
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIOVANNI FELICE AZZONE, GIORGIO DOBRILLA

**Studi sul meccanismo di rilasciamento della fibra
muscolare striata. - I. Dimostrazione di una
reazione di trasferimento di energia nella
«inibizione da substrato» dell'ATPasi actomiosinica**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 32 (1962), n.3, p.
408-412.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_32_3_408_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biochimica. — *Studi sul meccanismo di rilasciamento della fibra muscolare striata.* — I. *Dimostrazione di una reazione di trasferimento di energia nella « inibizione da substrato » dell'ATPasi actomiosinica* (*). Nota di GIOVANNI FELICE AZZONE e GIORGIO DOBRILLA, presentata **) dal Socio M. ALOISI.

Gli studi sul meccanismo di rilasciamento della fibra muscolare hanno avuto inizio con l'esperimento di Marsh [1], il quale notò un effetto rilasciante da parte del supernatante di omogenato di muscolo. Portzehl [2] dimostrò che tale effetto rilasciante non era proprio del supernatante in toto, ma della sua quota corpuscolata. Muscatello *et al.* [3] hanno separato mediante centrifugazione frazionata diverse frazioni da omogenati di muscolo di rana ed hanno così dimostrato che l'effetto rilasciante è esclusivamente associato alle vescicole originate dalla frammentazione del reticolo sarcoplasmatico o sistema sarcotubulare. In successive ricerche Muscatello *et al.* [4, 5] hanno ottenuto prove per una correlazione fra la attività ATPasica, stimolata dal Mg^{++} ed inibita dal Ca^{++} , presente nei sarcotubuli, e l'effetto rilasciante del sistema sarcotubulare. Sulla base di questi dati è stata formulata l'ipotesi [5, 6] che i sarcotubuli inibiscono l'ATPasi actomiosinica attraverso la sintesi di un composto fosforilato ad alta energia. A favore di ciò sta l'osservazione che l'amital – inibitore delle reazioni di trasferimento di energia a livello dei mitocondri animali [7] – è in grado di rimuovere l'effetto rilasciante dei sarcotubuli.

Nella presente ricerca è stato provato l'effetto di inibitori delle reazioni di trasferimento di energia e di antilaviniici sull'ATPasi miofibrillare operante in ambiente con eccesso di ATP. È noto, dal lavoro di Perry e Grey [8], che, se nel sistema in cui agiscono le miofibrille la concentrazione di ATP supera quella del Mg^{++} , si ha inibizione della ATPasi miofibrillare. Tale fenomeno – indicato con termine di inibizione da substrato – viene rimosso dall'aggiunta di Ca^{++} in concentrazioni anche di molto inferiori a quelle del magnesio.

CONDIZIONI SPERIMENTALI.

Le miofibrille sono state ottenute secondo il metodo di Perry e Grey [8] leggermente modificato. Le concentrazioni dei reagenti nel mezzo erano le seguenti: 25 mM KCl, 10 mM tampone borato pH, 7,1, 50 mM TRIS pH 7,4, 2 mM $MgCl_2$, 2,5–5 mM ATP, 2 mM ossalato sodico. Volume finale 2 ml; 0,5 ml

(*) Dal Centro di Studio « G. Vernoni » per la Fisiopatologia del C.N.R. presso l'Istituto di Patologia generale della Università di Padova; la ricerca è stata sussidiata anche da un « Grant-in-aid » della « Muscular Dystrophy Associations of America ».

(**) Nella seduta del 10 marzo 1962.

di sospensione miofibrillare in KCl-borato, contenenti mg 2,88 di proteina, venivano aggiunti immediatamente prima di incubare. La incubazione durava 5 minuti, a 25 C° di temperatura.

Il fosforo inorganico liberato veniva determinato secondo il metodo di Martin e Doty modificato da Lindberg ed Ernster [9].

TABELLA I.

Aggiunte	μMole di P _i liberate	
	con ATP 2,5 mM	con ATP 5 mM
Exp. I nessuna	2,75	1,81
amital 1 mM	2,81	2,31
» 4 mM	2,85	3,00
atrattiloside 0,001	2,81	1,54
» 0,01	2,95	1,90
» 0,1	2,75	2,68
Exp. II nessuna	2,65	0,98
atebrina 0,1 mM	2,72	1,34
» 0,3 mM	2,40	1,53
» 1 mM	2,24	2,08
» 3 mM	2,35	3,06
Exp. III nessuna	1,90	0,4
clorpromazina 0,0003 mM . .	2,00	0,53
» 0,003	2,43	0,57
» 0,03	2,55	1,66
» 0,1	2,50	2,58
» 0,3	2,23	2,58
» 0,6	1,92	2,23

Per la composizione del mezzo di incubazione vedi CONDIZIONI SPERIMENTALI.

RISULTATI.

Gli inibitori delle reazioni di trasferimento d'energia ed i composti anti-flavinici si sono rivelati tutti capaci di rimuovere la « inibizione da substrato » e di ripristinare la attività enzimatica delle miofibrille.

L'amital che, come sopra riferito, aggiunto ad un sistema miofibrille-sarcotubuli, inibisce l'effetto rilasciante di quest'ultimi, in concentrazione 4 mM era in grado di rimuovere ampiamente anche la inibizione da eccesso di ATP. È da notare che la concentrazione necessaria perché l'amital rimuova questo « rilasciamento » indotto dall'ATP in eccesso, è la stessa richiesta per interferire nelle reazioni di trasferimento energetico a livello dei mitocondri epatici.

Analogo il comportamento dell'attrattiloside. Questo composto, che agisce come la oligomicina nell'ambito della fosforilazione ossidativa, mostrava anch'esso di rimuovere la inibizione da eccesso di ATP.

Composti ant flavinici sono stati usati da Löw [10] per dimostrare la natura flavinica delle ATPasi mitocondriali. Sulla base di questi risultati è stata avanzata l'ipotesi che in molte delle reazioni ATPasiche, che risultino espressione di sistemi di trasferimento di energia, partecipino enzimi flavinici. Si è ritenuto pertanto utile provare se anche nel caso del fenomeno del rilasciamento, svolgentesi, secondo la nostra ipotesi, attraverso meccanismi di trasferimento di energia, siano implicati enzimi flavinici. I risultati ottenuti con l'atebrina e con la cloropromazina appaiono in accordo con tale ipotesi. L'atebrina rimuove quasi completamente la inibizione indotta da eccesso di ATP alla concentrazione di 10^{-3} M, mentre la cloropromazina determina effetti simili in concentrazioni notevolmente inferiori (10^{-4}).

È da rilevare anche che queste sostanze, saggiate sulla ATPasi miofibrillare senza eccesso di ATP nel mezzo ed alle stesse concentrazioni in cui rimuovono la inibizione da eccesso di ATP, non inducono modificazioni apprezzabili sulla ATPasi miofibrillare.

DISCUSSIONE.

Negli esperimenti sopra riferiti è stato studiato il fenomeno dell'inibizione da substrato dell'ATPasi miofibrillare che può essere considerato un equivalente del rilasciamento. Che tale inibizione da eccesso di ATP rappresenti in effetti un equivalente della inibizione ottenuta mediante aggiunta di frammenti del sistema sarcotubulare, è sostenuto dall'osservazione che in ambedue i casi l'effetto rilasciante è abolito dall'aggiunta di concentrazioni molto basse di Ca^{++} o dall'aggiunta di amital. La rimozione da parte dell'amital dell'effetto rilasciante dei sarcotubuli di rana è stato considerato un argomento importante in favore dell'ipotesi che il rilasciamento coinvolga reazioni di trasferimento di energia. Tale ipotesi appare ulteriormente sostenuta dai dati riferiti nella presente Nota. Infatti sia l'amital che l'attrattiloside, composti per i quali è stata fornita un'esauriente dimostrazione di essere inibitori delle reazioni di trasferimento di energia nei mitocondri animali, rimuovono largamente l'effetto da eccesso di ATP.

Esistono ancora scarse indicazioni sulla natura delle reazioni di trasferimento di energia operanti durante il fenomeno del rilasciamento. Sem-

brano ad esse partecipare degli enzimi flavinici, come suggerito dalla capacità degli antilavonici, atebina e clorpromazina, di rimuovere la inibizione da eccesso di ATP.

Weber [11], Ebashi [12] e Baird e Perry [13] hanno proposto che lo stato di contrazione e di rilasciamento sia regolato dalla disponibilità di Ca^{++} a livello della ATPasi actomiosinica. Il sistema rilasciante agirebbe legando una frazione di Ca^{++} necessaria per l'attivazione dell'ATPasi actomiosinica e per la contrazione. Indipendentemente da tale ipotesi, in nostri precedenti lavori abbiamo suggerito che il meccanismo di rilasciamento sia regolato anche dalla utilizzazione di un composto intermedio ad alta energia sintetizzato ad opera dell'ATPasi sarcotubulare.

Tale composto avrebbe la funzione di impedire l'attivazione da parte dell'actina dell'ATPasi miosinica, e quindi la trasformazione dell'ATPasi miosinica inibita dal Mg^{++} in ATPasi actomiosinica stimolata dal Mg^{++} . Non esistono ancora indicazioni su come l'actina riesca a modificare l'ATPasi miosinica. È probabile tuttavia che non si tratti di una semplice modificazione della « configurazione » della molecola miosinica, ma piuttosto della creazione di una nuova catena di reazioni associate ad idrolisi di ATP conseguente ad un trasferimento di energia tra le due proteine.

Sin dalle prime ricerche sull'actina si osservò che una proprietà interessante di questa proteina è quella di polimerizzarsi e depolimerizzarsi con scissione di ATP durante la polimerizzazione e resintesi durante la depolimerizzazione. La polimerizzazione della G-actina in F-actina si accompagna così a liberazione di fosforo inorganico. Mommaerts [14] ha calcolato che la idrolisi dell'ATP durante la polimerizzazione della actina può termodinamicamente spiegare il consumo di energia del muscolo durante la contrazione. È possibile che nel ciclo contrazione-rilasciamento abbiano luogo due diverse reazioni di trasferimento di energia: una, diretta, dalla miosina alla actina connessa con il fenomeno della contrazione ed eventualmente operante attraverso la polimerizzazione reversibile dell'actina; una seconda, indiretta, possibilmente mediata da un flavoenzima, la quale permette un trasferimento di energia dal fattore rilasciante o dall'ATP in eccesso ad una delle due proteine contrattili e impedisce così la successiva interazione fra le due proteine. Ulteriori ricerche sono in corso per chiarire tali meccanismi.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] B. B. MARSH, « Nature », 167, 45 (1951).
- [2] H. PORTZEHL, « Biochim. Biophys. Acta », 24, 474 (1957).
- [3] U. MUSCATELLO, E. ANDERSSON-CEDERGREN, G. F. AZZONE e A. VON DER DECKEN, « J. Biophys. Biochem. Cyt. », 10 Suppl., 201 (1961).
- [4] U. MUSCATELLO, E. ANDERSSON-CEDERGREN e G. F. AZZONE, « Biochim. Biophys. Acta », 51, 426 (1961).
- [5] U. MUSCATELLO, E. ANDERSSON-CEDERGREN e G. F. AZZONE (in preparazione).
- [6] G. F. AZZONE, *Symposium on Functional Biochemistry of Cell Structures*. V° Congresso Internazionale di Biochimica, Mosca 1961.

- [7] G. DELLNER, L. ERNSTER e G. F. AZZONE (in preparazione).
- [8] S. V. PERRY e T. C. GREY, « Biochem. J. », 64, 184 (1956).
- [9] O. LINDBERG e L. ERNSTER, in « Methods of Biochemical Analysis », D. Glick ed., New York, Interscience Pub., 3, 1 (1953).
- [10] H. LÖW, « Biochim. Biophys. Acta », 32, 1, 11 (1959).
- [11] A. WEBER, « J. Biol. Chem. », 234, 2764 (1959).
- [12] S. EBASHI, F. EBASHI, Y. FUJIE, « J. Biochem. », 47, 54 (1960).
- [13] G. D. BAIRD, S. V. PERRY, « Biochem. », 47, 54 (1960).
- [14] W. F. H. M. MOMMAERTS, « Biochim. Biophys. Acta », 7, 477 (1951).