
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIORGIO MARIA GIACOMETTI, ALVARO DA ROS,
MAURIZIO BRUNORI

Osservazioni sulla cinetica della transizione acido-alcalina nella metamioglobina di *Aplisia*

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 54 (1973), n.1, p. 107–113.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_54_1_107_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/>

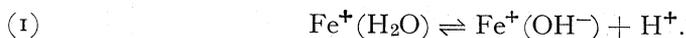
Biochimica. — *Osservazioni sulla cinetica della transizione acido-alcalina nella metamioglobina di Aplysia* (*). Nota di GIORGIO MARIA GIACOMETTI, ALVARO DA ROS e MAURIZIO BRUNORI, presentata (**)
dal Socio A. ROSSI FANELLI.

SUMMARY. — The paper reports a study on the kinetics of the transition between acid and alkaline Aplysia myoglobin. The results, obtained with the temperature-jump method, show that the observed relaxation effect corresponds to a perturbation of the equilibrium between the protonated and deprotonated forms of the protein.

The pH dependence of the data and their analysis suggest that the process involves a proton-linked conformational change of the protein, in agreement with independent experiments.

The comparison of the results reported here with those obtained for other hemeproteins, notably sperm whale myoglobin, constitutes a clear-cut example of the dominant role of the protein moiety in regulating the ligand reactivity of the heme.

È nota l'esistenza nelle emoproteine respiratorie di un processo pH dipendente che comporta variazioni dello spettro di assorbimento dell'eme nel visibile e nel Soret, e dello stato di spin totale del ferro eminico che passa, andando da pH acidi a pH alcalini, da una struttura ad alto spin ad una struttura a basso spin [1]. Questo processo, attribuito alla ionizzazione della molecola d'acqua che, come dimostrato da dati cristallografici, occupa il sesto sito di coordinazione del ferro eminico, può essere descritto come segue:



Il pK apparente (pK') di questo equilibrio varia notevolmente nelle diverse emoproteine come indicato per alcune di esse dai dati riportati in Tabella I, mostrando che sulla transizione acido-alcalina del ferro eminico esercita un ruolo fondamentale la parte proteica dell'emoproteina.

Nella metamioglobina di balena, tentativi di seguire la cinetica della transizione acido-alcalina con il metodo del salto di temperatura [4], hanno dimostrato che i tempi di rilasciamento sono uguali o inferiori al tempo morto dell'apparato (qualche microsecondo) [5].

Ilgenfritz e Schuster [6] facendo uso del campo elettrico quale agente perturbante l'equilibrio del sistema, hanno potuto misurare i tempi di rilasciamento coinvolti nella transizione della mioglobina di Balena ed hanno dimostrato che il processo non può essere descritto come una semplice reazione di trasferimento di un protone, ma richiede un meccanismo più complesso.

(*) Lavoro eseguito nel Centro di Biologia Molecolare, CNR. Ist. Chimica Biologica, Università di Roma.

(**) Nella seduta del 13 gennaio 1973.

TABELLA I.

Effetto del tipo di proteina e del tipo di eme sul pK' della transizione acido alcalina di alcune emoproteine a 20 °C e forza ionica 0.2 M.

EMOPROTEINA	pK' ± 0.05			Ref.
	Proto	Deutero	Meso	
Mioglobina di Aplysia (*)	7.5	6.9 ₅	—	—
Emoglobina umana	8.0 ₅	8.4	8.6	3
Mioglobina di balena	8.9 ₅	9.1	9.3 ₅	2
Perossidasi di Rafano	10.9	—	—	2

(*) a 25 °C.

Questa Nota riporta i risultati ottenuti con il metodo del salto di temperatura nello studio della cinetica della transizione acido-alcalina della metamioglobina di Aplysia.

MATERIALI E METODI

La mioglobina è stata estratta e purificata dai muscoli boccali del mollusco gasteropode *Aplysia Limacina* secondo il procedimento originale di Rossi Fanelli e Antonini [7]. Così preparata la mioglobina è già allo stato ferrico e non richiede ulteriori processi di ossidazione.

La deutero metamioglobina di Aplysia è stata preparata aggiungendo eme sintetico in quantità stechiometrica ad una soluzione di apomioglobina preparata con il metodo all'acetone acido [1, 8].

Le soluzioni tampone sono state preparate tutte con reagenti della Merck Darmstadt.

Le determinazioni spettrofotometriche sono state fatte con spettrofotometri registratori Cary modello 14 e Beckman modello DB-GT. Le misure cinetiche sono state eseguite col metodo del salto di temperatura [4] su un apparato a singolo raggio costruito da Messanlagen (Göttingen). In questo apparato l'aumento di temperatura è realizzato, in un tempo di pochi μ sec, facendo scaricare attraverso la soluzione un condensatore a bassa capacità; il potenziale di carica utilizzato è di circa 30 KV corrispondente ad un Δt di ~ 5 °C. È stata usata una cella di 7 ml di capacità ed 1 cm di cammino ottico.

I valori di pH di tutte le soluzioni sono stati determinati volta per volta con un microlettrodo capillare su un apparecchio pHmeter 4 della Radiometer.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La transizione acido-alcalina della metamioglobina di *Aplisia* ha un pK' di 7,6 a 20 °C [1]; nel caso della metamioglobina ricostituita con deuterio il pK' della transizione è inferiore di circa 0,5 unità di pH ($pK' = 6,95$ a 25 °C). La Tabella I riporta dati analoghi per altre emoproteine native e ricostituite.

Esperimenti di salto di temperatura eseguiti su soluzioni di metamioglobina di *Aplisia* in tamponi a valori di pH vicini al pK' della transizione acido-alcalina, hanno rivelato la presenza di un rilassamento analizzabile,

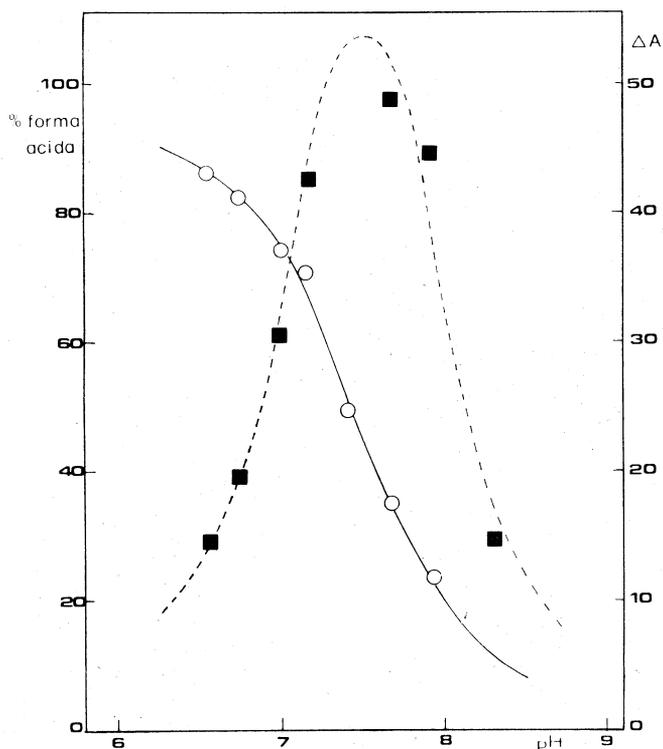


Fig. 1. - Dipendenza dal pH della percentuale di metamioglobina acida (○) e dell'ampiezza del rilassamento osservato (in unità arbitrarie) col metodo del salto di temperatura (■). *Condizioni:* temperatura 20 °C; concentrazione di emoproteina 6×10^{-6} M; tamponi fosfato forza ionica 0,2 M

in ogni condizione sperimentale, in termini di un singolo esponenziale. A pH costante, il tempo di rilassamento (τ) è indipendente dalla lunghezza d'onda di osservazione (fra 370 e 440 nm), dalla concentrazione della proteina (fra 3 e 15×10^{-6} M), e dalla molarità e dal tipo di tampone usato.

Il processo è stato attribuito ad una perturbazione dell'equilibrio fra metamioglobina acida ed alcalina sulla base dei seguenti dati:

i) l'ampiezza della perturbazione dallo stato di equilibrio, misurata dalla variazione totale della assorbanza a lunghezza d'onda costante, dipende

dal pH del mezzo. Per la protomioglobina l'ampiezza del rilassamento è infatti massima a pH intorno a 7.5 e diventa trascurabile a valori di pH superiori a 9.0 ed inferiori a 6.0 (fig. 1).

ii) Lo spettro differenziale all'equilibrio tra la meta mioglobina acida e alcalina coincide con lo spettro differenziale cinetico ottenuto dall'esame dell'ampiezza totale della perturbazione in funzione della lunghezza d'onda,

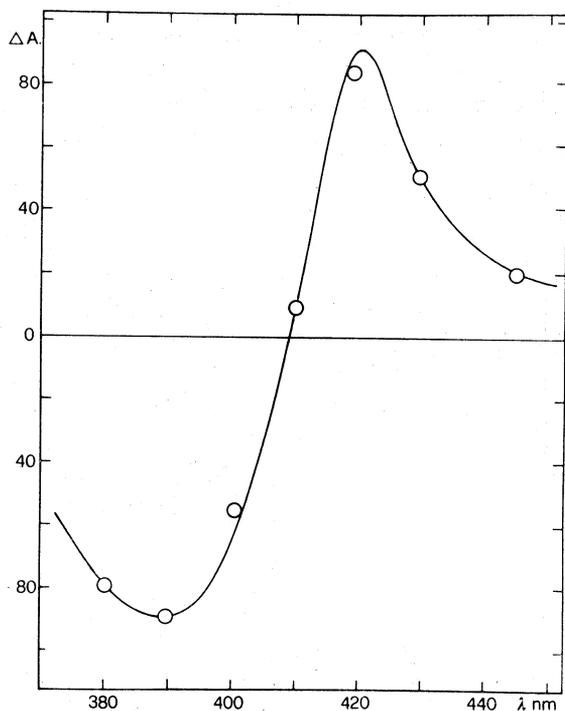


Fig. 2. - Confronto degli spettri differenziali all'equilibrio cinetico. La linea continua si riferisce allo spettro differenziale tra forma acida e alcalina della metamioglobina all'equilibrio, i punti (○) allo spettro differenziale cinetico ottenuto col metodo del salto di temperatura. Condizioni degli esperimenti cinetici: temperatura 20 °C; concentrazione dell'emoproteina 6×10^{-6} M; tampone fosfato pH 7.5 forza ionica 0.2 M.

La scala delle ordinate è data in unità arbitrarie.

a concentrazione costante di proteina (fig. 2). Inoltre lo spettro differenziale cinetico calcolato a tempi successivi mantiene inalterata la forma e presenta un netto punto isobestico (a circa 409 nm).

iii) A 425 nm, il salto di temperatura è associato ad un aumento di densità ottica, in accordo col segno dell'entalpia del processo di ionizzazione della molecola d'acqua in posizione distale ($\Delta H = + 3.3$ Kcal/mole) e con le proprietà spettroscopiche delle due forme della proteina.

Risultati del tutto analoghi a quelli riportati per la mioglobina nativa, contenente protoeme, sono stati ottenuti anche per la mioglobina ricostituita con deuterioeme.

La fig. 3 mostra la dipendenza del reciproco del tempo di rilassamento dal pH (da pH 6.0 a pH 8.0) in mezzo tamponato sia per la proto che per la deuterio metamioglobina. Come atteso per una reazione che coinvolge il trasferimento di un protone, τ^{-1} aumenta col diminuire del pH.

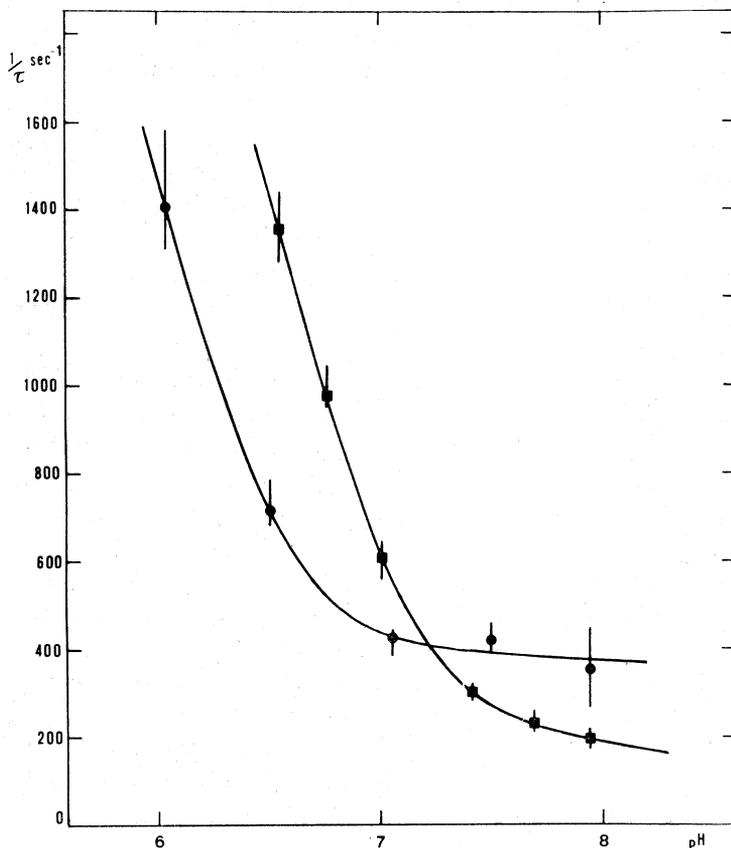


Fig. 3. - Dipendenza dal pH dell'inverso del tempo di rilassamento per la transizione fra metamioglobina acida e alcalina: (□) protomioglobina, (●) deuteromioglobina. *Condizioni:* temperatura 20 °C; concentrazione di emoproteina 6×10^{-6} M; tamponi fosfato forza ionica 0.2 M.

Assumendo per il processo osservato cinematicamente lo schema semplice:



dove:

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{(\text{Mb}_{\text{alc}})}{(\text{Mb}_{\text{ac}})} \quad \text{e} \quad \tau^{-1} = k_1 + k_2,$$

è possibile ricavare le costanti cinetiche apparenti della transizione, essendo noto ad ogni pH, dalle misure all'equilibrio, il valore del rapporto $(\text{Mb}_{\text{alc}})/(\text{Mb}_{\text{ac}})$:

$$k_1 = \tau^{-1} \cdot K / K + 1$$

$$k_2 = \tau^{-1} \cdot 1 / K + 1.$$

Per ambedue le mioglobine i risultati ottenuti sono descrivibili con lo schema semplice riportato sopra e quindi sulla base di due sole costanti di velocità, una delle quali (k_1) è pH indipendente e l'altra (k_2) dipende linearmente dal pH. Per la protomioglobina a 20 °C, k_1 ha un valore pH indipendente di 160 sec⁻¹, mentre k_2 dipende linearmente dal pH, con valori che vanno da circa 1600 sec⁻¹ a pH 6.5 a circa 13 sec⁻¹ a pH 8.5.

Questi risultati indicano che la cinetica della transizione acido-alcalina nella metamioglobina di Aplisia è consistente con lo schema (1), nel quale la forma basica della proteina Fe⁺(OH⁻), acquista un protone, con una costante apparente di combinazione di $4.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (per la proto metamioglobina a 20 °C). Questo valore è più basso delle costanti di protonazione caratteristiche di molecole semplici, che hanno valori di 10^{10} - $10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ [9]. La costante apparente di dissociazione ($\sim 160 \text{ sec}^{-1}$ a 20 °C) è, d'altro canto, molto diversa da quelle caratteristiche di processi semplici, che hanno valori variabili fra 10^4 e 10^6 sec^{-1} [9].

Questo dato fa supporre che al processo di deprotonazione della molecola d'acqua coordinata in sesta posizione sia associata una variazione nella struttura tridimensionale della proteina. Questa ipotesi è confortata da altre evidenze indipendenti a cioè: (a) studi cristallografici di emoglobine e mioglobine hanno dimostrato che, nella forma ferrica a pH bassi (spin alto), l'atomo del metallo si trova spostato dal piano della porfirina di alcuni decimi di Å verso l'imidazolo in posizione prossimale [1], e cioè in una situazione simile a quella caratteristica del derivato desossigenato. Quando l'acqua viene sostituita da un ossidrilico si ha uno spostamento del ferro eminico verso il piano della porfirina associato alla variazione nello stato di spin totale del metallo, spostamento che necessariamente si riflette sulla distanza di legame fra ferro e azoto imidazolico; (b) misure di spettroscopia di risonanza magnetica nucleare [10] ed elettronica [11] della metamioglobina di Aplisia sembrano indicare la presenza di due stati conformazionali della mioglobina in soluzione; (c) per la metamioglobina di Balena, la cinetica della transizione acido-alcalina è inconsistente con uno schema che coinvolge esclusivamente lo scambio di un protone, e per spiegare i risultati ottenuti Ilgenfritz e Schuster [6] hanno proposto che l'imidazolo in posizione distale possa funzionare da «tampone interno».

Il paragone dei risultati ottenuti per la mioglobina di Aplisia con quelli riportati in precedenza per la mioglobina di balena presenta un certo interesse. Il pK' della transizione acido-alcalina è considerevolmente diverso per le due proteine ($\Delta \text{pK}' = 1.4$). Inoltre sostituendo il protoeme con il deuterioeme, il pK' della transizione aumenta nella mioglobina di balena (e anche nella emoglobina umana), mentre diminuisce per la mioglobina di Aplisia (Tabella I). Infine la cinetica della transizione avviene con velocità enormemente diverse per le due emoproteine dato che il tempo di rilassamento è $\tau = 15 \text{ msec}$ per la Mb di Aplisia (a pH 8) e circa 1000 volte più piccolo per la Mb di balena in condizioni simili [6].

L'interpretazione strutturale di queste notevolissime differenze di comportamento tra le due mioglobine non è al momento possibile, per quanto

sia significativo, e forse determinante, il fatto che nella Mb di balena il residuo ammino-acidico in posizione distale sia l'imidazolo dell'istidina in posizione F8, istidina che nella Mb di *Aplisia* manca [12, 13]. In ogni caso l'insieme dei risultati costituisce una ulteriore conferma del ruolo determinante esercitato nelle proteine coniugate dalla parte proteica nel controllare la reattività del gruppo prostetico verso un agente legante esterno.

BIBLIOGRAFIA

- [1] E. ANTONINI e M. BRUNORI, *Hemoglobin and Myoglobin in their reactions with ligands*, Ed. North Holland Company Amsterdam-London (1971).
- [2] M. BRUNORI, G. AMICONI, E. ANTONINI, J. WYMAN, R. ZITO e A. ROSSI FANELLI, « *Biochim. Biophys. Acta* », *154*, 315 (1968).
- [3] E. ANTONINI, M. BRUNORI, A. CAPUTO, E. CHIANCONE, A. ROSSI FANELLI e J. WYMAN, « *Biochim. Biophys. Acta* », *79*, 287 (1964).
- [4] EIGEN M. e L. DE MAYER, *Relaxation Methods*, « *Techniques of organic Chemistry* », Interscience, New York (1963).
- [5] M. BRUNORI e T. M. SCHUSTER, Dati non pubblicati.
- [6] G. ILGENFRITZ e T. M. SCHUSTER, in « *Probes of Structure and function of Macromolecules and Membranes* », vol. II, pag. 299, Academic Press, New York 1971.
- [7] A. ROSSI FANELLI e E. ANTONINI, « *Biochimia* », *22*, 336 (1957).
- [8] A. ROSSI FANELLI e E. ANTONINI, « *Rendiconti Accademia Nazionale dei Lincei* », *22*, 133 (1957).
- [9] M. EIGEN, W. KRUSE, G. MAASS, e L. DE MAYER, « *Progress in Reaction Kinetics* », *2*, 287; Pergamon Press Oxford, London, New York (1964).
- [10] K. WÜTHRICH *et al.*, Comunicazioni personali.
- [11] G. ROTILIO, L. CALABRESE, G. M. GIACOMETTI e M. BRUNORI, « *Biochim. Biophys. Acta* », *236*, 234 (1971).
- [12] L. TENTORI, G. VIVALDI, S. CARTA, E. ANTONINI e M. BRUNORI, « *Nature* », *219*, 487 (1968).
- [13] L. TENTORI, *et al.*, Comunicazioni personali.