



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Biologia e Biochimica dell'Uomo e dell'Ambiente

Ciclo XXIV

**Caratterizzazione strutturale e funzionale dei sistemi emoglobinici di
due specie di pesci (*Mugil cephalus* e *Ophisurus serpens*)
e di due varianti emoglobiniche umane
(*HbRoma* e *HbF-SS-Monserrato*)**

SSD BIO-10

Presentata da:

Claudia Meloni

Coordinatore Dottorato

Professor Emanuele Sanna

Relatore

Professoressa Mariagiuseppina Pellegrini

Esame finale anno accademico 2010 – 2011

Claudia Meloni ha svolto la propria attività di studio e ricerca all'interno della Scuola di Dottorato in Biologia e Biochimica dell'Uomo e dell'Ambiente, curriculum Biochimica e Biologia Molecolare presso il Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Macrosezione Biomedica.

La dottoranda ha seguito un progetto di ricerca che ricade nell'ambito della Biochimica (settore scientifico-disciplinare BIO/10) dal titolo "**Caratterizzazione strutturale e funzionale dei sistemi emoglobinici di due specie di pesci (*Mugil cephalus* e *Ophisurus serpens*) e di due varianti emoglobiniche umane (*HbRoma* e *HbF-SS-Monserrato*).**"

Lo scopo della ricerca è quello di contribuire alla conoscenza delle relazioni struttura-funzione della molecola emoglobinica mediante la caratterizzazione strutturale e funzionale di emoglobine varianti naturali umane e di quelle presenti in differenti specie animali. In quest'ultimo caso l'analisi comparativa tra le emoglobine presenti nelle diverse specie può contribuire a comprendere come questa proteina nel corso dell'evoluzione si sia modificata in relazione alle differenti esigenze fisiologiche e dell'habitat.

Per la caratterizzazione strutturale delle emoglobine oggetto di studio sono state utilizzate diverse tecniche elettroforetiche (IEF, AUT-PAGE), cromatografiche (cromatografia ad esclusione molecolare, a scambio ionico ed RP-HPLC) e tecniche di spettrometria di massa, mentre la caratterizzazione funzionale è stata effettuata mediante esperimenti di equilibrio con l'ossigeno.

La caratterizzazione del sistema emoglobinico del *Mugil cephalus* sono stati pubblicati nella rivista *J Comp Physiol* [Olianas A, Meloni C, Messina I, Sanna MT, Castagnola M, Manconi B, Salvatori S, Giardina B, Pellegrini M (2011) 181:187-97] e ha evidenziato la presenza di due componenti emoglobiniche, HbI e HbII, identiche dal punto di vista funzionale, suggerendo che l'eterogeneità emoglobinica che spesso caratterizza i pesci non può semplicemente essere spiegata come una risposta evolutiva alle necessità fisiologiche e ambientali delle specie, ma che è molto probabilmente altre funzioni biologiche parallele dell'emoglobina siano implicate in questi meccanismi di adattamento molecolare.

Il sistema emoglobinico dell'*O. serpens* risulta invece costituito da una emoglobina catodica e quattro emoglobine anodiche maggiori, diverse sia dal punto di vista strutturale che dal punto di vista funzionale: da un lato l'Hb catodica sembrerebbe garantire un adeguato apporto di ossigeno ai tessuti in condizioni di ipossia e acidosi, dall'altro il ruolo

delle emoglobine anodiche sembrerebbe quello di pompare l'ossigeno all'interno della vescica natatoria e di consentire al pesce di mantenere il giusto assetto.

L'interesse per la caratterizzazione strutturale e funzionale delle varianti naturali umane deriva dal fatto che forniscono un'ottima opportunità per capire il ruolo di un determinato residuo aminoacidico all'interno della struttura dell'emoglobina e per verificare gli effetti funzionali dovuti alla sua sostituzione.

La variante HbF-Monserrato-Sassari è la prima, tra le varianti fetali note, a presentare una sostituzione della cisteina in posizione $\gamma 93$ (F9) con un'arginina. I dati relativi alla sua caratterizzazione sono stati pubblicati nella rivista *Biochimica et Biophysica Acta* [Pellegrini M, Manconi B, Olianas A, Sanna MT, Meloni C, Pirastu M, Mereu P, Leoni G, Masala B (2011) 1810:1272-7] e indicano che la sostituzione della cisteina $\gamma 93$ comporta delle alterazioni funzionali nella proteina, in quanto, rispetto all'emoglobina fetale normale, la variante HbF-Monserrato-Sassari presenta una elevata affinità per l'ossigeno, un ridotto effetto Bohr e una ridotta cooperatività.

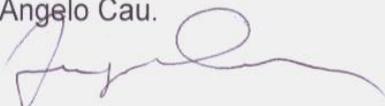
La variante Hb Roma è caratterizzata invece dalla sostituzione della alanina, normalmente presente in posizione $\beta 115$ (G17), con una valina. Anche in questo caso i dati funzionali ottenuti, pubblicati nella rivista *Biochimica et Biophysica Acta* [Manconi B, De Rosa MC, Cappabianca MP, Olianas A, Carelli Alinovi C, Mastropietro F, Ponzini D, Amato A, Pellegrini M (2010) 1800:327-337], indicano che la sostituzione Ala \rightarrow Val $\beta 115$ (G17) comporta delle alterazioni funzionali dell'emoglobina, la quale ha mostrato un significativo incremento dell'affinità per l'ossigeno rispetto all'HbA normale.

La dottoranda, durante la Scuola di Dottorato, ha svolto attività di tutoraggio presso l'Università degli Studi di Cagliari nel Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia della Facoltà di Medicina e Chirurgia e nei Corsi di Laurea in Farmacia e in Tossicologia della Facoltà di Farmacia; inoltre ha partecipato in qualità di relatore a diversi congressi nazionali organizzati dalla Società Italiana di Biochimica.

Come risulta dalla qualificata produzione scientifica, la dottoranda Claudia Meloni ha dimostrato di possedere ottime capacità di ricerca e ha inoltre dimostrato buone capacità didattiche e apprezzabili attitudini relazionali.

Il Direttore della Scuola di Dottorato di Ricerca

Prof. Angelo Cau.



INDICE

1.INTRODUZIONE	PAG. 5
1.1.Proprietà strutturali dell'emoglobina umana	PAG. 6
1.2.Le proprietà funzionali dell'emoglobina	PAG. 8
1.3.Organizzazione ed espressione dei geni globinici	PAG. 14
1.4.La spettrometria di massa	PAG. 17
2.SCOPO DELLA RICERCA	PAG. 25
3. IL SISTEMA EMOGLOBINICO DEL <i>Mugil cephalus</i>	PAG. 26
3.1.MATERIALI E METODI	PAG. 28
Emolisi	PAG. 28
Tecniche elettroforetiche	PAG. 28
Tecniche cromatografiche	PAG. 29
Determinazione della massa delle catene globiniche	PAG. 29
Studi funzionali	PAG. 30
3.2. RISULTATI	PAG. 31
3.3. DISCUSSIONE	PAG. 37
4. IL SISTEMA EMOGLOBINICO DELL' <i>Ophisurus serpens</i>	PAG. 42
4.1.MATERIALI E METODI	PAG. 43
Emolisi	PAG. 43
Tecniche elettroforetiche	PAG. 43
Tecniche cromatografiche	PAG. 44
Determinazione della massa delle catene globiniche	PAG. 45
Digestione triptica e analisi RP-HPLC-ESI-MS	PAG. 45
Studi funzionali	PAG. 47
4.2. RISULTATI	PAG. 48
4.3. DISCUSSIONE	PAG. 57
5. Hb Roma[β115(G17)Ala→Val]	PAG. 64
5.1.MATERIALI E METODI	PAG. 65
Emolisi	PAG. 65
Tecniche cromatografiche	PAG. 65
Determinazione della massa delle catene globiniche	PAG. 66
Digestione triptica e analisi RP-HPLC-ESI-MS	PAG. 66
Studi funzionali	PAG. 67

5.2. RISULTATI	PAG. 67
5.3. DISCUSSIONE	PAG. 72
6. HbF-Monserrato-Sassari [^Gγ93(F9) Cys→Arg]	PAG. 75
6.1.MATERIALI E METODI	PAG. 77
Emolisi	PAG. 77
Tecniche elettroforetiche	PAG. 77
Tecniche cromatografiche	PAG. 78
Determinazione della massa delle catene globiniche	PAG. 79
Studi funzionali	PAG. 79
6.2.RISULTATI	PAG. 80
6.3 DISCUSSIONE	PAG. 84
BIBLIOGRAFIA	PAG. 87

INTRODUZIONE.

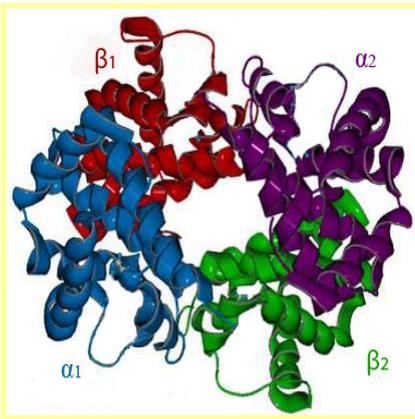
A differenza di quanto accade negli organismi unicellulari, dove l'ossigeno necessario per il metabolismo passa per semplice diffusione, negli organismi complessi la sola diffusione non è in grado di garantire un adeguato apporto di ossigeno. Pertanto nei vertebrati sono presenti delle proteine, le emoglobine, capaci di legare reversibilmente l'ossigeno che attraverso un sistema circolatorio garantiscono un adeguato rifornimento di ossigeno ai tessuti.

L'emoglobina (Hb), contenuta nei globuli rossi del sangue, rappresenta quindi il principale legame tra l'ambiente esterno e l'organismo, in quanto trasporta l'ossigeno dai polmoni (o dalle branchie) ai tessuti e, in senso opposto, la CO₂ e gli ioni H⁺ prodotti nei tessuti. Considerando la varietà di specie in cui l'emoglobina è presente è facile immaginare quanto questa proteina debba esplicare la propria funzione in condizioni fisiologiche e di habitat estremamente variabili e quanto quindi, nel corso dell'evoluzione, si sia adattata modificando le sue proprietà funzionali.

L'enorme quantità di dati raccolti negli anni, fa dell'emoglobina uno dei sistemi più interessanti per lo studio delle interrelazioni tra le condizioni ambientali e l'evoluzione molecolare.

La conoscenza della molecola emoglobinica più abbondante nell'uomo, l'HbA, rappresenta il punto di partenza per lo studio di qualunque altra Hb presente in natura.

1.1. PROPRIETA' STRUTTURALI DELL'EMOGLOBINA UMANA.

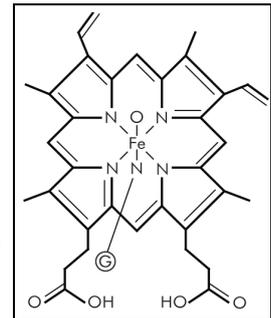


L'emoglobina (PM: 64.500 Da) è una proteina oligomerica, costituita da una porzione proteica e un gruppo prostetico o eme.

La porzione proteica è rappresentata da un tetramero costituito da quattro catene peptidiche, dette globine, uguali a due a due: due sono di tipo α e due di tipo β . Le catene globiniche sono molto simili tra loro sia per la struttura terziaria che per il

numero di residui aminoacidici; le α constano di 141 residui aminoacidi, mentre le β di 146. La struttura terziaria delle globine presenta 8 tratti di α elica denominati con le lettere maiuscole da A ad H, intervallate da tratti privi di struttura secondaria che consentono il ripiegamento creando un ambiente idrofobico atto a proteggere dall'ossidazione l'eme, il quale rappresenta il sito di legame per l'ossigeno.

Il gruppo prostetico eme (PM = 614 Da) è costituito da un anello tetrapirrolico sostituito, la protoporfirina IX, che chela uno ione Fe^{2+} , responsabile del legame con l'ossigeno. Esso è penta-coordinato nella emoglobina deossigenata poiché attraverso 4 legami equatoriali si lega agli atomi di azoto centrali dell'anello porfirinico e con un legame assiale si lega



ad uno degli atomi d'azoto dell'imidazolo della istidina F8, detta istidina prossimale, mentre è esa-coordinato nell'emoglobina ossigenata, in quanto con un ulteriore legame assiale lega la molecola di ossigeno. La sesta posizione di coordinazione viene occupata da una molecola di acqua nella metaemoglobina che ha il Fe^{3+} ed è incapace di legare reversibilmente l'ossigeno. Nella carbosiemoglobina invece è occupata dal CO, estremamente tossico perché presenta un'affinità per l'eme 25000 volte superiore a quella dell'ossigeno. A tal proposito, estremamente importante è l'istidina E7, detta istidina distale, che si trova dal lato opposto rispetto all'istidina prossimale F8 e che svolge un ruolo sterico cruciale nel favorire il legame con l'ossigeno e ridurre l'affinità dell'eme per il CO. Da analisi di cristallografia ai raggi X dei complessi monossido di carbonio-eme è emerso che il legame con il ferro è quasi perpendicolare al piano dell'eme. Nella carbosiemoglobina la presenza dell'istidina E7 determina una inclinazione

dell'angolo di legame di 30° riducendo così l'affinità per il monossido di carbonio di 100 volte. In questo modo il CO prodotto fisiologicamente in basse concentrazioni (circa 1%) non è letale.

Il ruolo che spetta alle globine però è anche quello di creare un alto grado di accoppiamento tra le subunità necessario per la stabilità della struttura quaternaria. Le subunità α e β sono infatti così strettamente associate tanto che si parla dell'emoglobina come di un dimero di dimeri $\alpha\beta$. I contatti $\alpha1\beta1$ e $\alpha2\beta2$ ("packing contacts") coinvolgono 35 residui amminoacidici presenti nelle eliche B, G e nell'angolo GH. Tali interazioni sono importanti per la stabilità del tetramero e impedirebbero l'ossidazione dell'eme. I contatti $\alpha1\beta2$ e $\alpha2\beta1$ ("sliding contacts") coinvolgono 19 residui presenti nelle eliche C e G e nell'angolo FG (Sack et al., 1978). Tali contatti vanno incontro a cambiamenti nel passaggio dalla forma deossigenata a quella ossigenata e perciò sono ritenuti responsabili delle proprietà allosteriche dell'Hb.

Diverse teorie sono state proposte per spiegare le transizioni allosteriche che accompagnano il processo di ossigenazione nell'emoglobina. Il *modello sequenziale* (KNF) proposto da Koshland, Nemethy e Filmer suppone che le globine possano cambiare, una alla volta, la loro conformazione terziaria in seguito all'interazione con la molecola di ossigeno e ipotizza quindi l'esistenza di emoglobine che presentano contemporaneamente delle subunità nello stato a bassa affinità e delle subunità nello stato ad alta affinità. La cooperatività deriva dal fatto che l'ossigenazione di alcune subunità agevola il passaggio alla forma ossi, ad alta affinità, delle altre non ancora legate all'ossigeno (Koshland et al., 1966).

Secondo il *modello concertato* (MWC) di Monod, Wyman e Changeux (Monod et al., 1965), invece, l'emoglobina può esistere solo in due diverse strutture quaternarie in equilibrio tra loro, lo stato R o "rilassato" ad alta affinità per l'ossigeno, tipico della ossiemoglobina, e lo stato T o "teso" a bassa affinità per l'ossigeno che invece è proprio della deossiemoglobina. Secondo questo modello l'ossigenazione parziale sposta l'equilibrio verso la forma R in maniera concertata escludendo quindi l'esistenza di emoglobine miste aventi alcune subunità nella conformazione R e altre nella conformazione T.

In realtà negli ultimi anni, poiché è stato evidenziato che nessuno dei due modelli sia in grado di spiegare correttamente il comportamento allosterico

dell'emoglobina e che quindi un modello non escluda l'altro, sono stati costruiti dei *modelli multistato* che tengono in considerazione i principi sia del modello MWC che quelli del modello KNF. Il legame ed il rilascio dell'ossigeno determinano un cambiamento conformazionale da una struttura all'altra e quindi la transizione reversibile $T \rightarrow R$ il cui equilibrio è regolato dalla costante allosterica $L = T/R$. In base al modello MWC, il processo di ossigenazione e di deossigenazione può essere definito anche dal parametro $c = K_T / K_R$ indipendente da L . Il valore di L dà una indicazione della stabilità relativa delle strutture quaternarie T ed R in assenza di ossigeno, mentre c è il rapporto delle costanti di affinità per l'ossigeno dello stato T (K_T) e dello stato R (K_R).

Lo stato T è stabilizzato da 8 ponti salini intra e intercatena che, visti i cambiamenti strutturali che avvengono a partire dal momento in cui l'ossigeno si lega ad una subunità dell'emoglobina, sono invece assenti nello stato R . In particolare quando l'atomo di ossigeno si lega ad una delle subunità della deossi-Hb, si ha una riduzione del raggio atomico dello ione ferroso che gli consente di inserirsi nel piano dell'anello porfirinico trascinando con sé l'istidina prossimale cui è legato e l'intera elica F . Questa modificazione conformazionale viene trasmessa alle altre subunità attraverso i punti di contatto fra le catene determinando la rottura dei ponti salini tipici della forma T e la conseguente transizione alla forma R . Altri eventi connessi all'ossigenazione sono la rotazione del dimero $\alpha_1\beta_1$ rispetto al dimero $\alpha_2\beta_2$ di circa 15° e un movimento della subunità $\alpha_1(\alpha_2)$ rispetto alla $\beta_1(\beta_2)$. I contatti $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ sono quelli che, rispetto a quelli $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$, subiscono i principali cambiamenti durante la transizione (Yasuda et al., 2002). L'ossigenazione sposta quindi l'equilibrio fra le due strutture quaternarie in favore della forma R a più alta affinità: un'interazione di questo tipo è un esempio di cooperatività positiva.

1.2. PROPRIETA' FUNZIONALI DELL'EMOGLOBINA

Da quanto riportato sopra risulta che l'Hb è una proteina allosterica per la quale l'ossigeno funge da effettore omotropico positivo e consente alla proteina di legare l'ossigeno in maniera efficiente dove la sua pressione parziale è elevata (a livello polmonare o branchiale) e di cederlo laddove i valori di pressione si abbassano (a livello tissutale).

Oltre a questo meccanismo, comune a tutte le emoglobine, l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno viene modulata, in condizioni fisiologiche, anche da altri effettori allosterici che, avendo una maggiore affinità per lo stato deossigenato, stabilizzano lo stato T e fungono quindi da modulatori negativi, favorendo il rilascio dell'ossigeno a livello dei tessuti. Uno fra questi è rappresentato dagli ioni H^+ che, secondo un meccanismo noto con il nome di effetto Bohr, determinano un abbassamento dell'affinità dell'Hb per l'ossigeno. Dal punto di vista strutturale nell'HbA umana tale effetto è stato attribuito ad alcuni gruppi chimici impegnati nella formazione dei ponti salini che stabilizzano lo stato T. L'analisi ai raggi X della HbA ossigenata a confronto con quella deossigenata ha suggerito che l'effetto Bohr nasce dal fatto che i cambiamenti strutturali associati all'ossigenazione spostano le catene laterali di specifici aminoacidi in un microambiente diverso provocando l'alterazione dei valori di pK dei loro gruppi ionizzabili (Perutz et al, 1969; Perutz, et al., 1980). A pH fisiologico i cambiamenti dei valori di pK associati all'ossigenazione sono tali che l'ossigenazione dell'HbA porta al rilascio di circa 2 protoni. Tre aminoacidi giocano un ruolo fondamentale nell'effetto Bohr alcalino: l'His β 146, la Val α 1 e l'His α 122. Il modello stereochimico proposto da Perutz (Perutz 1970) suggerisce che His β 146 sia l'amminoacido che maggiormente contribuisce all'effetto Bohr alcalino. Nella forma deossigenata l'azoto imidazolico protonato dell'His β 146 forma un ponte salino intracatena con il gruppo carbossilico deprotonato dell'Asp β 94. Tuttavia è noto che nell'effetto Bohr il contributo di un determinato residuo aminoacidico è influenzato dalle interazioni con gli altri due effettori allosterici BPG e ioni cloruro e quindi anche dalla loro concentrazione (Brittain, 2005). Contrariamente all' His β 146, il cui contributo all'effetto Bohr è indipendente dalla presenza di ioni cloruro, è stato dimostrato che il residuo di Val α 1 contribuisce all'effetto Bohr solo in loro presenza (O'Donnell et al., 1979; Van Beek et al., 1979; Van Beek e De Bruin 1980; Fantl et al., 1987). Il pK del gruppo amminico terminale della Val α 1, che nella forma deossigenata forma un ponte salino intercatena con il gruppo carbossilico terminale dell'Arg 141 dell'altra catena α , varia da 8 nella deossiemo globina a 7.25 nella ossiemo globina in presenza della concentrazione fisiologica di Cl^- 100 mM, mentre rimane del tutto invariato a basse concentrazioni di ioni cloruro (Van Beek e De Bruin 1980). Le interazioni tra l'His β 146 e l'Asp β 94 e tra la Val α 1 e l'Arg α 141 vengono a mancare nella forma ossigenata e sono responsabili del rilascio dei protoni da

parte dell'emoglobina rispettivamente per il 40% e per il 20% (Perutz et, 1969, Kilmartin et al., 1973; Kilmartin e Wooton, 1970). Le basi strutturali del contributo del 20% dell'effetto Bohr alcalino attribuito all'His α 122 sono ancora da definire. Infine, le origini del restante 20% sono ancora controverse, ma studi comparativi tra varianti emoglobiniche suggeriscono che siano coinvolte l'His β 143 e la Lys β 144 (Russu et al., 1980; Mathews et al., 1979).

La riduzione dell'affinità dell'emoglobina umana per l'ossigeno nell'intervallo di pH 6-10 viene definito effetto Bohr alcalino; invece l'aumento dell'affinità per l'ossigeno al diminuire del pH, che nell'HbA si verifica al di sotto di pH 6, viene definito effetto Bohr acido, detto anche "reverse" (Perutz et al., 1980).

Nelle condizioni di pH relativamente basso e di elevata concentrazione di anidride carbonica presenti nei tessuti periferici, l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno diminuisce man mano che si legano H^+ e CO_2 . L'anidrasi carbonica eritrocitaria, infatti, catalizza l'idratazione dell'anidride carbonica ad acido carbonico il quale dissocia in ioni H^+ e bicarbonato (HCO_3^-). Quest'ultimo rappresenta la forma principale con cui la CO_2 viene trasportata nel sangue venoso. A livello polmonare il bicarbonato si lega ai protoni rilasciati dall'emoglobina, riformando l'acido carbonico che grazie all'azione catalitica dell'anidrasi carbonica darà H_2O e CO_2 che potrà così essere espirata. La CO_2 inoltre agisce sulla transizione R \rightarrow T anche in maniera diretta, in quanto può legarsi ai gruppi N-terminali non protonati delle catene alfa dell'emoglobina, dando luogo alla carbammino-Hb. I residui carbammino-terminali, dotati di carica negativa, formano legami salini con i residui dell'Arg α 121 e stabilizzano ulteriormente la forma T.

E' bene notare che studi funzionali sulle emoglobine di alcuni pesci hanno evidenziato non solo l'assenza dell'effetto Bohr acido a valori di pH bassi, ma al contrario una così drastica diminuzione dell'affinità per l'ossigeno che l'emoglobina non riesce ad ossigenarsi neanche a pressioni estremamente elevate del ligando stesso (Root 1931; Sholander e Van Dam, 1954; Pelster e Weber, 1991). Questo fenomeno è meglio noto in letteratura col nome di effetto Root e benché non sia ancora del tutto chiaro il meccanismo molecolare che ne sta alla base, si è concordi nell'affermare che a bassi valori di pH, al di sotto di 6, le emoglobine che presentano effetto Root non solo manifestano un decremento dell'affinità per l'ossigeno, ma una perdita della cooperatività con valori del coefficiente di Hill (n_{50}) inferiori all'unità, segno dell'impedimento alla transizione allosterica dallo stato T

allo stato R (Giardina et al., 2004). L'effetto Root è stato correlato alla presenza della vescica natatoria in cui, a seconda delle necessità, possono essere riversate o prelevate quantità differenti di gas attraverso le ghiandole di cui la vescica stessa è rivestita. La quantità di gas prelevata viene regolata in modo da consentire al pesce di galleggiare alla profondità a cui si trova. In realtà l'effetto Root è stato riscontrato anche in pesci privi di vescica natatoria, ma che possiedono una retina poco vascolarizzata, la quale necessita di essere ossigenata anche quando le pressioni di ossigeno sono estremamente basse. Sia la vescica natatoria che la retina possiedono una struttura detta "rete mirabile" in grado di produrre metabolicamente acido lattico. Questo viene secreto in un sistema circolatorio locale contro corrente determinando un notevole abbassamento del pH e conseguentemente un rilascio locale dell'ossigeno da parte dell'emoglobina (Brittain, 2005). La variazione di affinità è talmente marcata che l'ossigeno può essere rilasciato nella vescica natatoria e nella retina anche contro pressioni di centinaia di atmosfere (Scholander et al. 1954). In questo modo, l'effetto Root può essere utilizzato per riempire di gas la vescica natatoria anche a profondità elevate o per mantenere l'ossigenazione dei tessuti retinici scarsamente vascolarizzati anche in ambienti poco ossigenati.

Numerosi studi hanno cercato di spiegare l'effetto Root dal punto di vista molecolare. Negli anni '80 un'analisi comparativa fra le sequenze aminoacidiche dell'HbA umana e dell'emoglobina dei pesci aveva inizialmente fatto attribuire l'insorgenza dell'effetto Root alla sostituzione della CysF9 β con la serina che consentiva la formazione di un legame idrogeno addizionale stabilizzando ulteriormente lo stato T a bassa affinità del tetramero. (Perutz e Brunori, 1982, Parkhurst et al., 1983). In realtà la SerF9 β era stata poi trovata anche in organismi che non presentavano effetto Root (Rodewald et al., 1984) indicando che, anche se probabilmente necessario, questo residuo aminoacidico non è da solo sufficiente a suscitare l'effetto Root. In seguito, attraverso l'analisi cristallografica delle Hb di altri pesci sono state formulate due ipotesi per spiegare la riduzione della cooperatività e la stabilizzazione della forma T tipiche dell'effetto Root. La prima ipotesi suggerisce che la stabilizzazione dello stato T sia dovuta al legame di un protone addizionale tra due residui di acido aspartico, l'Asp95(G1) α e l'Asp101(G3) β , nell'interfaccia α 1 β 2 (Ito et al. 1995; Camardella et al., 1999). La seconda ipotesi suggerisce che ci sia una destabilizzazione della forma R a pH

acidi dovuta alla presenza di un cluster di cariche positive nell'interfaccia $\beta 1\beta 2$ (Mylvaganam et al. 1996). Entrambe le ipotesi sono state in seguito smentite alla luce della struttura dei cristalli della Hb 1 nello stato R del *Trematomus newnesi* che non presenta effetto Root che è stata messa a confronto con le strutture disponibili dell'Hb allo stato T ed R di altri pesci in cui questo effetto è presente (Mazzarella et al, 1999). In seguito, il confronto fra la struttura dei cristalli dell'Hb del tonno nello stato T, a bassi valori di pH, e nello stato R, ad alti valori di pH, ha mostrato un ulteriore meccanismo di controllo dell'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno in funzione del pH (Yokoyama et al., 2004). In particolare la protonazione tra i due residui di acido aspartico, precedentemente suggerita, è stata confermata, ma la sua formazione richiede la presenza di una serina o di una alanina in posizione $\alpha 96$ perché venga espresso l'effetto Root. Inoltre nella struttura della forma T è stata messa in evidenza la formazione di un ulteriore ponte salino tra l'His $\beta 69$ e l'Asp $\beta 72$ dovuta alle modifiche della struttura terziaria della globina β indotte dalla sua interazione con un ligando. A seguito della transizione allo stato R il ponte salino si rompe e vengono rilasciati due protoni per tetramero (Yokoyama et al., 2004). L'alta risoluzione ottenuta successivamente delle strutture cristallografiche di emoglobine dotate di effetto Root ha messo in evidenza che il requisito strutturale minimo per avere l'effetto Root sia il legame di un protone fra l'Asp 95α e l'Asp 101β , che viene stabilizzato dall'Asp 99β (Mazzarella et al., 2006a) e che i residui di istidina giocano un ruolo fondamentale nel modulare l'entità dell'effetto Root (Mazzarella et al., 2006b). Tuttavia in quest'ultimo studio viene messo in evidenza che ogni emoglobina dotata di effetto Root possa avere, almeno per una parte di tale effetto, i propri determinanti strutturali.

Nei mammiferi l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno è regolata allostericamente anche dagli ioni cloruro i quali non vanno a legarsi ad alcun sito specifico, ma neutralizzano la repulsione elettrostatica dovuta alla presenza di cariche positive nella cavità centrale della molecola stabilizzando così la forma T dell'emoglobina (Perutz et al., 1994).

Un altro effettore allosterico in grado di ridurre l'affinità dell'emoglobina umana per l'ossigeno e di stabilizzare la forma T è l'acido 2,3-bisfosfoglicerico (BPG), che deriva dal metabolismo del glucosio ed è presente all'interno dei globuli rossi ad una concentrazione circa uguale a quella dell'emoglobina. La molecola di BPG si

lega alla deossiemoglobina in una cavità centrale che si viene a creare tra le subunità β in cui si affacciano le catene laterali cariche positivamente di alcuni residui aminoacidici delle catene beta. Queste cariche sono disposte in maniera complementare a quelle negative del BPG stabilizzando con ulteriori interazioni elettrostatiche la forma T. Nell'emoglobina umana adulta questi residui sono la valina N-terminale (NA1), l'istidina NA2, la lisina 82 (EF6) e l'istidina 143 (H21) (Arnone, 1972). A seguito del legame con il BPG la disposizione spaziale delle catene β viene modificata. L'elica A, infatti, si muove verso l'elica E e l'elica H si allontana dalla cavità centrale, avvicinandosi al gruppo eme. Di conseguenza le eliche A delle due catene β si avvicinano tra loro, mentre le due eliche H si allontanano. La complementarità stereochimica tra il BPG e il suo sito di legame è specifica della struttura quaternaria che presenta la deossiemoglobina. Nella transizione conformazionale che accompagna il legame con l'ossigeno questa complementarità viene meno, in quanto nella cavità centrale le due eliche H si avvicinano, mentre si allontanano tra loro le eliche A. In queste condizioni la molecola di BPG non è più in grado di interagire con il tetramero e viene rilasciato. La presenza del BPG garantisce il rilascio dall'emoglobina di quantità di ossigeno sufficienti a livello dei tessuti dove la pressione parziale di ossigeno è di circa 20 torr, mentre in assenza di BPG alla stessa pressione parziale l'emoglobina adulta HbA è già quasi completamente saturata e non sarebbe in grado di consentire una normale ossigenazione. La base molecolare del legame del BPG all'emoglobina adulta HbA rende ragione del fatto che l'emoglobina fetale HbF, in cui le catene β sono sostituite da quelle γ , abbia un'affinità maggiore per l'ossigeno. Nelle catene γ in posizione 143 (H21) c'è la sostituzione His \rightarrow Ser rispetto alle catene β dell'emoglobina adulta (Tomita, 1981). Perciò viene a mancare uno dei siti di legame per il BPG con una diminuzione delle interazioni di tale ligando con il tetramero. La maggiore affinità dell'Hb fetale che ne deriva consente il trasferimento di ossigeno dal sangue materno a quello fetale attraverso la placenta.

Se il BPG è il principale modulatore fisiologico delle emoglobine della maggior parte dei mammiferi, in altre classi di vertebrati un analogo ruolo è svolto da altre molecole quali l'inositolo-pentafosfato (IPP) negli uccelli e l'adenosintrifosfato (ATP) e/o il guanosintrifosfato (GTP) nei pesci. In quest'ultimo caso, come per il BPG i siti di legame sono localizzati nelle catene β : nell'emoglobine dei pesci i

residui della valina (NA1) e della lisina (EF6) sono conservati, mentre il residuo dell'istidina (H21) è sostituito da un residuo di arginina o di lisina. Nonostante la sostituzione del residuo di istidina (NA2) con un residuo di glutammato, la presenza di tre residui aminoacidici carichi positivamente è in accordo con il grande effetto del GTP e dell'ATP in queste specie.

Un recente approfondimento del notevole effetto dei fosfati sull'emoglobina catodica di alcuni Anguilliformi ha consentito di evidenziare la presenza di un sito addizionale per il GTP nel *Conger conger* (Pellegrini et al., 2003), nell'anguilla ed in una specie di murena, la *Muraena helena* (Olianas et al., 2005) ed in seguito anche nell'emoglobina principale del cefalo comune, il *Mugil cephalus* (Olianas et al., 2011). Nel primo caso mediante studi di computer modelling sono stati evidenziati i residui aminoacidici coinvolti: la tirosina (C1), la lisina (G6), l'aspartato (H9) e l'arginina (HC3) delle catene α e l'aspartato (G10) delle catene β .

Un altro importante controllo dell'affinità per l'ossigeno è dovuto alla temperatura in quanto la reazione di ossigenazione dell'emoglobina è esotermica ($\Delta G < 0$). Perciò l'incremento della temperatura a livello dei tessuti rispetto ai polmoni sposta l'equilibrio della reazione verso la forma deossigenata, favorendo il rilascio dell'ossigeno, mentre la minore temperatura a livello polmonare opera in senso opposto.

1.3. ORGANIZZAZIONE ED ESPRESSIONE DEI GENI GLOBINICI.

La sintesi dell'emoglobina avviene attraverso l'espressione coordinata di geni che codificano per le globine di tipo α e di geni che codificano per le globine di tipo β .

Le catene α , costituite da 141 aminoacidi, vengono prodotte sotto il controllo di geni localizzati nel genoma umano nel telomero del braccio corto del cromosoma 16, mentre le β , costituite da 146 aminoacidi, vengono codificate da geni situati nella parte distale del braccio corto del cromosoma 11.

Il cluster dei geni globinici α si trova in una regione del DNA di circa 30 kb particolarmente ricca in G+C (60%) e comprende un gene embrionale ζ , tre pseudogeni $\Psi\zeta$, $\Psi\alpha_1$, $\Psi\alpha_2$, i geni fetoadulti α_1 ed α_2 e lo pseudogene θ , disposti secondo l'ordine con cui vengono attivati ed espressi durante i vari periodi dello sviluppo. Gli pseudogeni hanno un'elevata similarità strutturale con gli altri loci globinici, ma presentano delle mutazioni tali da non essere funzionali e quindi non essenziali. I geni di tipo β formano invece un cluster genico della dimensione di

circa 60 kb ricco in A+T che comprende sette geni: cinque funzionali (β , γ^A , γ^G , δ ed ϵ) e lo pseudogene $\Psi\beta$. Il gene ϵ è embrionale ed è attivo fino all'ottava settimana di gestazione, mentre i geni fetali γ^A e γ^G lo sono dall'ottava settimana di gestazione sino al terzo-sesto mese di vita. Infine i due geni adulti β e δ si attivano man mano che diminuisce l'attività dei geni γ e si esprimono al massimo solo dopo la nascita.

Durante lo sviluppo ontogenico umano, la produzione coordinata e bilanciata dei tetrameri tipici di ciascuno stadio di sviluppo (embrionale, fetale e adulto) è regolata da una serie complessa di eventi molecolari noti col nome di *switches* genici, i quali provocano prima l'interruzione dell'espressione dei geni globinici embrionali in favore di quelli fetali e successivamente l'interruzione dei geni globinici fetali in favore quelli adulti. Nell'uomo quindi le emoglobine variano nel corso della vita intrauterina e nei primi mesi di vita: la vita embrionale è caratterizzata dalla presenza della Hb embrionale Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$) e da altri due ibridi Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\epsilon_2\gamma_2$). Dall'ottava settimana di gestazione fino all'ottavo mese dopo la nascita, gli eritrociti contengono l'emoglobina fetale, una miscela di tetrameri $\alpha_2\gamma_2^G$ e $\alpha_2\gamma_2^A$, in cui le catene gamma differiscono nel residuo 136, che può essere una glicina (γ^G) oppure un'alanina (γ^A). Esiste anche una componente minore dell'HbF, chiamata HbF1, caratterizzata da un gruppo acetile o da una molecola di glucosio legati al residuo N-terminale. Negli eritrociti di soggetti adulti troviamo invece la cosiddetta emoglobina adulta (HbA), che deriva da una miscela delle specie HbA (95%-98%) e HbA2 (2%-3%) la cui struttura è, rispettivamente, $\alpha_2\beta_2$ e $\alpha_2\delta_2$.

La sequenza aminoacidica delle catene γ differisce da quella delle catene β per 39 o 40 residui a seconda che in posizione 136 ci sia una alanina (γ^A) o una glicina (γ^G). In generale comunque studi cristallografici hanno dimostrato che la struttura della deoxy-HbF è molto simile a quella della deoxy-HbA. Dei residui modificati nelle catene γ , 22 sono localizzati sulla superficie della molecola e pertanto hanno una scarsa influenza sulle proprietà funzionali dell'emoglobina; altri sono localizzati nell'interfaccia $\alpha_1\gamma_1$ (e $\alpha_2\gamma_2$) e hanno un ruolo importante nel controllare la stabilità dell'ossigeno legato al tetramero, così come per i contatti $\alpha_1\beta_1$ (e $\alpha_2\beta_2$) della HbA. Invece ai contatti $\alpha_1\beta_2$ (e $\alpha_2\beta_1$) così come a quelli $\alpha_1\gamma_2$ (e $\alpha_2\gamma_1$) spetterebbe il compito di regolare la cooperatività di legame con l'ossigeno (Yasuda et al., 2002).

L'espressione dei geni globinici è regolata da processi talmente coordinati da comportare alterazioni fisio-patologiche qualora anche uno solo dei geni codificanti per una data globina sia strutturalmente e funzionalmente alterato. Niente di strano quindi che fra le patologie monogeniche in assoluto più comuni vi siano quelle derivanti da difetti ereditari dell'emoglobina. Tali patologie comprendono:

- **difetti di sintesi delle catene globiniche:** la struttura primaria della proteina non è alterata, ma la sua sintesi è anomala. Questo è il caso delle talassemie in cui si ha una ridotta o assente sintesi delle catene globiniche e in base alla globina oggetto di questa anomalia si parla di talassemia α , β , γ oppure δ ;
- **mutazioni a carico delle sequenze aminoacidiche:** la variante viene prodotta in quantità normali ma la struttura primaria della proteina è alterata. Il difetto molecolare più comune è la singola sostituzione aminoacidica, che se si trova sulla superficie esterna della molecola può non alterare le proprietà funzionali tipiche dell'emoglobina ed in questo caso si definisce silente. In altri casi la variazione strutturale è tale che le conseguenti alterazioni funzionali possono provocare anemia emolitica, cianosi (nelle varianti a bassa affinità per l'ossigeno e nelle metaemoglobine) o policitemia (nelle varianti ad alta affinità per l'ossigeno). Pertanto non si può sottovalutare una loro corretta identificazione.

Il numero di varianti identificate è in continuo aumento, grazie anche alle tecniche di laboratorio sempre più sofisticate. In generale comunque le varianti vengono distinte in comuni o rare a seconda della loro incidenza. Molte di quelle comuni sono state selezionate dalla malaria per il vantaggio selettivo dei portatori sani in ambiente malarico (HbS).

Le varianti emoglobiniche rare interessano invece piccoli gruppi o famiglie e alcune di esse sono talmente instabili da determinare problemi ematologici severi.

- **mutazioni a carico delle sequenze promotrici** responsabili delle sindromi HPFH (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin), nelle quali, a causa di un'alterata regolazione dell'espressione dei geni γ , l'emoglobina fetale è presente in quantità apprezzabili anche nella vita adulta. Ad oggi sono note circa 100 mutazioni che, coinvolgendo i geni γ , determinano HPFH. In generale si assiste ad una riduzione o totale assenza di sintesi di catene β e ad un

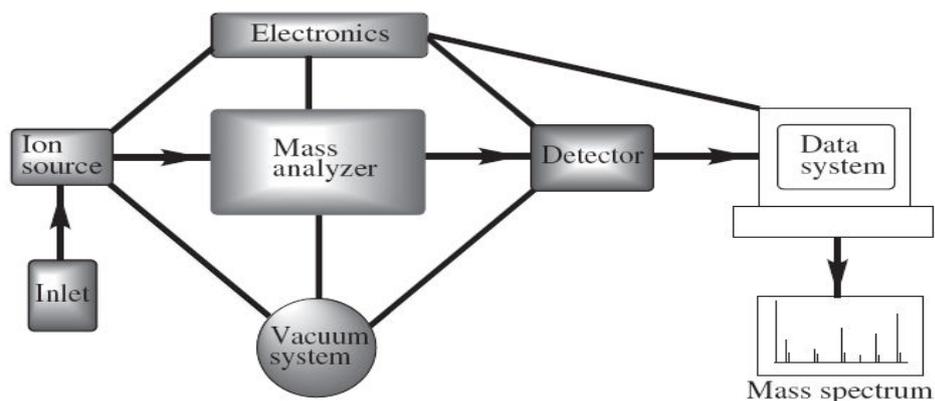
variabile incremento, compensatorio, di produzione di catene γ . Sono note HPFH da delezione in cui è sempre presente una delezione di circa 100 kb che copre la regione compresa fra i geni γ e δ ed i geni δ e β (Rochette et al., 1994). In questo caso l'enhancer localizzato in 3' al gene β attiva continuamente entrambi i geni γ , che in condizioni normali sono invece troppo lontani. Nell'HPFH da non delezione viene mantenuta l'integrità strutturale del *locus* per la globina β , ma sostituzioni nucleotidiche singole nelle sequenze promotrici dei geni $A\gamma$ e $G\gamma$ aumentano l'efficienza trascrizionale del gene fetale nel cui promotore è localizzata la mutazione. Queste HPFH sono associate ad uno stato non patologico e di solito vengono scoperte per caso.

1.4. LA SPETTROMETRIA DI MASSA.

La spettrometria di massa è una tecnica analitica usata per identificare prodotti incogniti, per determinazioni quantitative di composti noti e per chiarire le proprietà strutturali e chimiche delle molecole.

Uno spettrometro di massa è tipicamente composto da:

- Sistema di introduzione del campione
- Sorgente ionica (o camera di ionizzazione)
- Analizzatore (separatore di ioni)
- Rivelatore e sistema di elaborazione dei dati.



Il pre-requisito fondamentale per le analisi di spettrometria di massa è che la molecola da analizzare si trovi allo stato gassoso e venga preventivamente ionizzata. Lo spettrometro di massa infatti non misura la massa molecolare, ma il rapporto massa/carica (m/z) degli ioni che si formano dalla molecola in esame. Inizialmente gli spettrometri di massa richiedevano necessariamente il campione in fase gassosa, ma recentemente l'applicabilità della spettrometria di massa è

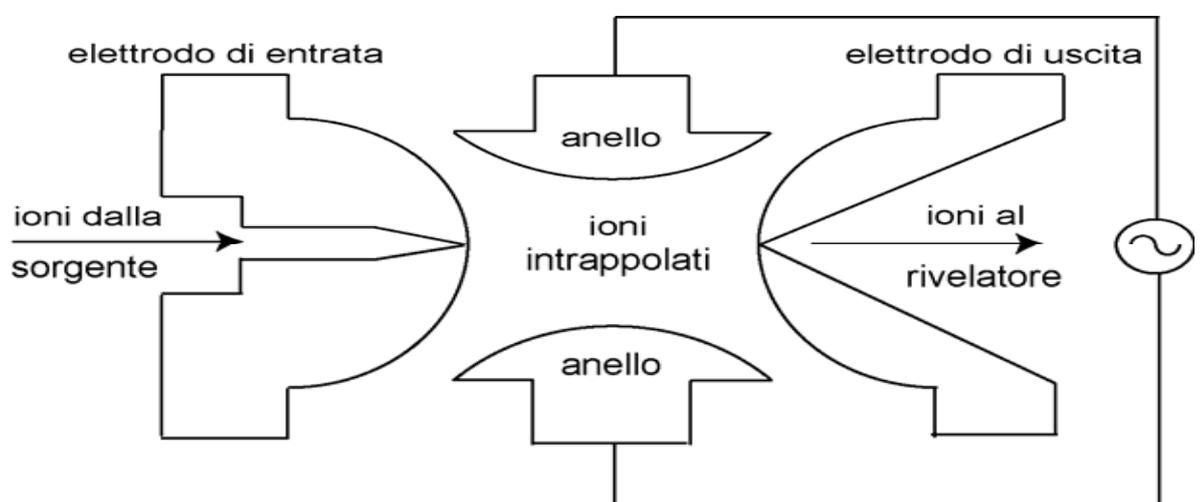
stata estesa anche a campioni in fase liquida che vengono preventivamente vaporizzati. Per ottenere lo spettro di massa di un singolo composto presente in una miscela i vari componenti devono essere separati prima dell'analisi di spettrometria di massa, poiché due composti presenti contemporaneamente nella stessa miscela darebbero luogo a segnali sovrapposti difficilmente distinguibili e renderebbero quindi ambigua l'identificazione del composto d'interesse. Per questo motivo già all'inizio degli anni '60 la spettrometria di massa fu accoppiata alla gas cromatografia (GC) al fine di separare miscele in fase gassosa o vapore. In questo modo infatti è possibile introdurre in tempi diversi i componenti di una miscela così che possano essere separati ed analizzati sequenzialmente. Più recentemente, sempre allo scopo di separare i componenti di una miscela prima dell'analisi di massa, sono stati messi appunto degli spettrometri di massa collegati a sistemi di cromatografia liquida, di cromatografia a fluido supercritico e di elettroforesi capillare.

In generale, una volta separati i componenti di una miscela vengono indirizzati verso il sistema di ionizzazione, che ha un compito cruciale nella spettrometria di massa, in quanto da esso dipende il numero, l'abbondanza e la natura degli ioni che compaiono nello spettro di massa. Le tecniche di ionizzazione vengono distinte in *hard* e *soft* in relazione alle energie messe in gioco. La prima ad essere stata messa a punto è stata la ionizzazione elettronica (E.I.), una tecnica *hard* che richiede obbligatoriamente un campione in fase gassosa. Poiché si tratta di una tecnica di ionizzazione forte che può provocare una estesa frammentazione della molecola e rendere quindi difficoltosa la determinazione del peso molecolare e della struttura di una determinata sostanza, questa tecnica non può essere utilizzata per l'analisi delle macromolecole biologiche. Le tecniche di ionizzazione *soft* operano a bassa energia e vengono definite tecniche di ionizzazione non distruttiva. La prima tecnica *soft* ad essere sviluppata è stata la tecnica *FAB* (*Fast Atom Bombardment*), seguita dalle tecniche *ESI* (*Electrospray ionization*) e *MALDI* (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*).

Nella tecnica **ESI** il processo di ionizzazione avviene a carico di soluzioni in metanolo e acqua, acetonitrile e acqua con tracce di acido acetico, formico o trifluoroacetico che vengono nebulizzate, utilizzando un gas inerte (di solito azoto), attraverso un capillare tenuto ad alto potenziale elettrico (5000-6000 V). Il campo elettrostatico è sufficientemente forte da disperdere la soluzione emergente in una

sottile nube di gocce di solvente contenenti gli ioni. L'elevata temperatura e la presenza di N_2 che attraversa la sorgente a bassa velocità favoriscono il processo di evaporazione del solvente. Man mano che le gocce si rimpiccioliscono, perdendo quella che è la loro sfera di solvatazione, al loro interno aumenta la densità di carica e quando la repulsione elettrostatica supera la tensione superficiale delle gocce queste esplodono liberando i singoli ioni nudi in esse contenuti. In questo modo il campione è posto nelle condizioni ottimali per essere analizzato. Gli ioni fuoriescono dal capillare accelerati dal campo elettrico ad esso applicato e vengono indirizzati all'analizzatore dove, sempre in condizioni di vuoto spinto (10^{-4} - 10^{-8} mmHg), vengono separati in base al loro rapporto m/z .

Gli analizzatori a **trappola ionica (IT)** sono degli analizzatori a quadrupolo tridimensionali (QIT) in cui gli elettrodi, a cui sono applicati dei campi elettrici continui o alternati a radiofrequenze (RF), sono disposti in una geometria a *sandwich*: un elettrodo anulare al centro e due elettrodi identici, uno al di sopra e uno al di sotto dell'elettrodo anulare. Attraverso uno dei due elettrodi assiali gli ioni provenienti dalla sorgente di ionizzazione entrano all'interno della trappola ionica e vengono separati, mentre attraverso l'altro elettrodo avviene il passaggio degli stessi ioni dall'analizzatore al rivelatore.



La separazione è ottenuta il moto degli ioni nel tempo; all'interno dell'analizzatore, infatti, gli ioni si muovono con traiettorie oscillanti secondo un ordine dipendente dal loro rapporto m/z . Aumentando l'intensità dei voltaggi di corrente elettrica e le radiofrequenze applicate ai due elettrodi si provoca una instabilità degli ioni a più elevato rapporto massa/carica i quali vengono deviati nella loro traiettoria verso gli elettrodi assiali e quindi fuoriescono dal campo verso il rivelatore con un tempo

ritardato, secondo un ordine di valore m/z crescente. Gli ioni vanno a collidere sulla superficie del rivelatore che produrrà uno spettro di massa, registrabile su carta o processabile da un computer, che riporta sull'asse delle x i valori di rapporto m/z e sull'asse delle y i valori di abbondanza relativa degli ioni analizzati. La peculiarità della tecnica di ionizzazione ESI è quella di provocare la formazione di ioni multicarica. Per esempio, nel caso di una proteina di peso molecolare 10.000 (Da), con dieci gruppi acidi (C- terminale, acido aspartico e glutammico) e dieci basici (N- terminale, lisine, arginine ed istidine), in ambiente fortemente acido tutti i gruppi acidi saranno protonati e quindi neutri; la proteina avrà quindi una carica di +10 derivante dalla protonazione dei gruppi basici. All'aumentare del pH i gruppi acidi libereranno il protone e diventeranno negativi, generando specie con carica netta positiva minore. Si avrà quindi che la stessa proteina esisterà in soluzione come una miscela di proteine con cariche diverse, le cui percentuali relative (o frazioni molari) saranno funzione del pH e delle costanti di dissociazione dei vari gruppi acidi. Si potranno pertanto osservare segnali a diversi rapporti m/z , come ad esempio:

N° di protoni legati	Specie (Carica)	Massa	Rapp. m/z
1	$[M+1H]^{+1}$	10001	10001.0
2	$[M+2H]^{+2}$	10002	5001.0
3	$[M+3H]^{+3}$	10003	3334.3
4	$[M+4H]^{+4}$	10004	2501.0
5	$[M+5H]^{+5}$	10005	2001.0
6	$[M+6H]^{+6}$	10006	1667.7
7	$[M+7H]^{+7}$	10007	1429.6
8	$[M+8H]^{+8}$	10008	1251.0
9	$[M+9H]^{+9}$	10009	1112.1
10	$[M+10H]^{+10}$	10010	1001.0

Lo spettro di massa della proteina avrà una caratteristica distribuzione di picchi m/z organizzata come una gaussiana. La relazione generale che consente di valutare la massa M dalla sequenza di picchi è data dalla semplice formula: $M = (m \cdot z) - z$, dove M è la massa della proteina integra, m è la m/z osservata e z è la sua carica. Il calcolatore, nel valutare il picco propone anche una carica plausibile. Per comprendere come il calcolatore effettua la scelta della carica si fa riferimento alle abbondanze isotopiche. Come è ben noto ogni atomo esiste in abbondanze isotopiche diverse e definite, infatti, quando il numero di atomi della molecola è elevato, come in una proteina di elevate dimensioni, la probabilità che fra di essi esista un atomo di ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O (e così via) aumenta. In questo modo vicino al picco di massa 10001 sarà presente un picco isotopico di valore m/z 10002, nel quale almeno un atomo (o di H, o di C, o di N, ...) è un isotopo di massa maggiore di un'unità. Si avrà poi il picco corrispondente alla presenza contemporanea sulla stessa molecola di due atomi isotopi di massa maggiore (m/z 10003), e così via. La sequenza dei picchi isotopici del composto monocarica sarà quindi spaziata di 1 Da. Nel caso dei composti multicarica la sequenza dei picchi isotopici sarà spaziata di un valore $1/z$. Ad esempio se viene considerata la molecola tetra-carica $[\text{M}+4\text{H}]^{+4}$, di massa 10004, i picchi isotopici avranno massa 10005, 10006, etc, ed i relativi valori m/z misurati dall'apparecchio saranno 2501.00 (10004/4), 2501.25 (10005/4), 2501.50 (10006/4). Il calcolatore, osservando per questi picchi una spaziatura di 0.25 (1/4) unità di massa, proporrà per la serie dei picchi una carica di + 4 unità e attraverso un'operazione matematica, chiamata deconvoluzione, propone all'operatore la massa più probabile della molecola integra.

Una tecnica molto utile per la caratterizzazione della struttura primaria di un oligopeptide è la **spettrometria di tandem/MS (MS-MS)**. Un sistema tandem/MS può accoppiare fisicamente due analizzatori (*in space MS/MS*) oppure trattenere l'analita entro una trappola e analizzarlo/frammentarlo/ionizzarlo più volte sempre con lo stesso macchinario (*in time MS/MS*). Nel caso della ionizzazione *in space* il primo analizzatore ha la funzione di selezionare (filtrare) tra i vari ioni presenti in uno spettro lo ione desiderato. Questo ione "precursore" o "genitore" viene convogliato in una cella di collisione dove, utilizzando un opportuno gas di collisione (He, Ar), viene frammentato in "ioni figli" i quali vengono poi separati dal secondo analizzatore. Gli analizzatori utilizzati per le procedure *in time* sfruttano

invece la possibilità di trattenere nella trappola ionica tutti gli ioni presenti nello spettro primario, di isolare successivamente lo ione desiderato (espellendo contemporaneamente gli altri ioni dalla trappola) e di frammentarlo. I frammenti così generati in questo caso vengono analizzati all'interno della stessa trappola ionica. Nel caso specifico di questa ricerca, le analisi di spettrometria MS-MS sono state condotte *in time*.

I siti di frammentazione che si ottengono con gli spettri di MS-MS seguono alcune sequenze ben definite e tali sequenze di frammentazione sono codificate in base ad una nomenclatura internazionale. Nella modalità di ionizzazione positiva (la più utilizzata) il protone localizzato sul gruppo amminico terminale di un peptide o di una proteina ha la tendenza a migrare lungo lo scheletro proteico posizionandosi sui gruppi amminici impegnati nei legami peptidici. L'energia fornita attraverso eventi di collisione può portare alla frammentazione dello ione peptide secondo schemi molto caratteristici e documentati in letteratura. Sono tre i tipi di legame in una sequenza aminoacidica: il legame C α -C carbonilico, il legame peptidico C-N e quello N-C α . Teoricamente ognuno di questi tre legami è suscettibile alla rottura, perché la carica può essere trattenuta sia dai frammenti terminali amminici che da quelli carbossilici. I frammenti carichi N-terminali sono denominati a_n , b_n , e c_n , mentre i corrispondenti frammenti carichi C-terminali sono detti x_n , y_n , e z_n (Figura 1).

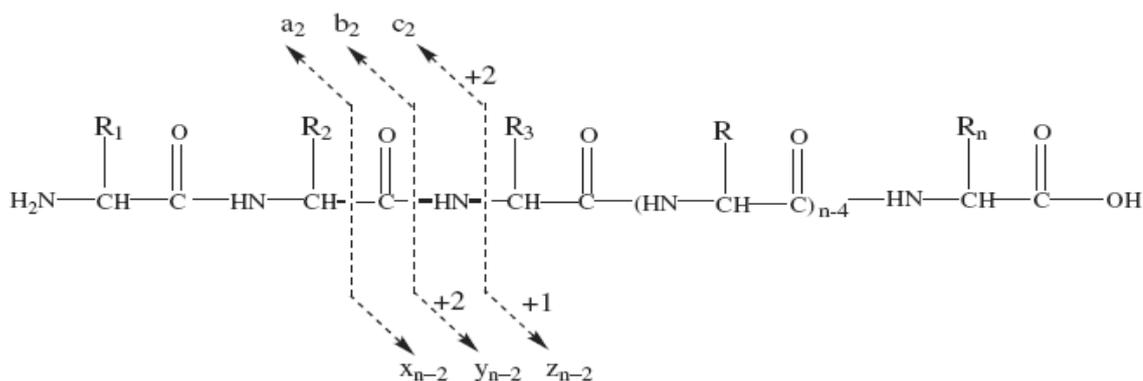


Figura 1. Frammentazioni possibili di un polipeptide sottoposto a dissociazione.

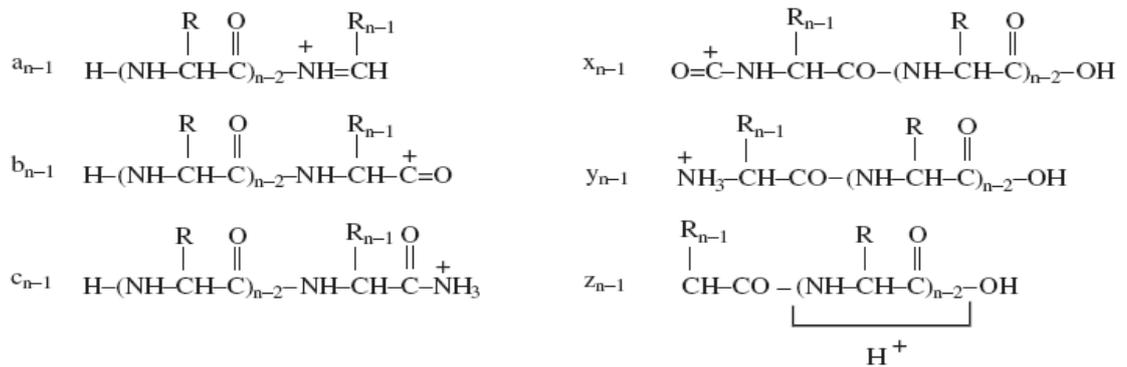


Figura 2. Frammenti di un polipeptide dopo dissociazione indotta.

Tra i diversi ioni illustrati in Figura 2 in realtà sono percentualmente rilevanti solo quelli delle serie *y* e *b*. Altri ioni notevoli sono i cationi immonici e i “frammenti interni” (vedi Figura 3) che derivano da frammentazioni sequenziali nella catena aminoacidica (rottura di un legame C-N e di un legame C-C che liberano un singolo aminoacido o rottura di due legami C-N che liberano un dipeptide, riarrangiato poi con formazione di uno ione immonio interno sull’azoto impegnato nel legame peptidico) e possono andare incontro a loro volta ad ulteriori frammentazioni (anche con perdite neutre di ammoniaca o acqua, sovente da parte di ioni derivati *y* e *b*). L’analisi e l’allineamento di questi ioni/frammenti, possono permettere il sequenziamento *de novo* del peptide target.

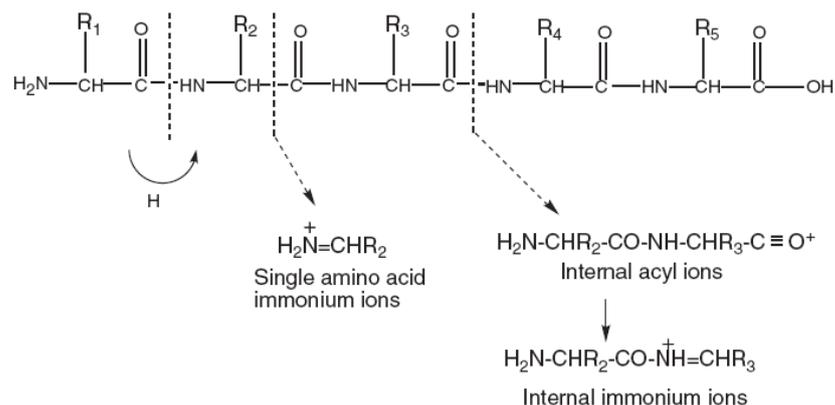


Figura 3. Cationi immonici e frammenti interni.

Nelle procedure *in time* oltre alla trappola ionica si può utilizzare anche l’*Orbitrap*. Lo spettrometro di massa LTQ-Orbitrap può essere considerato come un modello modificato e innovativo della trappola ionica quadrupolare (QIT), in cui però viene utilizzato un campo elettrostatico invece che un campo elettrico oscillante. In

questo caso, gli ioni generati dalla sorgente vengono inviati ad una trappola quadrupolare lineare (LTQ). La trappola lineare accumula gli ioni, li isola, li frammenta e li convoglia verso un quadrupolo a radiofrequenza (chiamato *C-trap* per la caratteristica forma a C) in cui gli ioni vengono compressi in una piccola nube. Da qui gli ioni sono inviati nell'*Orbitrap*, che funziona da secondo analizzatore. Si può decidere di rivelare i frammenti analizzati nel solo LTQ o nell'*Orbitrap*; nel primo caso si ottengono spettri di MS e MS/MS ad alta sensibilità, ma con una bassa risoluzione e accuratezza di massa, mentre gli spettri registrati nell'*Orbitrap* sono più puliti, ossia contengono meno ioni che interferiscono durante l'analisi (rumore di fondo) ed hanno quindi un'alta risoluzione.

In questa tesi la spettrometria di massa (ESI/MS e LTQ-Orbitrap) è stata utilizzata come parte integrante della caratterizzazione strutturale delle catene globiniche.

2. SCOPO DELLA RICERCA.

Questa ricerca ha lo scopo di contribuire alla conoscenza delle relazioni struttura-funzione della molecola emoglobinica mediante la caratterizzazione strutturale e funzionale di emoglobine varianti naturali umane e di quelle presenti in differenti specie animali. In quest'ultimo caso attraverso un'analisi comparativa tra le emoglobine presenti nelle diverse specie sarà possibile verificare come questa proteina nel corso dell'evoluzione si sia modificata in relazione alle differenti esigenze fisiologiche e dell'habitat (Weber, 1990).

In particolare la nostra attenzione è stata rivolta allo studio di due varianti umane, la variante adulta Hb Roma [β 115(g17) Ala→Val] e la variante fetale HbF–Monserrato–Sassari [$^G\gamma$ 93(F9) Cys→Arg], e dei sistemi emoglobinici di due specie di pesci, quello del *Mugil cephalus* e quello dell'*Ophisurus serpens*.

Il sistema emoglobinico del *Mugil cephalus*

3. Il sistema emoglobinico del *Mugil cephalus*.

A differenza dei mammiferi la molteplicità emoglobinica non sembra essere una particolarità rara nei pesci. Le emoglobine multiple differiscono nella sequenza aminoacidica e molto spesso queste differenze strutturali si riflettono anche sulle proprietà funzionali (di Prisco et al., 1992; Weber 1990). In più, come già precedentemente accennato, alcuni pesci mostrano il cosiddetto effetto Root con una notevole riduzione dell'affinità per l'ossigeno e della cooperatività a bassi valori di pH (Root 1931; Scholander et al., 1954; Noble et al., 1986; Pelster et al., 1991, Yokoyama et al., 2004). Sebbene non siano state identificate ancora con certezza le basi strutturali di tale effetto, l'insieme di dati relativi alla sua importanza fisiologica suggeriscono che si tratti di un meccanismo utilizzato dai pesci per riempire di gas la vescica natatoria anche a profondità elevate, e per rifornire di ossigeno, in ambienti poco ossigenati, i tessuti retinici scarsamente vascolarizzati anche (Pelster 2001, Brittain 2005).

All'interno dei globuli rossi il GTP e l'ATP, oltre ai protoni, agiscono da effettori eterotropici negativi, riducendo fortemente l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno (Weber and Jensen 1988). Alcuni studi hanno dimostrato che dei due nucleotidi trifosfato il GTP è spesso il più potente cofattore (Pellegrini et al., 1995, 2003), mentre in altri pesci il suo effetto è del tutto paragonabile a quello dell'ATP (Tamburrini et al., 2001). Inoltre è stato osservato che lo stesso effetto Root in vitro può essere incrementato dalla presenza dei nucleotidi trifosfato (Vaccaro Torracca et al., 1977) e che la loro concentrazione all'interno dei globuli rossi diminuisce in condizioni di ipossia (Weber et al., 1976a) aumentando conseguentemente l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno.

In alcune emoglobine, come ad esempio quella dell'uomo e del dromedario (Zuiderweg et al., 1981; Amiconi et al., 1985; Safo et al., 2001), nelle due emoglobine dell'uccello antartico *Catharacta maccormicki* (Tamburrini et al., 2000) e nell'Hb3 del pesce antartico *Anarhichas minor* (Verde et al., 2002) è stato identificato un sito di legame aggiuntivo per i fosfati organici, mentre in un recente lavoro sono stati trovati due siti di legame per il GTP nell'emoglobina catodica di tre anguilliformi (Olianas et al., 2005). Benché non esista ancora una teoria univoca sul significato biologico della molteplicità emoglobinica, sicuramente grazie all'eterogeneità funzionale delle diverse componenti emoglobiniche il range di condizioni all'interno delle quali l'emoglobina può trasportare l'ossigeno è più

ampio, consentendo all'organismo di adattarsi non solo a diversi ambienti di vita, ma anche alle differenti esigenze fisiologiche che si manifestano durante il suo sviluppo.

Il *Mugil cephalus*, oggetto di questo studio, appartiene alla famiglia Mugilidae e vive tra i 42°N e i 46°S di latitudine in estuari intertidali e habitat marini costieri e d'acqua dolce. Nonostante la facile reperibilità di questa specie, importante sia a livello gastronomico che industriale, non esistono in letteratura studi sul suo sistema emoglobinico e sulla sua risposta funzionale alle variazioni di pH e alla modulazione esercitata dai fosfati organici.

Lo scopo di questo studio è stato pertanto quello di analizzare le caratteristiche funzionali di un sistema emoglobinico che si adatta a delle condizioni ambientali estremamente diverse dal punto di vista della salinità, della temperatura e della disponibilità di ossigeno.

3.1. MATERIALI E METODI.

Emolisi.

Gli esemplari adulti di *M. cephalus* ($n^{\circ} = 40$ con una lunghezza di circa 35-40 cm) sono stati catturati lungo le coste sarde e immediatamente trasferiti in un acquario con una temperatura dell'acqua intorno a 10-13°C. I campioni di sangue sono stati prelevati con una siringa eparinizzata dalla vena caudale previa anestesia con tricaina-metano-sulfonato (MS222). Il campione di sangue è stato centrifugato per 5 minuti a 4°C a 1000 x *g* e sottoposto a cicli di lavaggio con una soluzione isotonica costituita da Tris/HCl 1 mM e NaCl 1.7 % a pH 8.0 e successive centrifugazioni a 1000 x *g* a 4°C in una centrifuga BECKMAN J2 21 al fine di separare il plasma dai globuli rossi. La lisi dei globuli rossi è stata effettuata con l'aggiunta di un volume di soluzione ipotonica fredda (Tris/HCl 1 mM pH 8.0) seguita da una centrifugazione a 12.000 x *g* per 30 minuti a 4°C. Il supernatante che contiene l'emoglobina è stato utilizzato per le successive analisi.

Tecniche elettroforetiche.

- L'isoelettrofocalizzazione (IEF) ha consentito di identificare il numero di componenti emoglobiniche contenute nell'emolisato del *M. cephalus*. Il supporto utilizzato è rappresentato da un gel di poliacrilammide al 5%, al quale è stata aggiunta una miscela di anfoliti al 40% con un range di pH 5.0 –

7.0 (Manca et al., 1988; Masala et al., 1991). Alla fine della corsa elettroforetica, 3 ore circa a 1000 V, il gel è stato colorato con una soluzione allo 0.1% di Blu di Bromofenolo in etanolo al 50% e acido acetico al 5% e decolorato con una soluzione di etanolo al 30% e acido acetico al 6%.

Tecniche cromatografiche.

- La separazione delle componenti emoglobiniche è stata condotta attraverso una cromatografia a scambio ionico su una colonna di DEAE-cellulosa (25 x 2.5 cm) in tampone Tris/HCl 10 mM a pH 8.5. L'eluizione è stata effettuata utilizzando un gradiente lineare di pH da 8.5 a 8.2 in 150 minuti ad un flusso di 1 mL al minuto. L'assorbanza delle frazioni è stata misurata a 540 nm.
- L'emolisato e le componenti purificate sono state analizzate mediante cromatografia liquida ad alta pressione in fase inversa (RP-HPLC). E' stata utilizzata una colonna C5 Discovery Bio Wide Pore (250 x 4.6 mm, 5µm di diametro delle particelle, Supelco) ad un flusso di 1 mL/min. Il solvente A era costituito da acetonitrile/H₂O (20:80) e acido trifluoroacetico (TFA) allo 0.1% e il solvente B da acetonitrile/H₂O (60:40) e acido trifluoroacetico (TFA) allo 0.1%. Per l'eluizione delle globine è stato utilizzato un gradiente lineare dal 60% al 100% di B in 60 minuti a un flusso di 1 mL/min.
- La cromatografia ad esclusione molecolare condotta su una colonna Sephadex G-25 (25 x 2.5 cm), equilibrata con un tampone Tris/HCl 10 mM a pH 8 e NaCl 0.1 M, è stata utilizzata per ottenere la cosiddetta Hb stripped cioè separata dai modulatori eterotropici quali adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP).

Determinazione della massa delle catene globiniche.

Per gli esperimenti di spettrometria di massa è stato utilizzato uno spettrometro di massa LCQ Advantage (ThermoFinnigan, San José, CA, USA), equipaggiato con una sorgente per elettrobulizzazione (*ESI*) ed un analizzatore a trappola ionica (IT) accoppiato ad un Micro-*HPLC* della ThermoFinnigan (San José, CA, USA) La separazione in RP-HPLC è stata condotta in una colonna Vydac C4 (150 x 2.1 mm, 5µm di diametro delle particelle) utilizzando come eluente A l'acido trifluoroacetico (TFA) allo 0.056% e come eluente B acetonitrile/H₂O (80:20) e TFA allo 0.05 %, applicando un gradiente lineare dallo 0% al 100% di B in 60 min ad un

flusso di 0.2 mL/min. Una valvola a T indirizzava un flusso di 0.133 mL/min al detector (*diode array*) e un flusso di 0.067 mL/min verso la sorgente *ESI*. Gli spettri di massa sono stati acquisiti in modalità di ionizzazione positiva ogni 3 ms, nell'intervallo di valori m/z 300-2000. Il voltaggio di ionizzazione è stato settato a 4.50 kV e la temperatura del capillare a 220°C.

La deconvoluzione degli spettri di massa è stata eseguita automaticamente utilizzando il software fornito con lo strumento e con il software MagTran 1.0. (Zhang and Marshall, 1998).

Studi funzionali.

Per gli studi funzionali sono stati condotti esperimenti di equilibrio con l'ossigeno utilizzando il metodo tonometrico (Giardina et al, 1981) mediante uno spettrofotometro Varian modello Cary 50. Sono stati così determinati i parametri di legame dell'emoglobina per l'ossigeno quali l'affinità, espressa in termini di $\log P_{50}$, e la cooperatività tra gli emi, espressa in termini di n_{50} , coefficiente di Hill. Gli esperimenti sono stati eseguiti alla temperatura di 20° C utilizzando i seguenti tamponi:

- MES/NaOH 0.1M nel range di pH fra 6.0 e 6.8
- HEPES/NaOH 0.1M nel range di pH fra 6.8 e 7.8
- TAPS/NaOH 0.1M nel range di pH fra 7.8 e 8.5

Gli esperimenti sono stati condotti sia in assenza che in presenza di NaCl 0.1 M e/o GTP (o ATP) 1 mM e ad una concentrazione proteica di 3-5 mg/mL.

Inoltre al fine di evidenziare la presenza dell'effetto Root è stata condotta una serie di esperimenti a 20°C in un range di pH 6.0-7.5, in assenza e in presenza di GTP o ATP 1mM, utilizzando i tamponi MES/HEPES/NaOH 0.1 M e NaCl 0.1 M. La frazione di saturazione di ossigeno (Y) per ciascun valore di pH è stata misurata calcolando la media della differenza di assorbanza a tre valori di lunghezza d'onda (540, 560 e 575 nm) a quel pH, e paragonando tale valore a quelli ottenuti dallo spettro a $\text{pH } 8.4 \pm 0.4$ (emoglobina totalmente ossigenata) e da quello ottenuto dopo completa deossigenazione (ottenuta aggiungendo ditionito di sodio).

Per valutare l'effetto della concentrazione del GTP sull'affinità per l'ossigeno dell'Hb è stata effettuata una serie di esperimenti a pH 7.0 e a 20°C, in presenza di concentrazioni variabili di GTP (da 0 a 0.1 M), sia in assenza che in presenza di

ioni cloruro 0.1 M. I dati ottenuti in assenza di ioni cloruro sono stati analizzati utilizzando la classica equazione di binding (Szabo et al., 1976):

$$\log P_{50} = \log P_0 + R \log \frac{1 + K_t [\text{GTP}]}{1 + K_r [\text{GTP}]} \quad (1)$$

nella quale K_t rappresenta la costante di associazione del GTP per la deossiemoglobina e K_r quella per l'ossiemoglobina. Il valore di R indica il numero di siti di legame del GTP per gruppo eme, perciò $R = 0.5$ indica che sono presenti due siti per tetramero.

I dati ottenuti dalla titolazione del GTP in presenza di ioni cloro sono stati analizzati utilizzando la seguente equazione (Amiconi et al. 1985):

$$\log P_{50} = \log P_0 + \frac{1}{4} \log \frac{1 + K_{1t} [\text{GTP}] + K_{1t} K_{2t} [\text{GTP}]^2}{1 + K_{1r} [\text{GTP}] + K_{1r} K_{2r} [\text{GTP}]^2} \quad (2)$$

mediante la quale sono state ottenute le costanti di associazione per i due siti di legame:

- K_{1t} e K_{2t} sono le costanti di associazione per la deossiemoglobina del primo e del secondo sito di legame del GTP.
- K_{1r} e K_{2r} sono le costanti di associazione per la ossiemoglobina del primo e del secondo sito di legame del GTP.

3.2. RISULTATI.

L'emolisato ottenuto da 40 esemplari di *M. cephalus* è stato sottoposto a isoelettrofocalizzazione (IEF) da cui risulta che il suo sistema emoglobinico può presentare due differenti fenotipi con una frequenza molto diversa (Fig.1). Il 90% degli esemplari, infatti, mostra un fenotipo con due componenti emoglobiniche, HbI e HbII, che hanno punti isoelettrici molto simili e la più anodica (HbI) rappresenta circa il 70% dell'emoglobina totale. Il restante 10% degli esemplari mostra una sola componente emoglobinica con mobilità elettroforetica identica all'HbI del primo fenotipo (fig.1).

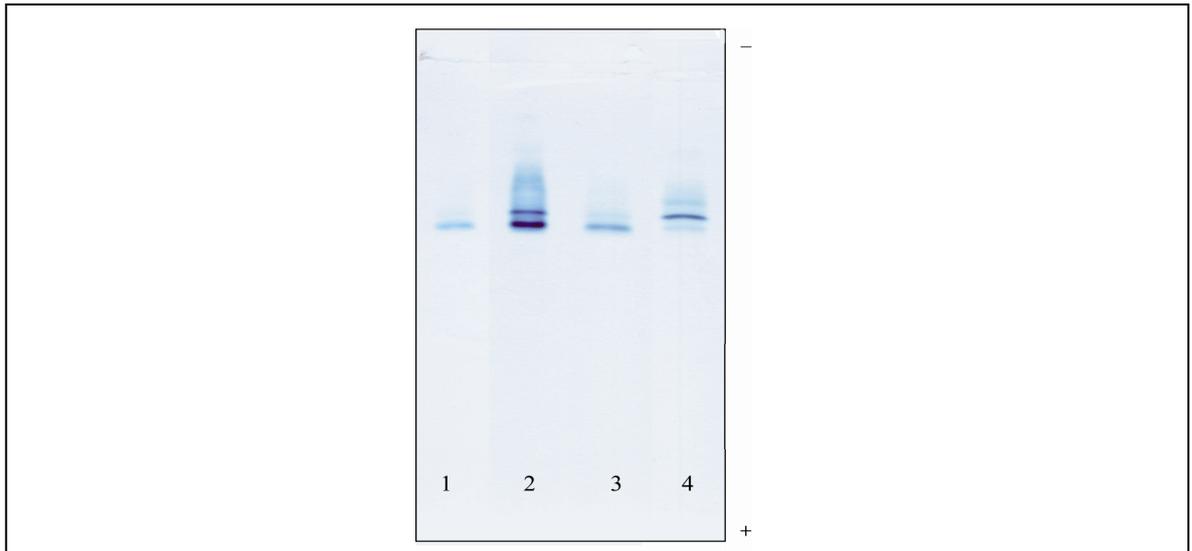


Fig. 1: IEF su gel di poliaccrilamide dell'emolisato e delle frazioni purificate; Linea 1: emolisato del fenotipo meno frequente; Linea 2: emolisato del fenotipo più frequente; Linea 3: HbI; Linea 4: HbII.

In accordo con quanto riscontrato in IEF, la cromatografia in DEAE-cellulosa, effettuata sull'emolisato degli esemplari con il fenotipo più frequente, ha permesso di separare due componenti emoglobiniche (fig. 2) che sono state poi utilizzate per gli studi funzionali.

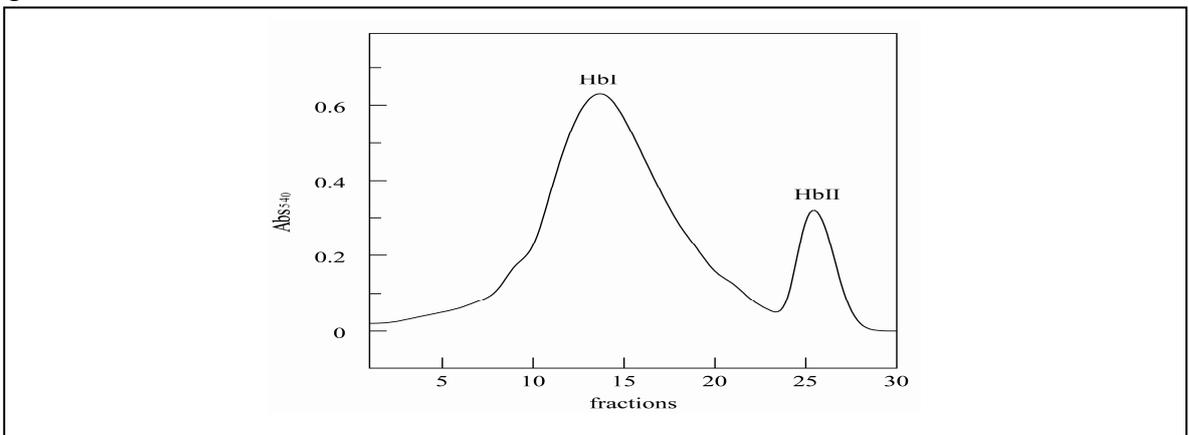


Fig. 2: Profilo di eluizione della separazione delle due frazioni emoglobiniche ottenuta mediante cromatografia in DEAE-cellulosa.

L'emolisato e le due frazioni emoglobiniche separate tramite la cromatografia a scambio anionico sono state quindi analizzate in RP-HPLC (fig. 3). L'emolisato ha mostrato 4 picchi principali, che eluiscono a 29.9, 31.0 32.6 44.2 minuti, mentre il cromatogramma dell'HbI mostra tre picchi principali che eluiscono a 29.9, 32.6 e 44.2 minuti e quello dell'HbII presenta solo due picchi, che eluiscono a 31.0 e 44.2 minuti.

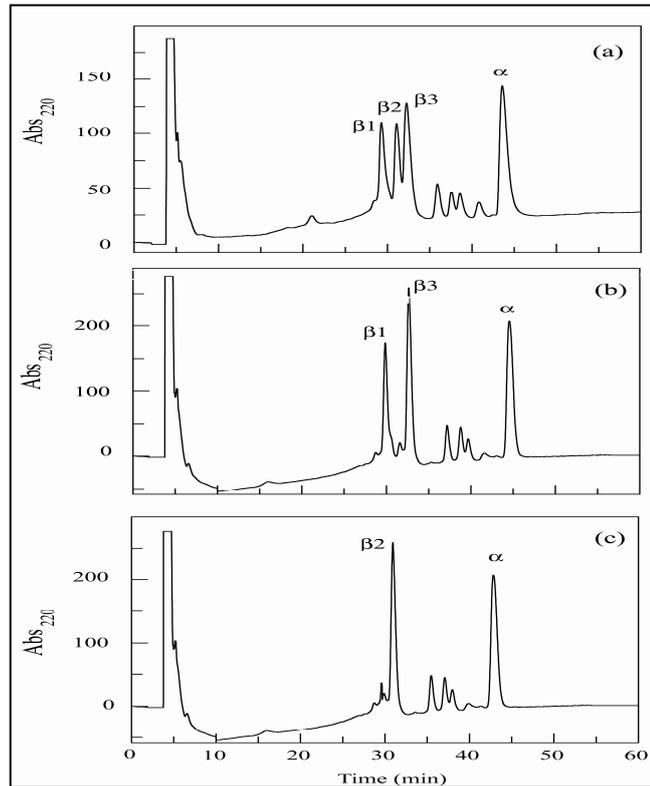


Fig. 3: RP-HPLC dell'emolisato (a) e delle frazioni purificate HbI (b) e HbII (c).

L'analisi RP-HPLC-ESI-MS, effettuata per ottenere ulteriori informazioni sulla struttura del sistema emoglobinico del *M. cephalus*, ha messo in evidenza un pattern ben più complesso sia per l'HbI che per l'HbII.

Infatti l'HbI ha rivelato la presenza di quattro globine: β_1 (15.933 ± 3 Da), β_3 (15.989 ± 3 Da), α_1 (15.335 ± 3 Da) e α_2 (15.361 ± 3 Da) (fig. 4).

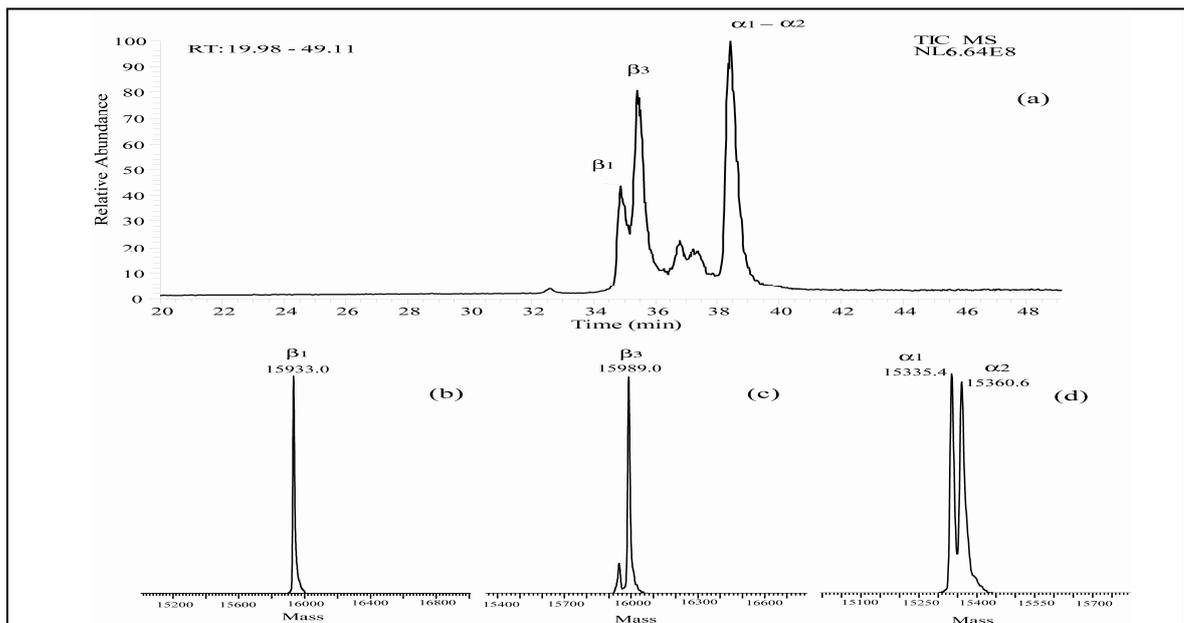


Fig. 4: RP-HPLC-ESI-MS dell'HbI. profilo di corrente ionica totale (TIC) (a); deconvoluzione dello spettro ESI-MS delle catene globiniche (b, c, d).

L'HbII presenta invece tre differenti globine: $\beta 2$ (15.946 ± 3 Da) e le stesse due globine α trovate nell'HbI (fig.5). (Alle globine è stato assegnato un numero in accordo con il loro tempo di eluizione in RP-HPLC).

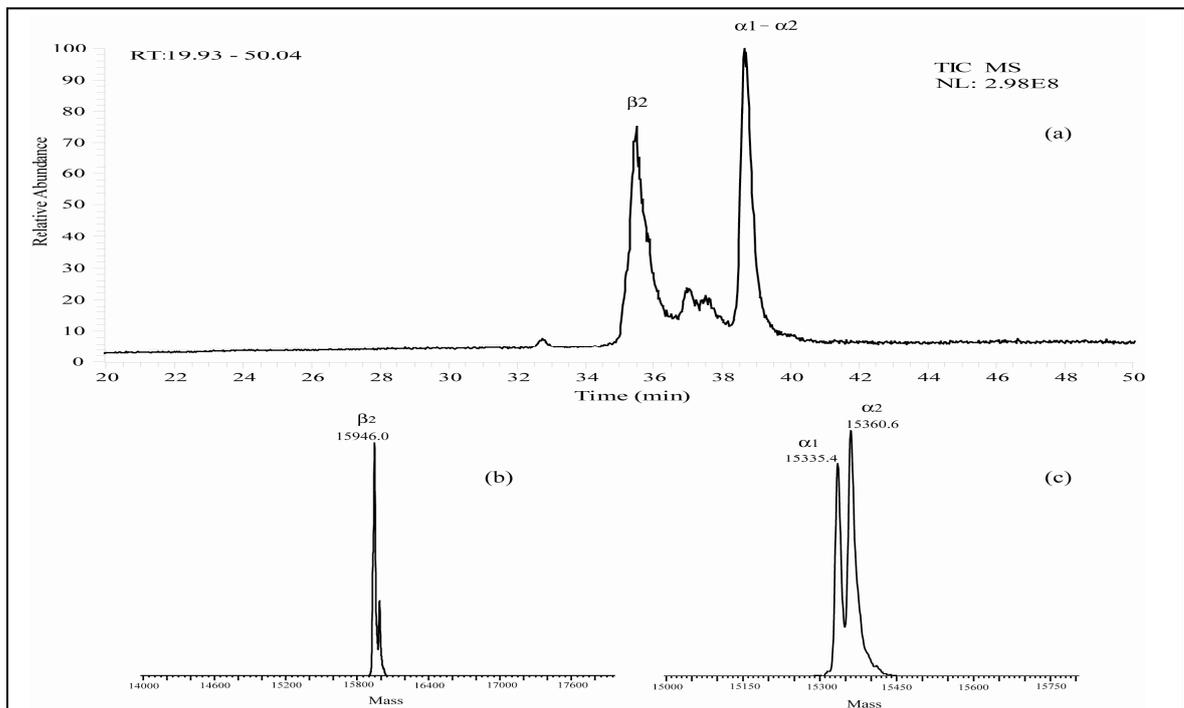


Fig. 5: RP-HPLC-ESI-MS dell'HbII.: profilo di corrente ionica totale (TIC) (a), deconvoluzione dello spettro ESI-MS delle catene globiniche (b,c).

Le proprietà di legame con l'ossigeno dell'emolisato di *M. cephalus* sono state misurate in assenza e in presenza di NaCl 0.1 M e GTP o ATP 1 mM, nel range di pH 6.0-8.5. Nella figura 6 è possibile osservare un ampio effetto Bohr in tutte le condizioni sperimentali utilizzate. In particolare, il coefficiente di Bohr ($\Phi = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$), che indica la media del numero di protoni che vengono rilasciati in seguito all'ossigenazione dell'eme, è pari a -0.73 nell'Hb stripped, -0.93 in presenza di NaCl e -1.1 in presenza dei fosfati organici. Tali valori indicano che l'affinità per l'ossigeno varia notevolmente all'interno del range di pH esaminato. Inoltre gli ioni cloruro provocano un leggero abbassamento dell'affinità per l'ossigeno a valori di pH inferiori a 7.35, mentre i fosfati organici provocano un forte decremento dell'affinità per l'ossigeno, che va aumentando al diminuire del pH.

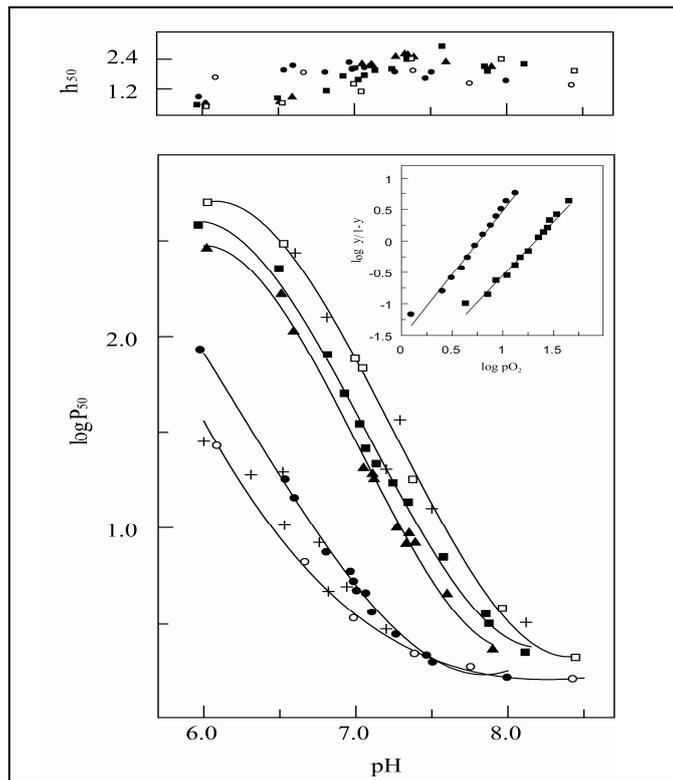


Fig 6. Effetto Bohr. Effetto del pH sull'affinità per l'ossigeno dell'emoglobina del *M.cephalus* espresso in termini di $\log P_{50}$ (a) e la cooperatività espressa in termini di h_{50} (b). Gli esperimenti sono stati condotti in MES/HEPES/TAPS 0.1 M a 20°C e ad una concentrazione proteica di 3-5 mg/mL; emoglobina stripped (\circ), + NaCl 0.1M (\bullet), + NaCl 0.1M e ATP 1mM (\blacktriangle), + NaCl 0.1M e GTP 1mM (\blacksquare), + GTP 1 mM (\square). Il simbolo (+) si riferisce agli esperimenti condotti sulle frazioni emoglobiniche purificate nelle stesse condizioni sperimentali della curva a cui appartengono. Nell'inserto il grafico di Hill degli esperimenti di equilibrio con l'ossigeno condotti a pH 7 in assenza (\bullet) e in presenza (\blacksquare) di GTP 1 mM.

Nell'inserto della figura 6 è riportato un grafico di Hill con due esperimenti di equilibrio con l'ossigeno allo scopo di evidenziare la grande differenza di affinità fra l'esperimento condotto in presenza di GTP 1 mM e quello condotto in sua assenza. Inoltre l'effetto modulatore del GTP è leggermente più forte di quello dell'ATP alla stessa concentrazione: infatti la differenza fra il valore di $\log P_{50}$ ottenuto a pH 7.0 in presenza di GTP e quello in assenza è di 1.05, mentre quando l'ATP sostituisce il GTP tale differenza è di 0.85. Nel grafico si può anche notare un leggero spostamento verso destra della curva relativa agli esperimenti condotti in presenza di GTP rispetto a quelli effettuati in presenza sia di GTP che di NaCl.

Le frazioni emoglobiniche (HbI e HbII) sono state sottoposte ad esperimenti di equilibrio con l'ossigeno al fine di valutare i loro parametri di legame con l'ossigeno (questi dati sono riportati col simbolo + nella fig. 6) ed è stato osservato che non ci sono differenze funzionali né tra l'HbI e l'HbII, né tra l'emolisato e le frazioni emoglobiniche. Inoltre, gli esperimenti di equilibrio con l'ossigeno condotti a pH acido, mostravano grafici di Hill con un andamento bifasico, indice della

presenza dell'effetto Root, che rende l'Hb incapace di saturarsi anche ad elevate pressioni di ossigeno e la cooperatività scende al di sotto dell'unità. Nella figura 7 è riportato l'effetto Root la cui ampiezza risulta molto piccola in assenza di fosfati organici, ma aumenta in loro presenza; nello specifico, a pH 6.4, la percentuale di saturazione a pressione atmosferica è pari al 37% nel caso del GTP e al 40% nel caso dell'ATP.

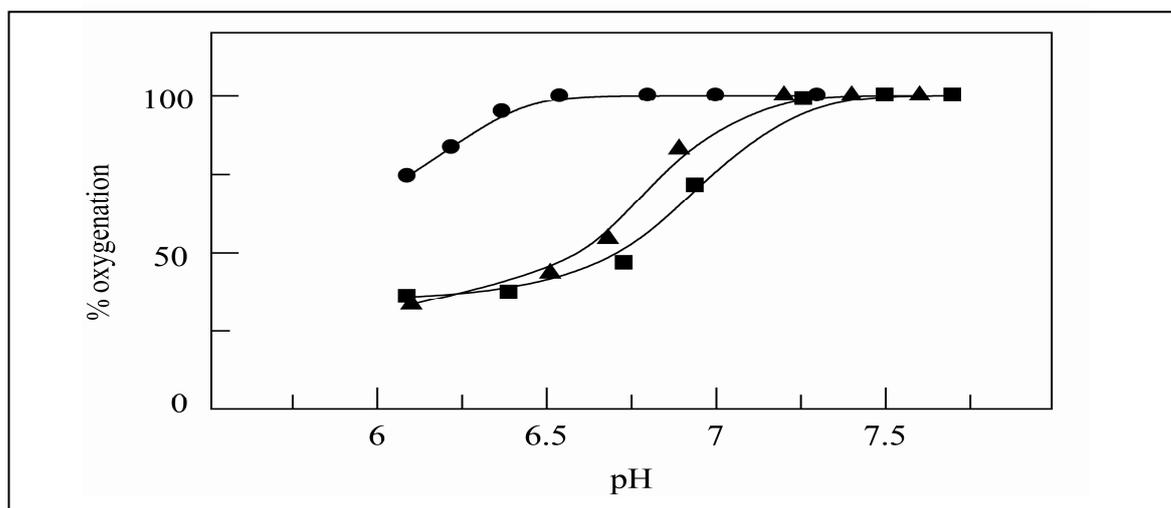


Fig 7. Effetto Root in funzione del pH. Gli esperimenti sono stati condotti a pressione atmosferica in assenza (●) ed in presenza di ATP 1 mM (▲) o GTP 1 mM (■).

Per capire meglio l'interazione tra l'emoglobina e i due anioni GTP e cloruro sono stati effettuati ulteriori esperimenti di equilibrio con l'ossigeno in funzione della concentrazione del GTP in assenza e in presenza di NaCl 0.1 M (fig.8). Fittando i dati sperimentali ottenuti in assenza di NaCl, mediante l'equazione 1 è stato possibile ottenere una curva accettabile solo assumendo che siano presenti due siti di legame per tetramero ($R = 0.5$) e che questi siano indistinguibili l'uno dall'altro. La costante di associazione del GTP per la deossiemoglobina è $K_t = 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e per la ossiemoglobina è $K_r = 1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Invece in presenza di NaCl l'assunzione di due siti di legame equivalenti non ha consentito un fit soddisfacente dei dati sperimentali. È stato perciò necessario supporre che i due siti abbiano una diversa affinità per il GTP e quindi ricorrere all'equazione 2. Le costanti di associazione del GTP per il primo sito della deossiemoglobina è risultata $K_{1t} = 2.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e quello dell'ossiemoglobina $K_{1r} = 2.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, mentre quelle per il secondo sito sono risultate $K_{2t} = 3.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $K_{2r} = 8.0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

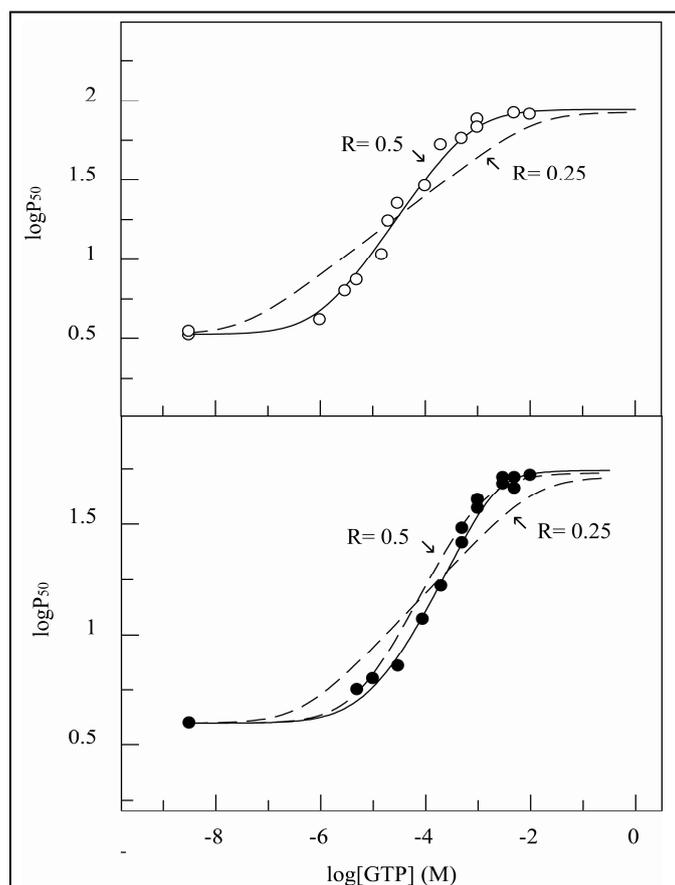


Fig 8. Effetto della concentrazione del GTP sull'affinità per l'ossigeno. Gli esperimenti sono stati condotti a 20°C, a pH 7, in HEPES 0.1 M in assenza (pannello in alto) e in presenza (pannello in basso) di NaCl 0.1 M. Le linee continue rappresentano le curve ottenute con il miglior fit dei dati sperimentali.

3.3. DISCUSSIONE.

Le emoglobine dei pesci hanno per molti anni attirato l'attenzione dei ricercatori dato il loro ampio spettro di proprietà funzionali. La variabilità della pressione di ossigeno, della temperatura e della concentrazione di soluti che caratterizza gli ambienti in cui i pesci vivono hanno indotto delle modifiche nella loro fisiologia (Brunori 1975; Weber et al., 1976a; Weber 1992; Noble et al., 1986) e la stessa emoglobina ha dovuto subire delle variazioni adattative che le consentono di funzionare in un range di condizioni estremamente ampio rispetto alle emoglobine di altri vertebrati (Weber et al., 1976b; di Prisco et al., 1992). Lo stesso effetto Root è un esempio di meccanismo aggiuntivo, rispetto al normale ciclo respiratorio degli altri vertebrati, molto importante per facilitare il rilascio dell'ossigeno a tessuti come la vescica natatoria anche ad elevate profondità dove la pressione di ossigeno è molto elevata.

Le emoglobine multiple, tipiche dei pesci, spesso hanno origine da duplicazioni geniche e in molti casi non sono distinguibili attraverso le tradizionali metodiche

cromatografiche ed elettroforetiche. In passato è stato riportato che il 90% degli esemplari adulti del *M. cephalus* presentava una sola emoglobina (Rizzotti 1993). In questo studio invece, probabilmente grazie alla maggior precisione dei metodi di analisi utilizzati (IEF ed RP-HPLC-ESI-MS), è stato riscontrato che solo il 10% possiede un'unica frazione emoglobinica con tre diverse globine mentre il 90% delle specie analizzate possiede un sistema emoglobinico più eterogeneo.

Con la spettrometria di massa è stato possibile evidenziare una differenza di massa di +56 Da tra le catene $\beta 1$ e $\beta 3$ attribuibile ad una sostituzione Gly \rightarrow Leu/Ile, mentre tra le catene $\beta 1$ e $\beta 2$ la differenza di massa di +13 Da è attribuibile ad una sostituzione Asp \rightarrow Lys, che sarebbe anche responsabile della differenza di carica tra le due frazioni emoglobiniche che ha consentito la loro separazione cromatografica. Invece le due catene alfa, presenti in entrambe le componenti emoglobiniche, avendo una differenza di massa molecolare pari a +26 Da, correlabile con una sostituzione Ser \rightarrow Leu/Ile o con una sostituzione Ala \rightarrow Pro, non manifestano differenze di carica. Tuttavia non sono escluse delle modificazioni post-traduzionali già riscontrate in altre globine di pesci, come ad esempio l'acetilazione.

Dal punto di vista funzionale i risultati ottenuti evidenziano che le due componenti emoglobiniche non differiscono tra di loro né di conseguenza con l'emolisato, suggerendo che l'eterogeneità emoglobinica che spesso caratterizza i pesci non può semplicemente essere spiegata come una risposta evolutiva alle necessità fisiologiche e ambientali delle specie. Bisogna tener conto del fatto che, poiché il muggine si nutre di detriti e organismi bentonici che va a reperire a diverse profondità, ha bisogno di un efficiente meccanismo di galleggiamento; è noto che quest'ultimo è in qualche modo collegato alla capacità delle emoglobine dotate di effetto Root di consentire la secrezione di ossigeno nella vescica natatoria (Pelster and Weber 1991, Brittain 2005). In ogni caso il vantaggio della molteplicità emoglobinica nei pesci richiede ulteriori chiarimenti. Vari fattori oltre all'adattamento (Weber et al., 1976a,b) e ai cambiamenti nei diversi stadi ontogenetici (Wilkins et Iles 1966) sono sicuramente legati a questo fenomeno ed è molto probabile che altre funzioni biologiche parallele dell'emoglobina siano implicate in questi meccanismi (Giardina et al., 1995). La presenza di differenti componenti emoglobiniche in uno stesso eritrocita infatti potrebbe essere importante per la stabilità della molecola e quindi per la durata di vita della cellula

e potrebbe prevenire fenomeni di precipitazione e cristallizzazione al suo interno. Non bisogna comunque escludere che la presenza di una miscela emoglobinica più eterogenea possa essere dovuta alla formazione di emoglobine ibride determinate da una diversa associazione delle catene α e β .

Particolarmente importante è anche il ruolo che, in determinate condizioni, l'ATP e il GTP svolgono sull'affinità per l'ossigeno. È noto infatti che in condizioni di ipossia la concentrazione dei fosfati organici all'interno degli eritrociti può diminuire (Weber 1990) e il GTP potrebbe quindi essere fondamentale nell'adattamento del *M. cephalus* ai livelli di ossigeno dell'ambiente in cui si viene a trovare.

Nell'emoglobina umana il BPG si lega a quattro residui carichi positivamente localizzati nella cavità centrale tra le due catene β : la Val(NA1), l'His(NA2), la Lys(EF6) e l'His(H21). Nelle emoglobine dei pesci la Val(NA1) e la Lys(EF6) sono conservate, mentre l'His(H21) è sostituita in genere da un residuo di arginina (Perutz e Brunori 1982; Gronenburg et al., 1984). Nonostante il residuo di His(NA2) sia sostituito da un residuo acido (Glu o Asp) la presenza di tre residui aminoacidici carichi positivamente è in accordo con il forte effetto del GTP e dell'ATP sull'affinità per l'ossigeno dell'emoglobina dei pesci. Poiché a valori di pH fisiologico entrambi i nucleotidi trifosfato hanno la stessa carica, il maggior effetto del GTP in alcune emoglobine di pesci è stato correlato con la formazione di un legame idrogeno addizionale in grado di aumentare, rispetto all'ATP, la sua complementarità stereochimica al sito di legame. In particolare la sostituzione His \rightarrow Glu in NA2 β , responsabile della formazione del legame idrogeno addizionale, porta a sei il numero di legami coinvolti nell'interazione del GTP con il suo sito di legame contro i cinque dell'ATP (Perutz e Brunoni, 1982). Ulteriore conferma a questa ipotesi venne dal caso dell'Hb IV della trota, dove l'acido glutammico in posizione NA2 β è sostituito da un residuo di acido aspartico e l'ATP e il GTP hanno lo stesso identico effetto. In questo caso infatti il residuo di acido aspartico, avendo una catena laterale più corta impedisce la formazione del legame idrogeno aggiuntivo rendendo del tutto identico il legame dei due nucleotidi al sito di legame (Gronenburg et al., 1984). Tuttavia successivi studi hanno dimostrato che emoglobine di altri pesci, in cui il residuo di istidina in posizione NA2 β è sostituito da un residuo di acido glutammico, presentano la stessa risposta nei confronti del GTP e dell'ATP (Pellegrini et al., 1995; Tamburrini et al., 2001). Questa discordanza tra dati, dovuta ad un numero sempre più alto di

emoglobine di pesci sequenziate, evidenzia come sia estremamente difficile collegare le caratteristiche funzionali di una emoglobina ad uno o pochi residui aminoacidici e quanto siano necessarie molte più informazioni strutturali per poter capire le basi molecolari della modulazione dell'affinità per l'ossigeno indotta dai fosfati nei pesci. Nell'emoglobina del *M. cephalus* il GTP ha un grande effetto sull'affinità per l'ossigeno (la differenza tra il valore di $\log P_{50}$ ottenuto in presenza di GTP 1mM a pH 7.0 e quello ottenuto in sua assenza è di 1.35), uguale a quello dell'emoglobina anodica dell'*Anguilla anguilla* (Fago et al., 1997) ed è maggiore del 30% rispetto all'effetto che il BPG ha sull'emoglobina umana HbA. Inoltre il decremento eccezionale dell'affinità per l'ossigeno indotto dai fosfati organici all'abbassarsi del pH suggerisce che a valori di pH fisiologici il ligando sia in grado di bloccare la proteina nello stato T a bassa affinità. Il marcato effetto Root indica che il rilascio dell'ossigeno causato dai protoni è accentuato dalla presenza di fosfati organici e soprattutto dal GTP.

Un'altra interessante proprietà delle emoglobine del *M. cephalus* è che il range di pH nel quale l'effetto Bohr (o Root) è operativo è sotto il controllo dei fosfati organici in quanto l'apparente pK della transizione è spostato di circa un'unità di pH nel passare dalla condizione di Hb stripped a quella di Hb saturata di fosfati. Tuttavia l'importanza fisiologica dell'effetto dei fosfati, riscontrato anche in altre emoglobine di pesci (Pellegrini et al., 1995; Tamburrini et al., 2001) e probabilmente legato a specifici comportamenti, non è ancora chiaro.

L'analisi delle curve ottenute in funzione di concentrazioni crescenti di GTP indicano la presenza di due siti di legame per il GTP che risultano equivalenti in assenza di cloruri, mentre in loro presenza mostrano una differente affinità per il ligando. Infatti in presenza di ioni Cl^- le costanti di legame del GTP per il primo sito sono un ordine di grandezza più basse di quelle trovate per lo stesso sito in assenza di Cl^- , mentre le costanti per il secondo sito in presenza di Cl^- sono da due a cento volte più basse di quelle rilevate in sua assenza, suggerendo che esista una competizione fra i due anioni per entrambi i siti di legame e che l'affinità per il secondo sito sia più bassa. Sembrerebbe esserci una eterogeneità intramolecolare tra i due siti, indotta dagli ioni Cl^- , il cui significato fisiologico però non è ancora chiaro.

Uno studio condotto sul secondo sito di legame per il GTP presente nell'emoglobina catodica (HbC) di un altro pesce, il *C. conger*, ha messo in

evidenza che le molecole di GTP sono localizzate nella cavità centrale del tetramero dove interagiscono, attraverso legami idrogeno e/o ponti salini, sia con le catene α che con le catene β . In particolare sono coinvolti i residui della tirosina (C1), della lisina (G6), dell'aspartato (H9) e dell'arginina (HC3) delle catene α ed il residuo dell'aspartato (G10) delle catene β (Pellegrini et al., 2003). Tuttavia ulteriori approfondimenti sulla struttura primaria delle emoglobine del *M. cephalus* potrebbero essere utili per valutare correttamente quali siano le relazioni tra la struttura e le proprietà funzionali riscontrate nelle emoglobine di altri pesci. L'analisi comparativa tra le emoglobine presenti nelle diverse specie consentirà di verificare come questa proteina nel corso dell'evoluzione si sia adattata alle differenti esigenze fisiologiche e dell'habitat (Weber, 1990).

Il sistema emoglobinico dell'*Ophisurus serpens*

4. Il sistema emoglobinico del *Ophisurus serpens*.

Precedenti studi hanno messo in evidenza che il sistema emoglobinico degli *Anguilliformi* consiste di una componente chiamata catodica, in quanto presenta un punto isoelettrico maggiore di 8, e diverse componenti anodiche con un punto isoelettrico minore di 8 (Pellegrini et al., 2003; Fago et al., 1995; Fago et al., 1997; Tamburrini et al., 2001).

L'*Ophisurus serpens* appartiene all'ordine degli *Anguilliformi*, famiglia degli *Ophictidae*, genere *Ophisurus*, vive con il corpo completamente infossato nei fondali fangosi tra i 100 e i 200 m di profondità e si avvicina alla costa solo durante il periodo riproduttivo. L'interesse nei confronti di questa specie nasce dal fatto che la scarsa quantità di ossigeno dell'ambiente in cui vive potrebbe aver influenzato il suo sistema emoglobinico e fornisce quindi un'ulteriore opportunità per capire come l'emoglobina si sia modificata nel corso dell'evoluzione in relazione alle differenti esigenze fisiologiche e di habitat di una determinata specie.

4.1. MATERIALI E METODI.

Emolisi.

Gli esemplari adulti di *O. serpens* (n° = 44, con una lunghezza di 80-110 cm e un peso di 130-300 g) sono stati catturati lungo le coste sarde e immediatamente trasferiti in un acquario con una temperatura dell'acqua di 10-13°C. I campioni di sangue sono stati prelevati con una siringa eparinizzata dalla vena caudale previa anestesia con tricaina-metano-sulfonato (MS222). Il campione di sangue è stato centrifugato per 5 minuti a 4°C a 1000 x g e sottoposto a dei cicli di lavaggio con una soluzione isotonica costituita da Tris/HCl 1 mM e NaCl 1.7% a pH 8.0 e successive centrifugazioni a 1000 x g a 4°C in una centrifuga BECKMAN J2 21 al fine di separare il plasma dai globuli rossi. La lisi dei globuli rossi è stata effettuata con l'aggiunta di un volume di soluzione ipotonica fredda (Tris/HCl 1 mM pH 8.0) seguita da una centrifugazione a 12.000 x g per 30 minuti a 4°C. Il supernatante che contiene l'emoglobina è stato utilizzato per le successive analisi.

Tecniche elettroforetiche.

- Le componenti emoglobiniche contenute nell'emolisato sono state identificate tramite una isoelettrofocalizzazione (IEF). Il supporto utilizzato è rappresentato

da un gel di poliacrilammide al 5% al quale è stata aggiunta una miscela di anfoliti al 40% con un range di pH 3.5-10.0 (Manca et al., 1988; Masala et al., 1991). L'elettroforesi viene condotta per 3 ore circa a 1000 V e al termine della corsa il gel viene colorato con una soluzione allo 0.1% di Blu di Bromofenolo in etanolo al 50% e acido acetico al 5% e decolorato con una soluzione di etanolo al 30% e acido acetico al 6%.

Tecniche cromatografiche.

- La separazione delle componenti emoglobiniche è stata condotta attraverso una cromatografia a scambio ionico su una colonna di DEAE-cellulosa (25 x 2.5 cm) in tampone Tris/HCl 10 mM a pH 7.7. Per l'eluizione della prima componente (Hb catodica) è stato utilizzato lo stesso tampone, mentre per l'eluizione delle emoglobine anodiche è stato utilizzato un tampone più concentrato (Tris/HCl 100 mM) a pH 7.0. L'assorbanza delle frazioni da 1.0 mL è stata determinata alla lunghezza d'onda di 540 nm.
- Per eliminare dall'emolisato i fosfati organici è stata utilizzata una cromatografia su colonna di Sephadex G-25 (25 x 2.5 cm) equilibrata con un tampone Tris/HCl 10 mM e NaCl 0.1 M a pH 8.0.
- La separazione delle componenti globiniche è stata ottenuta mediante cromatografia liquida in fase inversa ad alta pressione (RP-HPLC) utilizzando una colonna C18 μ Bondapak (300 x 3.9 mm) ad un flusso di 1 mL/min. Il solvente A era costituito da acetonitrile/H₂O (45:55) e TFA allo 0.2%, mentre il solvente B era costituito da acetonitrile/H₂O (60:40) e TFA allo 0.1%.

L'eluizione è stata condotta nel modo seguente:

- un gradiente lineare dallo 0% all'80% del solvente B per 30 minuti.;
 - un gradiente lineare dall'80% al 100% del solvente B per 5 minuti;
 - il 100% del solvente B per 15 minuti.
- Per determinare la concentrazione di ATP e GTP presente all'interno degli eritrociti è stata utilizzata una cromatografia liquida in fase inversa ad alta pressione (RP-HPLC) condotta su una colonna Symmetry C18 (150 x 2.1 mm) ad un flusso di 0.2 mL/min. Il solvente A era costituito da idrossido di tetrabuttilammonio 10 mM, KH₂PO₄ 10 mM e metanolo all'1% a pH 7.0, mentre il solvente B era costituito da tetrabuttilammonio 2.8 mM, KH₂PO₄ 100 mM e metanolo al 30% a pH 5.5. L'eluizione è stata eseguita nel modo seguente:

- il 100% del solvente A per 12 minuti;
- un gradiente lineare dallo 0 al 40% del solvente B per 2 minuti;
- un gradiente lineare dal 40 al 44% del solvente B per 11 minuti;
- un gradiente lineare dal 44 al 100% del solvente B per 10 minuti;
- il 100% del solvente B per 5 minuti.

I campioni da analizzare sono stati preparati aggiungendo, a 0.2 mL di eritrociti, 0.2 mL di TCA al 10% e la miscela così ottenuta è stata centrifugata due volte per 10 minuti a 1800 x g a 4°C. La concentrazione dei nucleotidi trifosfato è stata determinata misurando l'area del picco a 266 nm e sulla base delle curve di calibrazione precedentemente effettuate.

Determinazione della massa delle catene globiniche.

Per gli esperimenti di spettrometria di massa è stato utilizzato uno spettrometro di massa LCQ Advantage (ThermoFinnigan, San José, CA, USA), equipaggiato con una sorgente per elettrobulizzazione (ESI) ed un analizzatore a trappola ionica (IT) accoppiato ad un Micro-HPLC della ThermoFinnigan (San José, CA, USA). La separazione in cromatografia liquida ad alta pressione RP-HPLC è stata condotta su una colonna Vydac C8 (150 x 2.1 mm, 5µm di diametro delle particelle) utilizzando come solvente A acido trifluoroacetico (TFA) allo 0.056% e come eluente B una soluzione di acetonitrile/H₂O (80:20) e TFA allo 0.05%. L'eluizione è stata condotta applicando un gradiente lineare dallo 0% al 100% di B in 60 minuti ad un flusso di 0.3 mL/min.

La valvola a T indirizza un flusso di 0.2 mL/min verso il detector (*diode array*), e un flusso di 0.1 mL/min verso la sorgente ESI. Gli spettri di massa sono stati acquisiti in modalità di ionizzazione positiva ogni 3 ms, nell'intervallo di valori m/z 300-2000. Il voltaggio di ionizzazione è stato settato a 4.50 kV e la temperatura del capillare a 220°C. La deconvoluzione degli spettri di massa è stata eseguita automaticamente utilizzando il software fornito con lo strumento e con il software MagTran 1.0 (Zhang and Marshall, 1998).

Digestione triptica e analisi RP-HPLC-ESI-MS.

La digestione triptica delle globine è stata effettuata aggiungendo a 50 µl di campione (contenenti circa 100 µg di globine) 49µl di bicarbonato d'ammonio 0.1

M a pH8.0 e 1 μ L di tripsina (1 μ g/ μ L). La miscela è stata poi incubata a 37°C per 5 ore.

Alla fine di ciascuna digestione la miscela dei peptidi è stata analizzata mediante un Ultimate 3000 Nano/Micro HPLC (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) dotato di un modulo FLM-3000-Flow manager, accoppiato ad uno spettrometro LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher, San José, CA, USA) Presso l'Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica dell'Università Cattolica di Roma. La cromatografia è stata condotta ad un flusso di 4.5 μ L/min su una colonna Zorbax 300 SB-C8 (15 cm x 1 mm, 3.5 μ m) utilizzando come eluente A acido trifluoroacetico (TFA) allo 0.056% e come eluente B acetonitrile e TFA allo 0.050% (v/v). L'eluizione è stata condotta nel modo seguente: il 5% di B (isocratico) per 4 min, un gradiente lineare dal 4 al 50% di B per 30 minuti, un gradiente lineare dal 50 al 90% di B per 30 min. Le condizioni sperimentali utilizzate sono le seguenti: la temperatura del capillare 220°C, il voltaggio della sorgente 2.4 kV, il voltaggio del capillare 26 V e il voltaggio delle lenti 245 V.

La deconvoluzione degli spettri di massa ESI è stata ottenuta grazie al software fornito con lo spettrometro e grazie al software MagTran 1.0 (Zhang and Marshall, 1998); l'accessorio Xtract, compreso nel software Xcalibur per lo spettrometro LTQ Orbitrap, è stato utilizzato per la deconvoluzione degli spettri di MS/MS.

I valori di massa sperimentali dei peptidi triptici sono stati confrontati con i valori di massa monoisotopici teorici, ottenuti attraverso il programma *Peptide Mass* (<http://us.expasy.org>), e gli spettri di MS/MS sperimentali ottenuti sono stati confrontati con quelli teorici generati utilizzando il programma *MS-product* (<http://prospector.ucsf.edu/>).

Studi funzionali.

Per gli studi funzionali sono stati condotti esperimenti di equilibrio con l'ossigeno utilizzando il metodo tonometrico (Giardina et al, 1981) mediante uno spettrofotometro Varian modello Cary 50. Sono stati così determinati i parametri di legame dell'emoglobina per l'ossigeno quali l'affinità, espressa in termini di $\log P_{50}$, e la cooperatività tra gli emi, espressa in termini di n_{50} , coefficiente di Hill. Gli esperimenti sono stati eseguiti a 20°C usando i seguenti tamponi:

- MES/NaOH 0.1M nel range di pH fra 6.5 e 6.8;
- HEPES/ NaOH 0.1M nel range di pH fra 6.8 e 7.8;

- TAPS/NaOH 0.1M nel range di pH fra 7.8 e 8.2.

Gli esperimenti sono stati condotti in assenza e in presenza di NaCl 0.1M e/o GTP o ATP 1 mM, ad una concentrazione proteica di 3-5 mg/mL.

Al fine di evidenziare la presenza dell'effetto Root è stata condotta un'altra serie di esperimenti in un range di pH 6.0-7.5 a 20°C, in assenza e in presenza di GTP o ATP 1 mM. La frazione di saturazione di ossigeno (Y) per ciascun valore di pH è stata misurata calcolando la media della differenza di assorbanza a tre valori di lunghezza d'onda (540, 560 e 575 nm) a quel pH, e paragonando tale valore a quelli ottenuti dallo spettro a pH 8.4 ± 0.4 (emoglobina totalmente ossigenata) e da quello ottenuto dopo completa deossigenazione (ottenuta aggiungendo ditionito di sodio).

Per valutare l'effetto della concentrazione del GTP sull'affinità per l'ossigeno delle componenti emoglobiniche è stata fatta un'altra serie di esperimenti a pH 7.0, a 20°C, in assenza ed in presenza di concentrazioni variabili di GTP (da 0 a 0.1 M). I dati ottenuti in assenza di ioni cloro sono stati analizzati utilizzando la classica equazione di binding (Szabo et al., 1976):

$$\log P_{50} = \log P_0 + R \log \frac{1 + K_t[\text{GTP}]}{1 + K_r[\text{GTP}]} \quad (1)$$

nella quale K_t rappresenta la costante di associazione del GTP per la deossiemoglobina e K_r quella per l'ossiemoglobina. Il valore di R indica il numero di siti di legame del GTP per gruppo eme, perciò $R = 0.5$ indica che sono presenti due siti per tetramero.

4.2. RISULTATI.

Il pattern elettroforetico ottenuto mediante l'IEF dell'emolisato è risultato uguale per tutti i 44 esemplari di *O. serpens* analizzati (escludendo così l'esistenza di polimorfismi all'interno della specie) e ha messo in evidenza la presenza di un'unica componente catodica ($pI > 8$) che rappresenta il 36.5% dell'emoglobina totale e di quattro emoglobine anodiche maggiori ($pI < 8$) (Fig. 1).

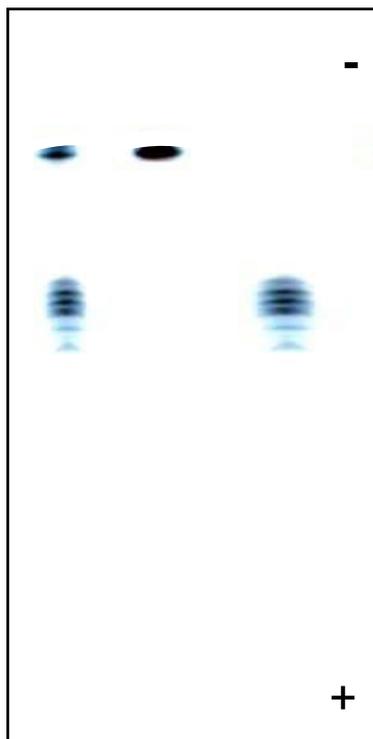


Fig. 1. IEF dell'emolizzato (Linea 1), dell'Hb Catodica (Linea 2) e del pool delle Hb Anodiche (Linea 3).

Nella fig. 2 viene mostrato il profilo di eluizione della cromatografia a scambio anionico su DEAE-cellulosa che ha consentito di separare le due frazioni emoglobiniche. Nella fig. 1 si possono osservare le due frazioni emoglobiniche separate.

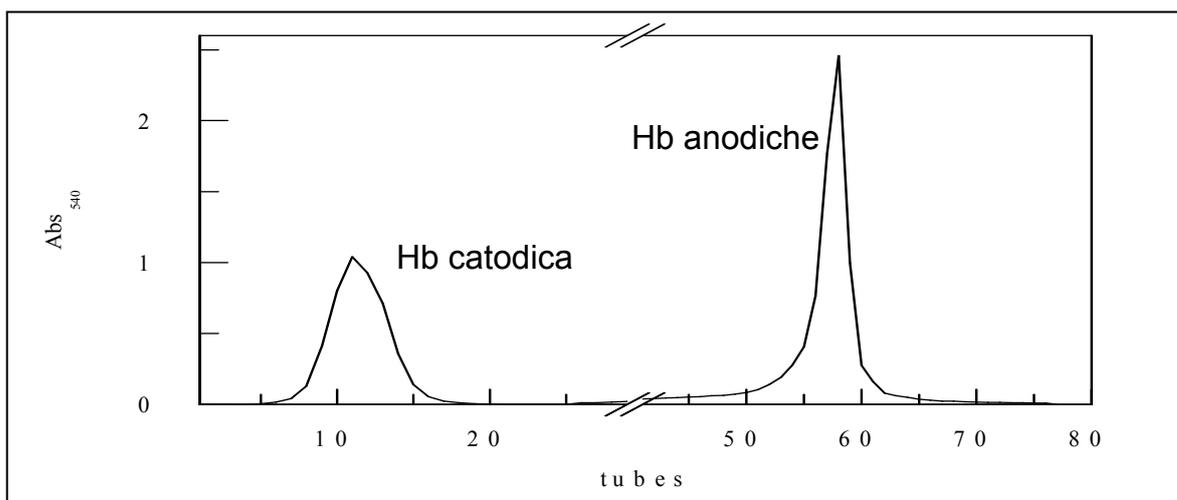


Fig. 2: Profilo di eluizione della separazione delle frazioni emoglobiniche ottenuta mediante cromatografia in DEAE-cellulosa.

Le due frazioni emoglobiniche purificate sono state analizzate mediante RP-HPLC. Il cromatogramma dell'emoglobina catodica mostra due picchi, che eluiscono a 24.3 minuti e a 36.0 minuti, corrispondenti a due catene globiniche (fig. 3A). Il cromatogramma dell'analisi RP-HPLC relativa alle emoglobine anodiche mostra invece 3 picchi, che eluiscono rispettivamente a 29.7, 30.5 e 32.5 minuti (fig. 3B), indicando che le globine appartenenti alle emoglobine anodiche differiscono da quelle dell'emoglobina catodica e che questo tipo di analisi potrebbe aver sottostimato il loro numero, dato che nell'IEF sono state messe in evidenza quattro componenti anodiche maggiori.

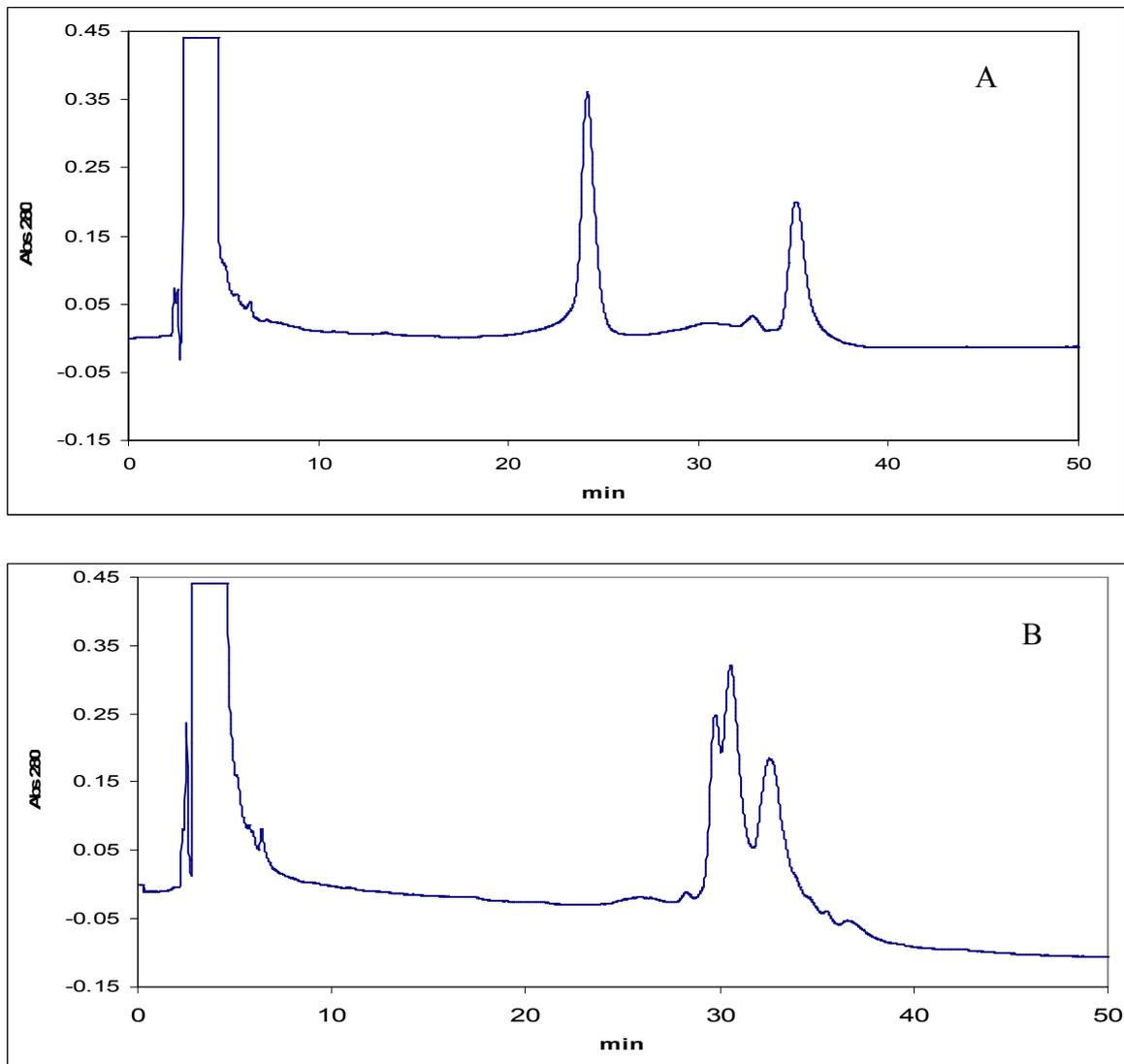


Fig. 3. RP-HPLC dell' emoglobina catodica (A) e delle emoglobine anodiche (B).

L'analisi RP-HPLC-ESI-MS dell'emoglobina catodica ha fornito uno spettro ESI dalla cui deconvoluzione è stato possibile mettere in evidenza due valori di massa,

pari a 15.345 ± 3 Da e 16.004 ± 3 Da, attribuibili il primo alle catene α ed il secondo a quelle β (Fig. 4).

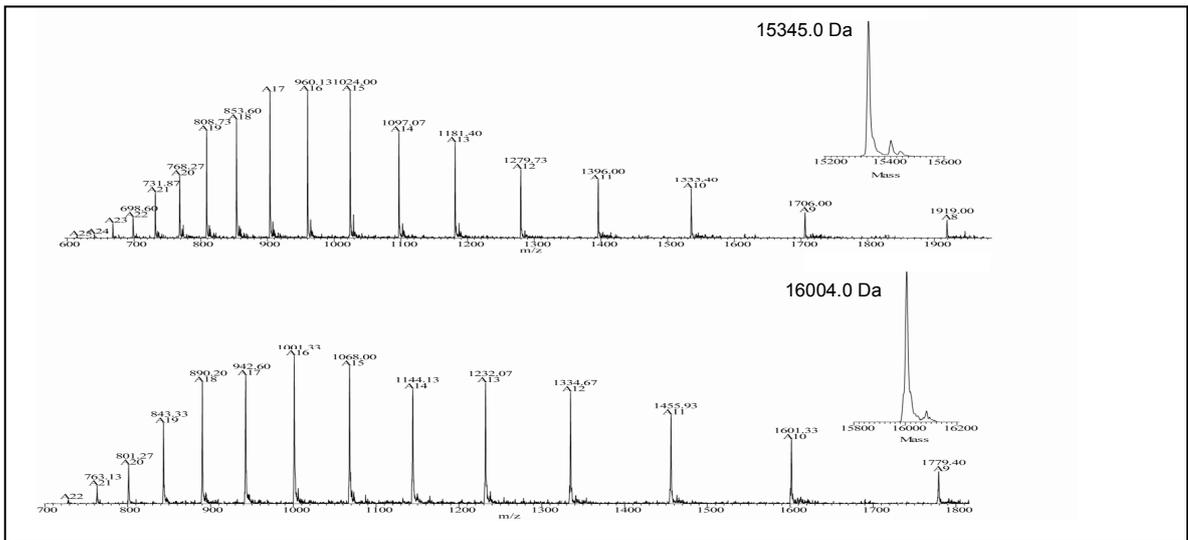


Fig. 4. Spettro ESI-MS e deconvoluzione delle globine relative all'Hb catodica.

L'analisi di spettrometria di massa delle emoglobine anodiche ha mostrato un pattern ben più complesso di quanto rilevato dalla RP-HPLC. La deconvoluzione dello spettro ESI in realtà ha messo in evidenza quattro picchi maggiori e due minori che, sulla base dei loro valori di massa, sono stati assegnati alle globine di tipo alfa o beta. In particolare, i picchi con massa pari a 15.983 ± 3 Da e 16.160 ± 3 Da sono stati attribuiti alle catene α , mentre quelli con massa pari a 16.544 ± 3 Da, 16.572 ± 3 Da, 16.656 ± 3 Da e 16.683 ± 3 Da alle catene β (Fig. 5).

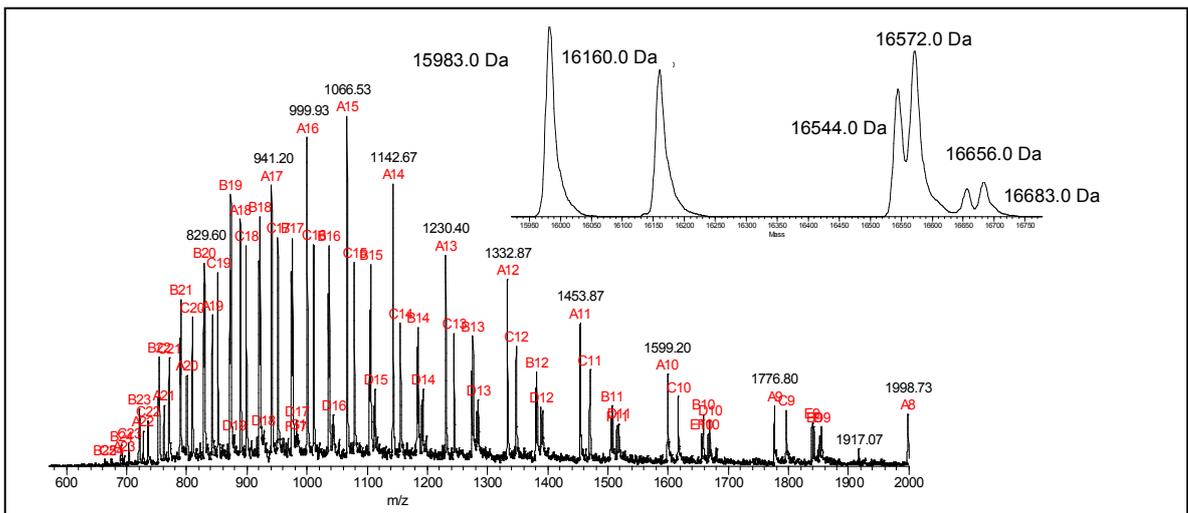


Fig. 5. Spettro ESI-MS e deconvoluzione delle globine relative alle Hb anodiche.

Per ottenere informazioni sulla sequenza aminoacidica delle globine dell'Hb catodica sono stati eseguiti degli esperimenti di tandem MS, dopo digestione triptica delle catene α e β . Nelle figure 6 e 7 viene riportata la sequenza delle

catene α e β finora ottenuta a confronto con le sequenze note di altri Anguilliformi e dell'HbA.



Fig. 6. Sequenza aminoacidica delle catene alfa dell'*O. serpens* a confronto con quella di altri Anguilliformi e dell'HbA.

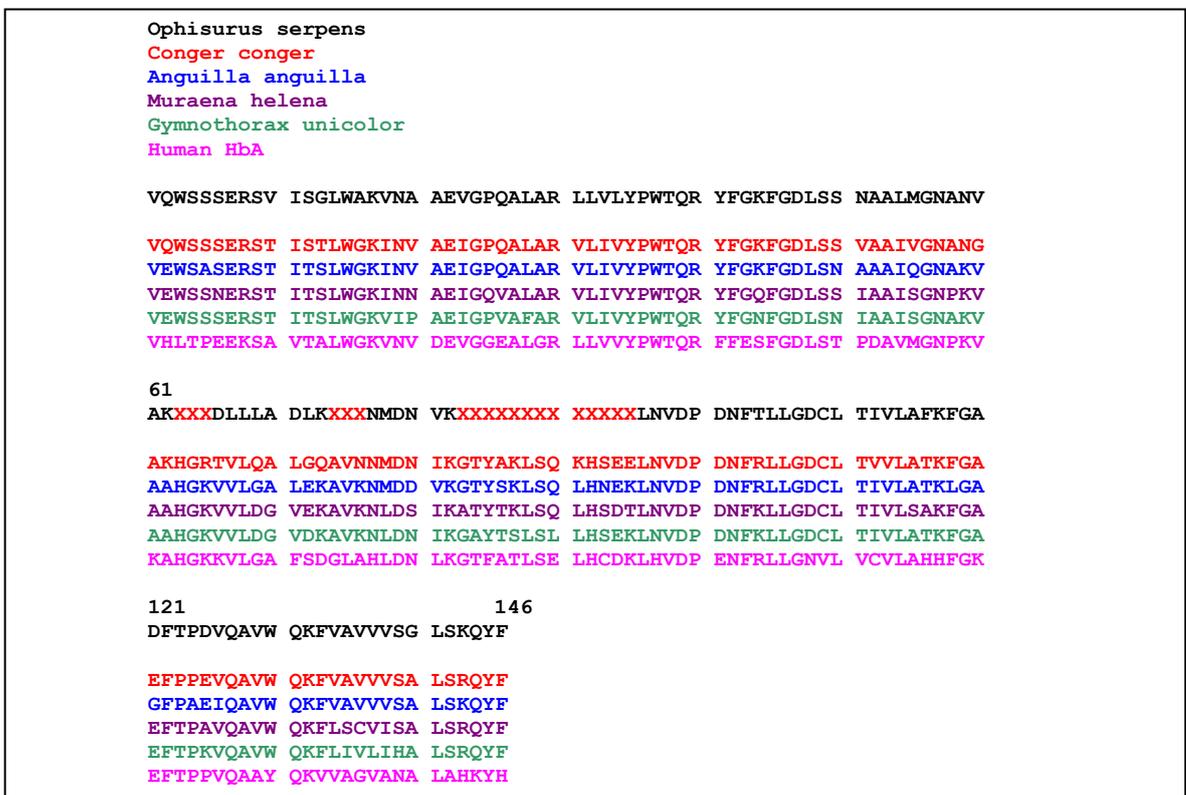


Fig. 7. Sequenza aminoacidica delle catene beta dell'*O. serpens* a confronto con quella di altri Anguilliformi e dell'HbA.

Per quanto riguarda la caratterizzazione funzionale dell'Hb catodica gli esperimenti di equilibrio con l'ossigeno sono stati condotti in assenza e in presenza di NaCl e GTP o ATP, nel range di pH tra 6.5 e 8.0 (Fig.8). In assenza di modulatori l'emoglobina catodica dell'*O. serpens* non solo risulta insensibile alle variazioni di pH, ma mostra, rispetto alle emoglobine catodiche degli Anguilliformi studiati in passato (Olianas et al., 2005), un'affinità intrinseca per l'ossigeno estremamente alta (Tabella 1). Al contrario, in presenza di NaCl si osserva il cosiddetto effetto Bohr "reverse", con una riduzione dell'affinità al crescere del pH ed un coefficiente di Bohr ($\Phi = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$) pari a +0.46, il che indica che in seguito all'ossigenazione del tetramero vengono rilasciati circa due protoni. Quando oltre al cloruro sono presenti i fosfati organici in concentrazione 1 mM, si verifica una notevole riduzione dell'affinità per l'ossigeno; questo effetto viene ulteriormente evidenziato dall'insero della Figura 8 in cui vengono riportati i grafici di Hill di due esperimenti di equilibrio con l'ossigeno allo scopo di evidenziare la grande differenza di affinità fra l'esperimento condotto in presenza di una concentrazione 1 mM di GTP e quello condotto in sua assenza. Inoltre si verifica un aumento significativo della cooperatività: il valore di n_{50} misurato in assenza di fosfati organici è pari a 1.35 ± 0.15 , mentre in loro presenza è pari a 2.12 ± 0.2 . In aggiunta l'ATP ed il GTP modificano l'effetto del pH, eliminando l'effetto Bohr "reverse" e cambiando il segno del coefficiente di Bohr ($\Phi = -0.19$) come già osservato per l'emoglobina catodica del *C. conger* (Pellegrini et al., 2003). Il valore del coefficiente di Bohr indica che in queste condizioni sperimentali la transizione dalla forma T alla forma R dell'emoglobina catodica dell'*O. serpens* è accompagnata dal rilascio di circa 0.76 protoni. Inoltre, a parità di concentrazione, l'effetto del GTP è maggiore rispetto a quello dell'ATP: infatti la differenza fra il valore di $\log P_{50}$ misurato a pH 7.0 in assenza di GTP e quello misurato in sua presenza è di 1.01, mentre quando l'ATP sostituisce il GTP tale valore diventa 0.54.

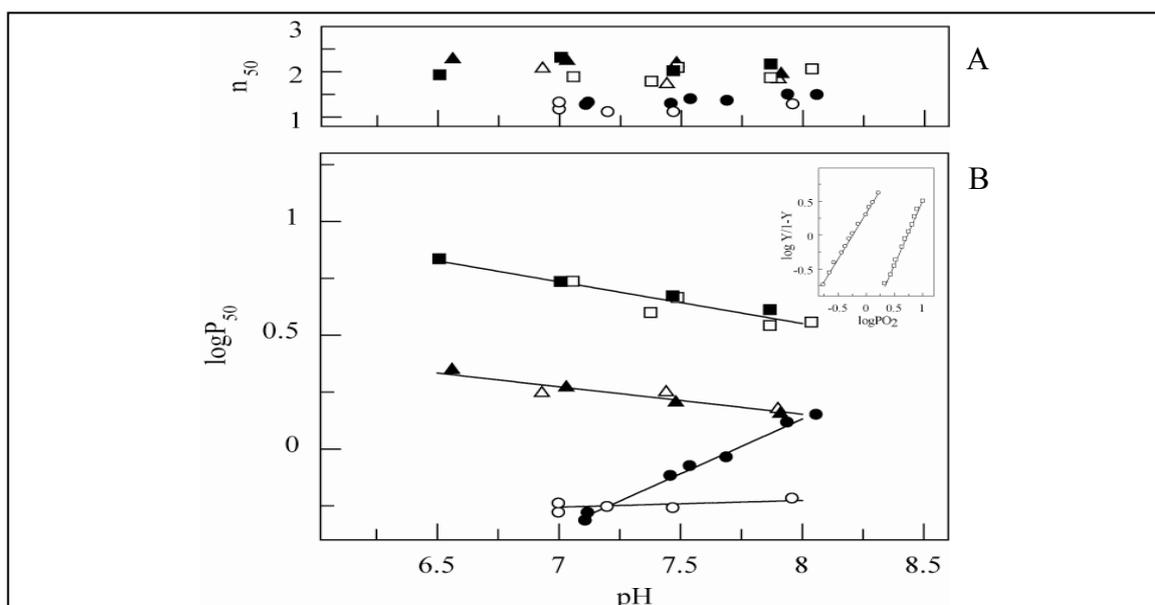


Fig. 8. Effetto Bohr. Effetto del pH sull'affinità per l'ossigeno (in termini di $\log P_{50}$) (B) e sulla cooperatività (espressa in termini di n_{50}) (A) dell'Hb catodica. Gli esperimenti sono stati condotti in MES/HEPES/TAPS 0.1 M a 20°C; emoglobina stripped (\circ), + NaCl 0.1M (\bullet), + ATP 1m M (Δ) + NaCl 0.1M e ATP 1mM (\blacktriangle), + GTP 1mM (\square) + NaCl 0.1M e GTP 1mM (\blacksquare). Nell'insero sono riportati i grafici di Hill degli esperimenti di equilibrio con l'ossigeno condotti in assenza (\circ) e in presenza (\square) di GTP 1 mM.

Tabella 1. Parametri di legame con l'ossigeno dell'Hb catodica dell'*O. serpens* a confronto con quelli di altre quattro specie di Anguilliformi

specie	<i>O. serpens</i>	<i>M. helena</i>	<i>G. unicolor</i>	<i>A. anguilla</i>	<i>C. conger</i>
stripped					
$\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$	0	0	+0.1	+0.3	+0.28
$\log P_{50}$ a pH 7.0	-0.27	+0.32	+0.24	-0.12	+0.02
n_{50}	1.35 ± 0.15	1.2 ± 0.05	1.17 ± 0.05	1.65 ± 0.25	1.6 ± 0.1
+ 0.1 M NaCl					
$\log P_{50}$ a pH 7.0	-0.04	0.6	0.45	0.2	0.37
n_{50}	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.2	2.15 ± 0.15	1.85 ± 0.1
$\Delta \log P_{50}$ a pH 7.0	0.46	0.27	0.21	0.32	0.35
+ concentrazioni saturanti di GTP					
$\Delta \log_{50} / \Delta \text{pH}$	-0.19	-0.19	0	0	-0.11
$\log P_{50}$ a pH 7.0	0.98	1.32	0.85	0.99	1.27
n_{50}	2.0 ± 0.15	2.1 ± 0.2	1.7 ± 0.2	2.16 ± 0.1	2.1 ± 0.2
$\Delta \log P_{50}$ a pH 7.0	1.25	1.03	0.61	1.11	1.25
+ concentrazioni saturanti di GTP e 0.5 M NaCl					
$\log P_{50}$ a pH 7.0	0.99	1.36	0.85	0.99	1.27
n_{50}	2.12 ± 0.2	1.9 ± 0.2	1.7 ± 0.15	2.3 ± 0.15	2.4 ± 0.2
$\Delta \log P_{50}$ a pH 7.0	1.26	1.04	1.04	1.11	1.29

Per capire meglio l'interazione tra l'emoglobina e i due anioni GTP e cloruro sono stati effettuati esperimenti di equilibrio con l'ossigeno in funzione della concentrazione del GTP in assenza e in presenza di NaCl 0.5M (fig. 9). Utilizzando l'equazione 1 per fittare i dati sperimentali è stato possibile ottenere una curva accettabile solo assumendo che siano presenti nel tetramero due siti di legame per il GTP ($R = 0.5$) e che questi siano indistinguibili l'uno dall'altro. In particolare in assenza di ioni Cl^- il valore della costante di associazione del GTP per la deossiemoglobina K_t era $1.24 \pm 0.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ mentre quello per la ossiemoglobina K_r era $4.2 \pm 0.4 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$. In presenza di ioni Cl^- il valore di K_t è risultato pari a $5.3 \pm 0.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e quello di K_r pari a $3.82 \pm 0.4 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (Tabella 2)

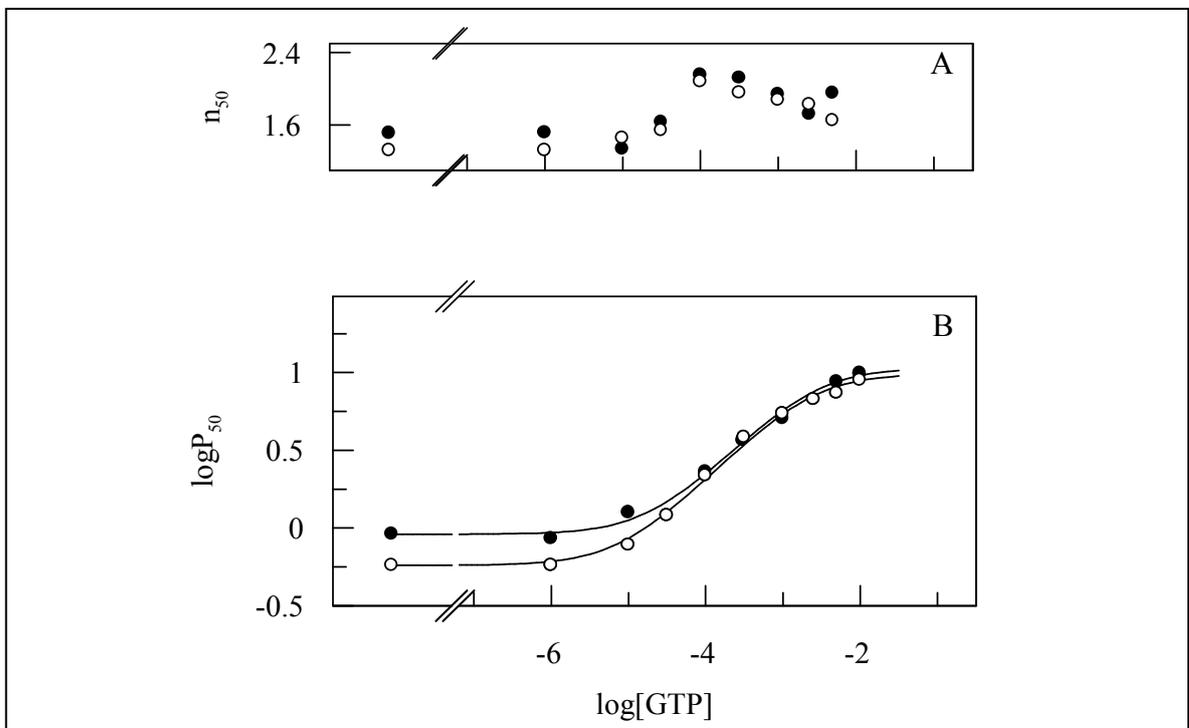


Fig. 9. Effetto della concentrazione del GTP sull'affinità per l'ossigeno in termini di $\log P_{50}$ (B) e sulla cooperatività in termini di n_{50} (A) dell'Hb catodica. Gli esperimenti sono stati condotti in HEPES 0.1 M (pH 7.0) a 20°C in assenza (○) e in presenza (●) di NaCl 0.5 M.

Tabella 2. Costanti di associazione (esprese in M^{-1}) del GTP alla deossiemoglobina (K_t) e alla ossiemoglobina (K_r) dell'*O. serpens* a confronto con quelle di altre quattro specie di Anguilliformi.

Specie	<i>O. serpens</i> (2 siti di legame)	<i>M. helena</i> (2 siti di legame)	<i>A. anguilla</i> (2 siti di legame)	<i>C. conger</i> (2 siti di legame)	<i>G. unicolor</i> (1 sito di legame)
Valore di R					
Eqn. (1)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
0.1 M Hepes					
K_t	$(1.24 \pm 0.4) \cdot 10^5$	$(6.6 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$(6.1 \pm 0.4) \cdot 10^5$	$(8.5 \pm 0.7) \cdot 10^5$	$(1.2 \pm 0.2) \cdot 10^5$
K_r	$(4.2 \pm 0.4) \cdot 10^2$	$(7.0 \pm 0.8) \cdot 10^2$	$(2.9 \pm 0.4) \cdot 10^3$	$(1.9 \pm 0.3) \cdot 10^3$	$(3.6 \pm 0.3) \cdot 10^2$
0.1 M Hepes + 0.5 M NaCl					
K_t	$(5.3 \pm 0.4) \cdot 10^4$				$(3.4 \pm 0.4) \cdot 10^3$
K_r	$(3.82 \pm 0.4) \cdot 10^2$				$(7.0 \pm 1.2) \cdot 10^1$
K_{1t}		$(9.3 \pm 0.6) \cdot 10^4$	$(4.0 \pm 0.6) \cdot 10^5$	$(1.7 \pm 0.3) \cdot 10^5$	
K_{1r}		$(3.1 \pm 0.4) \cdot 10^2$	$(8.0 \pm 1.5) \cdot 10^4$	$(2.8 \pm 0.9) \cdot 10^3$	
K_{2t}		$(1.1 \pm 0.4) \cdot 10^3$	$(3.5 \pm 1.4) \cdot 10^4$	$(1.1 \pm 0.4) \cdot 10^4$	
K_{2r}		$(2.1 \pm 0.9) \cdot 10^2$	$(4.0 \pm 2.4) \cdot 10^1$	$(8.0 \pm 2.0) \cdot 10^1$	

Lo studio funzionale condotto sulle emoglobine anodiche ha messo in evidenza in condizioni stripped una bassa affinità per l'ossigeno (ad esempio il $\log P_{50}$ a pH 7.0 è 0.93) e una bassa cooperatività tra le subunità ($n_{50} = 1.35 \pm 0.15$) (Fig. 10).

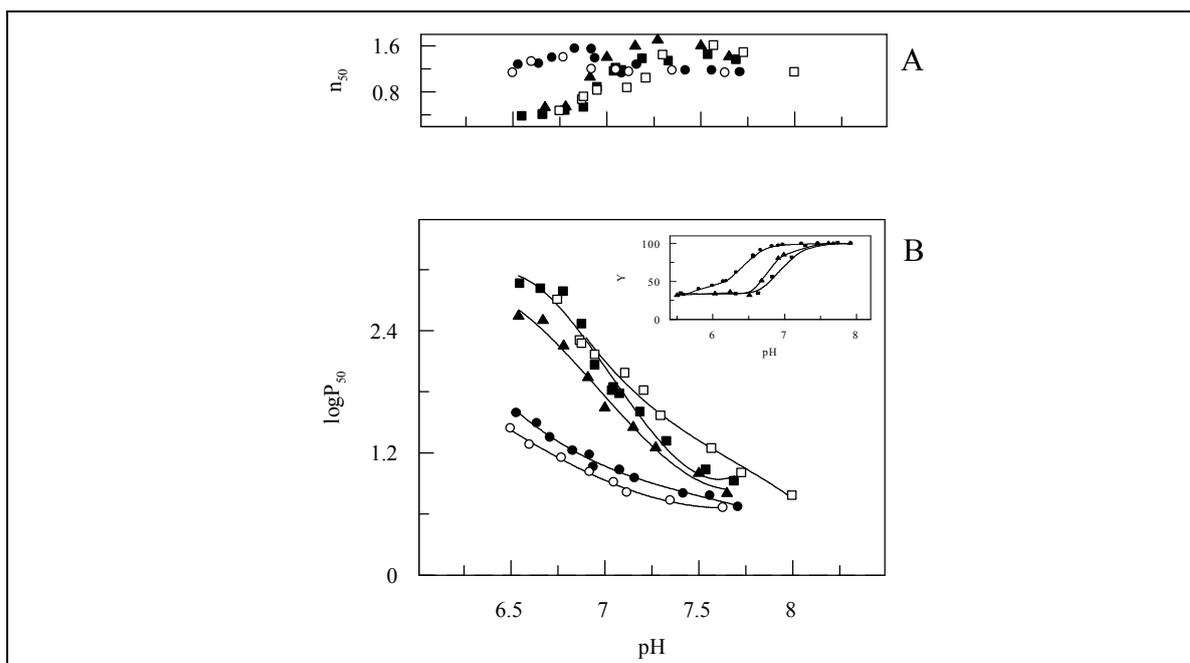


Fig. 10. Effetto Bohr. Effetto del pH sull'affinità per l'ossigeno (in termini di $\log P_{50}$) (B) e sulla cooperatività (espressa in termini di n_{50}) (A) dell'Hb anodiche. Gli esperimenti sono stati condotti in MES/HEPES/TAPS 0.1 M a 20°C e ad una concentrazione proteica di 3-5 mg/mL; emoglobina stripped (○), + NaCl 0.1M (●), + ATP 1mM (Δ) + NaCl 0.1M e ATP 1mM (▲), + GTP 1mM (□) + NaCl 0.1M e GTP 1mM (■). Nell'insero è riportata la frazione di saturazione in funzione del pH.

Inoltre in tutto il range di pH esaminato gli ioni cloruro provocano un leggero abbassamento dell'affinità per l'ossigeno, mentre i fosfati organici determinano un forte decremento dell'affinità specialmente a valori di pH acidi tanto che se in assenza di effettori allosterici il coefficiente di Bohr Φ era -0.75, diventa -2.06 in presenza di ioni cloruro e di GTP e -1.68 se al posto del GTP c'è l'ATP. Questi dati indicano che il numero di protoni di Bohr legati all'emoglobina, che era uguale a 3 in condizioni stripped, nella forma deossigenata può aumentare fino a circa 8.24 in presenza di GTP e a circa 6.72 in presenza di ATP.

Conseguentemente al forte effetto Bohr in presenza dei fosfati, l'affinità delle emoglobine anodiche per l'ossigeno varia ampiamente all'interno dell'intervallo di pH esaminato, anche se risulta sempre molto più bassa di quella dell'emoglobina catodica; ad esempio in presenza di ioni cloruro 0.1 M e GTP 1 mM il valore di $\log P_{50}$ a pH 7.0 risulta pari a 2.0, mentre era pari a 0.72 nel caso dell'emoglobina catodica. Inoltre l'effetto modulatore del GTP è più forte di quello dell'ATP alla stessa concentrazione: infatti la differenza fra il valore di $\log P_{50}$ ottenuto a pH 7.0 in presenza di GTP e quello in sua assenza è di 1.05 mentre nel caso dell'ATP tale differenza è di 0.75. Nella Fig 10 si può anche notare uno spostamento verso destra della curva relativa agli esperimenti condotti in presenza di GTP e di ioni cloruro rispetto a quella ottenuta in condizioni stripped, indicando che i due modulatori influenzano i valori di pK_a dei gruppi coinvolti nell'effetto Bohr. Inoltre nel range di pH 7.0-7.7 si può osservare che la curva in presenza del solo GTP subisce un ulteriore spostamento verso destra rispetto a quella ottenuta in presenza sia di ioni cloruro che di fosfati organici. La diminuzione della saturazione di ossigeno riscontrata a bassi valori di pH (vedi l'insero della Fig. 10) ha indicato la presenza dell'effetto Root (che rende l'Hb incapace di saturarsi anche ad elevate pressioni di ossigeno e la cooperatività di legame con l'ossigeno scende al di sotto dell'unità). Infatti i valori di n_{50} sono diminuiti significativamente fino a 0.4, il che potrebbe essere spiegato da una notevole eterogeneità intramolecolare riscontrabile nel momento in cui l'emoglobina è stabilizzata nella sua forma T. L'ampiezza dell'effetto Root è risultata molto piccola in assenza di fosfati organici, ma aumenta in loro presenza; nello specifico, a pH 6.25, la percentuale di saturazione a pressione atmosferica è pari al 55% in assenza di fosfati organici, mentre in loro presenza è pari al 30% circa.

All'interno degli eritrociti la concentrazione di ATP era di 1.3 mM, mentre quella del GTP, che è risultato il modulatore allosterico dominante sia per l'emoglobina catodica che per le emoglobine anodiche, era pari a 3 mM. In particolare, per quanto riguarda l'emoglobina catodica, a concentrazioni saturanti di GTP, la differenza tra i valori di $\log P_{50}$ misurati in assenza di GTP e quelli misurati in sua presenza era di 1.26. Nel caso delle emoglobine anodiche a pH 7.0 il $\Delta \log P_{50}$ è simile a quello dell'emoglobina catodica anche se in questo caso l'effetto del GTP varia significativamente in relazione al pH.

4.3. DISCUSSIONE.

La molteplicità emoglobinica, tipica dei pesci, e le sue implicazioni funzionali sono state ampiamente studiate in passato. Oltre ai cambiamenti nei diversi stadi ontogenetici (Wilkins et al. 1966) e a quelli dovuti all'adattamento all'habitat e alle esigenze fisiologiche (Weber et al., 1976a,b), vari altri fattori sono sicuramente legati a questo fenomeno ed è molto probabile che in questi meccanismi di adattamento molecolare siano implicate altre funzioni biologiche parallele dell'emoglobina (Giardina et al., 1995). Infatti all'interno dello stesso eritrocita la presenza di differenti componenti emoglobiniche potrebbe essere importante per la stabilità e quindi per la durata di vita della cellula e potrebbe prevenire fenomeni di precipitazione e cristallizzazione al suo interno.

Molti teleostei hanno un sistema emoglobinico caratterizzato da due tipi di emoglobine, differenti dal punto di vista strutturale e funzionale (Hashimoto et al., 1960; Binotti et al., 1971; Weber et al., 1976a; Pellegrini et al., 1995; Tamburrini et al., 2001), che vengono normalmente indicate come emoglobine anodiche e catodiche in relazione al loro punto isoelettrico. Gli Anguilliformi presentano un numero variabile di emoglobine anodiche e una sola emoglobina catodica (Hb C) (Fago et al., 1995); in particolare la *Murena helena* e il *Conger conger* hanno emoglobine anodiche multiple (Pellegrini et al., 1995; Pellegrini et al., 2003) mentre l'*Anguilla anguilla* (Fago et al., 1997) e il *Gymnotorax unicolor* (Tamburrini et al., 2001) hanno una sola emoglobina anodica. L'*O. serpens* appartiene al gruppo degli Anguilliformi e alla famiglia degli Ophichthidae. Ad oggi non esistono in letteratura studi del sistema emoglobinico di altre specie appartenenti alla stessa famiglia e la specie più vicina dal punto di vista filogenetico studiata è il *C. conger*. Le quattro principali componenti anodiche purificate dall'emolisato dell'*O. serpens*,

a causa della notevole vicinanza del loro punto isoelettrico, non possono essere separate. Tuttavia sembra esserci fra loro una minima differenza strutturale evidenziata dalle analisi di spettrometria di massa. Infatti, mediante la deconvoluzione degli spettri ESI, si evidenzia una differenza di massa, tra le catene $\beta 1$ e $\beta 3$, di + 28 Da attribuibile ad una sostituzione Lys \rightarrow Arg, Ser \rightarrow Asp o Thr \rightarrow Glu. Le due catene $\beta 3$ e $\beta 4$ presentano invece una differenza di massa molecolare pari a + 27 Da riconducibile ad una sostituzione Glu \rightarrow Arg, Ser \rightarrow Asn o Thr \rightarrow Gln.

Per quanto riguarda invece l'unica emoglobina catodica è stato possibile approfondire lo studio sulla struttura primaria e determinare una parziale sequenza aminoacidica sia delle catene alfa che delle catene beta (figure 6 e 7). Pertanto la base molecolare delle proprietà funzionali dell'emoglobina catodica dell'*O. serpens* può essere discussa utilizzando i dati sulla sua struttura primaria a confronto con la struttura primaria dell'HbA umana e quella di altri pesci.

L'Hb catodica in assenza di modulatori presenta un'affinità per l'ossigeno e una cooperatività molto poco sensibili alle variazioni di pH. Nell'emoglobina umana, l'effetto Bohr è stato attribuito principalmente al residuo di His146 β (HC3) che, nella conformazione T, forma un ponte salino con il residuo di Asp94 β (FG1). Questo legame viene a mancare nel momento in cui si ha la transizione dallo stato T allo stato R ed è responsabile per il 40% del rilascio di protoni da parte dell'emoglobina. Nel caso dell'emoglobina catodica dell'*O. serpens* l'HisHC3 è sostituita da un residuo di Phe che, non potendo formare il ponte salino con l'Asp94 β (FG1), potrebbe essere responsabile dell'inibizione dell'effetto Bohr alcalino così come si verifica nel caso delle altre emoglobine catodiche che presentano la stessa sostituzione (Weber et al., 1976a; Pellegrini et al., 1995; Tamburrini et al., 2001, Pellegrini et al., 2003). Al contrario, nelle emoglobine anodiche il residuo di istidina all'estremità C-terminale delle catene β è conservato e infatti i dati sperimentali rivelano che, in tutte le condizioni esaminate, la loro affinità per l'ossigeno sia molto più sensibile alle variazioni di pH rispetto a quella dell'emoglobina catodica. Inoltre, il residuo N-terminale delle catene α , che nell'HbA è considerato responsabile per il 20% dell'effetto Bohr (Perutz, 1983; Giardina et al., 2004; Berenbrink, 2006), nei teleostei è acetilato e quindi non può contribuire al suddetto effetto. In presenza di NaCl si osserva un ampio effetto Bohr reverse cioè una diminuzione dell'affinità per l'ossigeno all'aumentare del pH. I dati indicano che, in seguito all'ossigenazione

dell'eme, l'abbassamento dei valori di pK_a di alcuni residui aminoacidici, che non sono stati identificati, provoca il rilascio di circa 2 protoni.

Nell'emoglobina umana il BPG si lega a quattro residui carichi positivamente localizzati nella cavità centrale tra le due catene β : la Val(NA1), l'His(NA2), la Lys(EF6) e l'His(H21). Nelle emoglobine dei pesci la Val(NA1) e la Lys(EF6) sono conservate, mentre l'His(H21) è sostituita in genere da un residuo di arginina (Perutz e Brunori 1982; Gronenberg et al., 1984). Nonostante il residuo di His(NA2) sia sostituito da un residuo carico negativamente, la presenza di tre residui aminoacidici carichi positivamente è in accordo con il forte effetto del GTP e dell'ATP sull'affinità per l'ossigeno dell'emoglobina dei pesci. Poiché a valori di pH fisiologico entrambi i nucleotidi trifosfato hanno la stessa carica, il maggior effetto del GTP in alcune emoglobine di pesci era stato correlato con la formazione di un legame idrogeno addizionale in grado di aumentare, rispetto all'ATP, la sua complementarità stereochimica al sito di legame. In particolare la sostituzione His \rightarrow Glu in NA2 β , responsabile della formazione del legame idrogeno addizionale, porta a sei il numero di legami coinvolti nell'interazione del GTP con il suo sito di legame che nel caso dell'ATP sono cinque (Perutz e Brunori, 1982). Successivamente, nel caso dell'Hb IV della trota era stato riscontrato che l'ATP e il GTP avevano lo stesso identico effetto. In questo caso era stato suggerito che, essendo l'acido glutammico in posizione NA2 β sostituito da un residuo di acido aspartico che ha una catena laterale più corta, sarebbe impedita la formazione del legame idrogeno addizionale rendendo del tutto identico il legame dei due nucleotidi al sito di legame per i fosfati (Gronenberg et al., 1984). Tuttavia successivi studi hanno dimostrato che le emoglobine di altri pesci (*M. helena* e *G. unicolor*), in cui il residuo di istidina in posizione NA2 β è sostituito da un residuo di acido glutammico, presentano la stessa risposta nei confronti del GTP e dell'ATP (Pellegrini et al., 1995; Tamburrini et al., 2001) smentendo perciò l'ipotesi di Perutz e Brunori. L'emoglobina catodica dell'*O. serpens* presenta in posizione NA2 β un residuo di glutamina, così come l'emoglobina catodica del *C. conger* (Pellegrini et al., 2003); le due emoglobine rispondono nello stesso modo alla modulazione dell'affinità per l'ossigeno indotta dai fosfati: entrambe riescono a discriminare l'ATP dal GTP e, rispetto alla *M. helena*, all'*A. anguilla* e al *C. conger*, sono modulate in maniera più significativa dal GTP (Tabella 1). Inoltre, come già riscontrato nella stessa emoglobina catodica della *M. helena*, dell'*A. anguilla* e del

C. conger, anche nell'*O. serpens* sono presenti due siti di legame per il GTP, mentre il *G. unicolor* ne presenta solo uno (Pellegrini et al., 2003).

Per quanto riguarda l'analisi delle curve ottenute in funzione di concentrazioni crescenti di GTP un buon fit dei dati sperimentali è stato ottenuto utilizzando un'equazione che descrive due siti di legame per il GTP equivalenti, sia in assenza di ioni cloruro che in loro presenza. Sono state così misurate una costante di associazione del GTP per la deossiemoglobina e una per la ossiemoglobina. Invece nelle altre tre specie di Anguilliformi che hanno due siti di legame per il GTP era stato possibile determinare, nelle stesse condizioni sperimentali, quattro differenti costanti di associazione, due per ogni struttura emoglobinica (Tabella 2). Le costanti di associazione del GTP per la ossiemoglobina dell'*O. serpens* determinate in assenza e in presenza di ioni cloruro hanno valori pressoché uguali, mentre le costanti di associazione del GTP per la deossiemoglobina ottenute in assenza di ioni cloruro sono risultate due volte più alte rispetto a quelle determinate in loro presenza. Questo fatto suggerisce che ci sia una competizione fra i due anioni, GTP e cloruro, solamente quando l'Hb si trova nella struttura T.

Tuttavia al fine di spiegare le differenze che esistono, relativamente all'interazione con il GTP, tra l'Hb catodica dell'*O. serpens* e quella delle altre specie ad esso filogeneticamente correlate, bisogna tener presente che questo è il primo studio sul sistema emoglobinico di una specie appartenente alla famiglia Ophichthidae. Le somiglianze strutturali e funzionali tra l'emoglobina catodica dell'*O. serpens* e quella del *C. conger* evidenziate in questo studio potrebbero essere ricondotte alla loro maggiore vicinanza da un punto di vista filogenetico rispetto agli altri Anguilliformi studiati sino ad oggi.

Il sito addizionale per i fosfati dell'emoglobina catodica (HbC) del *C. conger* è stato analizzato con la tecnica del *computer modelling* che ha rivelato che le molecole di GTP sono localizzate nella cavità centrale del tetramero e interagiscono, attraverso legami idrogeno e/o ponti salini, sia con le catene α che con le catene β . In particolare sono coinvolti i residui della tirosina (C1), della lisina (G6), dell'aspartato (H9) e dell'arginina (HC3) delle catene α ed il residuo dell'aspartato (G10) delle catene β (Pellegrini et al., 2003). Nell'emoglobina catodica dell'*O. serpens* i residui della lisina (G6), dell'aspartato (H9) e dell'arginina (HC3) delle catene α e dell'aspartato (G10) delle catene β sono conservati, mentre il residuo della tirosina (C1) è sostituito da un residuo di fenilalanina, come nel caso dell'Hb C dell'*A.*

anguilla. Dal momento che quest'ultima presenta anch'essa due siti di legame per il GTP, probabilmente la sostituzione Tyr→Phe non influisce in alcun modo sulla struttura del sito di legame addizionale. Tuttavia non siamo in grado di spiegare la base strutturale della incapacità dell'Hb catodica dell'*O. serpens* di distinguere i due siti di legame per il GTP.

L'Hb catodica dell'*O. serpens* presenta un'affinità per l'ossigeno estremamente alta, la più alta riscontrata fra gli Anguilliformi studiati sino ad oggi (Tabella 1); è stato ipotizzato che questo tipo di emoglobina garantisca il trasporto dell'ossigeno ai tessuti anche in condizioni di ipossia e acidosi (Powers, 1972; Pelster and Weber, 1990) e svolga un importante ruolo in condizioni di sforzo, quando a livello delle branchie il pH scende a valori tanto bassi che le altre emoglobine che hanno l'effetto Root non sono in grado di garantire un apporto di ossigeno sufficiente (Brunori, 1975). L'effetto modulatore esercitato dagli ioni cloruro e, in misura maggiore, dal GTP potrebbe essere essenziale in alcune situazioni cruciali che potrebbero verificarsi nei fondali fangosi dove l'*O. serpens* vive. A tal proposito è opportuno ricordare che all'interno degli eritrociti dei pesci la concentrazione dei fosfati organici può diminuire in condizioni di ipossia (Weber, 1990) facendo aumentare di conseguenza l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno. Inoltre, dato che il GTP è in grado di annullare l'effetto Bohr reverse, nell'emoglobina catodica non si può ignorare che l'ampiezza e spesso anche il segno dell'effetto Bohr siano regolati dalla sua concentrazione.

Alla luce dei risultati di questo studio e di quelli presenti in letteratura sembrerebbe che negli Anguilliformi la presenza di due siti di legame per i fosfati organici sia una caratteristica molto frequente, anche se l'interazione tra gli stessi e l'emoglobina è diversa da una specie all'altra (Pellegrini et al., 2003; Olinas et al., 2005). La possibilità di legare una seconda molecola di GTP rappresenta un meccanismo aggiuntivo di modulazione dell'emoglobina utile per soddisfare le esigenze fisiologiche di quelle specie che vivono in ambienti in cui la disponibilità dell'ossigeno è molto variabile per cui l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno deve poter essere modulata in misura differente secondo le richieste fisiologiche di ossigeno.

Per quanto riguarda invece il ruolo delle emoglobine anodiche dell'*O. serpens*, esso potrebbe essere legato alla loro bassa affinità per l'ossigeno ed all'elevata sensibilità nei confronti del pH (Perutz and Brunori, 1982; Pellegrini et al 1995;

Fago et al., 1997; Tamburrini et al, 2001). In particolare, in questo studio è stato evidenziato un effetto Root significativo. Il ruolo fisiologico di tale effetto è quello di pompare l'ossigeno all'interno della vescica natatoria, anche contro elevate pressioni idrostatiche, e di consentire al pesce di mantenere il giusto assetto (Denton, 1961); un altro ruolo dell'effetto Root potrebbe essere quello di fornire grandi quantità di ossigeno alla rete coroidea dell'occhio (Ingermann and Terwilliger, 1982; Riggs, 1988), anche se tale funzione era stata suggerita per i pesci che non presentano vescica natatoria e questo non è il caso dell'*O. serpens*. Un'altra interessante proprietà delle emoglobine anodiche dell' *O. serpens* è che il range di pH nel quale l'effetto Bohr (o Root) è operativo è sotto il controllo della concentrazione dei fosfati organici in quanto l'apparente pK della transizione è spostato di circa un'unità di pH nel passare dalla condizione di Hb stripped a quella di Hb in presenza di fosfati. Tuttavia l'importanza fisiologica di tale proprietà, riscontrata anche in altre emoglobine di pesci (Pellegrini et al., 1995) e probabilmente legata a qualche specifico comportamento, non è ancora chiara. L'ulteriore spostamento verso destra, nella scala del pH da 7.0 a 7.7, della curva dell'effetto Bohr ottenuta in presenza di GTP rispetto alla curva ottenuta in presenza sia di ioni cloruro che di GTP, suggerisce che in tale range di pH ci sia una competizione fra i due anioni.

Il sistema emoglobinico dell'*O. serpens* rappresenta un altro caso di molteplicità emoglobinica in cui si assiste ad una probabile suddivisione di ruoli fra le singole componenti: da un lato l'Hb catodica garantirebbe un adeguato apporto di ossigeno in condizioni di ipossia e acidosi quando le emoglobine anodiche diventano incapaci di legare l'ossigeno a causa della loro bassa affinità per il ligando e dell'elevata sensibilità nei confronti del pH; dall'altro lato le emoglobine anodiche sembrerebbero coinvolte nell'apporto dell'ossigeno all'interno della vescica natatoria e nel controllo del mantenimento del giusto assetto del pesce.

Inoltre suggeriamo che le caratteristiche peculiari dell'Hb catodica dell'*O. serpens*, come l'affinità per l'ossigeno estremamente alta, l'ampio range di concentrazione di GTP in cui esso è operativo e la possibilità di controllarne la sua concentrazione in determinate condizioni potrebbero essere una risposta evolutiva alle abitudini di vita di questa specie.

Hb Roma[β 115(G17)Ala→Val]

5. Hb Roma[β 115(G17)Ala→Val].

L'Hb Roma è una variante emoglobinica adulta riscontrata (in eterozigosi) in una donna italiana di 33 anni che presentava un profilo clinico ed ematologico riferibile ad un quadro di lieve β -talassemia, con una leggera ipocromia e microcitosi e un moderato incremento dell'HbA2. Studi condotti presso il Centro Studi Microcitemie di Roma hanno portato all'identificazione della mutazione $G_{CC} \rightarrow G_{TC}$ nel codone 115 del gene β -globinico responsabile della sostituzione della alanina, normalmente presente in posizione β 115(G17), con una valina. L'interesse per la caratterizzazione strutturale e funzionale di questa nuova variante deriva dal fatto che tale sostituzione avviene a livello dell'interfaccia $\alpha_1\beta_1$ (o $\alpha_2\beta_2$) e quindi fornisce un'opportunità in più per valutare come una sostituzione di un residuo aminoacidico con un altro anch'esso apolare ma di maggiori dimensioni in questa parte del tetramero emoglobinico possa alterare la sua funzionalità.

5.1. MATERIALI E METODI.

Emolisi.

Il campione di sangue è stato sottoposto a tre cicli di lavaggio con una soluzione isotonica di NaCl allo 0.9%. La centrifugazione a 1000 x g a 4°C in una centrifuga BECKMAN J2 21 ha consentito di separare il plasma dai globuli rossi, i quali sono stati poi lisati con l'aggiunta di due volumi di soluzione ipotonica fredda.

L'emolisato ottenuto dopo centrifugazione a 12.000 x g per 30 minuti a 4°C è stato analizzato mediante diverse tecniche.

Tecniche cromatografiche.

- La cromatografia a scambio anionico è stata effettuata su una colonna preimpaccata HiLoad 26/10 Q Sepharose HP (GE-Healthcare) collegata ad un sistema cromatografico FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) Akta-Prime (GE-Healthcare). La colonna è stata equilibrata con un tampone Tris/HCl 20 mM a pH 8.5 e l'eluizione è stata condotta applicando un gradiente lineare di NaCl da 0 a 0.2 M in 120 minuti ad un flusso di 5 mL/min. In tal modo è stato possibile eliminare le componenti emoglobiniche minori presenti nell'emolisato e, dato che la sostituzione Ala→Val non comporta una differenza di carica nel tetramero Hb Roma, non è stato possibile purificarla dall'HbA per cui tutti gli esperimenti sono stati condotti sulla miscela di HbA/Hb Roma.

- La cromatografia ad esclusione molecolare condotta su una colonna Sephadex G-25 (25 x 2.5 cm), equilibrata con un tampone Tris/HCl 10 mM e NaCl 0.1 M a pH 8.0, è stata utilizzata per la rimozione dei modulatori eterotropici quali il BPG.

Determinazione della massa delle catene globiniche.

Per gli esperimenti di spettrometria di massa è stato utilizzato uno spettrometro di massa LCQ Advantage (ThermoFinnigan, San José, CA, USA) equipaggiato con una sorgente per elettro-nebulizzazione (ESI) ed un analizzatore a trappola ionica (IT) accoppiato ad un Micro-HPLC della ThermoFinnigan (San José, CA, USA). La separazione delle catene globiniche in RP-HPLC è stata condotta su una colonna Vydac C8 (150 mm x 2.1, 5µm di diametro delle particelle) utilizzando come eluente A acido trifluoroacetico (TFA) allo 0.056% e come eluente B acetonitrile/H₂O (80:20) e TFA allo 0.05%, applicando un gradiente lineare dallo 0% al 100% di B in 60 minuti e ad un flusso di 0.3 mL/min. Una valvola a T indirizzava un flusso di 0.2 mL/min al detector (*diode array*) e un flusso di 0.1 mL/min verso la sorgente ESI. Gli spettri di massa sono stati acquisiti in modalità di ionizzazione positiva ogni 3 ms, nell'intervallo di valori m/z 300-2000. Il voltaggio di ionizzazione è stato settato a 4.50 kV e la temperatura del capillare a 220°C. La deconvoluzione degli spettri di massa è stata eseguita automaticamente utilizzando il software fornito con lo strumento e con il software MagTran 1.0 (Zhang and Marshall, 1998).

Digestione triptica e analisi RP-HPLC-ESI-MS.

La digestione triptica delle globine è stata effettuata utilizzando 1 mg di globina (privata dell'eme mediante il metodo dell'acetone acido, Rossi-Fanelli et al., 1958) a cui sono stati addizionati 500 µL di bicarbonato d'ammonio 0.1 M a pH 8.0 e 100µL di tripsina (1µg/µl). La miscela è stata incubata a 37°C per 8 h e la reazione è stata bloccata con TFA all'1%. Il campione è stato centrifugato 10 min a 3000 x g e iniettato in RP-HPLC-ESI-MS. La separazione dei frammenti triptici è stata condotta utilizzando la stessa colonna e le stesse fasi utilizzate per la separazione delle catene globiniche mentre il gradiente utilizzato era dallo 0% al 55% di B in 40 minuti ad un flusso di 0.3 mL/min. La deconvoluzione degli spettri di massa è stata

eseguita automaticamente utilizzando il software fornito con lo strumento e con il software MagTran 1.0 (Zhang and Marshall, 1998).

I valori di massa sperimentali dei peptidi triptici sono stati confrontati con i valori di massa monoisotopici teorici, ottenuti attraverso il programma *Peptide Mass* (<http://prospector.ucsf.edu/>). Gli esperimenti di MS/MS sono stati eseguiti sul peptide β T-12 normale e variante; gli spettri di MS/MS sperimentali ottenuti sono stati confrontati con quelli teorici generati utilizzando il programma *MS-product* (<http://prospector.ucsf.edu/>).

L'area del picco della corrente ionica estratta (XIC) dei peptidi β T-12, normale e su quello variante, è stata utilizzata per stimare la percentuale di Hb Roma presente nell'emolisato. In particolare, i picchi XIC sono stati rilevati selezionando gli ioni $[M + 3H]^{+3} = 574.4$ m/z e $[M + 2H]^{+2} = 861.1$ m/z per il peptide β T-12 normale e gli ioni $[M + 3H]^{+3} = 583.7$ m/z e $[M + 2H]^{+2} = 875.1$ m/z per il peptide β T-12 variante. La quantità del peptide β T-12 normale e di quello variante è stata ottenuta integrando le aree dei loro picchi XIC: la percentuale relativa del peptide variante β T-12 è stata ottenuta dal rapporto $T12^*/(T12 + T12^*)$, dove $T12^*$ e $T12$ sono rispettivamente l'area del picco del peptide β T-12 variante e quella del peptide β T-12 normale.

Studi funzionali.

Per gli studi funzionali sono stati condotti esperimenti di equilibrio con l'ossigeno utilizzando il metodo tonometrico (Giardina et al, 1981) mediante uno spettrofotometro Varian modello Cary 50. Sono stati così determinati i parametri di legame dell'emoglobina per l'ossigeno quali l'affinità, espressa in termini di $\log P_{50}$, e la cooperatività tra gli emi, espressa in termini di n_{50} , coefficiente di Hill. Gli esperimenti sono stati eseguiti alla temperatura di 20° C, in un range di pH 6.8-8.3 utilizzando un tampone HEPES/NaOH 0.1 M e NaCl 0.1 M, sia in presenza che in assenza del modulatore allosterico BPG 5 mM e ad una concentrazione proteica di 3-5 mg/mL.

5.2. RISULTATI.

La variante Hb Roma, che deve il suo nome alle origini geografiche della paziente in cui è stata riscontrata, è stata identificata presso il Centro Studi Microcitemie di Roma tramite sequenziamento diretto che ha messo in evidenza, a livello del

codone 115 del gene β -globinico, la mutazione $G_{CC} \rightarrow G_{TC}$ responsabile della sostituzione della alanina, normalmente presente in posizione $\beta 115(G17)$, con una valina.

Ulteriori analisi condotte presso lo stesso centro rilevarono l'impossibilit  di separare la variante mediante le procedure standard elettroforetiche e di HPLC. Perci  fu necessario ricorrere ad analisi di spettroscopia di massa. Il profilo di corrente ionica totale (TIC) della miscela contenente HbA e Hb Roma, ottenuto dall'analisi attraverso RP-HPLC-ESI-MS mostra due picchi che sono stati attribuiti alle catene α e β sulla base dei loro valori di massa (Fig. 1).

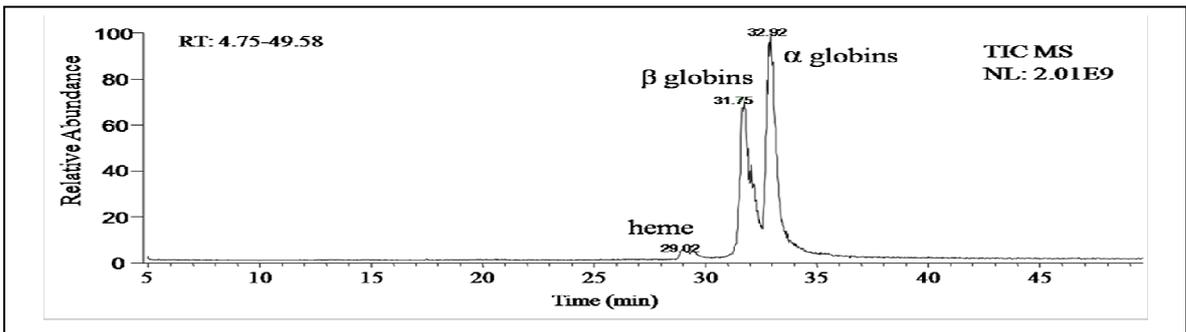


Fig.1. Profilo RP-HPLC-ESI-MS della miscela HbA/HbRoma.

La deconvoluzione dello spettro ESI ha permesso inoltre di mettere in evidenza due valori di massa relativi alle globine β : uno pari a 15.868 ± 3 Da, corrispondente al valore di massa delle catene β normali, ed un secondo valore di massa che differisce dal primo di $+ 28$ Da, in accordo con la sostituzione $Ala \rightarrow Val$ riscontrata a livello genico (Fig. 2A). La deconvoluzione dello spettro ESI-MS delle catene α ha messo invece in evidenza un solo valore di massa pari a 15.128 ± 3 Da corrispondente alla massa delle catene α normali (Fig. 2B).

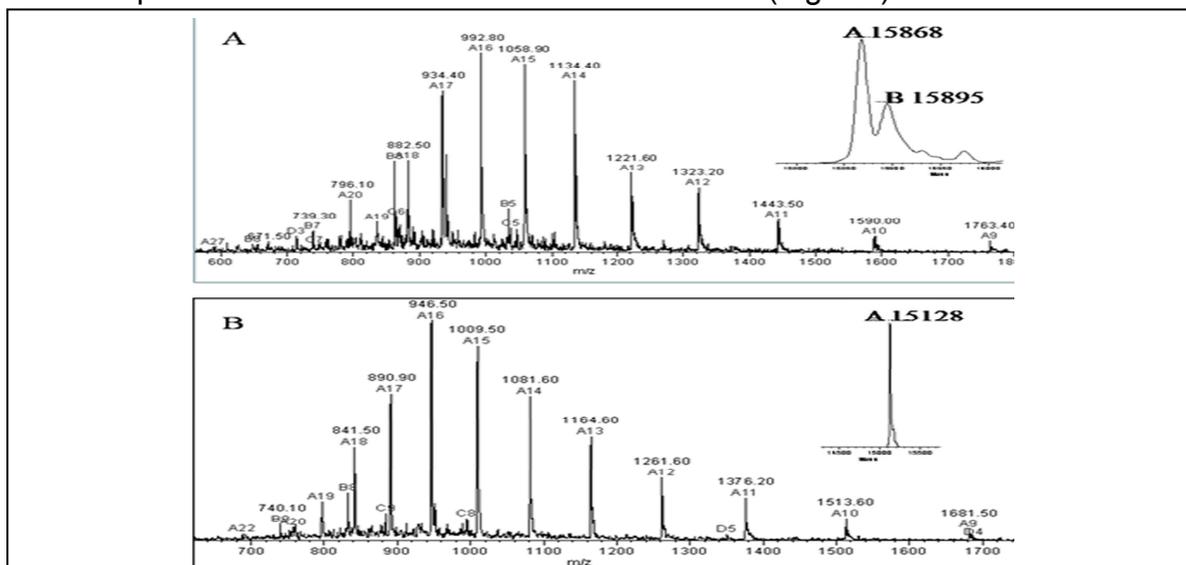


Fig. 2. Deconvoluzione dello spettro ESI-MS delle globine. Nel profilo TIC le globine β (pannello A) e le globine α (pannello B) eluiscono a 31.75 e 32.92 minuti rispettivamente.

Per confermare ulteriormente la mutazione a livello della proteina, le globine provenienti dalla miscela di HbA/Hb Roma sono state sottoposte a digestione triptica e i peptidi triptici sono stati analizzati mediante RP-HPLC-ESI-MS e MS/MS. Il profilo di corrente ionica totale (TIC) ottenuto dall'analisi RP-HPLC-ESI-MS della miscela triptica (Fig. 3) ha permesso di identificare i peptidi triptici delle catene α e β normali sulla base dei loro valori di massa molecolare che sono noti. Invece il picco che eluisce a 35.6 minuti mostra una massa di 1748.2 Da, con un incremento di 28 Da rispetto al frammento T12 (1720.2 Da) delle catene β normali, in accordo ancora una volta con la sostituzione Ala \rightarrow Val.

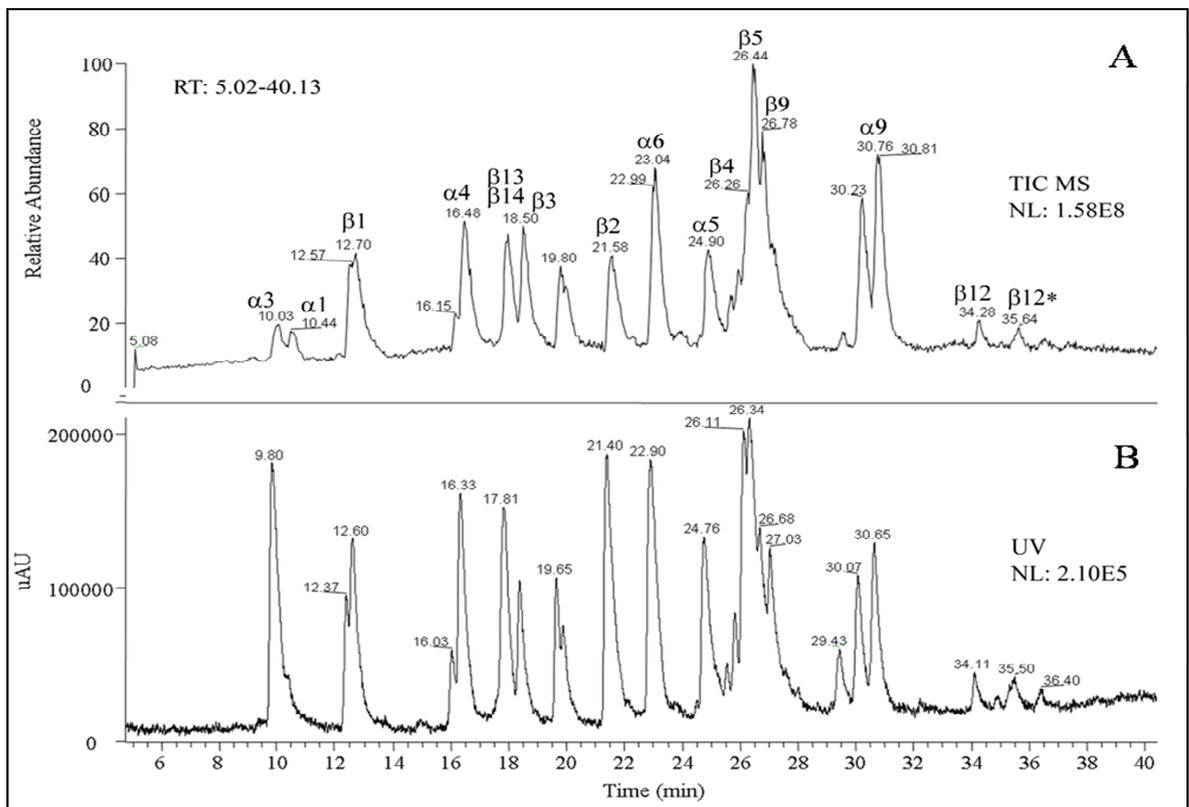


Fig. 3. Identificazione del peptide variante mediante analisi RP-HPLC-ESI-MS. Nel pannello A il profilo di corrente ionica totale (TIC) mostra i peptidi triptici identificati sulla base del loro valore di massa molecolare, mentre nel pannello B è riportato il profilo UV a 214 nm del digerito triptico della miscela HbA/HbRoma. Il picco β 12* è il peptide variante che eluisce a 35.64 minuti. RT: retention time, NT: normalisation level.

Lo spettro MS/MS ottenuto sperimentalmente è stato confrontato con lo spettro teorico generato attraverso il programma *MS-Product*, disponibile on line sul sito Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>). Le serie di ioni *y* e *b* ottenute dallo spettro MS/MS sperimentalmente del frammento β -T12 modificato (Fig. 4) ha confermato la sequenza LLGNVLCVLVHHFGK, contenente la sostituzione Ala \rightarrow Val nell'undicesimo residuo.

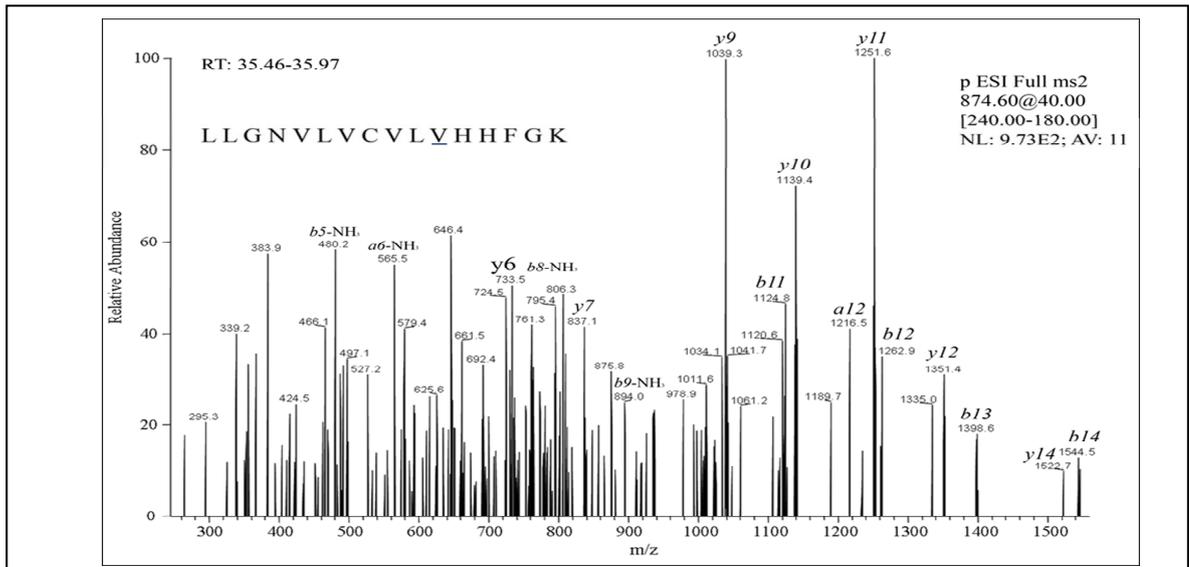


Fig. 4. Identificazione della sostituzione $\beta 115\text{Ala} \rightarrow \text{Val}$. Spettro MS/MS del peptide variante, ottenuto mediante la frammentazione dello ione bi-carica m/z 874.6. La sequenza del peptide è stata dedotta calcolando la differenza tra due valori di massa contigui di ciascun frammento y e b. Ogni differenza corrisponde ad un singolo residuo aminoacidico. RT: retention time; NL: normalisation level.

Poiché l'area del picco di corrente ionica estratta (XIC) di un singolo peptide può essere correlato con la sua concentrazione, si può assumere che le aree dei picchi dei peptidi appartenenti ad una proteina possano essere correlate alla concentrazione della proteina parentale (Bondarenko et al., 2002). Analogamente la concentrazione dell'Hb Roma nell'emolisato è stata stimata essere intorno al 25% dell'emoglobina totale, in quanto il peptide β -T12 modificato rappresenta il $25\% \pm 3$ della quantità totale di β globina.

Dato che l'Hb Roma possiede caratteristiche elettroforetiche e cromatografiche indistinguibili da quelle dell'HbA, le caratteristiche funzionali sono state misurate sulla miscela HbA/Hb Roma e sono state confrontate con quelle dell'HbA (figura 5).

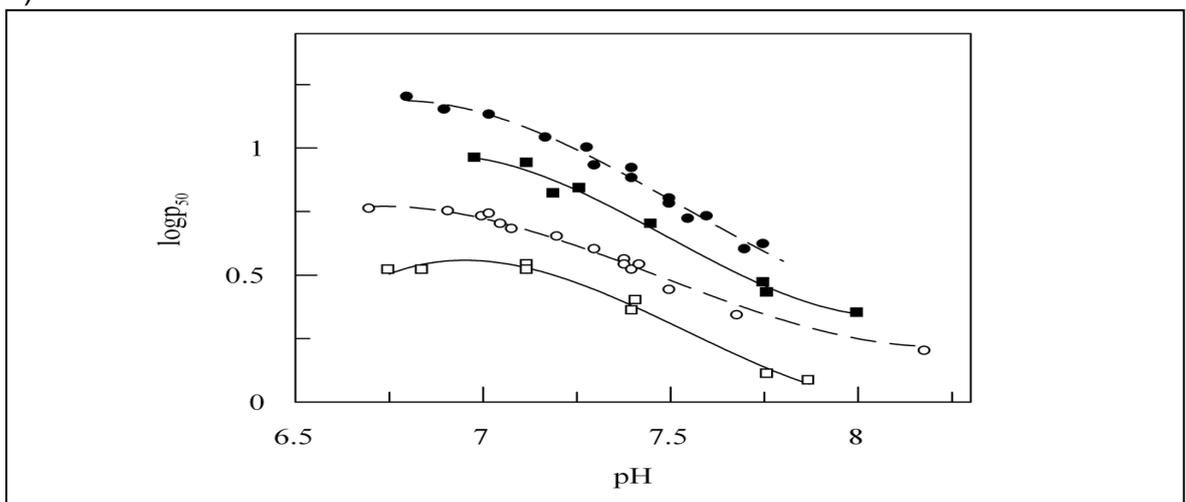


Fig. 5. Effetto Bohr. Effetto del pH sull'affinità per l'ossigeno (in termini di P_{50}) della miscela HbA/HbRoma (simbolo quadrato) e dell'HbA (simbolo tondo) in presenza (simboli pieni) e in assenza (simboli vuoti) di BPG 5mM.

La presenza della variante nella miscela determina un significativo incremento dell'affinità per l'ossigeno in tutto il range di pH esaminato. Per esempio il valore di P_{50} a pH 7.0 è più basso del 40% rispetto all'HbA in assenza di BPG e del 30% in sua presenza. Il valore del coefficiente di Bohr ($\Phi = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$) della miscela di HbA/Hb Roma e quello dell'HbA sono molto simili in assenza di fosfati, mentre in presenza di BPG sono risultati pari a -0.62 per la miscela di HbA/Hb Roma e a -0.55 nel caso dell'HbA. Tuttavia non si può escludere che queste differenze funzionali, riscontrate nonostante nella miscela di HbA/Hb Roma la variante rappresenti solamente il 25% dell'emoglobina totale, in parte possano essere dovute alla formazione di un tetramero ibrido con una catena β normale e una catena β mutata. La cooperatività di legame con l'ossigeno della miscela di HbA/Hb Roma, come dimostrato dai valori di coefficiente di Hill n_{50} ottenuti, non varia significativamente rispetto a quella dell'HbA.

Gli esperimenti di *computer modelling*, effettuati presso l'Istituto di Biochimica e Biochimica clinica dell'Università Cattolica di Roma, hanno permesso di valutare gli effetti strutturali della sostituzione dell'aminoacido presente nella posizione $\beta 115(\text{G}17)$ dell'HbA. I modelli strutturali delle varianti umane in posizione $\beta 115(\text{G}17)$ (l'Hb Roma [$\beta 115(\text{G}17)\text{Ala} \rightarrow \text{Val}$], l'Hb HK [$\beta 115(\text{G}17)\text{Ala} \rightarrow \text{Asp}$] e l'Hb Madrid [$\beta 115(\text{G}17)\text{Ala} \rightarrow \text{Pro}$]) sono stati costruiti mediante modelling di omologia utilizzando il software MODELLER e la struttura cristallografica dell'HbA come modello di riferimento.

Il confronto fra la struttura cristallografica dell'HbA e i modelli computazionali delle varianti in posizione $\beta 115(\text{G}17)$ (Fig. 6), ha messo in evidenza il fatto che l'Ala $\beta 115$ stabilisce delle interazioni di van der Waals attraverso l'interfaccia $\alpha 1\beta 1$ con la Val107, l'Ala110 e l'Ala111 della catena alfa (Fig. 6A). Nelle varianti i contatti fra le subunità si riducono poichè l'alanina $\beta 115$ è sostituita dalla valina (Hb Roma), dall'acido aspartico (Hb HK) o dalla prolina (Hb Madrid). Nello specifico, nell'Hb Roma il residuo di valina in posizione $\beta 115$ è in grado di interagire solo con l'Ala111 (G18) della catena α (Fig. 6B).

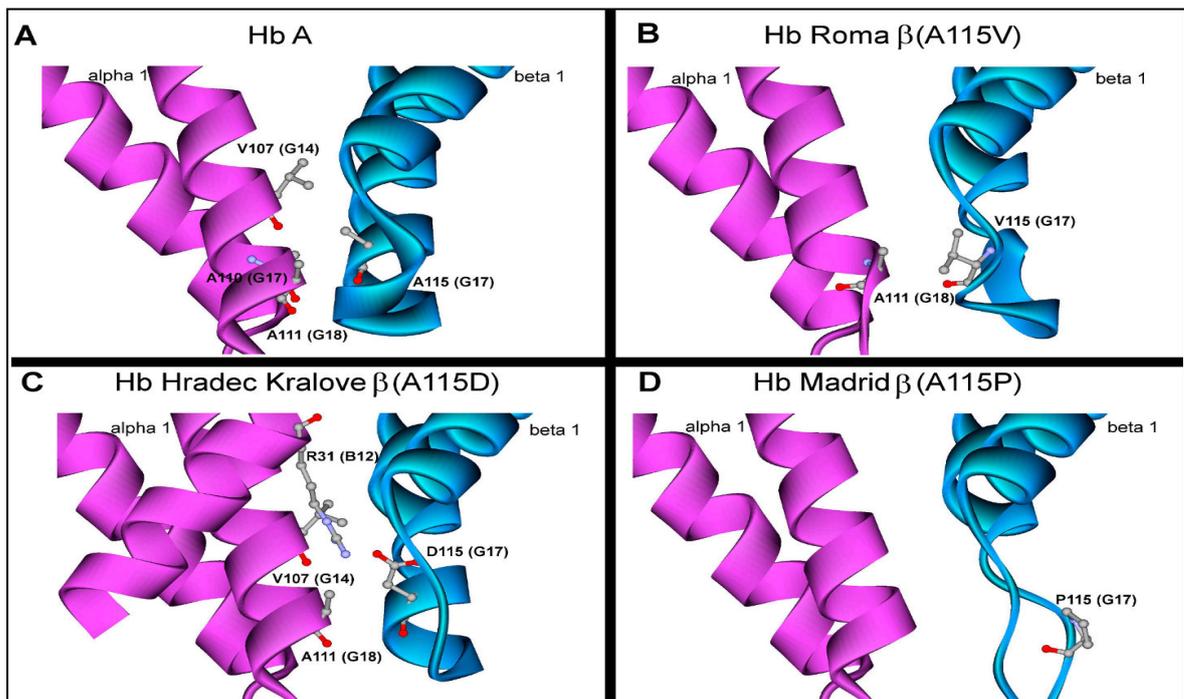


Fig. 6. Confronto fra la struttura dell'HbA e quella delle altre varianti in $\beta 115$. (A) modello strutturale dell'HbA, (B) modello strutturale dell'Hb Roma β (A115V), (C) modello strutturale dell'Hb Hradec Kralove β (A115D), (D) modello strutturale dell'Hb Madrid β (A115P).

5.3. DISCUSSIONE.

Il residuo di alanina in posizione $\beta 115$ (G17) interagisce con diversi residui aminoacidici all'interfaccia $\alpha 1\beta 1$ ritenuta fondamentale per la stabilizzazione della struttura quaternaria dell'emoglobina (Perutz et al., 1970; Sack et al, 1978; Dickerson et al., 1983). Qualsiasi sostituzione avvenga in questa regione può quindi causare instabilità del tetramero, esattamente come riscontrato nell'Hb Roma oggetto di questo studio in cui l'alanina $\beta 115$ (G17) viene sostituita da una valina, un residuo neutro ma più grande, causando una pur debole instabilità.

Dato che la sostituzione Ala \rightarrow Val nella posizione $\beta 115$ (G17) rende l'Hb Roma indistinguibile dall'HbA con i nostri metodi, non è stato possibile separarla per gli studi funzionali. Tuttavia i risultati ottenuti con la miscela HbA/HbRoma hanno dimostrato significative differenze nelle proprietà di legame con l'ossigeno rispetto all'HbA. Bisogna anche considerare l'eventuale formazione di un tetramero ibrido con una catena β normale e una catena β mutata. In questo caso il contributo alle proprietà funzionali dovrebbe dipendere dall'equilibrio all'interno del globulo rosso fra l'Hb normale, l'Hb ibrida e l'Hb Roma.

In accordo con la struttura cristallografica studiata da Perutz (Perutz et al., 1968) le sostituzioni che avvengono a livello dell'elica G delle catene β , che costituisce la

parte cruciale dell'interfaccia $\alpha 1\beta 1$, sono normalmente associate all'alterazione dell'affinità per l'ossigeno dell'emoglobina (<http://globin.cse.psu.edu>). Tuttavia delle altre due varianti in $\beta 115$, l'Hb HK [$\beta 115(\text{G17})\text{Ala}\rightarrow\text{Asp}$] e l'Hb Madrid [$\beta 115(\text{G17})\text{Ala}\rightarrow\text{Pro}$], non sono disponibili dati funzionali.

Recentemente, attraverso l'utilizzo di emoglobine ricombinanti è stato possibile rivisitare il ruolo dell'interfaccia $\alpha 1\beta 1$: sostituzioni nella posizione $\beta 108(\text{G8})$ e $\alpha 96(\text{G3})$ fanno diminuire significativamente l'affinità per l'ossigeno e la cooperatività del processo di ossigenazione. Inoltre attraverso studi all'NMR è stato suggerito che l'interfaccia $\alpha 1\beta 1$ e quella $\alpha 1\beta 2$ siano in comunicazione tra loro durante l'ossigenazione dell'emoglobina (Tsai et al., 1999). Ulteriori studi condotti su emoglobine ricombinanti mutate in posizione $\beta 116$ e/o $\beta 112$ hanno evidenziato solo delle leggere alterazioni delle proprietà di legame per l'ossigeno rispetto all'HbA. Questi stessi studi hanno anche dimostrato che il residuo in posizione $\beta 116$, adiacente a quella mutata nell'Hb Roma, gioca un ruolo estremamente importante non solo nella stabilizzazione dei contatti $\alpha 1\beta 1$, ma anche nell'inibire l'ossidazione dell'emoglobina. Tuttavia la stabilizzazione dei legami tra l'ossigeno e l'eme potrebbe non dipendere dalla stabilizzazione dei contatti $\alpha 1\beta 1$, mentre sarebbero le modifiche della struttura terziaria delle catene β nella regione dell'eme, in seguito all'assemblamento con le catene α , ad influenzare la stabilità dell'ossigeno legato alle catene β (Adachi et al., 2003). Contrariamente ai risultati ottenuti con le emoglobine ricombinanti, due varianti naturali mutate in posizione $\beta 116$ e note come Hb Hafnia [$\beta 116(\text{G18})\text{His}\rightarrow\text{Gln}$] (Blanke et al., 1988) e Hb Venix [$\beta 116(\text{G18})\text{His}\rightarrow\text{Leu}$] (Wajcman et al., 2003) hanno mostrato un incremento dell'affinità per l'ossigeno, sebbene più basso di quello riscontrato per l'Hb Roma. Nel caso dell'Hb Venix, che rappresenta il 42% dell'emoglobina totale (contro il 25% rappresentato dall'Hb Roma) l'emolisato ha mostrato un'affinità per l'ossigeno più alta del 35% rispetto all'HbA, ma i meccanismi molecolari che governano le alterate proprietà di legame dell'ossigeno non sono ancora chiare.

L'Hb Roma rappresenta la prima variante in posizione $\beta 115(\text{G17})$ ad essere stata studiata dal punto di vista funzionale e il ruolo di tale residuo aminoacidico è stato esaminato confrontando i modelli molecolari delle altre due varianti in $\beta 115(\text{G17})$. La riduzione delle interazioni di van der Waals giustifica la riduzione della stabilità dell'emoglobina nello stato T. I parametri di legame con l'ossigeno dell'Hb Roma

sembrerebbero indicare un grado di stabilità del tetramero nella sua forma R maggiore che nella forma T, in accordo quindi con l'aumento dell'affinità per l'ossigeno riscontrata sperimentalmente.

La storia clinica e le condizioni ematologiche lievemente alterate della paziente suggeriscono ulteriori indagini. Ad ogni modo, grazie a questo studio è stata identificata una nuova variante mutata nell'interfaccia $\alpha 1\beta 1$ e funzionalmente differente dall'HbA ed è stato esaminato per la prima volta il ruolo del residuo $\beta 115$ sia dal punto di vista strutturale che funzionale. Tuttavia, per caratterizzare definitivamente il meccanismo molecolare attraverso il quale la sostituzione dell'alanina in posizione $\beta 115(G17)$ con una valina possa alterare le proprietà funzionali dell'emoglobina sarà necessario produrre e analizzare delle molecole di Hb Roma ricombinanti.

HbF-Monserrato-Sassari

[^Gγ93(F9) Cys→Arg]

6. HbF-Monserrato-Sassari [^Gγ93(F9) Cys→Arg].

Le varianti delle emoglobine fetali vengono identificate attraverso lo screening dei neonati utilizzando il sangue del cordone ombelicale o comunque effettuando prelievi nei primi mesi di vita quando i livelli di HbF restano sufficientemente alti da consentire il rilevamento della variante emoglobinica.

Ad oggi si conoscono in totale 88 varianti ^Aγ e ^Gγ (<http://globin.bx.psu.edu>), un numero sicuramente sottostimato rispetto al numero totale di emoglobine fetali anomale presenti nella popolazione mondiale, perché lo stesso ambiente intrauterino esercita una selezione nei confronti di un feto che presenta un'emoglobina con un'alterata capacità di trasportare l'ossigeno ed inoltre perché sono ancora pochi i centri di neonatologia nei quali si effettua di routine lo screening relativo all'emoglobina.

Diverse varianti fetali sono state identificate in neonati sardi:

- l'HbF-Sardegna [^Aγ75(E19)Ile→Thr] (Grifoni et al., 1975) riscontrata per la prima volta in un soggetto di origine sarda e successivamente anche in molte altre popolazioni (Huisman et al., 1991).
- l'HbF-Porto Torres [^Aγ75(E19)Ile→Thr, ^Aγ136(H14)Ala→Ser] (Pirastu et al., 2004)
- l'HbF-Calabria [^Gγ118(GH1)Phe→Leu] così chiamata perché il neonato sardo aveva ereditato la mutazione dal padre di origine calabrese (Manca et al., 2000).
- L'HbF-Sassari [^Gγ75(E19)Ile→Thr] descritta per la prima volta in un neonato di Sassari (Ferranti et al., 1994) e successivamente in uno greco (Hb Lesvos) (Papadakis et al., 1996)
- l'HbF-Emirates [^Gγ59(E3) Lys→Glu] identificata per la prima volta in un neonato arabo (Abbes et al., 1995) e successivamente solo nella popolazione sarda (Manca et al., 2006)
- l'HbF-Columbus-GA [^Gγ94(FG1)Asp→Ans] (Cherchi et al., 2000) descritta per la prima volta in un unico neonato di origine caucasica (Nakatsuji et al., 1982).

L'HbF-Monserrato-Sassari oggetto di questa relazione deve il suo nome al fatto che è stata riscontrata per la prima volta a Sassari, in eterozigosi. Si tratta di una

variante G_{γ} che presenta una sostituzione della cisteina in posizione 93 (F9) con una arginina. L'interesse per la sua caratterizzazione strutturale e funzionale deriva dal fatto che è la prima, tra le varianti fetali, a coinvolgere il residuo di cisteina $\gamma 93$.

I dati raccolti nel database HbVar (<http://globin.cse.psu.edu>) hanno dimostrato che in più di 250 sequenze beta globiniche analizzate la posizione 93 è occupata dal residuo di cisteina, che risulta quindi essere altamente conservato. Da qui l'interesse nei confronti dell'HbF-Monserrato-Sassari che fornisce un'ottima opportunità per capire il ruolo della Cys93 nelle catene G_{γ} dell'HbF e verificare eventuali effetti funzionali dovuti alla sua sostituzione.

6.1. MATERIALI E METODI.

Emolisi.

Il campione di sangue prelevato dal neonato eterozigote per la variante HbF-Monserrato-Sassari è stato immediatamente sottoposto a tre cicli di lavaggio con una soluzione isotonica di NaCl allo 0.9%. La centrifugazione a 1000 x g a 4°C in una centrifuga BECKMAN J2 21 ha consentito di separare il plasma dai globuli rossi, i quali sono stati poi lisati con l'aggiunta di due volumi di soluzione ipotonica fredda. L'emolisato ottenuto dopo centrifugazione a 12.000 x g per 30 minuti a 4°C è stato analizzato mediante diverse tecniche.

Tecniche elettroforetiche.

- L'isoelettrofocalizzazione (IEF) ha consentito di identificare le varie componenti emoglobiniche contenute nell'emolisato.

Il supporto utilizzato è rappresentato da un gel di poliacrilammide al 5%, al quale viene aggiunta una miscela di anfoliti al 40% con un range di pH 6.7-7.7 (Manca et al., 1988; Masala et al., 1991). L'elettroforesi viene condotta per 3 ore circa a 1000 V e al termine della corsa il gel viene colorato con una soluzione allo 0.1% di Blu di Bromofenolo in etanolo al 50% e acido acetico al 5% e decolorato con una soluzione di etanolo al 30% e acido acetico al 6%.

- L'elettroforesi condotta in condizioni denaturanti in presenza di acido acetico 5%, urea 8 M e TRITON X-100 (AUT-PAGE, Acido acetico, Urea e TRITON, Poli-Acrilammide-Gel-Elettroforesi) (Manca et al., 1986) consente di determinare la composizione globinica dell'emolisato.

Il campione, denaturato con una soluzione contenente urea 8 M, acido acetico al 10% e 2-mercaptoetanololo al 10%, viene sottoposto alla corsa elettroforetica e le proteine in esso contenute si separano con una velocità inversamente proporzionale alla loro idrofobicità. Il TRITON X-100 infatti determina la formazione di aggregati micellari con le porzioni idrofobiche delle globine. Queste assumono quindi una mobilità che si riduce in funzione del loro grado di idrofobicità consentendo così di separarle.

Al termine della corsa il gel è stato colorato con una soluzione allo 0.5% (p/v) di Coomassie Brilliant Blue, metanolo al 40% e acido acetico al 10% e decolorato con una soluzione contenente metanolo al 40% e acido acetico al 10%.

Tecniche cromatografiche.

- La cromatografia liquida in fase inversa ad alta pressione (RP-HPLC), ha permesso di separare le componenti globiniche (Masala et al., 1994) utilizzando una colonna Vydac C4 (150 mm x 2.1, 5µm di diametro delle particelle). Il solvente A era costituito da acetonitrile/H₂O (20:80) e acido trifluoroacetico (TFA) allo 0.1%, mentre il solvente B da acetonitrile/H₂O (60:40) e acido trifluoroacetico (TFA) allo 0.1%. Per l'eluizione delle globine è stato utilizzato un gradiente lineare dal 52% al 59% del solvente B in 60 minuti ad un flusso di 1 mL/min. Il sistema di rivelazione connesso al sistema HPLC permette di rilevare l'assorbimento alla lunghezza d'onda di 220 nm.
- La cromatografia a scambio anionico, condotta su una colonna preimpaccata HiLoad 26/10 Q Sepharose HP (GE-Healthcare) collegata ad un sistema cromatografico FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) Akta-Prime (GE-Healthcare), ha permesso di purificare la variante fetale HbF-Monserrato-Sassari dall'emolisato. La colonna è stata equilibrata con un tampone Tris/HCl 20 mM a pH 8.5 e l'eluizione è stata condotta applicando un gradiente lineare di NaCl da 0 a 0.2 M in 120 minuti ad un flusso di 5 mL/min.
- La cromatografia ad esclusione molecolare, condotta in una colonna Sephadex G-25 (25 x 2.5 cm) equilibrata in un tampone HEPES/NaOH 10 mM e NaCl 0.1 M a pH 8.0, viene utilizzata per la rimozione dei modulatori eterotropici quali il BPG.

Determinazione della massa delle catene globiniche.

Per gli esperimenti di spettrometria di massa è stato utilizzato uno spettrometro di massa LCQ Advantage (ThermoFinnigan, San José, CA, USA), equipaggiato con una sorgente per elettronebulizzazione (ESI) ed un analizzatore a trappola ionica (IT) accoppiato ad un Micro-HPLC della ThermoFinnigan (San José, CA, USA). La separazione delle catene globiniche in RP-HPLC è stata condotta su una colonna Vydac C8 (150 x 2.1 mm, 5µm di diametro delle particelle) utilizzando come eluente A acido trifluoroacetico (TFA) allo 0.056% e come eluente B acetonitrile/H₂O (80:20) e acido trifluoroacetico (TFA) allo 0.05 %, applicando un gradiente lineare dallo 0% al 100% di B in 60 minuti e ad un flusso di 0.3 mL/min. Una valvola a T indirizzava un flusso di 0.2 mL/min al detector (*diode array*) e un flusso di 0.1 mL/min verso la sorgente ESI. Gli spettri di massa sono stati acquisiti in modalità di ionizzazione positiva ogni 3 ms, nel intervallo di valori m/z 300-2000. Il voltaggio di ionizzazione è stato settato a 4.50 kV e la temperatura del capillare a 220°C. La deconvoluzione degli spettri di massa è stata eseguita automaticamente utilizzando il software fornito con lo strumento e con il software MagTran 1.0 (Zhang and Marshall, 1998).

Studi funzionali.

Per gli studi funzionali sono stati condotti esperimenti di equilibrio con l'ossigeno utilizzando il metodo tonometrico (Giardina et al, 1981) mediante uno spettrofotometro Varian modello Cary 50. Sono stati così determinati i parametri di legame dell'emoglobina per l'ossigeno quali l'affinità, espressa in termini di $\log P_{50}$, e la cooperatività tra gli emi, espressa in termini di n_{50} , coefficiente di Hill. Gli esperimenti sono stati eseguiti alla temperatura di 37° C nel range di pH 7.0-7.8 utilizzando un tampone HEPES/NaOH 0.1 M e NaCl 0.1 M, sia in presenza che in assenza del modulatore allosterico BPG 3 mM e ad una concentrazione proteica di 3-5 mg/mL.

6.2. RISULTATI.

A differenza dell'emolisato di un neonato normale che presenta tre bande proteiche (HbF, HbF₁ e HbA), il pattern elettroforetico dell'emolisato del neonato oggetto di questo studio mostra due tetrameri aggiuntivi (Fig. 1). Di questi, uno migra come la variante HbF-Sardegna altamente diffusa in tutta la popolazione mondiale (Masala et al., 1991 e Manca et al., 2008), l'altro corrisponde alla variante HbF-Monserrato-Sassari.

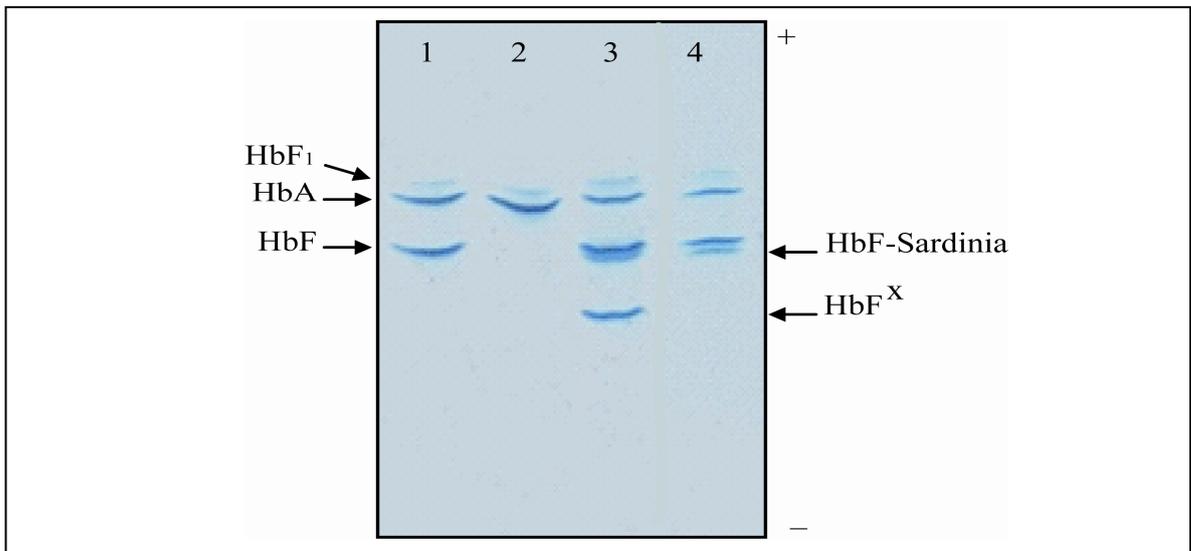


Fig. 1. IEF su gel di poliacrilammide dell'emolisato del cordone ombelicale.

Nell'elettroforesi in condizioni denaturanti, Fig.2, l'emolisato del neonato eterozigote per la variante HbF-Monserrato-Sassari (linea 1) è stato messo a confronto con l'emolisato di un adulto (linea 2) e quello di un neonato normale (linea 3). A differenza dell'emolisato del neonato normale, che presenta tre bande relative alle catene α , $G\gamma$ e $A\gamma$ (le globine $A\gamma^T$ e $A\gamma^I$ non si separano con questa tecnica e co-migrano), l'emolisato del neonato eterozigote per la variante HbF-Monserrato-Sassari presenta una banda aggiuntiva, relativa alla globina $G\gamma$ mutata, che risulta più catodica delle catene $G\gamma$ e $A\gamma$.

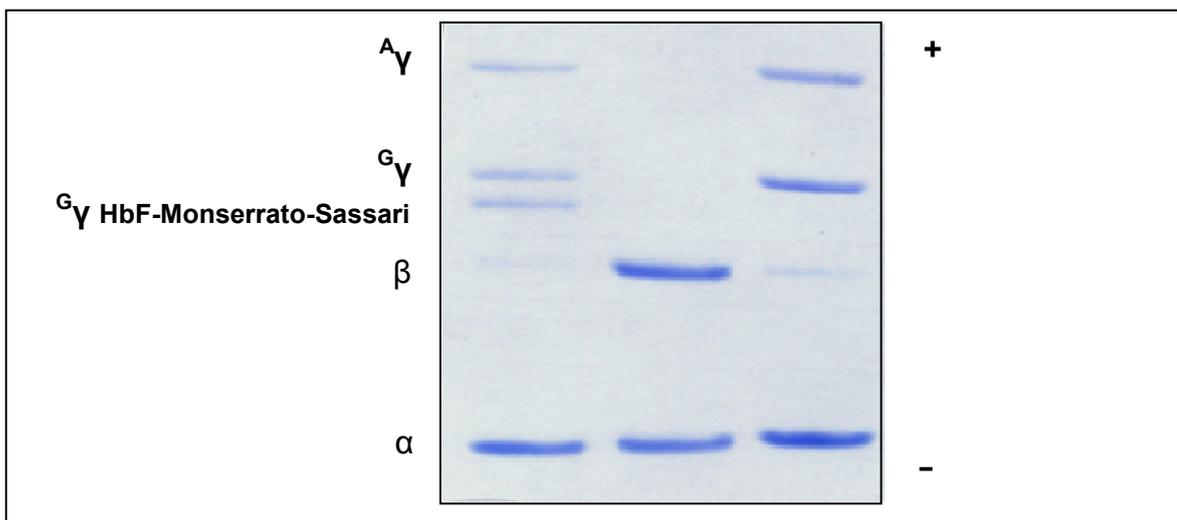


Fig. 2. AUT-PAGE . Elettroforesi condotta in condizioni denaturanti in presenza di acido acetico 5%, urea 8 M e TRITON X-100 (Manca et al., 1986) dell'emolisato del neonato eterozigote per la variante HbF-Monserrato-Sassari (linea 1), dell'adulto normale (linea 2) e del neonato normale (linea 3).

La composizione globinica dell'emolisato del neonato eterozigote per l'HbF-Monserrato-Sassari è stata ulteriormente risolta attraverso un'analisi in RP-HPLC. Il cromatogramma (Fig. 3) mostra, oltre alle catene α e β , le catene $A\gamma^I$ (19.2%), la variante allelica $A\gamma^T$ (15.8%), le catene normali $G\gamma$ (33.2%) e le catene $G\gamma$ mutate (31.8%).

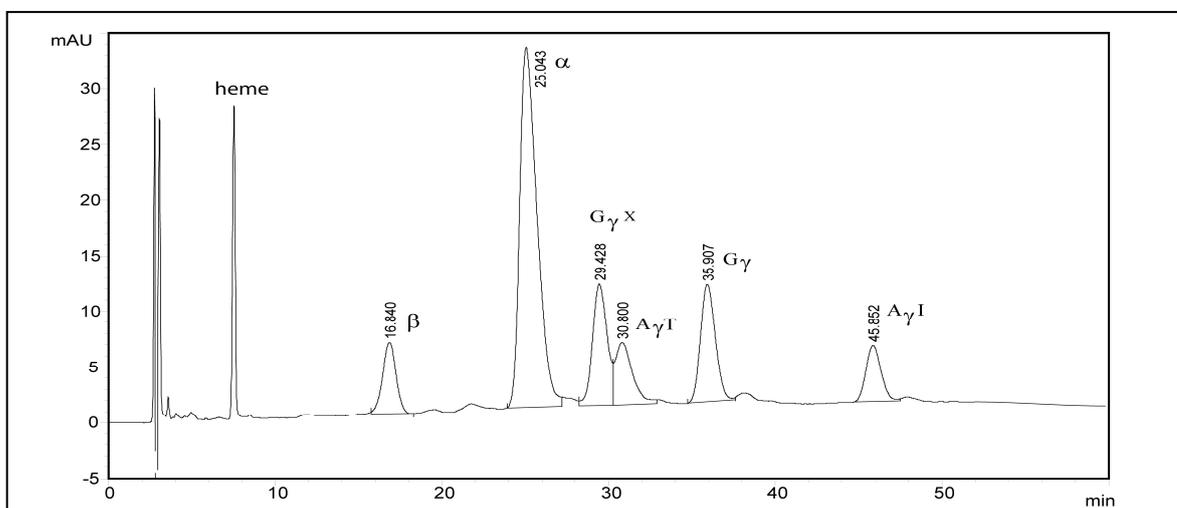


Fig. 3. Analisi RP-HPLC dell'emolisato del neonato eterozigote per l'HbF-Monserrato-Sassari.

La presenza in eterozigosi di una mutazione a carico del gene $G\gamma$ è stata confermata attraverso il sequenziamento genico, eseguito dal Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Biochimiche e Cellulari dell'Università di Sassari, che ha messo in evidenza una mutazione puntiforme nel codone 93 ($TGT \rightarrow CGT$) a carico dei geni codificanti per le catene $G\gamma$ che porta ad una sostituzione in posizione 93 nella sequenza aminoacidica Cys \rightarrow Arg.

L'uso di primers specifici ha rivelato l'eterozigosi anche per l'HbF-Sardegna dovuta ad una mutazione puntiforme nel codone 75 ($A\underline{T}A \rightarrow A\underline{C}A$) che porta alla sostituzione dell'isoleucina normalmente presente in posizione 75 (A_{γ}^I) con una treonina (A_{γ}^T) (Manca et al., 2008), confermando quanto era emerso dall'analisi in RP-HPLC.

L'analisi di massa effettuata sulle catene globiniche della variante purificata (Fig. 4) ha permesso di mettere in evidenza, tramite deconvoluzione dello spettro ESI, due valori di massa: il primo, pari a 15.126 ± 1 Da, corrisponde al valore di massa teorico delle catene α normali, mentre il secondo, pari a 16.048 ± 1 Da, mostra uno shift di massa di +53 Da rispetto alle catene G_{γ} normali, in accordo con la sostituzione Cys \rightarrow Arg dedotta a livello genico.

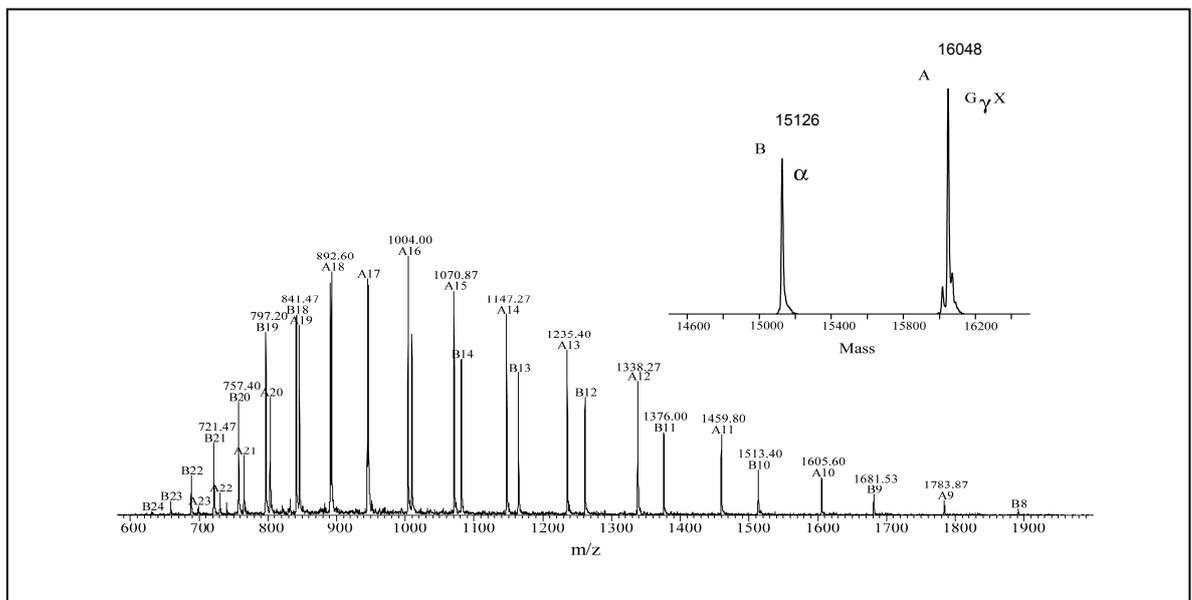


Fig. 4. Spettro ESI delle catene globiniche della variante HbF-Monserrato-Sassari purificata.

Al fine di valutare l'affinità per l'ossigeno dell'emolisato del neonato che presenta eterozigosi per la variante in oggetto sono stati condotti esperimenti di equilibrio con l'ossigeno in assenza e in presenza di concentrazioni fisiologiche del modulatore allosterico negativo BPG.

In assenza di BPG l'emolisato ha mostrato un'affinità, a pH 7.4, più alta del 32% rispetto a quella dell'HbF normale purificata, nonostante all'interno dell'emolisato l'HbF-Monserrato-Sassari costituisca solo il 23.3% dell'Hb totale. La variante purificata invece presenta, nelle stesse condizioni, un aumento dell'affinità del 44% rispetto all'HbF normale purificata e del 40% rispetto all'HbA (tabella 1). In

presenza del modulatore BPG l'affinità per l'ossigeno è stata valutata nel range di pH 7.0-7.8 (Fig. 4). In queste condizioni l'HbF-Monserrato-Sassari mostra un'affinità più alta rispetto all'HbF lungo tutto il range di pH esaminato; in particolare a pH 7.4 l'incremento di affinità risulta del 54% rispetto all'HbF e del 65% rispetto all'HbA (tavola 1). Inoltre l'effetto Bohr è ridotto rispetto a quello dell'HbF normale come indicato dal coefficiente di Bohr ($\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$) che per la variante è pari a -0.45 anziché -0.52. Per quanto riguarda la cooperatività, il coefficiente di Hill, n_{50} , il cui valore è pari a 2.4 ± 0.4 nell'HbF si riduce a 2.0 ± 0.3 nell'HbF-Monserrato-Sassari.

Tavola 1. Proprietà di legame dell'ossigeno dell'emolisato intero e delle frazioni purificate di HbF-Monserrato-Sassari, HbF e HbA. Gli esperimenti sono stati condotti in duplicato a pH 7.4 e a 37°C. E' stata calcolata una deviazione standard media per i valori di P_{50} pari a $\pm 8\%$; i valori di p risultano <0.0001 per ogni esperimento.					
Condizioni Sperimentali	Campione	P_{50} (torr)	? P_{50} (torr)	% incremento affinità	n_{50}
Stripped	emolisato intero	6.76	3.24*	32*	1.89
	HbF-Monserrato-Sassari	5.62	4.4* 3.7**	44*40**	1.71
	HbF	10			2.9
	HbA	9.33			2.6
+ 3 mM BPG	HbF-Monserrato-Sassari	7.4	8.6* 14**	54*65**	2.0
	HbF	16			2.4
	HbA	21.4			2.4

*rispetto all'HbF
**rispetto all HbA

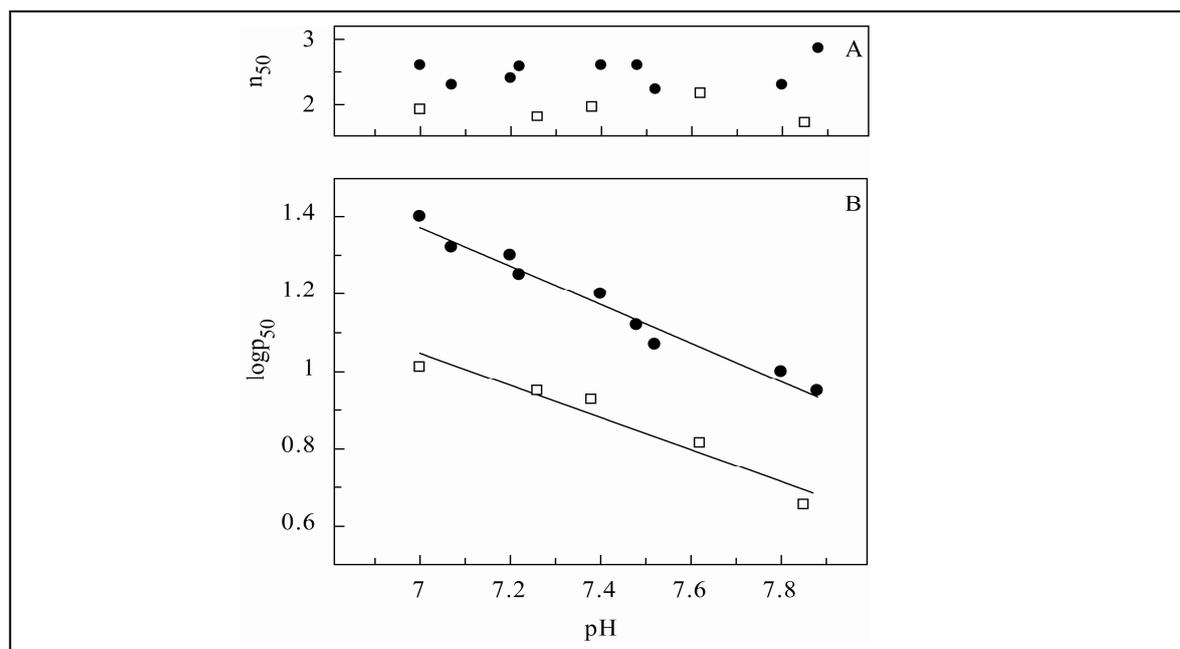


Fig. 4. . Effetto Bohr. Effetto del pH sull'affinità per l'ossigeno in termini di $\log P_{50}$ (B) e la cooperatività espressa in termini di n_{50} (A) dell'HbF-Monserrato-Sassari purificata (\square) e dell'HbF normale (\bullet). Gli esperimenti sono stati eseguiti a 37° C in HEPES/NaOH 0.1 M e NaCl 0.1 M + BPG 3mM.

6.3 DISCUSSIONE.

La caratterizzazione della variante HbF-Monserrato-Sassari porta a 53 il numero di varianti G_{γ} ad oggi note, con la particolarità di essere la prima a presentare una mutazione in posizione 93. In letteratura sono state descritte quattro mutazioni a carico del codone 93 del gene β globinico che hanno prodotto le seguenti varianti emoglobiniche adulte:

- HbA2 Sant'Antioco [$\delta 93(F9)Cys \rightarrow Gly$] (Galanello et al., 1994)
- Hb Okazaki [$\beta 93(F9)Cys \rightarrow Arg$] (Harano et al., 1984)
- Hb Cleveland [$\beta 93(F9)Cys \rightarrow Arg$; 121(GH4)Glu \rightarrow Gln] (Wilson et al., 1991)
- Hb Fort Dodge [$\beta 93(F9)Cys \rightarrow Tyr$] (Hoyer et al., 2002)

Come già detto la Cys93 è un residuo aminoacidico estremamente conservato nei mammiferi ed è situato nell'interfaccia $\alpha 1\beta 2$ nell'HbA, dove ha un ruolo cruciale sulle proprietà del tetramero, e nell'interfaccia $\alpha 1\gamma 2$ nell'HbF. Delle quattro HbA varianti in $\beta 93$ la caratterizzazione funzionale è stata effettuata solo sulla Hb Okazaki e sulla Hb Cleveland, quest'ultima con una mutazione addizionale a quella in $\beta 93$ (Mawjood et al., 2000; Cheng et al., 2002). Le due varianti, benché siano state ritrovate in individui apparentemente normali, mostrano simili variazioni funzionali: un incremento dell'affinità per l'ossigeno e una riduzione dell'effetto Bohr e della cooperatività tra gli emi. L'aumento dell'affinità per l'ossigeno è stato attribuito al fatto che cambiando l'identità del residuo in posizione 93 si ostacola la formazione di un ponte salino fondamentale per la stabilizzazione dello stato T (deoxy) dell'emoglobina. Nella deoxy-HbA, infatti, il residuo di istidina $\beta 146$ posto all'estremità C-terminale della globina forma un ponte salino con l'aspartato in posizione $\beta 94$ e la lisina in posizione $\alpha 40$. Lo stesso residuo di istidina forma un anello attorno al gruppo -SH della catena laterale dell'aminoacido $\beta 93$, la cisteina. Uno studio di Perutz ha dimostrato che la modificazione del gruppo -SH con reagenti voluminosi, come N-ethylmaleimide, ostacola la chiusura del suddetto anello con conseguente inibizione della formazione del ponte salino tra l'His $\beta 146$ e l'Asp $\beta 94$. Di conseguenza si ha una destabilizzazione della forma T dell'emoglobina che fa aumentare l'affinità per l'ossigeno e un'alterazione del contributo dato dall'istidina 146 all'effetto Bohr che risulta così ridotto (Perutz et al., 1969). Perciò Harano et al. hanno sostenuto che nell'Hb Okazaki la sostituzione in posizione $\beta 93$ della cisteina con la più ingombrante arginina,

agirebbe nello stesso modo per aumentare l'affinità per l'ossigeno anche di questa variante (Harano et al., 1984).

I risultati ottenuti con la caratterizzazione dell'HbF-Monserrato-Sassari sono in accordo con i dati citati sopra nel fornire una spiegazione agli effetti provocati dalla sostituzione Cys→Arg ed evidenziano che la cisteina in posizione $\gamma 93$ gioca lo stesso significativo ruolo strutturale e funzionale nella transizione T→R dell'HbF in quanto influisce sulla disposizione del legame salino nei contatti $\alpha 1\gamma 2$ e $\alpha 2\gamma 1$ che sono fondamentali per la cooperatività tra le subunità.

Alcuni studi hanno dimostrato che il più importante agente vasodilatatore, l'ossido nitrico, è sintetizzato oltre che dalle cellule endoteliali anche dagli eritrociti (Jubelin et al., 1996; Gladwin et al., 2000), dove in parte va ad interagire con il gruppo eme dell'emoglobina sottoforma di ferro-nitrosil-Hb e in parte si trova legato covalentemente alla Cys $\beta 93$ a formare S-nitrosoemoglobina (SNO-Hb) (Gladwin et al., 2000). Una volta che l'NO lascia gli eritrociti, a livello dei tessuti si verificano contemporaneamente l'ossigenazione e la vasodilatazione. Durante l'ultimo decennio l'emoglobina, quale modulatore allosterico della nitrito reductasi che genera l'NO, era stata considerata importante nel contribuire a fondamentali risposte fisiologiche come la vasodilatazione nell'ipossia. (Crosby et al, 2003; Huang et al. 2005; Grubina et al., 2007). In particolare, il nitrito in ambiente parzialmente ossigenato reagisce contemporaneamente con la deossi- e la ossi-emoglobina (Grubina et al., 2007). La reazione con la deossi-emoglobina determina la riduzione del nitrito ad ossido nitrico portando alla formazione di ferro-nitrosil-Hb; contemporaneamente l'ossi-emoglobina ossida il nitrito a nitrato formando tutta una serie di intermedi radicalici altamente reattivi che ossidano la ferro-nitrosil-Hb (prodotta dalla deossi-emoglobina) e rilasciano ossido nitrico dall'eme ferrico. La ferro-nitrosil-Hb inoltre può effettuare un trasferimento intramolecolare dell'NO alla Cys $\beta 93$ e formare la SNO-Hb (McMahan et al., 2000; McMahan et al., 2002).

A causa della presenza della Cys93 nelle catene γ sono stati trovati *in vivo* dei livelli di SNO-HbF più alti nella vena ombelicale piuttosto che a livello arterioso ed è stato ipotizzato che nel feto la pressione sanguigna possa essere regolata dagli eritrociti tramite un meccanismo dipendente dall'emoglobina (Funai et al., 1997).

Il confronto tra le proprietà funzionali della SNO-HbA e della SNO-HbF ha messo in evidenza che la S-nitrosazione aumenta l'affinità per l'ossigeno dell'HbA mentre

quella dell'HbF ne è meno influenzata (Clementi et al., 2003). Nel caso dell'HbA l'S-nitrosazione dell'emoglobina, che consente agli eritrociti di fornire simultaneamente ossigeno e ossido nitrico, avviene solo in condizioni di forte stress (ipossia, acidosi e ridotto flusso sanguigno), mentre nel caso dell'HbF avviene, in accordo con le richieste fisiologiche del feto, a livello dei tessuti con una pressione di ossigeno pressochè normale. I modelli strutturali dei residui aminoacidici coinvolti nella variazione dell'affinità per l'ossigeno in seguito alla nitrosazione indicano che la distanza tra la Cys γ 93 e l'His γ 146 è maggiore rispetto a quella dei corrispondenti residui dell'HbA ed è stato quindi ipotizzato che la nitrosazione delle catene γ non riesce ad inibire completamente la formazione del ponte salino tra l'His γ 146 e l'Asp γ 94, spiegando così il minore incremento dell'affinità per l'ossigeno dell'HbF rispetto all'HbA a seguito della S-nitrosazione (Clementi et al., 2003). In più, la sostituzione della Cys con un aminoacido di dimensioni simili non dovrebbe avere nessuna conseguenza sul trasporto dell'ossigeno, mentre la sua sostituzione con un residuo aminoacidico di dimensioni maggiori, come ad esempio l'Arg nel caso della variante in oggetto, dovrebbe influire maggiormente, come osservato nella Hb Okazaki.

Chiaramente l'HbF-Monserrato-Sassari, essendo la sua cisteina γ 93 sostituita, non può andare incontro alla S-nitrosazione né rilasciare NO per ottenere vasodilatazione e aumento del flusso sanguigno. Tuttavia noi pensiamo che essendo presente nell'emolisato del bambino portatore della variante fetale il 53% di HbF normale, le cui catene globiniche α γ e γ 93 hanno la cisteina in posizione 93, sia garantito un rilascio di NO sufficiente ad evitare conseguenze cliniche o biologiche.

BIBLIOGRAFIA.

- Abbes S, Fitzgerald PA, Varady E, Girot R, Pic P, Blouquit Y, Ducrocq R, Drupt F, Wajcman H (1995), *Hemoglobin* 19:173-82.
- Adachi K, Yang Y, Lakka V, Wehrli S, Reddy KS, Surrey S (2003), *Biochemistry* 42:10252-10259.
- Amiconi G, Bertollini A, Bellelli A, Coletta M, Condo` SG, Brunori M (1985), *Eur J Biochem* 150:387–393.
- Arnone A (1972), *Nature* 237:146-9.
- Berenbrink M (2006) *Respir Physiol Neurobiol.*154:165-84. Review.
- Bigotti I, Giovenco S, Giardina B, Antonini E, Brunori M, Wyman (1971), *J. Arch Biochem Biophys.*142:274-80.
- Blanke S, Johnsen A, Wimberley PD, Mortensen HB (1988), *Biochem. Biophys. Acta* 955:214-219.
- Bondarenko PV, Chelius D, Shaker TA (2002), *Anal. Chem.* 74:4741-4749.
- Brittain T (2005), *J. Inorg. Bioch.* 99:120-129.
- Brunori M (1975). In: Horecker BL, Stadtman ER (eds) *Current topics in cellular regulation*, vol 9. Academic Press, New York, pp 1–39.
- Camardella L, Caruso C, D'Avino R, di Prisco G, Rutigliano B, Tamburrini M, Fermi G, Perutz MF (1992) *J Mol Biol.* 224:449-60.
- Cheng Y, Shen TJ, Simplaceanu V, Ho C (2002), *Biochemistry* 41:11901-11913.
- Cherchi L, Palici di Suni M, Manca L, Masala B (2000), *Hemoglobin.* 24:53-57.
- Clementi ME, Orsini F, Schininà ME, Noia G, Giardina B (2003), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302:515-519.
- Crosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Shechter AN, Cannon RO, Gladwin MT (2003), *Nat. Med.* 9:1498-1505.
- Denton EJ (1961), *Prog Biophys Mol Biol.*11:177-234.
- di Prisco G, Tamburrini M (1992), *Comp Biochem Physiol* 102B:661–671.
- Dickerson RE, Geis I (1983), In: P. Hagopian (Ed.) *The Benjamin/Cummings Publishing Company*, Menlo Park, CA, USA.
- Fago A, Carratore V, di Prisco G, Feuerlein RJ, Sottrup-Jensen L, Weber RE (1995), *J Biol Chem* 270:18897–18902.
- Fago A, Bendixen E, Malte H, Weber RE (1997), *J Biol Chem.* 272:15628-35.

- Fantl WJ, Di Donato A, Manning JM, Rogers PH, Arnone A.(1987), J Biol Chem. 262:12700-13.
- Ferranti P, Barone F, Pucci P, Malorni A, Marino G, Pilo G, Manca L, Masala B (1994), Hemoglobin.18:307-15.
- Funai EF, Davidson A, Seligman SP, Finlay TH (1997), Biochem. Biophys. Res. Commun. 239:875-877.
- Galanello D, Gasperini D, Perseu L, Barella S, Ideo A, Cao A (1994), Hemoglobin 18:435-439.
- Giardina B, Amiconi G (1981), Methods Enzymol. 76:417-427.
- Giardina B, Amiconi G (1981). In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) Methods in enzymology, vol 76. Academic Press, New York, pp 417–427.
- Giardina B, Messina I, Scatena R, Castagnola M (1995), Crit Rev Biochem Mol Biol. 30:165-96. Review.
- Giardina B, Mosca D, De Rosa MC (2004) Acta Physiol Scand. 182:229-44. Review.
- Gladwin MT, Ognibene FP, Pannel LK, Nichols JS, Pease-Fye ME, Shelhamer JH, Schechter AN (2000), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:9943-9948.
- Grifoni V, Kamuzora H, Lehmann H, Charlesworth D. (1975), Acta Haematol. 53:347-55.
- Gronenberg AM, Clore GM, Brunori M, Giardina B, Falcioni G, Perutz MF (1984), J Mol Biol 178:731–742.
- Grubina R, Huang Z, Shiva S, Joshi MS, Azarov I, Basu S, Ringwood LA, Jiang A, Hogg N, Kim-Shapiro DB, Gladwin MT (2007), J. Biol. Chem. 282:12916-12927.
- Harano K, Harano T, Shibata S, Ueda S, Mori H, Seki M (1984), FEBS 173:45-47.
- Hashimoto K., Yamaguchi Y and Matsuura F (1960), Bull. Jap. Sot. Sci. Fish 26:827-834
- Hoyer DJ, Mc Cormick DJ., Snow K, Kubik KS, Holmes MW, Dawson DB, Shaber R, Marner M., Hosmer J, Shinno N, Fairbanks VF (2002), Hemoglobin 26:299-303.
- Huang Z, Shiva S, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Ringwood LA, Irby CE, Huang KT, Ho C, Hogg N, Schechter AN, Gladwin MT (2005), J. Clin. Invest. 115:2099-2107.
- Huisman TH, Kutlar F, Gu LH (1991), Hemoglobin 15:349-79. Review.
- Ingermann RL, Terwilliger RC (1982), J Exp Zool. 220:171-7.
- Ito N, Komiyama NH, Fermi G (1995), J Mol Biol.250:648-58.
- Jubelin BC, Gierman JL (1996), Am. J. Hypertens 9:1214-1219.

- Kilmartin JV, Breen JJ, Roberts GCK (1973), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70:1246-1249.
- Kilmartin JV, Wootton JF (1970), Nature 228:766-767.
- Koshland D E, Nemethy G, Filmer D (1966), Biochemistry 5:365-385.
- Manca L, Cherchi L, De Rosa MC, Giardina B, Masala B. (2000), Hemoglobin. 24:37-44.
- Manca L, Demuro P, Masala B (1988) Clin Chim Acta. 177:231-8.
- Manca L, Formato M, Depuro P, Gallismi D, Orzatesi M, Masala B (1986), Hemoglobin 10:519-528.
- Manca L, Masala B (2008), IUBMB Life 60:94-111.
- Manca L, Pirastru M, Speziga SM, Masala B (2006), Hemoglobin 30:29-34.
- Masala B, Manca L (1991) Clin Chim Acta 198:195-202.
- Masala B, Manca L (1994), Methods Enzymol. 231:21-44.
- Mathews JB, Hanania GFH, Gurd FRN (1979), Biochemistry 18:1928-1936.
- Mawjood AH, Miyazaki G, Kaneko R, Wada Y, Imai K (2000), Protein Eng. 13:113-20.
- Mazzarella L, Bonomi G, Lubrano MC, Merlino A, Riccio A, Vergara A, Vitagliano L, Verde C, di Prisco G (2006), PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics 62:316-321.
- Mazzarella L, D'Avino R, di Prisco G, Savino C, Vitagliano L, Moody PC, Zagari A (1999), J Mol Biol. 287:897-906.
- Mazzarella L, Vergara A, Vitagliano L, Merlino A, Bonomi G, Scala S, Verde C, di Prisco G. (2006), PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics 65:490-498.
- McMahon JT, Moon RE, Luschingier, Carraway MS, Stone AE, Stolp BW, Gow AJ, Pawloski JR, Watke P, Singel DJ, Piantadosi CA, Stamler JS (2002), Nat. Med. 8:711-777.
- McMahon JT, Stone AE, Bonaventura J, Singel DJ, Stamler JS (2000), J. Biol. Chem 275:16738-16745.
- Monod J., Wyman J., Changeux J-P. J. (1965), Mol. Biol. 12:88-118.
- Mylvaganam SE, Bonaventura C, Bonaventura J, Getzoff ED (1996), Nat Struct Biol. 3:275-83.
- Nakatsuji T, Lam H, Wilson JB, Webber BB, Huisman TH (1982), Hemoglobin 6:593-8.

- Noble RW, Kwiatkowski LD, De Young A, Davis BJ, Haedrich RL, Tam LT, Riggs AF (1986), *Biochim Biophys Acta* 870:552–563.
- O'Donnell S, Mandaro R, Schuster TM, Arnone A. (1979), *J Biol Chem.* 254:12204-8.
- Olianas A, Meloni C, Messana I, Sanna MT, Castagnola M, Manconi B, Salvadori S, Giardina B, Pellegrini M (2011), *J Comp Physiol B.* 181:187-97.
- Olianas A, Messana I, Sanna MT, Castagnola M, Manconi B, Masia D, Coluccia E, Giardina B, Pellegrini M (2005), *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*141:400-7.
- Papadakis MN, Patrinos GP, Drakoulakou O, Loutradi-Anagnostou A (1996), *Hum Genet.* 97:260-2.
- Parkhurst LJ, Goss DJ, Perutz MF (1983), *Biochemistry* 22: 5401-5409.
- Pellegrini M, Giardina B, Olianas A, Sanna MT, Deiana AM, Salvadori S, di Prisco G, Tamburrini M, Corda M (1995). *Eur J Biochem* 234:431–436.
- Pellegrini M, Giardina B, Verde C, Carratore V, Olianas A, Sollai L, Sanna MT, Castagnola M, di Prisco G (2003), *Biochem J.* 372:679-86.
- Pelster B (2001), *News Physiol Sci* 16:287–291.
- Pelster B, Weber RE (1991), vol 8. Springer, pp 55-77.
- Perutz MF (1970), *Nature* 228:726-39.
- Perutz MF, Brunori M (1982), *Nature* 199:421-426.
- Perutz MF, Kilmartin JV, Nishikura K, Fogg JH, Butler PJ, Rollema HS (1980), *J Mol Biol.*138:649-68.
- Perutz MF, Muirhead H, Co JM, Goaman LC (1968), *Nature* 219:131-139.
- Perutz MF, Muirhead H, Mazzarella L, Crowther RA, Greer J, Kilmartin JV (1969), *Nature* 222:1240-1243.
- Perutz MF, Shih DT, Williamson D (1994), *J Mol Biol.* 239:555-60.
- Pirastru M, Manca L, di Suni MP, Speziga SM, Masala B (2004), *Hemoglobin* 28:297-303.
- Powers DA and Edmundson AB (1972), *J. Biol. Chem.* 247:6686-6693.
- Riggs AF (1988) *Annu Rev Physiol.* 50:181-204. Review.
- Rizzotti M (1993), *Trends Comp Biochem Physiol* 1:385–392.
- Rochette J, Craig JE, Thein SL (1994), *Blood Rev.* 8:213-24.

- Rodewald K, Stangl A, Braunitzer G (1984), Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 365:639-49.
- Root RW (1931), Biol. Bull 61:247-259.
- Rossi-Fanelli A, Antonimi E, Caputo A (1958), Biochem. Biophys. Acta 28:221.
- Russu IM, Ho NT, Ho C (1980), Biochemistry 19:1043-1052.
- Sack JS, Andrews LC, Magnus KA, Hanson JC, Rubin J, Love WE (1978), Hemoglobin. 2:153-69.
- Safo MK, Moure CM, Burnett JC, Joshi GS, Abraham DJ (2001), Protein Sci 10:951–957.
- Sholander PF, Van Dam L (1954), Biol Bull 107:247-259.
- Szabo A, Karp M (1976), Biochemistry 15:2869-2877.
- Tam LT, Riggs AF (1986), Biochim Biophys Acta 870:552–563.
- Tamburrini M, Riccio A, Romano M, Giardina B, di Prisco G (2000), Eur J Biochem 267:6089–6098.
- Tamburrini M, Verde C, Olianias A, Giardina B, Corda M, Sanna MT, Fais A, Deiana AM, di Prisco G, Pellegrini M (2001). Eur J Biochem 268:4104–4111.
- Tomita S (1981), J Biol Chem. 256:9495-500.
- Tsai CH, Shen N, Ho N, Ho C (1999), Biochemistry 38:8751-8761.
- Vaccaro Torracca AM, Raschetti R, Salvioli R, Ricciardi G, Winterhalter KH (1977), Biochim Biophys Acta 496:367–373.
- Van Beek GG, De Bruin SH (1980), Eur J Biochem. 105:353-60.
- Van Beek GG, Zuiderweg ER, de Bruin SH (1979), Eur J Biochem. 99:379-83.
- Verde C, Carratore V, Riccio A, Tamburrini M, Parisi E, di Prisco G (2002), J Biol Chem 277:36312–36320.
- Wajcman H, Bardakjian-Michau J, Riou J (2003), Hemoglobin 3:191-199.
- Weber RE (1990) In: Truchot JP, Lahlou B (eds) Animal nutrition and transport processes, vol 2. Transport, respiration and excretion: comparative and environmental aspects. Comp Physiol, Karger, pp 58–75.
- Weber RE (1992). In: Wood SC, Weber RE, Hargens AR, Millard RW (eds) Physiological adaptations in vertebrates. Marcel Dekker Inc, New York, pp 257–277.
- Weber RE, Jensen FB (1988), Ann Rev Physiol 50:161–179.

- Weber RE, Lykkeboe G, Johansen K (1976a), *J Exp Biol* 64:75–88.
- Weber RE, Wood SC, Lomholt JP (1976b), *J Exp Biol* 65:333–345.
- Wilkins NP, Iles T (1966), *Comp Biochem Physiol* 17:1141–1143.
- Wilson JB, Ramachandran M, Webber BB, Kutlar F, Hazelwood LF, Barnett D, Hirschler NV, Huisman TH (1991), *Hemoglobin* 15:269-278.
- Yasuda J, Ichikawa T, Tsuruga M, Matsuoka A, Sugawara Y, Shikama K. (2002), *Eur J Biochem.* 269:202-11.
- Yokoyama T, Chong KT, Miyazaki G, Morimoto H, Shih DT, Unzai S, Tame JR, Park SY (2004), *J Biol Chem.* 279:28632-40.
- Zhang Z, Marshall AG (1998), *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 9: 225-233.
- Zuiderweg ERP, Hamers LF, Rollema HS, de Bruin SH, Hilbers CW (1981), *Eur J Biochem* 118:95–104.