

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

ALESSANDRO ROSSI-FANELLI, DINO GUERRITORE,  
MARIA LUISA BONACCI, MAURIZIO BRUNORI

## **Ricerche sulla struttura della clorocruorina di Spirographis spallanzanii. Osservazioni al microscopio elettronico**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 36 (1964), n.5, p. 596–599.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1964\\_8\\_36\\_5\\_596\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_36_5_596_0)>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

**Biochimica.** — *Ricerche sulla struttura della clorocruorina di Spirographis spallanzanii. Osservazioni al microscopio elettronico* (\*). Nota di ALESSANDRO ROSSI-FANELLI, DINO GUERRITORE, MARIA LUISA BONACCI e MAURIZIO BRUNORI, presentata (\*\*) dal Socio A. ROSSI-FANELLI.

Recentemente nel nostro Istituto sono stati condotti dettagliati studi su alcune proprietà fisico-chimiche della clorocruorina di *Spirographis spallanzanii* in soluzione [1, 2].

Immagini della clorocruorina di *Spirographis spallanzanii* al microscopio elettronico sono state riportate da Roche e coll. [3, 4, 5] nel corso di uno studio sistematico su cromoproteidi a peso molecolare elevato di varie specie di Anellidi. Da tali osservazioni comunque non è possibile concludere quale sia l'esatta struttura che corrisponde alla molecola proteica in soluzione.

Nella presente Nota sono riportati i risultati dell'osservazione al microscopio elettronico della clorocruorina a pH variabili da 7,2 a 11,5. Tali dati sono discussi e correlati con le caratteristiche fisico-chimiche della molecola studiate in soluzione in analoghe condizioni sperimentali [1, 2].

#### MATERIALI E TECNICHE.

La clorocruorina di *Spirographis spallanzanii* (1) è stata preparata dal sangue raccolto dai vasi della corona secondo la tecnica precedentemente descritta [1] e purificata fino ad ottenere un unico componente omogeneo e simmetrico all'ultracentrifuga.

Per le osservazioni al microscopio elettronico, la soluzione di clorocruorina - contenente 5,75 g/l di proteina in acetato d'ammonio all'1 % a pH 7,2 è stata diluita 1/10 con acetato d'ammonio all'1 % portato a pH 7,2 con KOH 1 N ed a pH 8, 9, 10 ed 11,5 con ammoniaca concentrata. Allo scopo di avere condizioni sperimentali esattamente sovrapponibili a quelle realizzate nella determinazione delle costanti di sedimentazione, le soluzioni sono state tenute a 4°C per 2 ore.

La colorazione negativa è stata eseguita secondo la tecnica di Brenner e Horne [6]. La soluzione contenete 575 µg/ml di clorocruorina è stata mesco-

(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Chimica Biologica della Università di Roma e nell'Istituto « Regina Elena » per lo Studio e la Cura dei Tumori, Roma.

(\*\*) Nella seduta del 9 maggio 1964.

(1) Il materiale è stato gentilmente fornito dalla Stazione Zoologica di Napoli.

lata in parti uguali con fosfotungstato di potassio al 2 % ed immediatamente nebulizzata con Vaponefrin su retino ricoperto da film di carbone.

I preparati sono stati osservati al microscopio elettronico RCA EMU 3 D ad un ingrandimento elettronico tra 33000 e 65000 $\times$ .

#### RISULTATI.

*Clorocruorina a pH neutro.* — La fig. 1 mostra un campo nel quale appaiono immagini esagonali ed immagini rettangolari. La forma esagonale, che ha un diametro medio di circa 270 Å, risulta formata di 6 elementi approssimativamente circolari del diametro di circa 90 Å, disposti agli angoli dell'esagono. Al centro dell'esagono si osserva una zona opaca agli elettroni. La forma rettangolare, costituita da elementi aventi uno spessore di circa 70 Å, ha dimensioni di circa 270  $\times$  180 Å. Queste immagini rettangolari, che sono talvolta disposte le une sulle altre a formare delle pile, appaiono sempre formate da due strutture sovrapposte (circa 270  $\times$  70 Å) che prendono contatto lungo i lati maggiori dando l'idea di un'associazione strutturale a paia (Tavv. I e II).

*Clorocruorina a pH alcalino.* — Con l'aumentare del pH l'aspetto delle strutture non varia dai quadri descritti per la clorocruorina a pH neutro, potendosi osservare essenzialmente forme esagonali e rettangolari. Tuttavia un aspetto diverso è presentato dal fondo sul quale è possibile individuare strutture rotondeggianti le cui dimensioni sembrano avvicinarsi ai 90 Å (Tav. III). Inoltre il numero di strutture esagonali o rettangolari per campo tende a ridursi con l'aumentare del pH; a pH più elevati (11,5) è possibile osservare qualcuna delle strutture integre prima descritte, mentre relativamente più rilevante sembra essere il numero delle immagini a dimensione di circa 90 Å (Tav. IV, fig. 1).

#### DISCUSSIONE.

Il peso molecolare della clorocruorina di *Spirographis spallanzanii* calcolato con il metodo della sedimentazione-diffusione e con quello della diffusione della luce è di  $2,8 \times 10^6$ ; la proteina risulterebbe una molecola relativamente compatta con dimensioni massime fra i 250 ed i 350 Å [2]. Di particolare rilievo è il fatto che a pH neutro ed a forze ioniche fra c,1 e 4,0 la clorocruorina non va incontro a fenomeni di associazione e dissociazione. A pH fra 10 ed 11 o in soluzioni concentrate di urea si determina una dissociazione irreversibile della molecola in subunità a costante di sedimentazione di circa 9,5 S, indicante un peso molecolare di  $2,3-2,5 \times 10^5$ , pari a circa 1/12 del peso iniziale.

L'analisi delle immagini al microscopio elettronico sopra riferite suggerisce che la molecola di clorocruorina a peso molecolare  $2,8 \times 10^6$  è formata

da due dischi sovrapposti, ciascuno costituito da 6 unità poste ai vertici di un esagono, per un insieme di 12 subunità le cui dimensioni sono di circa  $90 \times 90 \times 70 \text{ \AA}$ . La forma esagonale rappresenta la molecola vista ortogonalmente ai suoi assi maggiori ( $270 \text{ \AA}$ ), quella rettangolare l'immagine di profilo. Tali conclusioni si basano sui seguenti argomenti:

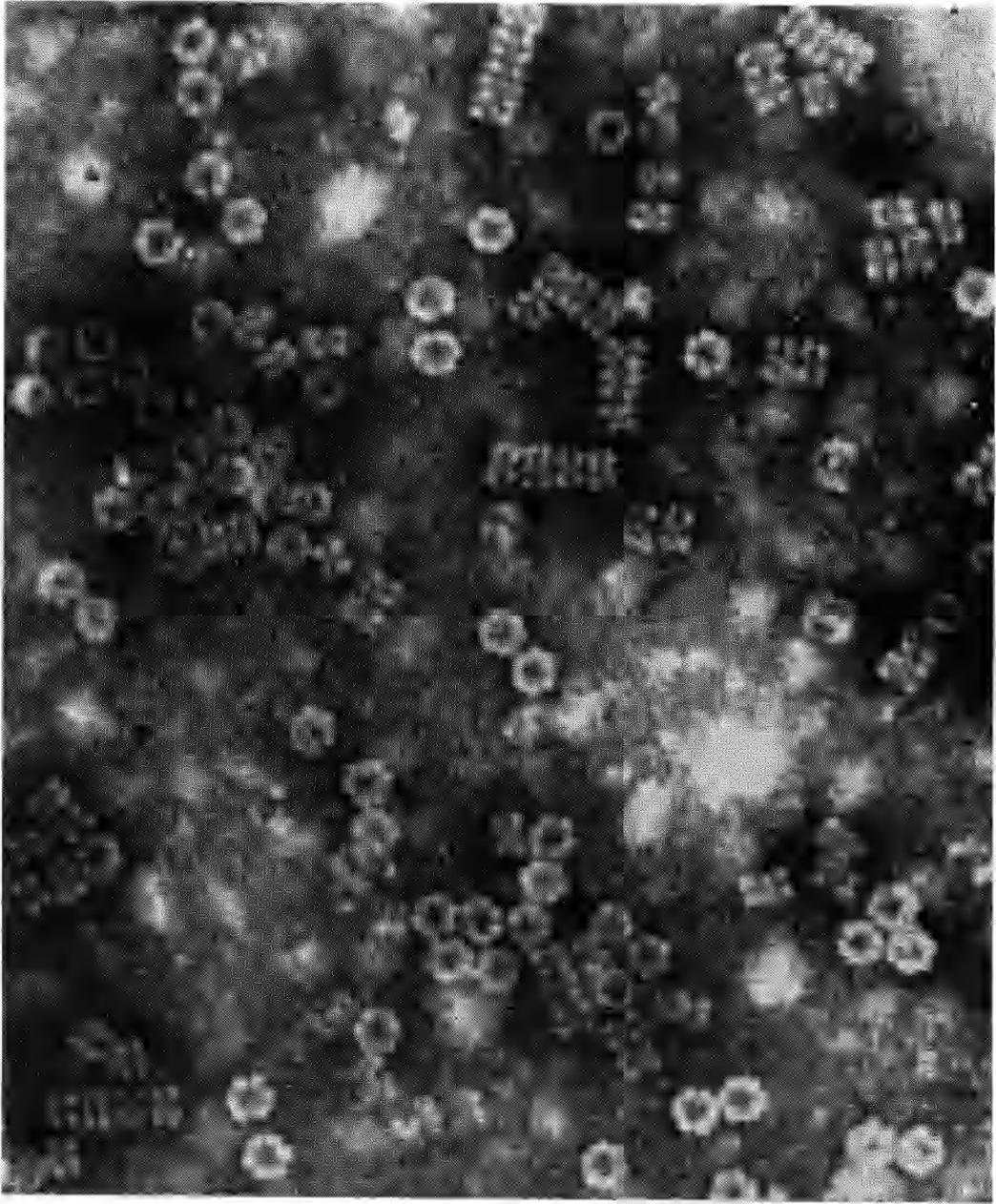
a) le forme rettangolari, che costituiscono l'immagine di profilo di due dischi disposti uno sull'altro, o di serie di tali strutture, sono particolarmente frequenti in ogni campo, mentre non è mai possibile rilevare l'immagine laterale di un disco isolato;

b) ogni qualvolta le forme rettangolari si dispongono a formare delle serie, è sempre evidente che l'associazione strutturale fondamentale è la forma rettangolare di  $270 \times 180 \text{ \AA}$  e non si sono mai riscontrate immagini costituite da un numero dispari di dischi da  $270 \times 70 \text{ \AA}$ ;

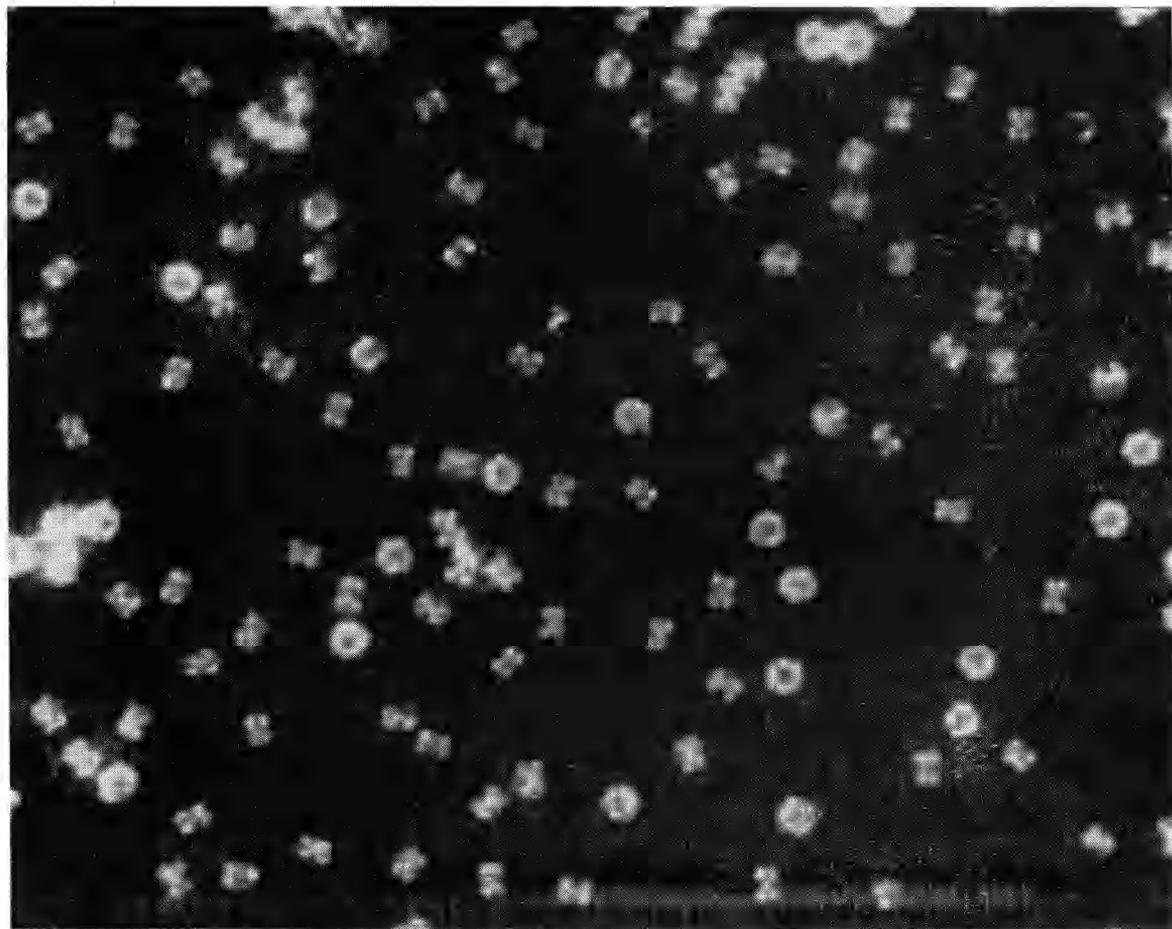
c) a pH superiore a 10, nelle stesse condizioni sperimentali adottate per lo studio della costante di sedimentazione, oltre alle strutture integre sopra descritte, si osservano al microscopio elettronico immagini rotondegianti aventi circa  $90 \text{ \AA}$  di diametro, corrispondenti alle subunità della molecola intera che, come risulta dalle misure della clorocruorina in soluzione, hanno un peso molecolare (Mw) pari a circa  $1/12$  della proteina indissociata. Il mancato reperto di forme intermedie tra la molecola integra e le subunità presenti sul fondo del campo è anch'esso in accordo con le osservazioni sulla clorocruorina in soluzione, secondo le quali la dissociazione si realizza mediante il passaggio diretto da un peso molecolare di circa  $2,8 \times 10^6$  ad uno di  $2,3-2,5 \times 10^5$ .

La determinazione del peso molecolare della clorocruorina dalle dimensioni della molecola ottenute al microscopio elettronico, pur con le limitazioni che tale metodo impone [7], può essere effettuata calcolando il peso molecolare per ciascuna delle subunità dell'esagono e moltiplicando tale valore per 12 (numero di tali subunità nelle strutture integre). Assumendo il valore di 1,3 per la densità della molecola e considerando ogni subunità come un cilindro avente un'altezza di circa  $70 \text{ \AA}$  ed un diametro del cerchio di base di circa  $90 \text{ \AA}$ , si ottiene un peso molecolare di 350.000. Questo valore costituisce un limite massimo non aderente alla realtà, dato che è stato calcolato considerando la subunità come una massa compatta. Introducendo una correzione del 25 %, giustificata dal fatto che circa  $1/4$  della superficie di ogni subunità è opaca agli elettroni (Tav. IV, fig. 2), si ottiene un peso molecolare di circa 260.000, in soddisfacente accordo con l'ipotesi che la molecola di  $2,8 \times 10^6$  sia formata da 12 subunità.

Le nostre conclusioni trovano un ulteriore conforto nel modello strutturale proposto da Levin per eritrocruorine a peso molecolare intorno a  $3 \times 10^6$  e perciò pressoché analogo a quello della clorocruorina. L'autore ritiene infatti che le molecole da lui studiate siano formate di 12 subunità, suddivise in due anelli sovrapposti di 6 unità ciascuno, ed abbiano dimensioni di  $260 \times 160 \text{ \AA}$  [8].



Clorocruorina a pH 7,2: 299.000 x.



Clorocruorina a pH 7,2. 165.000 $\times$ .



Clorocruorinã a pH 10 185.000 $\times$ .

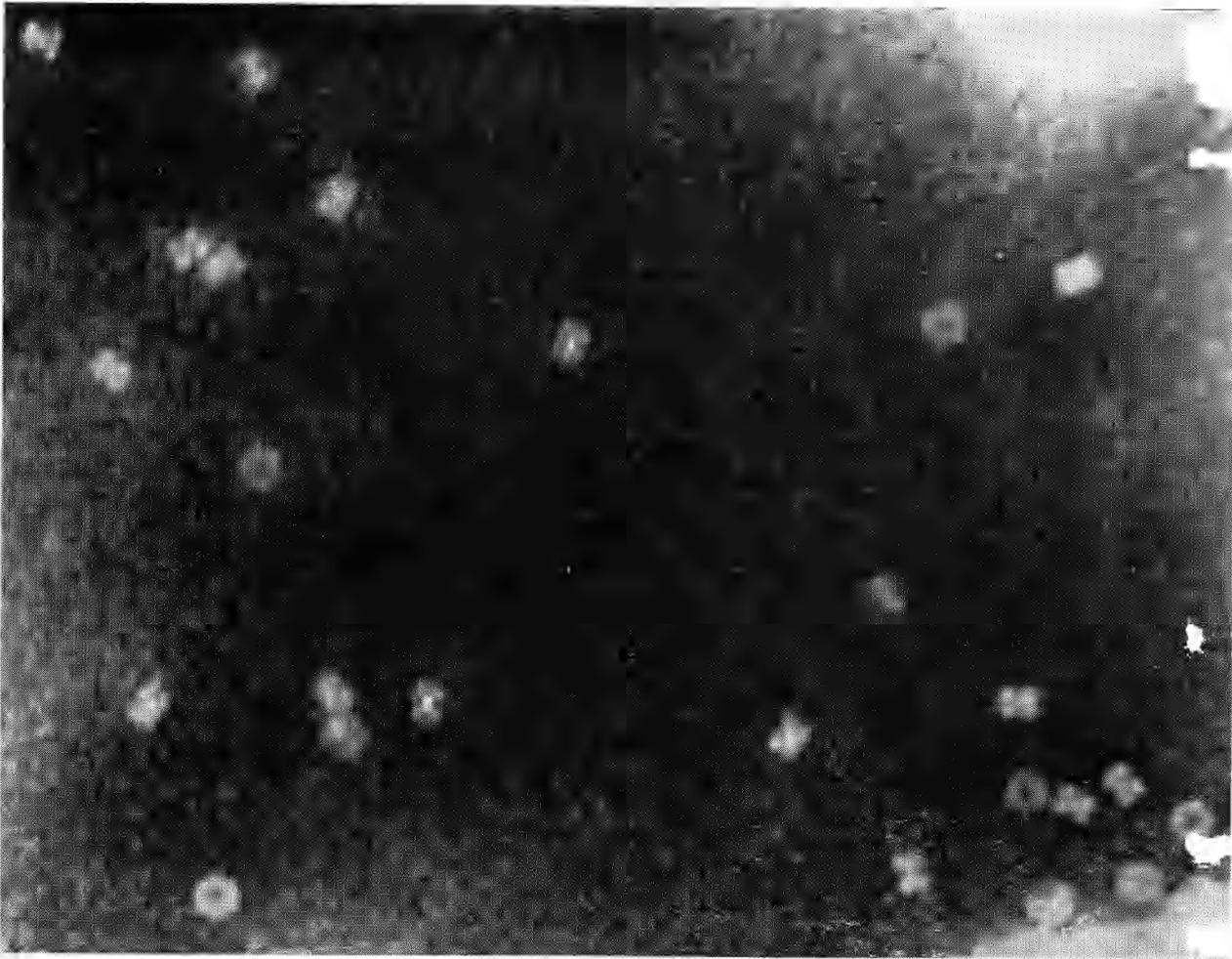


Fig. 1 - Clorocruorina a pH 11,5 215.000 $\times$ .



*a*



*b*

Fig. 2. - Immagine di una molecola isolata di clorocruorina a 450.000 $\times$  (5 *a*). In 5 *b* immagine di una molecola di clorocruorina ottenuta esponendo 6 volte il positivo con rotazioni successive di 60°; si desume che le subunità siano disposte simmetricamente su angoli di 60° l'una rispetto all'altra.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] E. ANTONINI, A. ROSSI-FANELLI e A. CAPUTO, « Arch. Biochem. Biophys. », 97, 336 (1962).
- [2] E. ANTONINI, A. ROSSI-FANELLI e A. CAPUTO, « Arch. Biochem. Biophys. », 97, 343 (1962).
- [3] J. ROCHE, M. BESSIS e J. P. THIERY, « Biochim. Biophys. Acta », 41, 182 (1960).
- [4] J. ROCHE, M. BESSIS, J. BRETON-GORIUS e H. STRALIN, « C.R. Acad. Sci., Paris », 252, 3886 (1961).
- [5] J. ROCHE, Atti di un Simposio Internazionale sull'Emoglobina. Perugia 1962.
- [6] S. BRENNER e R. W. HORNE, « Biochim. Biophys. Acta », 34, 103 (1959).
- [7] C. E. HALL e P. DOTY, « J. Am. Chem. Soc. », 80, 1269 (1957).
- [8] Ö. LEVIN, « J. Mol. Biol. », 6, 95 (1963).