
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

BACCIO BACCETTI

L'ultrastruttura del miofilamento e il modello «9 + 2»

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 36 (1964), n.5, p. 710-714.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_36_5_710_0>

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

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

SIMAI & UMI

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

Biologia. — *L'ultrastruttura del miofilamento e il modello « 9 + 2 »* ^(*). Nota di BACCIO BACCETTI, presentata ^(**) dal Corrisp. G. COLOSI.

La tipica organizzazione dei miofilamenti degli Artopodi comprende secondo lo schema di Huxley e Hanson ⁽¹⁾ due classi di elementi: filamenti primari, a disposizione esagonale, ed a prevalente contenuto miosinico, filamenti secondari, disposti in vario numero attorno ai primi, a prevalente contenuto actinico (Huxley e Hanson ⁽²⁾). Più recenti indagini di microscopia elettronica condotte sui filamenti del primo tipo (i più spessi) hanno svelato in essi la presenza di uno strato osmiofilo corticale circondante un asse centrale, trasparente; l'aspetto elettronico sembrerebbe deporre per una struttura tubolare. Precise immagini di questo tipo sono state ottenute con il metodo delle sezioni trasverse ultrasottili non solo nei classici muscoli fibrillari di Ditteri (Shafiq, ⁽³⁾) e Coleotteri (Smith ⁽⁴⁾), ma anche di Scorpioni (Auber ⁽⁵⁾) e di Anfosso (Peachey ⁽⁶⁾), ed hanno ricevuto recenti conferme dall'esame mediante la tecnica della colorazione negativa di preparazioni purificate di miosina di Coniglio (Huxley ⁽⁷⁾) o di miofilamenti dissociati di *Cambarus* (Peterson ⁽⁸⁾).

D'altro canto è noto, dalle ricerche x -diffrattografiche di Pauling e Corey ⁽⁹⁾, che anche nella miosina si può postulare una substruttura di filamenti elementari costituiti da « coiled coils » di α -eliche.

Le dimostrazioni finora tentate dai vari Autori con il microscopio elettronico non sono però riuscite a risolvere particolari dell'intima struttura dei miofilamenti che possano confortare i reperti ottenuti dalla diffrattografia. Nell'esaminare ad alta risolvibilità sezioni diverse di miofilamenti di Insetti

(*) Il lavoro è stato eseguito nei laboratori della Stazione di Entomologia Agraria di Firenze, dell'Istituto di Istologia dell'Università di Firenze e dell'Istituto Anatomico della Università di Milano. Ringrazio vivamente il prof. A. Bairati per i consigli datimi e per la lettura critica del manoscritto, il prof. E. Allara per la ospitalità concessami e per l'uso del microscopio elettronico in dotazione al Suo Istituto, la dr. T. Bani Sacchi per la preziosa assistenza tecnica.

(**) Nella seduta del 9 maggio 1964.

(1) *Electron Microscopy*, Proc. Stockolm conf. sept. 1946, 202 (1957).

(2) *Structure and function of Muscle*, ed. G. H. Bourne, 183 (1960).

(3) « J. Cell. Biol. », 17, 351 (1963).

(4) « J. Bioph. Bioch. Cytol. » 10, 123 (1961).

(5) « Journ. de microscopie », 2, 233 (1963).

(6) « J. Bioph. Bioch. Cytol. », 10, 159 (1961).

(7) « J. Molec. Biol. », 7, 281 (1963).

(8) « J. Cell Biol. », 18, 213 (1963).

(9) « Nature », 171, 59 (1953).

e Policheti ho potuto ottenere immagini di una loro ultrastruttura: i dati preliminari sono esposti nella presente Nota.

MATERIALE E METODI.

Sono state usate fibre muscolari di due diversi tipi. Classici muscoli lisci di un Anellide Polichete (*Perinereis cultrifera* Grube) e classici muscoli striati fibrillari di un Dittero (*Musca domestica* L.). Come fissatori sono stati usati tetrossido di osmio 1 % in tampone acetato-veronal a pH 7,2 (tempo di fissazione: 30'), o glutaraldeide 4 % in tampone fosfato 0,1 M (tempo di fissazione: 1 h), seguita da una postfissazione osmica di 30'. In tutti i casi la fissazione è stata iniziata *in vivo* e condotta a freddo (+ 4°C).

I campioni sono stati lavati in tampone, disidratati in soluzioni di alcool etilico a concentrazione crescente ed in ossido di propilene, inclusi in Araldite secondo la tecnica usuale.

Le sezioni sono state effettuate con gli ultramicrotomi Porter-Blum della Stazione di Entomologia Agraria di Firenze ed LKB dell'Istituto Anatomico dell'Università di Milano. Per supporto sono stati usati retini di rame privi di membrana, e con membrane di collodione o di Formwar fortemente porose, tali da consentire la utilizzazione degli spazi liberi. Il materiale è stato in ogni caso contrastato con acetato di uranile 1,5 % a caldo per 30' - 3 h, protetto con films di carbone vaporizzato.

Dopo un controllo preliminare effettuato con il microscopio elettronico Hitachi HS-6 della Stazione di Entomologia Agraria di Firenze, le indagini sono state svolte con il modello Siemens Elmiskop I della Facoltà di Medicina dell'Università di Firenze.

OSSERVAZIONI PERSONALI.

a) *Perinereis cultrifera* Grube (*Polychaeta*).

Esaminati in sezione trasversale a medi ingrandimenti (fig. 1) i singoli miofilamenti si mostrano resolvibili in uno strato corticale opaco, apparentemente compatto, ma di aspetto granuloso, circondante uno strato midollare trasparente agli elettroni. Al centro di questo è però possibile intravedere una zonula fortemente opaca. Il quadro è nel complesso in accordo con le immagini ottenute dai più moderni dei precedenti Autori sul filamento miosinico del muscolo striato.

Sottoponendo i punti delle sezioni più favorevoli (quelli cioè in cui il miofilamento sia sezionato in modo perfettamente trasversale) alle più forti risoluzioni, ed ingrandendo poi al massimo fotograficamente la lastra, si ottiene un chiarimento assai significativo (figg. 2 e 3). Lo strato corticale appare infatti costituito da 9 corpiccioli opachi, di forma grossolanamente

elissoidale, misuranti $25 \text{ \AA} \times 33 \text{ \AA}$ nei due diametri, separati fra di loro da uno spazio di 15 \AA circa. Entro questa rosa di 9 elementi è compreso uno spazio a minore densità elettronica (non però vuoto), al centro del quale si incontrano due corpiccioli affiancati subcircolari, misuranti circa 25 \AA , spesso apparentemente fusi in una massa omogenea maggiore, che dista, da ciascuno degli elementi periferici, 25 \AA circa.

Allorché la sezione non è rigidamente trasversa, si osserva chiaramente che ciascuna delle immagini sopra descritte non è altro che la sezione di un esile microfilamento (fig. 4), e che i vari microfilamenti dello strato corticale sono fra di loro paralleli, e distano esattamente i 15 \AA misurati nelle sezioni trasverse.

Il miofilamento risulta perciò costituito da 11 sottounità che indico come microfilamenti e che sono disposte secondo lo schema del $9 + 2$.

In alcune immagini (fig. 2) i 9 microfilamenti esterni sembrano mostrare una struttura duplice o triplice: sembrerebbero cioè costituiti da due o tre elementi accollati, più evidenti nelle sezioni trasverse. In alcune sezioni longitudinali (fig. 4) lungo ciascun microfilamento si osserva una apparente struttura periodica, determinata dall'alternarsi di sottili bande scure e chiare susseguentisi a brevissime distanze, secondo un periodo di $15-16 \text{ \AA}$.

b) *Musca domestica* L. (*Insecta, Diptera*).

I miofilamenti dei muscoli striati fibrillari di questo insetto, esaminati in sezione trasversa ed a medie risoluzioni (fig. 5) mostrano immagini del tipo classico: gli elementi primari (miosina) hanno una forma tubolare, quelli secondari non sembrano ulteriormente strutturati. Spingendo al massimo l'ingrandimento, in condizioni analoghe a quelle che hanno consentito di precisare la fine struttura del miofilamento di *Perinereis*, si osserva (figg. 6, 7 e 8) che lo strato osmiofilo corticale dei primi in sezione trasversa si risolve in una decina di masserelle opache, ciascuna delle quali ha un diametro medio di $25-30 \text{ \AA}$ circa. Tali masserelle sono disposte ad intervalli fra di loro molto irregolari, e non si possono contare con precisione. Anche al centro dello strato trasparente si osserva la presenza di uno o due piccoli corpi opachi (che sfuggono all'esame ad ingrandimenti bassi o medi), analoghi a quelli periferici, irregolarmente configurati e non ben numerabili. Anche il miofilamento primario del muscolo striato sembra pertanto resolvibile in un modello strutturale analogo a quello del muscolo liscio, secondo la formula del $9 + 2$. In questo caso però i microfilamenti, più esili, sono disposti molto irregolarmente e non numerabili con assoluta precisione.

Alcuni dei microfilamenti, in qualche caso, si possono però risolvere ulteriormente con maggiori dettagli che nel muscolo liscio. Essi sembrano costituiti da una breve serie di minuscole strutture filamentose cave, accollate; in qualche sezione apparentemente tre. Ciascuna di queste unità elementari che concorrono alla configurazione del microfilamento avrebbe un diametro di circa 10 \AA .

DISCUSSIONE.

Nel 1943 Bailey, Atsbury e Rudall⁽¹⁰⁾ inclusero cheratina, epidermina, miosina e fibrinogeno nel gruppo « k.e.m.f. » in base alla similarità del reperto diffrattografico con la tecnica dei piccoli angoli. Tale reperto sembrava postulare una similarità di organizzazione molecolare delle citate proteine, e gli studi successivi di biofisica, condotti con svariate tecniche, hanno cercato di accumulare prove decisive. Particolarmente le indagini di microscopia elettronica hanno tentato di visualizzare i modelli molecolari suggeriti dalle tecniche indirette, ma si può dire che soltanto nel campo delle cheratine, e quindi della epidermina, siano stati fatti passi decisivi (il caso del fibrinogeno va oggi considerato a sé). Crick⁽¹¹⁾ e Pauling e Corey⁽¹²⁾ proposero per la cheratina della lana e le altre « k.e.m.f. » proteine una struttura di « coiled coils » di α eliche; Fraser, Macrae e Rogers⁽¹³⁾, introducendo la microscopia elettronica come metodo di indagine sul problema, propongono in ciascun miofilamento di α cheratina (sempre di lana) la presenza di $9 + 2$ sottounità, ciascuna delle quali del diametro di 20 \AA circa e presumibilmente (collegandosi con i dati della x -diffrattografia) comprendente 3 catene polipeptidiche (α eliche) attorcigliate. Johnson e Sikorski⁽¹⁴⁾ analizzando la α cheratina di aculei di Porcospino, trovano invece giusta la discriminazione dei filamenti in sottounità, ma non possono contarle esattamente e dubitano della presenza del modello $9 + 2$. Ancor più recentemente, però, Wilson⁽¹⁵⁾ e Skertchly⁽¹⁶⁾ trovano che il miglior accordo fra i dati di x -diffrattografia e microscopia elettronica nella struttura della α cheratina è dato dalla disposizione $9 + 2$ di « coiled-coils » ciascuno di 3 α eliche attorcigliate, entro i filamenti.

Anche nei filamenti del « limbus spiralis » dell'orecchio di Ratto, che sono classificabili nel gruppo delle k.e.m.f. proteine, forse di tipo « epidermina », Iurato⁽¹⁷⁾ ha colto i segni di una ulteriore resolvibilità in miofilamenti.

I dati sopraesposti sul miofilamento di fibre muscolari lisce e striate propongono per la miosina un modello di organizzazione nuovo, dato che nessuno ha mai indagato se i dati x -diffrattografici per tale proteina possano essere interpretabili con un reperto di elementi submicroscopici organizzati secondo le regole del $9 + 2$.

Nel miofilamento della fibra liscia di Polichete si osserva la sicura presenza di una rosa di 9 sottounità (miofilamenti) periferici e di 2 centrali; nel miofilamento primario del muscolo fibrillare striato di Dittero si dimostra una organizzazione analoga (i cui elementi sono però più difficilmente nume-

(10) « Nature », 151, 716 (1943).

(11) « Nature », 170, 882 (1952).

(12) « Nature », 171, 59 (1953).

(13) « Nature », 193, 1052 (1962).

(14) « Nature », 194, 30 (1962).

(15) « J. Molec. Biol. », 6, 474 (1963).

(16) « Nature », 202, 161 (1964).

(17) « Zeit. Zellf. », 56, 40 (1962).

rabili) e si può spingere in qualche caso la risoluzione fino a dimostrare la presenza in ciascun microfilamento di ulteriori unità elementari costitutive.

È interessante osservare che la miosina (e verosimilmente la cheratina) dimostrino quella medesima organizzazione submicroscopica elementare (9 + 2) tipica, ad un livello molto maggiore, di ciglia, flagelli e centrioli, i quali solo in rari casi se ne discostano (Dahl⁽¹⁸⁾). È noto un caso (muscolo adduttore dell'Ostrica: Hanson e Lowey⁽¹⁹⁾) in cui i miofilamenti si dispongono in fasci di un numero fisso di elementi ad un livello morfologico pari a quello di un intero filamento flagellare o di un ciglio. Essi seguono però un modello tipico di 12 + 1. Niente si sa sulla possibilità di fine risoluzione delle varie unità principali costituenti ciglia e flagelli, nelle quali pure, come finora nei filamenti miosinici, si mette in evidenza uno strato corticale opaco (Baccetti e Bairati Jr.⁽²⁰⁾) e talora un asse centrale pure opaco. Tentativi di alte risoluzioni su questo e simili materiali dovrebbero consentire utili precisazioni sulla possibilità di estensione e ripetizione della legge del 9 + 2 a differenti livelli organizzativi.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Miofilamenti di fibra muscolare liscia di *Perinereis cultifera* Grube in sezione trasversa. Fiss. osmica, incl. Araldite, contr. acetato di uranile 30', Siemens Elmiskop I, 240.000 diam. (orig. 80.000).
- Fig. 2. - Immagine analoga alla precedente, a maggiore ingrandimento. Fiss. osmica, incl. Araldite, contr. acetato di uranile 30', Siemens Elmiskop I, 1.000.000 diam. (orig. 80.000).
- Fig. 3. - Immagine analoga alla precedente, nella quale il miofilamento è stato sezionato in maniera leggermente obliqua. Fiss. glutaraldeide-osmio, incl. Araldite, contr. acetato di uranile 30', Siemens Elmiskop I, 1.200.000 diam.
- Fig. 4. - Immagine analoga alla precedente, nella quale il miofilamento è sezionato in maniera ancora più obliqua allo scopo di mettere in evidenza brevi segmenti di microfilamenti, apparentemente periodati. Fiss. osmica, incl. Araldite, contr. acetato di uranile 60', Siemens Elmiskop I, 800.000 diam. (orig. 80.000).
- Fig. 5. - Porzione di fibra muscolare striata fibrillare di *Musca domestica* L. sezionata trasversalmente. Sono evidenti le due categorie di miofilamenti, dei quali i primari hanno struttura tubolare. Fiss. osmica, incl. Araldite, contr. acetato di uranile 60', Siemens Elmiskop I, 60.000 diam. (orig. 20.000).
- Figg. 6, 7 e 8. - Miofilamenti primari della medesima fibra, a forte ingrandimento ed in sezione trasversa. I microfilamenti appaiono talora costituiti da unità elementari tubolari ed accollate. Fiss. osmica, incl. Araldite, contr. acetato di uranile 60', Siemens Elmiskop I, 800.000 diam. (orig. 80.000).

Simboli:

- m - miofilamenti;
- mc - microfilamenti;
- mp - miofilamenti primari;
- ms - miofilamenti secondari.

(18) «Zeit. Zellf.», 60, 369 (1963).

(19) «Proc. R. Soc., B.», 154, 173 (1961).

(20) «Redia», 48, 1 (1963).

