
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

UMBERTO BIANCHI, GIULIETTA CHESSA

**Varianti molecolari monomeriche di emoglobina in
una specie sarda del genere *Chironomus* (Diptera:
Nematocera)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 50 (1971), n.6, p. 815–821.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_6_815_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/>

Biologia. — *Varianti molecolari monomeriche di emoglobina in una specie sarda del genere Chironomus (Diptera: Nematocera) (*)*.
Nota di UMBERTO BIANCHI e GIULIETTA CHESSA, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Multiple electrophoretic forms of larval haemoglobin have been found by studying a Sardinian species of *Chironomus*. Studies of molecular size, carried out by gel filtration and electrophoresis, have suggested the exclusive occurrence of haemoglobin monomeric forms, the molecular weight of which has been plotted in a range of values of 13,000–15,000. This finding supports the hypothesis stating that each electrophoretic variant is the product of a single structural gene.

INTRODUZIONE

L'emoglobina è una delle poche proteine il cui studio a livello molecolare ha raccolto un'enorme massa di contributi durante gli ultimi quindici-venti anni. Sono state finora infatti esaminate le emoglobine di diversi mammiferi, uccelli, rettili, pesci ed anfi e la valutazione del loro peso molecolare ha posto in evidenza straordinarie analogie poiché i valori ottenuti erano tutti compresi tra 64.000 e 68.000. L'unica eccezione era rappresentata dai Ciclostomi, i vertebrati più primitivi, per l'emoglobina dei quali è stato trovato un peso molecolare di 17.000. Il suddetto reperto ha permesso ad alcuni Autori di considerare l'emoglobina dei Ciclostomi più simile alla mioglobina che non all'emoglobina propriamente detta.

La presenza di emoglobina non è comunque limitata ai soli vertebrati poiché essa è stata reperita anche in alcune specie di insetti, tutte viventi in ambienti soggetti a temporanee o permanenti deficienze di ossigeno. Ad esempio possono essere citati il *Gastrophilus intestinalis*, che durante gli stadi di sviluppo vive parassita nello stomaco del cavallo, molti Emitteri acquatici e diverse specie di Chironomidi le cui larve vivono sul fondo di pozze di acqua dolce o salmastra.

L'emoglobina delle forme larvali dei Chironomidi è stata oggetto di studi da parte di numerosi ricercatori (Braun, 1964; Braun, Formanek e Braunitzer, 1968) i quali hanno messo in evidenza che questa proteina si trova liberamente disciolta nell'emolinfa e che rappresenta il 40% delle proteine totali di questa.

(*) Ricerca eseguita con il contributo del CNR nell'Istituto di Genetica dell'Università di Cagliari.

(**) Nella seduta del 18 giugno 1971.

Svedberg e Eriksson-Quensal (1934) hanno trovato che il peso molecolare della emoglobina di una specie non identificata di *Chironomus* si aggira intorno a 31.400.

Questo valore ha fatto pensare ad una struttura molecolare complessa e, più esattamente, ad un dimero le cui subunità fossero paragonabili alle globine dei vertebrati.

Nel 1965 Braunitzer e Braun hanno trovato che il numero di residui di amminoacido nelle catene globiniche di *Chironomus thummi* è di 124-127.

Ancora più recentemente Thompson, English e Bleecker (1969) analizzando quattro ceppi di *Chironomus tentans*, hanno posto in evidenza l'esistenza entro ogni ceppo, di numerose varianti molecolari emoglobiniche, ciascuna delle quali, secondo i suddetti Autori, sarebbe rappresentata da un semplice monomero avente un peso molecolare molto vicino a quello della mioglobina dei vertebrati.

I suddetti risultati sono stati ottenuti determinando i coefficienti di sedimentazione ed il comportamento su colonna di Sephadex G 100 delle emoglobine in esame.

Le implicazioni genetiche di simili risultati sono molto importanti in quanto hanno permesso di postulare l'esistenza, nel genoma della specie di *Chironomus* studiata, di numerosi geni strutturali ciascuno codificante la sintesi di una particolare variante emoglobinica.

In base a questi dati abbiamo impostato alcune ricerche che giustificano la presente Nota, aventi lo scopo di porre in evidenza in una specie sarda del genere *Chironomus* (*Chironomus affinis thummi*) l'eventuale presenza di eterogeneità elettroforetica delle emoglobine ed inoltre tendenti a valutare l'ordine di grandezza molecolare di queste cromoproteine.

MATERIALE

Gli individui utilizzati per i nostri esperimenti erano forme larvali al IV stadio, appartenenti ad una specie affine al *Ch. thummi*, catturate in pozze d'acqua salmastra presso Capoterra (CA).

Utilizzando una micropipetta e lavorando al binoculare veniva prelevata l'emolinfa di numerosi individui che veniva immediatamente utilizzata per gli esperimenti, oppure congelata e conservata in frigorifero alla temperatura di -20°C .

TECNICHE

Elettroforesi.

Le separazioni elettroforetiche delle diverse forme molecolari di emoglobina venivano eseguite su strisce di acetato di cellulosa gelatinizzato (Cellogel, Chemetron Chimica, Milano) aventi una superficie di circa 170 cm^2 . Su tali supporti era possibile analizzare contemporaneamente almeno dieci campioni

(0,01 ml di emolinfa ciascuno). Le corse elettroforetiche venivano eseguite in tampone di glicina, pH 8,6 (gr 53 di glicina e gr 3 di NaOH sono disciolti in 500 ml di acqua distillata e successivamente, prima dell'uso, questa soluzione viene diluita 1 : 3). Una tensione di 5 V/cm, fornita per circa due ore determinava soddisfacenti separazioni elettroforetiche.

Le frazioni emoglobiniche venivano poste in evidenza immergendo il supporto di acetato di cellulosa in 100 ml di una soluzione contenente:

- gr 0,2 di benzidina;
- gr 0,2 di sodio nitroprussiato;
- ml 1,0 di acido acetico;
- ml 2,0 di acqua ossigenata al 12 %.

Questo tipo di colorazione è specifico per le emoglobine, la mioglobina ed in genere per tutte quelle proteine coniugate contenenti un gruppo prostetico ferro-proto-eme.

Gel filtrazione (cromatografia su gel di Sephadex).

È stata usata la colonna SR/25 LKB, riempita con Sephadex G 200, un gel fortemente idrofilo ed insolubile in tutti i solventi. La fase mobile del sistema era rappresentata da tampone fosfato 0,15 M, pH 7,4. L'omogeneità del letto di gel veniva verificata versando una soluzione colorata di Blu destrano 2000 che, avendo un alto peso molecolare (2×10^6), attraversa la fase liquida e permette di calcolare il volume del liquido escluso dal gel. Frazioni di 0,5 ml, raccolte con collettore « Ultrorac LKB » venivano quindi esaminate allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 4150 Å.

Liofilizzazione.

Per eseguire alcuni esperimenti, i cui risultati saranno più oltre illustrati, è stato necessario ricorrere alla liofilizzazione di frazioni contenenti emoglobina, precedentemente desalificate mediante passaggio su « Sephadex G 10 ». È stato utilizzato un liofilizzatore da laboratorio della Ditta « Terzano » (Milano).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nelle nostre condizioni sperimentali l'emolinfa prelevata da diversi individui al IV stadio larvale si è separata dopo elettroforesi, in numerose frazioni pseudo-perossidasi positive. Queste frazioni sono state da noi considerate come emoglobine in possesso di diversa carica netta e quindi differenziabili anche a livello molecolare (Tav. I, fig. 1).

La molteplicità emoglobinica posta in evidenza nella specie sarda di *Chironomus* presa in considerazione era comunque in linea con i risultati ottenuti da altri ricercatori nel corso di questi ultimi anni: Thompson e English (1966); Thompson, English e Bleecker (1969).

La sopracitata eterogeneità elettroforetica si contrapponeva invece ad un altro risultato sperimentale da noi ottenuto. Infatti, eseguendo numerose gel-filtrazioni su colonna di Sephadex G 200, abbiamo sempre potuto osservare una assoluta omogeneità cromatografica. In altri termini, la frazione emoglobinica ottenuta per filtrazione su gel era sempre una sola.

L'emoglobina presente nella suddetta frazione cromatografica veniva identificata sia, come si è già riferito, mediante lettura allo spettrofotometro, ed inoltre ponendo in ciascuna frazione alcune gocce (0,01 ml) di una soluzione contenente: benzidina, tampone fosfato 0,15 M a pH 7,4, etanolo ed acqua ossigenata.

Entrambi i metodi ponevano in evidenza l'emoglobina, nella medesima frazione cromatografica.

L'analisi dei risultati sperimentali da noi ottenuti e sopra illustrati ci ha suggerito la seguente considerazione. L'emolinfia della specie di *Chironomus* da noi considerata sembra contenere numerose e differenti frazioni emoglobiniche le quali, comunque, dovrebbero avere tutte lo stesso peso molecolare. Una situazione di questo tipo porta con sé interessanti implicazioni genetiche che verranno più avanti illustrate. In questo contesto, avendo lo scopo di controllare sperimentalmente la validità della summenzionata conclusione, abbiamo deciso di intraprendere ulteriori esperimenti.

Come si è già riferito l'emoglobina di *Chironomus* veniva restituita dalla colonna di Sephadex G 200 in un'unica frazione. Abbiamo pertanto deciso di sottoporre ad elettroforesi la suddetta frazione cromatografica allo scopo di osservare quante e quali frazioni elettroforetiche di emoglobina fossero in essa contenute.

È stato necessario risolvere alcuni problemi tecnici. Infatti la concentrazione dell'emoglobina presente nella frazione cromatografica era troppo bassa per permettere esperimenti elettroforetici. D'altra parte, liofilizzando la suddetta frazione si otteneva un residuo costituito da poca emoglobina dispersa nella componente cristallina dei sali fosfati presenti nel sistema tampone eluente. Quando si cercava di riprendere il liofilizzato con una piccolissima quantità di acqua distillata (50 λ) si otteneva in pratica una soluzione salina talmente concentrata da danneggiare l'esperimento elettroforetico stesso. È stato però possibile ovviare a questo inconveniente operando nel seguente modo: la frazione cromatografica recuperata dal Sephadex e contenente praticamente tutta l'emoglobina in esame, veniva immediatamente ricromatografata mediante passaggio attraverso una colonna di Sephadex G 10 che escludeva la componente proteica mentre tratteneva tutta la parte salina. La frazione emoglobino-positiva ottenuta in tal modo, forniva, mediante liofilizzazione, una parte proteica praticamente esente da sali. Questo liofilizzato ripreso con circa 20-30 λ di acqua bidistillata, forniva una soluzione emoglobinica molto concentrata ma limpida e, naturalmente, desalificata. Piccole quantità di tali soluzioni seminate su «Cellogel», sottoposte ad elettroforesi e colorate con benzidina, si risolvevano in 5 frazioni elettroforetiche.

Nella fig. 2 della Tavola I è rappresentato un esperimento di questo tipo. Due ferogrammi rappresentano un controllo poiché ciascuno di essi è stato ottenuto sottoponendo ad elettroforesi l'emolinfa fornita da un solo individuo al IV stadio larvale. Naturalmente gli altri ferogrammi della stessa figura sono stati ottenuti dal liofilizzato della frazione cromatografica contenente l'emoglobina.

Osservando la fig. 2 è quindi possibile fare almeno tre considerazioni principali.

1) Evidentemente esistono, nella nostra specie di *Chironomus*, diverse forme molecolari di emoglobina aventi però tutte uguale peso molecolare.

2) Il doppio trattamento cromatografico e la successiva liofilizzazione, non sembrano danneggiare le molecole di emoglobina poiché le 5 bande elettroforetiche ottenute dal liofilizzato, corrispondono alle prime 5 bande ottenute dall'emolinfa di singoli individui.

3) Apparentemente durante i passaggi di gel filtrazione e di liofilizzazione, abbiamo perduto le 3 bande anodicamente più veloci presenti nei ferogrammi dell'emolinfa.

Le prime due osservazioni non abbisognano di commenti; esse sono constatazioni di dati sperimentali. Non sappiamo invece interpretare l'osservazione numero 3.

Rimane comunque il fatto che noi siamo riusciti a dimostrare che almeno 5 delle diverse frazioni molecolari emoglobiniche si pongono nello stesso ambito di valori per quanto riguarda il loro peso molecolare.

Questo fatto apre immediatamente, a livello genetico, il problema concernente il numero di geni strutturali esistenti nel pool genico della specie esaminata, deputati alla sintesi delle diverse emoglobine osservate.

Un simile argomento è stato recentemente trattato da Thompson e coll. (1969) i quali, avendo dimostrato che le diverse forme molecolari di emoglobina presenti in *Chironomus tentans* avevano semplice struttura monomerica, hanno potuto concludere che, con ogni probabilità, esisteva un numero di geni strutturali almeno uguale a quello delle emoglobine. I suddetti Autori hanno inoltre discusso la possibilità secondo la quale questi diversi geni strutturali si sarebbero originati per duplicazione nel corso dell'evoluzione della specie. Simili interpretazioni sono possibili anche nell'uomo. Ad esempio i geni strutturali specificanti la sintesi delle catene β e δ delle emoglobine umane, sono così strettamente concatenati da sembrare un tandem duplicativo, Baglioni (1962).

I nostri risultati si accordano perfettamente con quelli ottenuti da Thompson e coll. (1969) anche perché altri dati in nostro possesso ci spingono ad attribuire una semplice struttura monomerica alle emoglobine della specie sarda di *Chironomus* da noi studiata. Abbiamo infatti eseguito un'ulteriore serie di esperimenti aventi lo scopo di fornire una stima più precisa del peso molecolare delle emoglobine da noi analizzate elettroforeticamente. A questo scopo diverse proteine globulari a peso molecolare noto, purificate e reperi-

bili in forma cristallina, sono state poste su colonna di Sephadex G 200 e di ciascuna è stato calcolato il valore del coefficiente di ripartizione (K_{av}) tra la fase liquida e la fase di gel applicando la seguente formula:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

dove

V_e = volume di eluizione (corrispondente alla frazione nella quale la sostanza in esame è stata eluita).

V_o = volume occupato dal liquido escluso dal gel (questo volume coincide praticamente con il volume di eluizione del Blu destrano la cui macromolecola viene esclusa dal gel).

V_t = volume totale (in pratica il volume del letto del gel).

Le proteine già citate il cui K_{av} è stato calcolato e riportato nel grafico 1, sono: citocromo *c*, chimotripsinogeno, ovoalbumina, albumina, aldolasi e catalasi. Osservando il grafico 1 è possibile notare che il K_{av} dell'emoglobina di *Chironomus* coincide con quello del citocromo *c*.

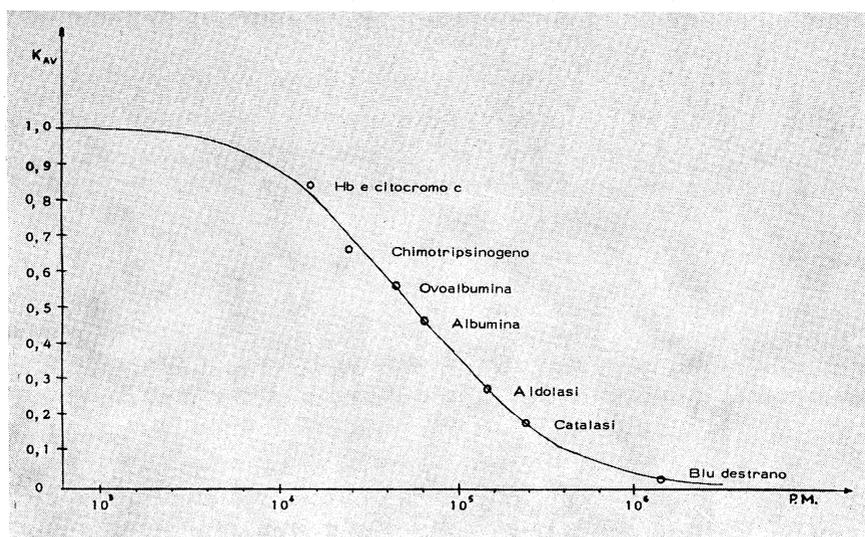


Grafico 1. - Correlazione tra comportamento all'eluizione e proprietà molecolari di proteine globulari: K_{AV} contro peso molecolare (su scala logaritmica). Curva costruita in accordo a P. Andrews (1964).

La curva da noi ottenuta è stata determinata ripetendo il medesimo esperimento per 5 volte. Desideriamo sottolineare il fatto che non abbiamo praticamente mai osservato deviazioni significative da un esperimento all'altro per cui i punti della curva non rappresentano medie di valori.

In conclusione noi crediamo quindi di poter affermare che, nelle nostre condizioni sperimentali il peso molecolare delle diverse emoglobine reperite

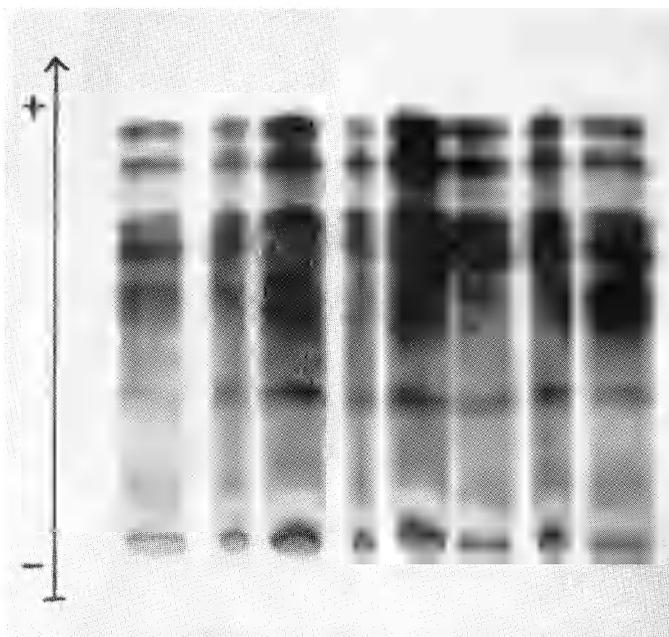


Fig. 1. - Ferogrammi ottenuti da emolinfa di *Chironomus* (colorazione alla benzidina). Ogni singola frazione elettroforetica rappresenta una diversa variante molecolare emoglobinica.

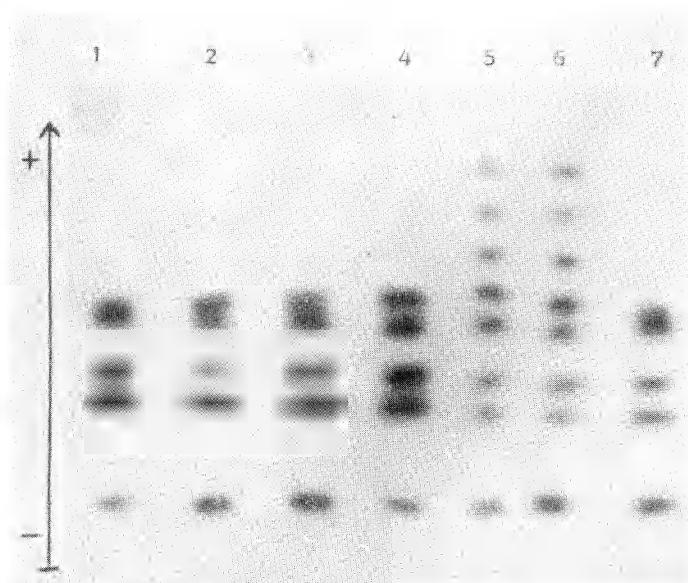


Fig. 2. - Molteplicità elettroforetica delle emoglobine contenute in un'unica frazione cromatografica (1, 2, 3, 4 e 7). I ferogrammi 5 e 6 sono stati invece ottenuti utilizzando emolinfa prelevata da singoli individui al IV stadio larvale.

in questa specie di *Chironomus* dovrebbe essere collocabile intorno a valori di 13-15.000. Come abbiamo già osservato simili valori sostengono fortemente l'ipotesi secondo la quale le diverse emoglobine di *Chironomus* hanno tutte una semplice struttura monomerica.

Gli autori desiderano esprimere la propria gratitudine al prof. Ugo Laudani che ha contribuito alla ricerca mediante discussioni, critiche e suggerimenti di grande utilità.

BIBLIOGRAFIA

- ANDREWS P., « Biochem. J. », 91, 222 (1964).
BAGLIONI C., « Proc. Nat. Acad. Sci. », 48, 1880 (1962).
BRAUN V., FORMANEK H. e BRAUNITZER G., « Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. », 349, 45 (1968).
BRAUNITZER G. e BRAUN V., « Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. », 340, 88 (1965).
THOMPSON P., ENGLISH D. S. e BLEECKER W., « Genetics », 63, 183 (1969).