

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

GIUSEPPE GERACI, LAWRENCE J. PARKHURST

**Fattori influenzanti la reattività dei sulfidril beta-93  
dell'emoglobina umana**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 50 (1971), n.1, p. 40–44.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1971\\_8\\_50\\_1\\_40\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_1_40_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.** — *Fattori influenzanti la reattività dei sulfidril beta-93 dell'emoglobina umana* (\*). Nota di GIUSEPPE GERACI e LAWRENCE J. PARKHURST (\*\*), presentata (\*\*\*) dal Socio A. ROSSI-FANELLI.

SUMMARY. — The reactivity of the sulfhydryl group beta-93 has been used as a probe of the conformation of beta chains in native human hemoglobin, globin and intermediate compound II, which consists of a hemoglobin with heme on alpha chains only. The study has been extended to the reactivity of the SH groups of isolated beta chains. Stopped-Flow analysis of the reaction of the SH groups of the individual molecules with parahydroxymercuribenzoate has been performed and the values of the second order rate constants, the pH dependence and the activation energy of the reactions have been used as criteria to distinguish the different reactivities. The results indicate that the major contributions to the conformation of beta chains in native human hemoglobin derive from alpha chain-beta chain interaction and from the insertion of heme into beta chain heme-pockets. The insertion of heme in the alpha chain heme-pockets appears to have only minor effects on beta chain conformation.

Le proprietà delle subunità isolate dell'emoglobina umana cambiano profondamente quando le si fa interagire in quantità stechiometrica ricostituendo la molecola normale di emoglobina (Antonini e *coll.*, 1965; Antonini e *coll.*, 1966).

Le differenze riguardano sia le proprietà funzionali, e cioè le caratteristiche di combinazione degli emi con i vari ligandi, sia le proprietà chimico-fisiche della molecola. È ormai dimostrato che anche le proprietà di regolazione caratteristiche dell'emoglobina derivano dalla sua struttura quaternaria formata dalla interazione di subunità *diverse*.

Infatti le catene beta isolate, pur avendo struttura quaternaria in quanto tetrameriche, non mostrano né effetti cooperativi né effetto Bohr (Antonini e *coll.* 1965).

Studi di dicroismo circolare nella regione di Soret (410 nm) e nelle bande del visibile mostrano che le alterazioni cinetiche osservate in seguito alla ricombinazione fra le subunità sono accompagnate ad alterazioni nei rapporti fra gli emi e le rispettive globine indicando che l'interazione fra le subunità influenza la loro struttura terziaria (Geraci e Li, 1969). Allo scopo di approfondire lo studio dei fattori che determinano la struttura delle subunità nella molecola di emoglobina ci si è avvantaggiati dell'osservazione che la reattività del sulfidril in posizione 93 delle catene beta cambia al cambiare dello stato di ossigenazione dell'emoglobina. Ad esempio la reattività verso il paracloromercuribenzoato (pMB) diminuisce di circa 100 volte passando da ossi a

(\*) Lavoro eseguito nel laboratorio di Embriologia Molecolare del C.N.R., Arco Felice, Napoli.

(\*\*) In permesso dal Department of Chemistry dell'Università del Nebraska, Lincoln, Nebraska U.S.A.

(\*\*\*) Nella seduta del 9 gennaio 1971.

deossiemoglobina e la variazione sembra dipendere essenzialmente dal legame dell'ossigeno all'eme delle sole catene beta (Antonini e Brunori, 1969).

Si è allora studiata la reattività del sulfidrilico beta 93 in una serie di derivati dell'emoglobina per identificare i fattori che maggiormente influenzano il suo comportamento e quindi l'ambiente che circonda il sulfidrilico.

#### MATERIALI E METODI

L'emoglobina è stata preparata da eritrociti derivanti da diversi donatori come descritto da Geraci, Parkhurst e Gibson (1969) e in parte utilizzata subito e in parte conservata a  $-20^{\circ}\text{C}$  dopo cristallizzazione per dialisi contro tampone di Drabkin (1946).

La globina è stata preparata secondo Rossi-Fanelli, Antonini e Caputo (1958). Il composto intermedio IC-II è stato isolato secondo il metodo di Winterhalter (1966). Le catene isolate dell'emoglobina umana sono state preparate secondo il metodo di Geraci, Parkhurst e Gibson (1969). La concentrazione delle varie molecole è stata misurata spettrofotometricamente su un Beckman DU-2 usando il coefficiente  $\epsilon \text{ mM} = 15.4$  a  $576 \text{ nm}$  per i derivati ossigenati e il coefficiente  $\epsilon \text{ mM} = 11.1$  a  $540 \text{ nm}$  per i derivati CN-met (Antonini, 1965) in tampone fosfato  $50 \text{ mM}$  pH 7.0. La omogeneità delle varie molecole è stata controllata per elettroforesi sul gel di amido con il metodo di Poulik (1957).

La reazione del pMB con i gruppi SH delle varie molecole è stata seguita staticamente a  $254 \text{ nm}$  in uno spettrofotometro Beckman DU-2 e per le misure cinetiche in uno spettrofotometro Stopped-Flow della Durrum equipaggiato con una cella di osservazione di  $2 \text{ cm}$  e con temperatura regolata a  $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ .

#### COMMENTI

La serie di derivati dell'emoglobina su cui si è eseguito lo studio oggetto di questa Nota permette di isolare il contributo di vari fattori alle caratteristiche di reazione del sulfidrilico beta 93.

Paragonando i dati relativi alla reazione dei sulfidrilici della ossiemoglobina e della globina si ha una indicazione dell'importanza della presenza dell'eme sulle sue catene; il composto IC-II permette di studiare l'influenza sulle catene beta dell'aggiunta dell'eme alle sole catene alfa; i dati sulle catene beta isolate permettono di mettere in evidenza l'importanza delle interazioni alfa-beta.

La fig. 1 offre un esempio di raccolta dei dati cinetici. I punti del grafico riportano valori di densità ottica fino a circa l'80% della reazione. La Tabella I riporta i valori della costante di velocità di secondo ordine ai vari pH per le singole molecole studiate. È importante notare a questo punto i dati riportati nella Tabella II. Da essi si deduce che le misure cinetiche allo spettrofotometro Stopped-Flow rappresentano la cinetica di uno solo dei due sulfidrilici esistenti sulle catene beta.

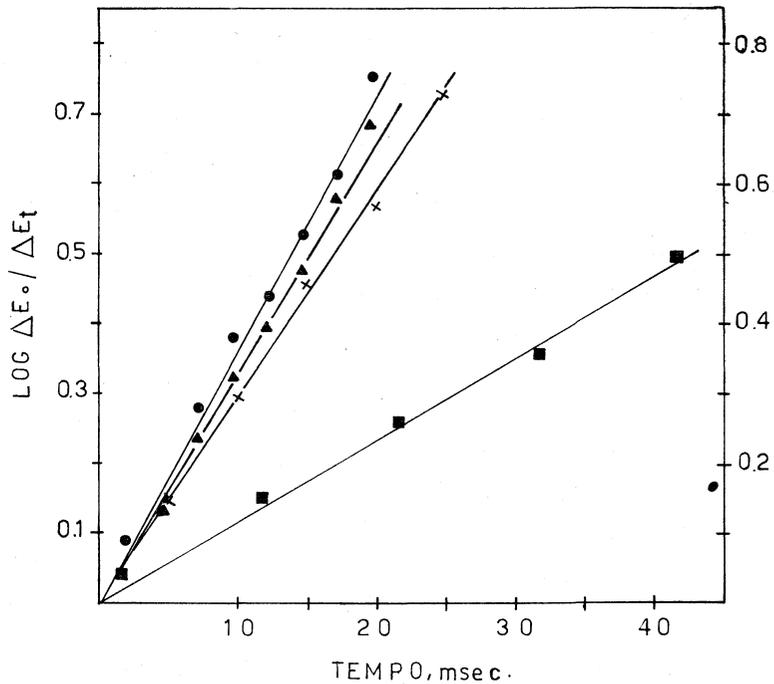


Fig. 1. - Cinetica della reazione della ossiemoglobina con il pMB a diversi pH. Temperatura 22.0°C. Concentrazione pMB 15  $\mu$ M; concentrazione HbO<sub>2</sub> 5  $\mu$ M.  $\lambda = 254$ nm; cella di misura 2 cm di cammino ottico.  $\Delta E_0$  è la variazione di densità ottica fra il tempo 0 e il tempo  $\infty$ ;  $\Delta E_t$  è la variazione di densità ottica fra il tempo  $t$  e il tempo  $\infty$ .  $\times-\times$ , 50 mM potassio fosfato pH 6.0;  $\bullet-\bullet$ , 50 mM potassio fosfato pH 7.0;  $\blacktriangle-\blacktriangle$ , 50 mM potassio fosfato pH 7.9;  $\blacksquare-\blacksquare$ , 50 mM sodio borato pH 9.0.

TABELLA I.

Costante di velocità di combinazione ( $M^{-1} Sec^{-1}$ )  
del pMB con vari derivati dell'emoglobina.

Temperatura, 20°; 50 mM potassio fosfato.

pH	Derivato			
	Gb	IC-II	HbO <sub>2</sub>	$\beta$ O <sub>2</sub>
	$\times 10^{-7}$	$\times 10^{-7}$	$\times 10^{-6}$	$\times 10^{-4}$
6,0	4,7	3,7	4,7	2,6
7,0	3,5	2,7	5,1	2,6
8,0	2,4	2,0	4,6	18
*9,0	1,9	2,0	1,8	115

(\*) 50 mM Na Borato.

TABELLA II

*Numero di sulfidri di vari derivati della emoglobina  
titolati per aggiunta di pMB.*

Temperatura 20° C; 50 mM fosfati pH 7.0;  $\lambda = 254$  nm  
A : metodo statico; B : metodo dinamico.

Derivato	sulfidri/molecola	
	A <sup>(1)</sup>	B <sup>(2)</sup>
Globina . . . . .	2	2
IC-II . . . . .	2	2
Emoglobina . . . . .	2	2
$\beta_4$ . . . . .	8	4

(1) Spettrofotometro Beckman DU-2.

(2) Spettrofotometro Stopped-Flow.

Non è stato finora possibile dimostrare se si tratta della reazione del sulfidre in posizione 93 oppure di quello in posizione 112. È comunque chiaro che la cinetica del sulfidre 93 delle catene isolate è in ogni caso diversa da quella caratteristica del sulfidre delle catene beta in combinazione con le catene alfa negli altri derivati. Nella Tabella III sono riportati i valori delle energie di attivazione per la reazione col pMB dei vari derivati, misurati fra 10° C e 25° C.

TABELLA III

*Energia di attivazione della reazione fra i gruppi SH  
di vari derivati dell'emoglobina e il pMB.*

50 mM fosfati pH 7.0. Intervallo di temperatura 10-25° C.

Derivato	E (K cal/mole)
Globina . . . . .	non misurabile
IC-2 . . . . .	non misurabile
Emoglobina . . . . .	5 ± 1
$\beta_4$ . . . . .	17 ± 2

Lo studio dei risultati riportati induce ad una serie di considerazioni. Innanzitutto la dipendenza dal pH del valore della costante di velocità è anomala per tutti i derivati eccetto che per le catene beta isolate e pertanto per questo criterio esse si differenziano dalle altre molecole.

I valori delle costanti di velocità per i vari derivati sono diversi per ordini di grandezza eccetto che tra la globina e il composto IC-II. Le energie di attivazione, pur diverse fra di loro, sono misurabili per l'emoglobina e per le catene isolate mentre non sono misurabili per la globina e per il composto IC-II. Risulta quindi che le caratteristiche di reattività del sulfidrilico beta 93 sono notevolmente diverse nell'emoglobina ossigenata, nelle catene beta isolate e nella globina, mentre sono praticamente identiche nella globina e nel composto IC-II.

Ne deriva che la reattività dei sulfidrilici beta 93 dipende dalla interazione fra le catene alfa e beta, dipende dalla presenza dell'eme sulle catene beta, ma non è influenzata in maniera apprezzabile dalla presenza o meno dell'eme sulle catene alfa.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] ANTONINI E., BUCCI E., FRONTICELLI C., WYMAN J. e ROSSI-FANELLI A., « J. Mol. Biol. », 12, 375 (1965).
- [2] ANTONINI E., « Physiol. Rev. », 45, 123 (1965).
- [3] ANTONINI E., BUCCI E., FRONTICELLI C., CHIANCONE E., WYMAN J. e ROSSI-FANELLI A. « J. Mol. Biol. », 17, 29 (1966).
- [4] ANTONINI E. e BRUNORI M., « J. Biol. Chem. », 244, 3909 (1969).
- [5] DRABKIN D. L., « J. Biol. Chem. », 164, 703 (1946).
- [6] GERACI G. e LI T. K., « Biochemistry », 8, 1848 (1969).
- [7] GERACI G., PARKHURST L. J. e GIBSON Q. H., « J. Biol. Chem. », 244, 4664 (1969).
- [8] POULIK M. D., « Nature », 180, 1477 (1957).
- [9] ROSSI-FANELLI A., ANTONINI E. e CAPUTO A., « Biochim. et Biophys. Acta », 30, 608 (1958).
- [10] WINTERHALTER K. H., « Nature », 211, 932 (1966).