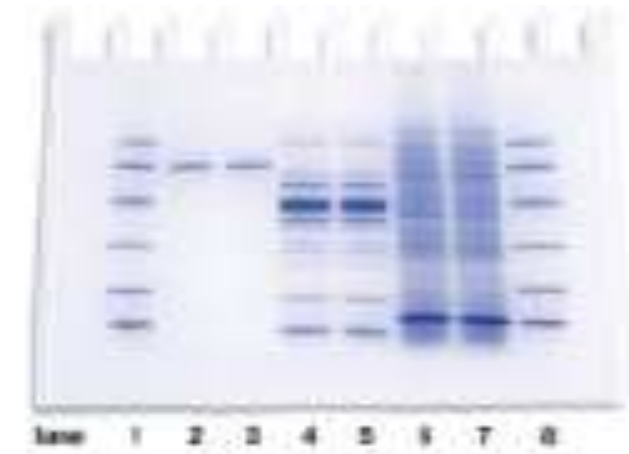
- ♦ Application of an electric field across the gel drives negatively charged SDS-coated polypeptides to the anode.
- ♦ Since the charge density is constant, the rate of migration depends on the resistive frictional force, thus short polypeptides migrate faster than long polypeptides.
- ♦ The distance traveled in a fixed time period is a log function of the molecular weight.



1D Gel Electrophoresis SDS-PAGE 3

♦ Fixing & staining

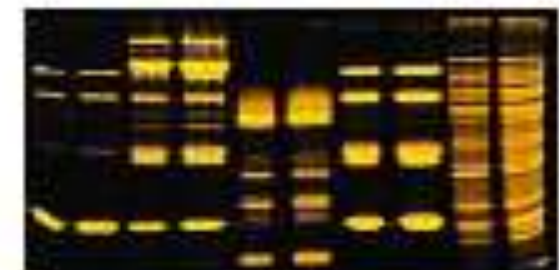
- ♦ Gels are “fixed” prior to staining to ensure that proteins remain denatured throughout the process.
- ♦ The composition of fixing solutions are dependent on the stain used and the thickness of the gel. Gels are usually soaked in the fixative for 1 hr.
- ♦ Proteins are usually stained with either Coomassie Blue, silver, or SYPRO (fluorescent) stains. Each has its own advantages and disadvantages.



Coomassie



Silver



SYPRO orange

Proteomics

- Began over 25 years ago with the development of 2D electrophoresis
- Spots on 2D gels were initially analyzed by identification methods (Edman degradation) involving larger amounts of protein
- Mass spectrometry would be better, but the problem was how to get peptides into the gas phase?
- Recent developments in ionization technology has made it possible to analyze femtomole (10^{-15} mole) quantities of peptide by MS

Mass spectrometers generally couple 3 devices:

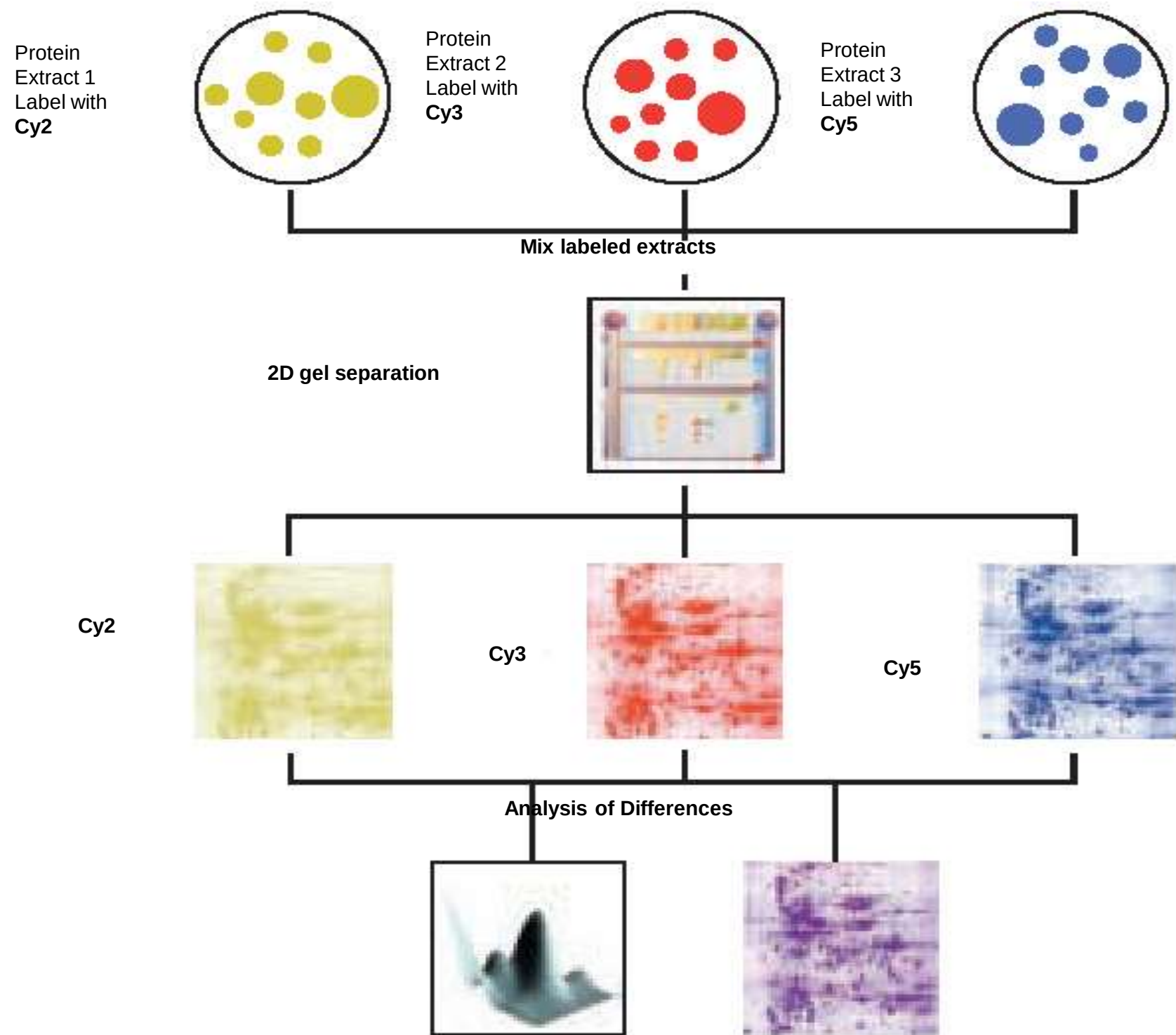
- Ionization device
- Mass analyzer
- Detector

2D Gel Electrophoresis

♦ Theory

- ♦ A protein mixture is absorbed into the gel.
- ♦ An electric field is then applied across the gel.
- ♦ Proteins in regions below or above their pI migrate to the cathode or anode respectively.
- ♦ Migration rate slows as the proteins approach the region where $pH = pI$.
- ♦ Protein migration ceases when $pH = pI$.
- ♦ Note: proteins remain in the native state throughout the process





Label-free quantification

