
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

CARLO CIROTTI, ANNA PETRIS, FAUSTO PANARA,
HARRY MANELLI

**Emoglobine di pollo adulto: struttura delle loro
subunità**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 57 (1974), n.3-4, p.
275-279.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1974_8_57_3-4_275_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 generale. — *Emoglobine di pollo adulto: struttura delle loro subunità.* Nota (*) di CARLO CIROTTO, ANNA PETRIS, FAUSTO PANARA e HARRY MANELLI, presentata dal Socio P. PASQUINI.

SUMMARY. — The β chains of the two hemoglobins typical of the adult chicken show the same electrophoretic mobility. When analyzed with the fingerprint technique, the two β chains show a similar peptide pattern, while the tryptic maps of the two α chains are very different. The electrophoretic characteristics of the tryptic peptides are in agreement with those obtained by analyzing the single chains by polyacrylamide gel electrophoresis in acetic acid-urea. These results are strongly supported by the electrophoretic data described in literature and by those concerning the SH group reactivity of the single chains. The hemoglobins of the adult chicken differ from those of the mammals: in fact, while in mammals both fetal and adult hemoglobins have identical α chains, in the chick there is a strong evidence for a very similar structure of the β chains.

INTRODUZIONE

Negli eritrociti di pollo adulto sono sintetizzate, essenzialmente, due componenti emoglobiniche: una costituisce il 25 % circa dell'emolizzato totale, l'altra il restante 75 % (Matsuda *et al.*, 1963). La loro struttura è del tipo $\alpha_2 \beta_2$ ed $\alpha_2' \beta_2''$, rispettivamente, ed ambedue hanno un peso molecolare uguale a quello delle emoglobine dei mammiferi (Huisman *et al.*, 1964). L'analisi delle subunità costituenti è stata condotta prevalentemente con tecniche elettroforetiche ed ha dimostrato che uno dei due tipi di catena, di cui ogni tetramero è costituito, presenta identiche caratteristiche di migrazione, sia che appartenga all'una come all'altra delle due emoglobine (Wilt, 1967; Bergellesi *et al.*, 1969). Recentemente Cirotto *et al.* (1974 a), servendosi di tecniche di caratterizzazione chimica, hanno dimostrato che la catena con la stessa migrazione elettroforetica è di tipo β . Questi dati fanno pensare che le due emoglobine siano costituite da catene β uguali o molto simili. A questa stessa conclusione portano i dati riguardanti il numero e la reattività dei gruppi sulfidrilici delle due emoglobine. È stato infatti dimostrato che i gruppi SH appartenenti alle globine β hanno le stesse caratteristiche di reattività in ambedue i tetrameri (Cirotto *et al.*, 1974 a).

È sembrato interessante, quindi, studiare con tecniche più accurate, ciascuna catena globinica di pollo adulto così da evidenziare meglio le somiglianze e le differenze esistenti tra loro.

MATERIALI E METODI

Le due emoglobine sono state ottenute in forma pura dagli eritrociti di pollo adulto seguendo le tecniche descritte da Cirotto *et al.* (1974 a). Tutte le altre separazioni ed analisi sono state iniziate entro 24 ore dalla lisi degli eritrociti.

(*) Pervenuta all'Accademia il 16 settembre 1974.

Le globine, preparate con la tecnica descritta da Rossi-Fanelli *et al.* (1958), sono state carbossimetilate in ambiente denaturante a pH 7,5 come descritto da Hunt *et al.* (1969) ed isolate per cromatografia su colonna di carbossimetil-cellulosa (Ciroto *et al.*, 1974 *b*). L'omogeneità delle frazioni cromatografiche è stata provata mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide in urea ed acido acetico (Stegink *et al.*, 1971). La tecnica di colorazione del gel è quella diretta, descritta da Malik *et al.* (1972).

Le frazioni cromatografiche, dopo dialisi contro acido formico all'1 %, sono state concentrate per liofilizzazione e sottoposte ad idrolisi triptica per 3 ore a 38°C (Hunt *et al.*, 1969). Dopo aver abbassato il pH al valore di 6,4 per aggiunta di acido acetico, sono stati eliminati, per centrifugazione, i peptidi insolubili ed il supernatante è stato liofilizzato almeno 3 volte, risolubilizzando ogni volta in acqua, per eliminare i sali volatili. I peptidi triptici sono stati separati con la tecnica del « fingerprint » (Ingram, 1958) su carta Whatman 3 MM. Per l'elettroforesi è stato adoperato il tampone piridina-acido acetico pH 6,4 (Ingram, 1958); per la cromatografia discendente il tampone di Waley *et al.* (1953). Le mappe triptiche sono state colorate con soluzione acetonica di ninidrina secondo Clegg *et al.* (1966).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella fig. 1 sono riportate le mappe dei peptidi ottenuti dall'idrolisi triptica delle subunità α isolate dalle due emoglobine di pollo. Ognuna di esse riassume i risultati di almeno quattro esperimenti fatti su diverse preparazioni.

L'idrolizzato triptico solubile della catena α' , isolata dalla componente emoglobinica minore, è costituito da 15 peptidi, tre dei quali formano un gruppo caratterizzato da un alto punto isoelettrico (fig. 1*a*).

L'altra subunità, la α'' , ha una mappa triptica costituita da 20 peptidi (fig. 1*b*). Di questi, soltanto 8 sono sovrapponibili ad altrettante macchie della mappa in fig. 1*a*. La struttura primaria di questa globina, studiata da Matsuda *et al.* (1971), dà ragione del numero di peptidi solubili prodotti dall'idrolisi triptica e conferma la validità delle tecniche analitiche qui riportate.

La differenza più evidente esistente fra le due mappe riportate in fig. 1, sta nel numero dei peptidi. Dall'idrolisi triptica della α'' , infatti, si ottengono 5 peptidi solubili in più che nel caso della α' . Ciò fa pensare o che il numero dei residui di lisina ed arginina sia diverso nelle due globine, o che sia diversa la distribuzione di tali residui nella catena polipeptidica. Dall'indagine sui peptidi triptici solubili, qui descritta, non è però possibile optare per l'una o l'altra delle due ipotesi, in quanto la parte insolubile, o « nocciolo », della proteina (Ingram, 1958) non è stata ulteriormente idrolizzata ed analizzata.

In fig. 2 sono riportati i « fingerprint » dei peptidi triptici delle due subunità β isolate dalle emoglobine di pollo. Ciascuna mappa è costituita da 20 peptidi, di cui due, indicati con linea tratteggiata, non sono sempre riproducibili. La

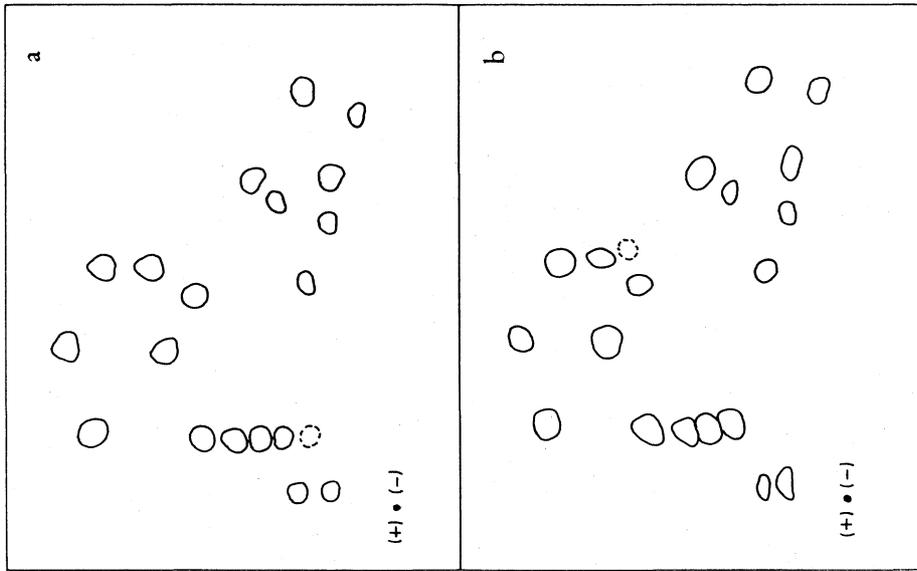


Fig. 2

Fig. 1. - Mappe dei peptidi ottenuti per idrolisi triptica della catena α' , isolata dalla frazione emoglobinica minore (a) e della catena α'' , isolata dalla frazione emoglobinica maggiore (b).

Fig. 2. - Mappe dei peptidi ottenuti per idrolisi triptica della catena β' , isolata dalla frazione emoglobinica minore (a) e della catena β'' , isolata dalla frazione emoglobinica maggiore (b).

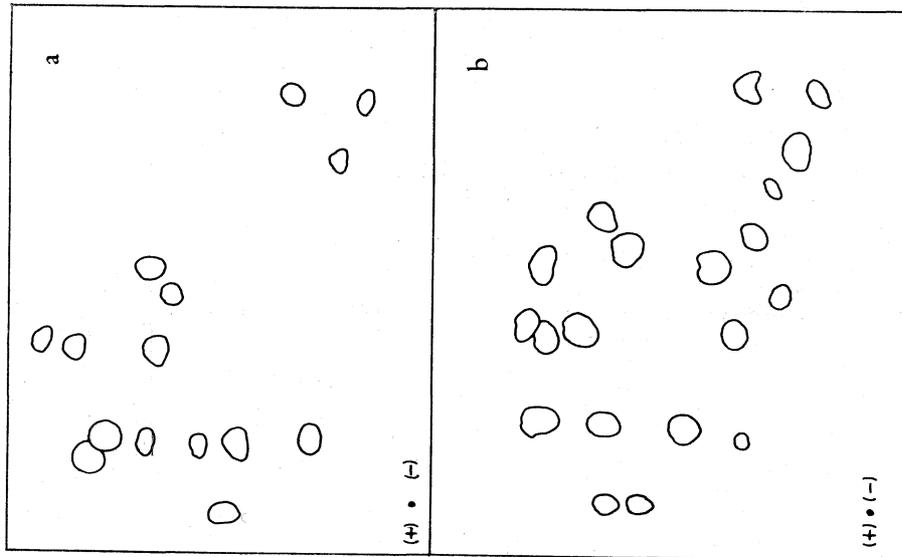


Fig. 1

sovrapponibilità della mappa (α) a quella (β) si mantiene entro i limiti dell'errore sperimentale e sta a dimostrare che le due catene posseggono una struttura primaria molto simile.

Da questo tipo di analisi, del tutto preliminare, non è possibile trarre conclusioni riguardanti la identità o meno delle due globuline β : è possibile, però, affermare che le catene β delle due emoglobine di pollo sono tra loro molto più simili di quanto non lo siano le catene α . Questo fatto è l'opposto di quanto si riscontra nelle emoglobine dell'uomo e dei mammiferi in genere, in cui è la subunità di tipo α ad essere identica in tutte le emoglobine tipiche della vita adulta e di quella fetale (Antonini *et al.*, 1971). Non è possibile, allo stato attuale delle conoscenze, formulare ipotesi circa le cause genetiche o l'eventuale funzione fisiologica di questa diversità strutturale.

In letteratura sono riportati vari esperimenti di separazione elettroforetica delle globine di pollo adulto (Hashimoto *et al.*, 1966; Bargellesi *et al.*, 1969; D'Amelio, 1966). Come supporto è utilizzato sia il gel di amido che quello di poliacrilamide, l'intervallo di pH scelto va da 1,9 (Hashimoto *et al.*, 1966; D'Amelio, 1966) a 3,5 (Bargellesi *et al.*, 1969) e l'ambiente è fortemente denaturante per urea o acido formico. I risultati di tutti questi esperimenti concordano sul fatto che le due globine β hanno identica velocità di migrazione e che la catena α'' migra verso il catodo più velocemente della α' . Osservando le mappe della fig. 2, si trova la giustificazione della uguale migrazione delle catene β : la somiglianza della loro struttura primaria. Anche il comportamento elettroforetico delle catene α è confermato e giustificato dalle mappe triptiche della fig. 1. Si nota, infatti, nel caso della α'' , un numero di peptidi solubili ad alto punto isoelettrico, che è nettamente maggiore di quello posseduto dalla α' . Ne deriva quindi una velocità di migrazione elettroforetica maggiore per la α'' che per la α' .

BIBLIOGRAFIA

- ANTONINI E. e BRUNORI M. (1971) - *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*. North-Holland Company, Amsterdam, p. 253.
- BARGELLESÌ A., CALLEGARINI C. e CONCONI F. (1969) - *Heterogeneity and globin composition of adult chicken hemoglobin*, « *Experientia* », 25, 137.
- CIROTTO G. e GERACI G. (1974 a) - *Exposed sulphhydryl groups of chicken haemoglobins: globin localization on their reactivity*, « *J. Mol. Biol.* », 84, 103.
- CIROTTO C. e D'AMELIO V. (1974 b) - *Patrimonio globinico delle cellule eritroidi di pollo adulto. Analisi cromatografica*, « *Boll. Soc. It. Biol. Sper.* », in corso di stampa.
- CLEGG J. B., NAUGHTON M. A. e WEATHERALL D. J. (1966) - *Abnormal human haemoglobins. Separation and characterization of the α and β chains by chromatography, and the determination of two new variants, Hb Chesapeake and Hb J (Bangkok)*, « *J. Mol. Biol.* », 19, 91.
- D'AMELIO V. (1966) - *The globins of adult and embryonic chick hemoglobin*, « *Biochim. Biophys. Acta* », 127, 59.
- HASHIMOTO K. e WILT F. H. (1966) - *The heterogeneity of chicken hemoglobin*, « *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* », 56, 1477.
- HUISMAN T. H. J., SCHILLHORN VAN VEEN J. M., DOZY A. M. e NECHTMAN C. M. (1964) - *Studies on animal hemoglobins. II. The influence of inorganic phosphate on the physico-*

- chemical and physiological properties of the hemoglobin of the adult chicken*, « Biochim. Biophys. Acta », 88, 352.
- HUNT Y., HUNTER T. e MUNRO A. (1969) – *Control of haemoglobin synthesis: rate of translation of the messenger RNA for the α and β chains*, « J. Mol. Biol. », 43, 123.
- INGRAM V. M. (1958) – *Abnormal human haemoglobins. I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by "finger printing"*, « Biochim. Biophys. Acta », 28, 539.
- MALIK N. e BERRIE A. (1972) – *New stain fixative for proteins separated by gel isoelectric focusing based on Coomassie Brilliant Blue*, « Anal. Biochem. », 49, 173.
- MATSUDA G. e TAKEI H. (1963) – *The studies on the structure of chicken haemoglobin. I. Chromatographic purification of chicken haemoglobin*, « J. Biochem. Tokyo », 54, 156.
- MATSUDA G., TAKEI H., CHAYU K. e SHIOZAWA T. (1971) – *Amino acid composition of the soluble tryptic peptides and chymotryptic peptides from the α polypeptide chain of A II component of chicken hemoglobin*, « Int. J. Protein Research », III, 339.
- ROSSI-FANELLI A., ANTONINI E. e CAPUTO A. (1958) – *Studies on the structure of haemoglobin. I. Physicochemical properties of human globin*, « Biochim. Biophys. Acta », 30, 608.
- STEGINK L. D., MEYER P. D. e CHALKLEY R. (1971) – *Acrylamide gel electrophoresis of hemoglobin polypeptide chains*, « Anal. Biochem. », 41, 351.
- WALEY S. Q. e WATSON J. (1953) – *The action of trypsin on polylysine*, « Biochem. J. », 55, 328.
- WILT F. H. (1967) – *The control of embryonic hemoglobin synthesis*, « Adv. Morphogenesis », 6, 89.