



***Ricostituzione e attività  
pseudoenzimatica della  
mioglobina modificata***

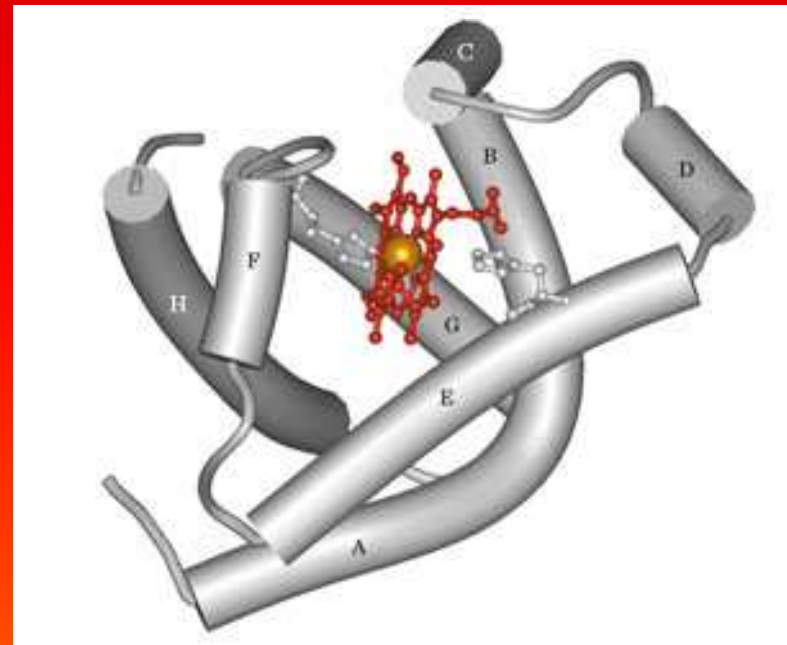
***Giulia Bertelegni e Carolina Ferrari***

***I.I.S. A.Maserati***

***Facoltà di Scienze MM.FF.NN.  
Dipartimento di Chimica generale  
Università degli studi di Pavia***

# *Cos'è la mioglobina??*

La mioglobina è un' eme proteina che coordina reversibilmente l'ossigeno molecolare e può essere trovata nei muscoli striati dei vertebrati in cui agisce come riserva di ossigeno e ne facilita la diffusione dai capillari all'ambiente intracellulare.



# *Scopo del lavoro*

**Estrazione dell' apomioglobina**  
**Preparazione dell' eme sintetico**  
**Costituzione della nuova proteina**  
**Controllo della ricostituzione della  
proteina**  
**Studio delle cinetiche**

# *Estrazione dell'apomioglobina*

Dopo aver sciolto in acqua distillata la mioglobina liofilizzata estratta dal cuore di cavallo, si acidifica la soluzione con HCl per rompere il legame tra il ferro del gruppo eme e l'azoto imidazolico dell'istidina prossimale. In seguito si effettuano varie estrazioni con butanone ( $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) per ottenere l'apomioglobina. Si preleva la fase contenente l'apoproteina e la si pone in dialisi.

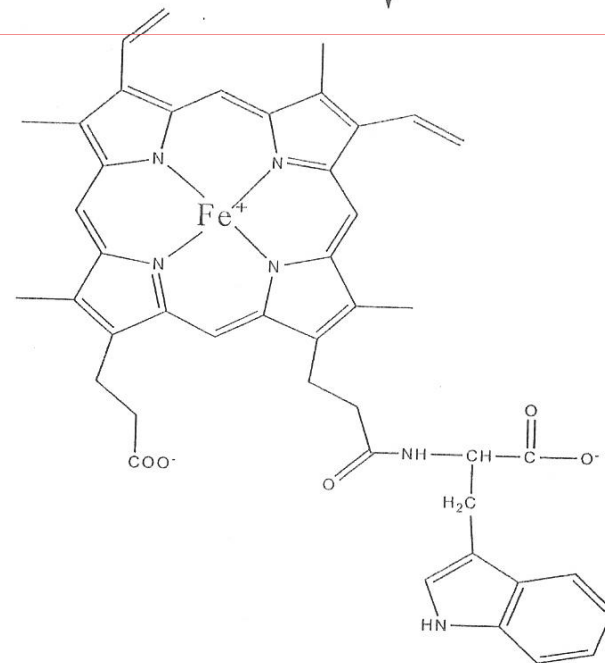
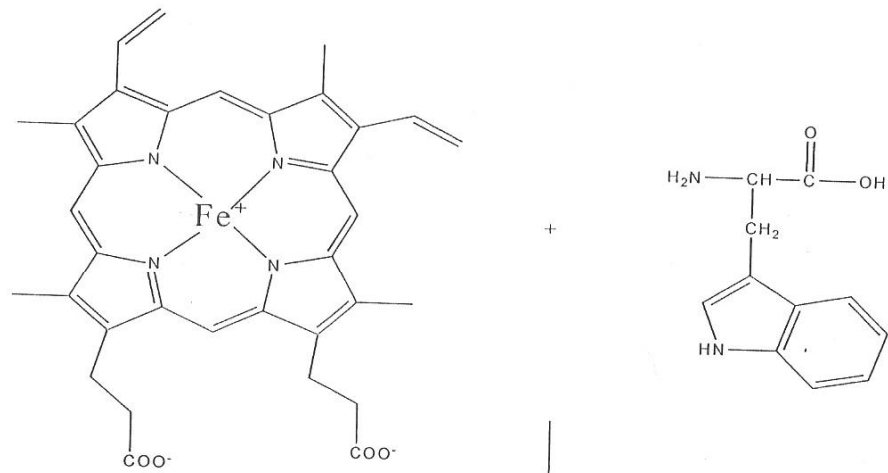
# *Preparazione dell'eme sintetico*

Si solubilizza l'emina-triptofano costituita da un gruppo eme legato al triptofano in cui è presente  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (forma ossidata), il quale ha il compito di formare il legame con l'apomioglobina.



**Si calcola la concentrazione dell'emina-  
triptofano e dell'apomioglobina tramite una  
determinazione spettrofotometrica .**





*Sintesi del  
gruppo eme  
modificato  
dall'aggiunta  
del triptofano*

# *Ricostituzione della mioglobina*

Si aggiunge una quantità stechiometrica di emina all'apoproteina in modo che le due soluzioni reagiscano in rapporto 1:1.



In seguito la nuova soluzione viene posta in un rotavapor e successivamente dializzata dopo aver aggiunto DMF, una sostanza molto polare, poiché l'amina- triptofano precipitava in soluzione acquosa e non permetteva una corretta ricostituzione.



# *La proteina si è ricostituita??*

Per controllare se nella soluzione vi è la presenza di proteina libera si effettua una determinazione spettrofotometrica. Se a 282 nm non vi sono picchi si può dedurre che la proteina si sia ricostituita del tutto in quanto l'apomioglobina presenta una banda proprio a questa lunghezza d'onda. Nel grafico si è anche notato il picco della DMF.

# *Saggio dell'emocromogeno*

Per poter calcolare la  $\epsilon$  della mioglobina ricostituita è stata preparata una nuova soluzione di mioglobina in quanto quella da noi ottenuta era poco concentrata. Alla nuova proteina si aggiunge piridina, NaOH e sodio ditionito, un composto riducente.

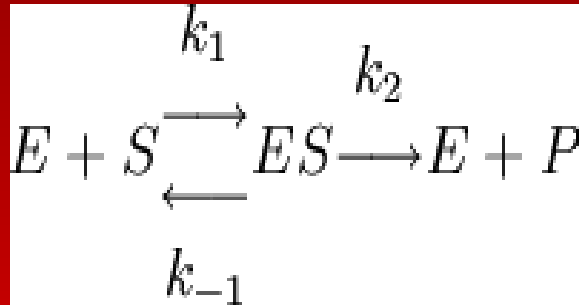


Si è quindi formato l'addotto eme bis-piridina di cui noi conosciamo la  $\epsilon$  a 556 nm. Grazie a questo dato e alla legge di Lambert – Beer si può calcolare il valore approssimativo della mioglobina ricostituita ( $\epsilon=123000$ ) e la sua concentrazione .

# *Studi cinetici*

## *La cinetica di Michaelis - Menten*

*La cinetica di Michaelis - Menten mostra la velocità di una reazione catalizzata da un enzima (che rimane immutato) al variare della concentrazione del substrato. Al raggiungimento della massima velocità della reazione corrisponde la saturazione dell'enzima da parte del substrato.*



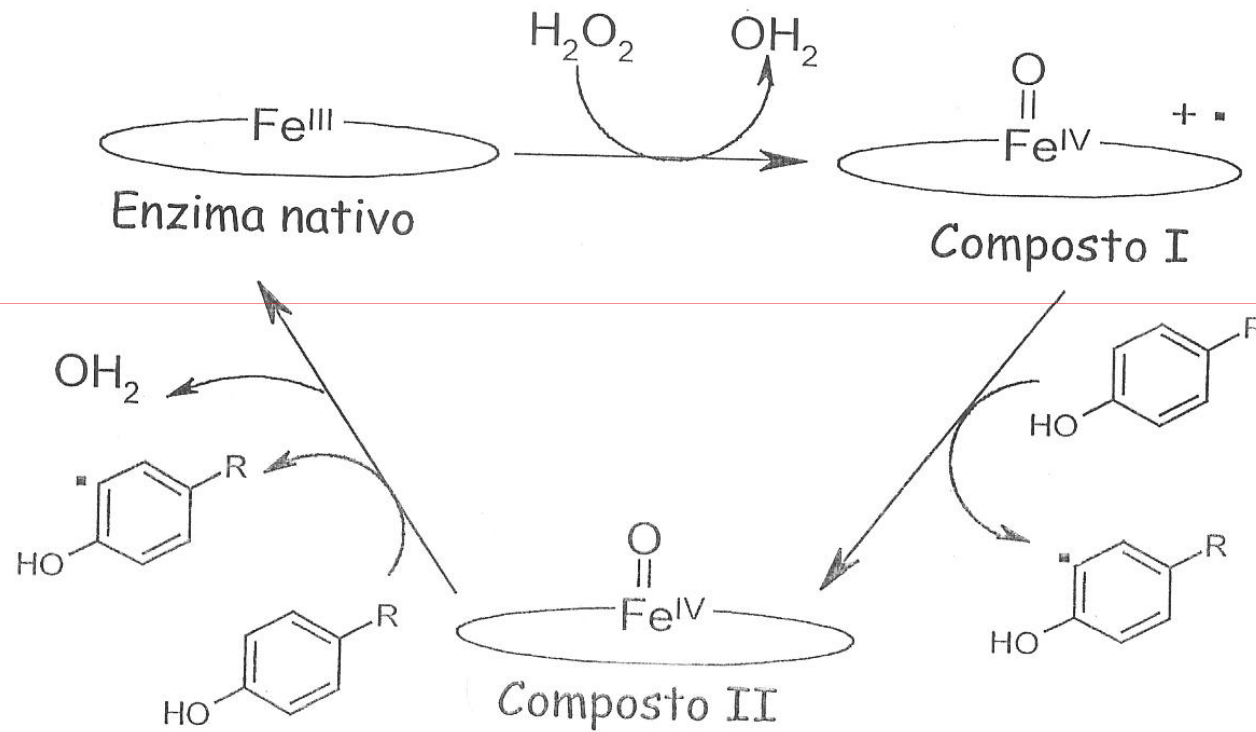
*Schema della reazione tra l'enzima e il substrato*

*L'equazione di Michaelis- Menten*

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

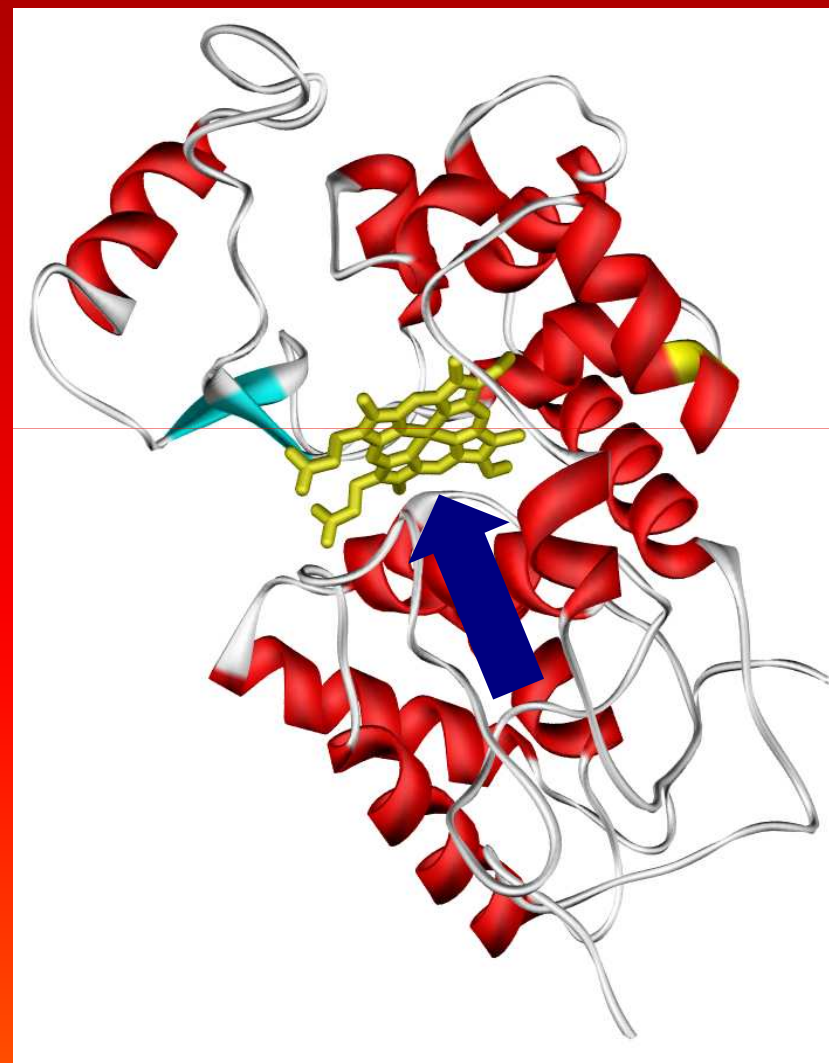
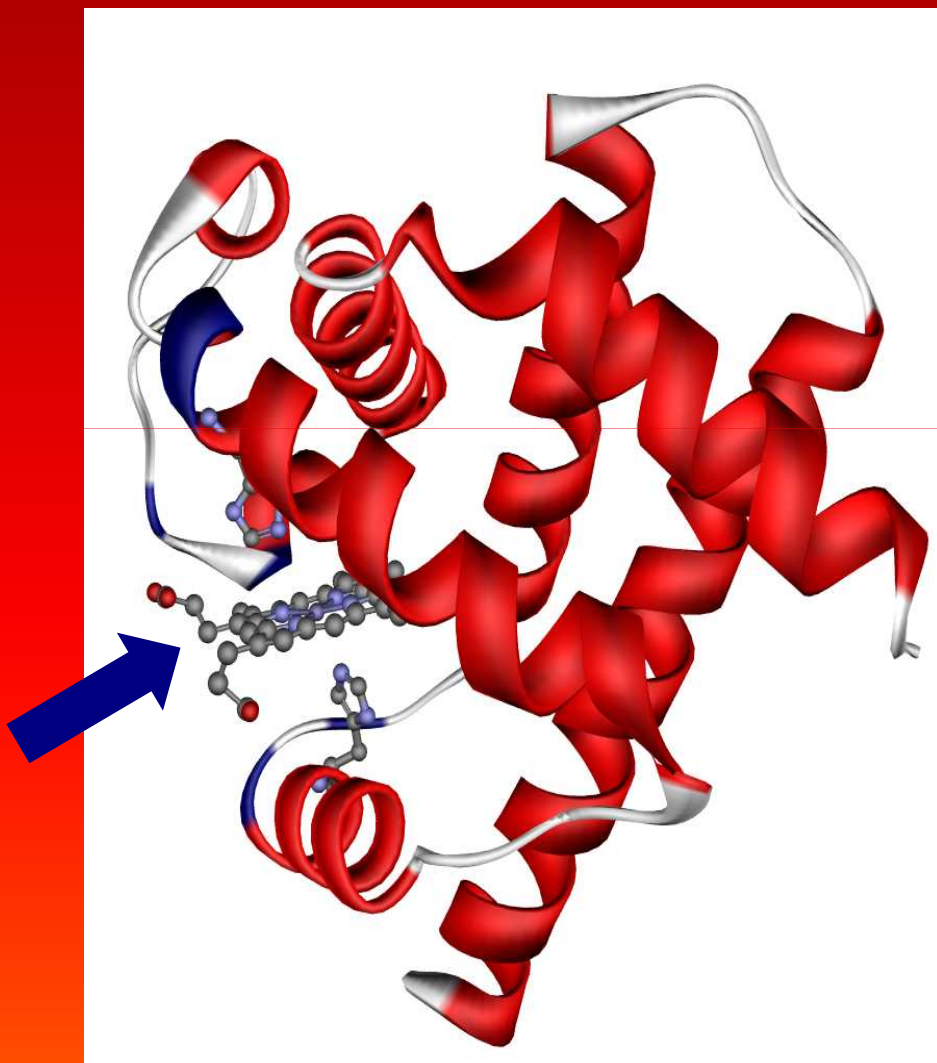
*L'equazione mette in relazione la velocità di formazione del prodotto e concentrazione del substrato.*

Nella nostra esperienza abbiamo effettuato studi di attività perossidasi.

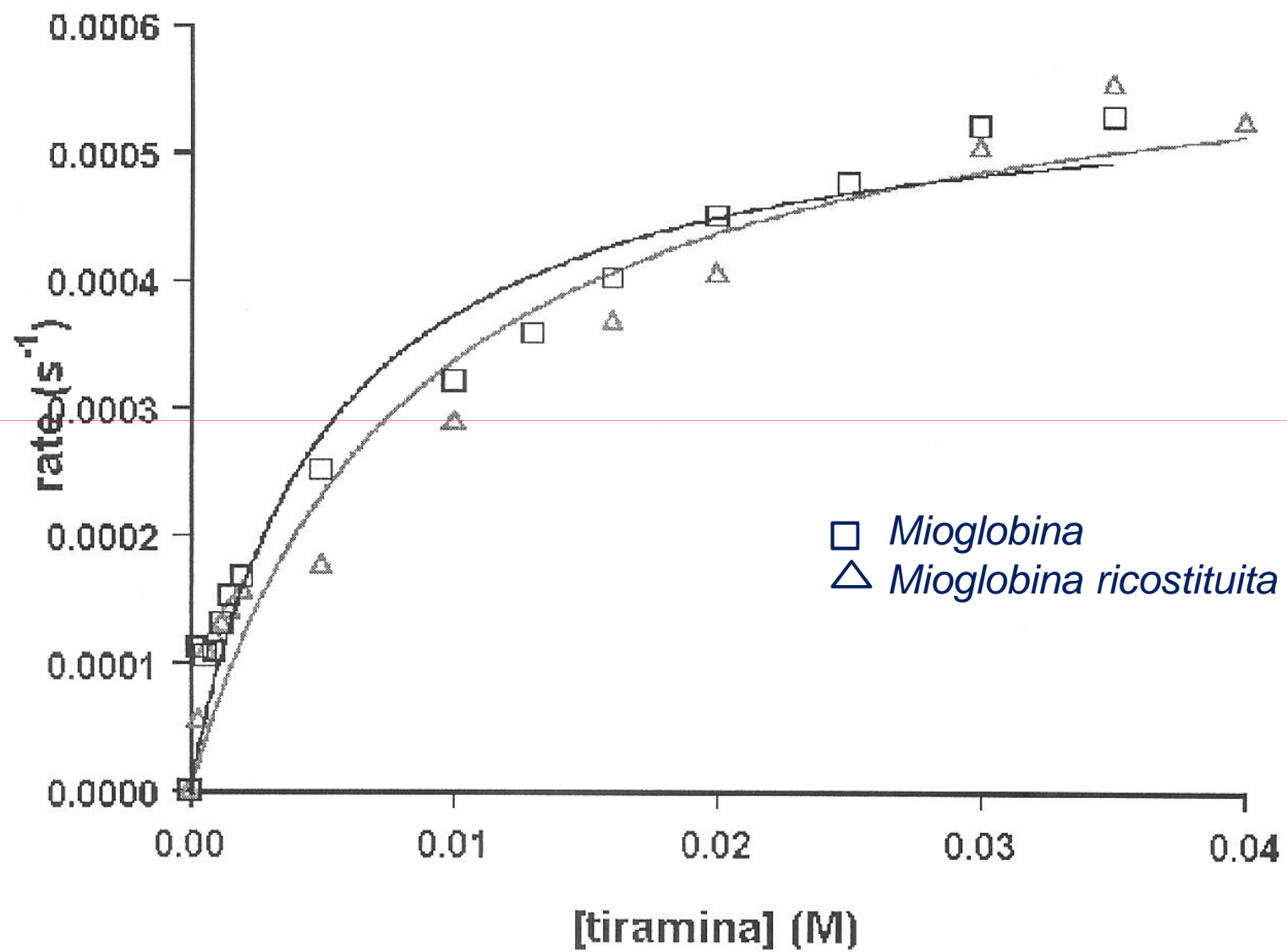


*Ciclo catalitico della perossidasi*

# *Mioglobina e perossidasi*



Per effettuare le cinetiche sulla mioglobina e su quella ricostituita si effettua l'ottimizzazione del perossido di idrogeno per trovare la quantità adatta. Quest'ultimo ha il compito di avviare la reazione. Quindi si effettuano più misurazioni variando la concentrazione della tiramina (il substrato). I dati ottenuti vengono inseriti in un programma che utilizzando la formula  $V_m \cdot x / (K_m + x)$  ne mostra il grafico.



## *Conclusioni*

Dal grafico si capisce che la mioglobina non ricostituita è più attiva, tuttavia le curve sono molto simili. Questo comportamento è spiegabile tramite tre ipotesi: la proteina è la stessa e di conseguenza non ci sono molte modificazioni, la proteina non si è ricostituita del tutto oppure l'eme nuovo è troppo grande e quindi non entra perfettamente nella tasca della apomioglobina.

# *Quali strumenti abbiamo utilizzato??*



**Spettrofotometro:**  
strumento che, grazie a un fascio luminoso fatto passare attraverso una soluzione da analizzare, indica le lunghezze d'onda assorbite da essa.

La legge che ci permette di risalire alla concentrazione della proteina avendo l'assorbanza ricavata dallo spettrofotometro è la seguente:

Assorbanza

Lunghezza di cammino  
ottico

$$A = \epsilon bc$$

Coefficiente di  
estinzione molare

Concentrazione

*Legge di Lambert-Beer*



## *pH-metro:*

*Strumento per rilevare la concentrazione di ioni  $H^+$  in una sostanza utilizzando come riferimento standard a pH noto.*

## *Rotavapor:*

*Strumento che creando un vuoto all'interno del pallone permette l'eliminazione dei solventi per evaporazione.*



The background of the slide features a circular seal of the University of Pavia. The seal is rendered in a golden-yellow color against a dark red background. It depicts a balance scale with a book resting on its base. The Latin text 'UNIVERSITAS PAVENSIS' is written across the scale's arms, and 'GENERALE STUDIUM' is at the bottom. The year 'MCCXXI' is visible on the left side, and 'CAPIT' is at the top.

*Si ringrazia il dipartimento di chimica generale della facoltà di MM.FF.NN dell'Università degli Studi di Pavia e in particolare il Dott. Enrico Monzani, il Dott. Emanuele Ferrari e il Dott. Davide Ciregna per averci seguito nel corso di questa interessante esperienza.*

