
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

HIDEO SAWADA

Ricerche immunologiche sull'actina di *Helix pomatia* L.

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 39 (1965), n.5, p. 352–358.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_39_5_352_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. — *Ricerche immunologiche sull'actina di Helix pomatia L.* Nota di HIDEO SAWADA (*) presentata (**) dal Corrisp. S. RANZI.

L'actina con le proteine dello stroma rappresenta il 2,5% del peso del muscolo di vertebrato (il 13-15% delle proteine totali); dal residuo del muscolo si elimina la miosina, quindi la polvere viene fatta seccare e, aggiungendo acqua, si porta in soluzione l'actina.

Due sono le proprietà caratteristiche e fondamentali dell'actina: *a*) esistono due forme di actina, la G-actina e la F-actina convertibili l'una nell'altra; *b*) l'actina, combinata con la miosina, forma l'actomiosina.

Il primo a preparare l'actina fu Straub (1942); in seguito molti altri Autori hanno perfezionato o modificato il metodo di estrazione e di purificazione.

Le actine dei Molluschi sono state poco studiate; Carsten e Katz (1964) hanno studiato la composizione in aminoacidi, i peptidi, le proprietà elettroforetiche delle actine estratte da un bivalvo e da un cefalopodo; essi hanno potuto porre in evidenza come le actine dei Molluschi differiscano cospicuamente da quelle della muscolatura striata dei Vertebrati.

Scopo della mia ricerca è stato quindi quello di esaminare l'actina della chiocciola ed in particolare le sue proprietà immunologiche.

Poiché uno dei problemi fondamentali dello studio di questa proteina è costituito dalla sua purificazione, ho dedicato una particolare attenzione a questo lato della ricerca, approfittando del fatto che, mediante tecniche immunologiche, possono essere facilmente evidenziati eventuali contaminanti di natura proteica.

MATERIALI E METODI.

1) *Preparazione dell'actina.* — Oltre alla actina di *Helix pomatia L.* ho studiato per confronto le actine estratte dalle seguenti specie di Molluschi: *Unio mancus* Lam. (D)⁽¹⁾, *Mytilus galloprovincialis* Lam. (M), *Viviparus contectus* (Millet) (D), *Murex brandaris* L. (M), *Murex trunculus* L. (M), *Aplysia depilans* L. (M), *Limnaea peregra* (Mueller) (D), *Planorbarius corneus* L. (D), *Helix lucorum* L. (T). Ho anche esaminato l'actina estratta dal muscolo striato di coniglio.

Ho usato circa 200 gr di piede di chiocciola. Ho lavato ripetutamente i muscoli tagliati in piccoli pezzetti prima in una soluzione di 0,1 M KCl, quindi in 0,05 M NaHCO₃; dopo in 0,001 M EDTA, infine in acqua bidistillata. Ho quindi lavato con acetone per togliere le

(*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Zoologia dell'Università Statale di Milano (Gruppo di Embriologia del C.N.R. per lo studio del differenziamento cellulare). Ringrazio il dott. Vittorio Parisi per l'aiuto nella preparazione del manoscritto. Indirizzo dell'A.: Department of Legal Medicine, Gifu University School of Medicine, Gifu (Japan).

(**) Nella seduta del 13 novembre 1965.

(1) D = dulcacquicolo; M = marino; T = terrestre.

sostanze solubili in esso. Tutte queste operazioni vennero eseguite a + 4°C. Ho fatto asciugare a temperatura ambiente il residuo ed ho ottenuto circa 25 gr di actina impura.

La purificazione della actina è stata eseguita sia con il metodo di Mommaerts (1952) che con colonne di Sephadex.

Nel primo caso si è utilizzata la trasformazione di G-actina in F-actina con KCl 0,1 M e MgCl₂ 0,1 mM e, viceversa, mediante trasformazione di F-actina in G-actina con ATP 0,2 mM e ascorbato 0,2 mM. Le ultracentrifugate sono state fatte nella Spinco preparativa a 105.000 g per tre ore.

Per la cromatografia su Sephadex G-200 è stata usata una colonna alta 35 cm e avente un diametro di 2,5 cm, previamente equilibrata con ATP 5.10⁻⁴ M (a pH 8,1); sono stati utilizzati 10 ml della soluzione di actina impura in ATP alla stessa molarità. Sono state purificate con questo metodo le actine di chiocciola e coniglio (Fig. 1).

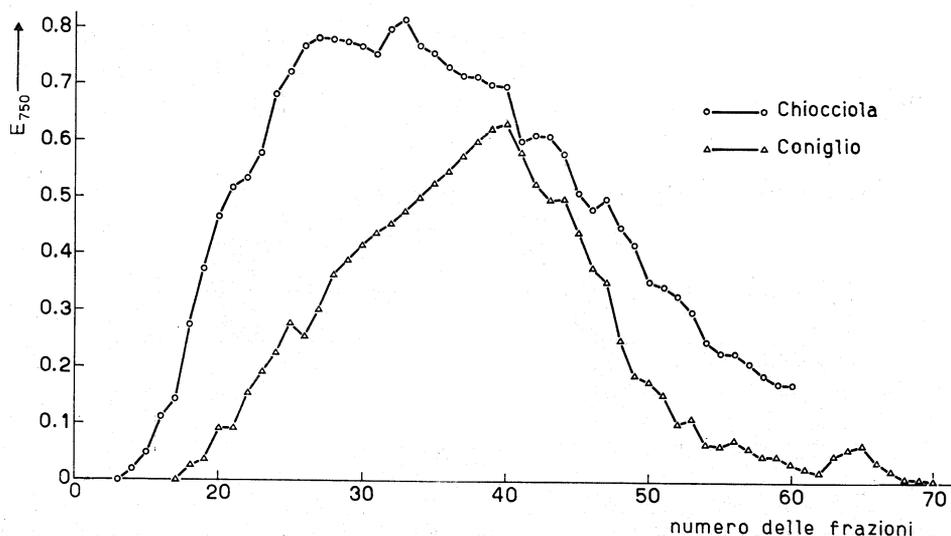


Fig. 1. — Diagramma relativo alla separazione mediante colonna di Sephadex G-200 delle diverse frazioni presenti nei preparati di actina impura di chiocciola e coniglio.

2) *Preparazione degli antisieri.* — Ho iniettato actina impura di chiocciola (50 mg/ml) in conigli sia per via endovenosa sia per via intramuscolare con adiuvanti (Complete Freud Adjuvant DIFCO). Sono state fatte quattro iniezioni, una per settimana. Nei conigli iniettati per via endovenosa non si è avuta formazione di anticorpi.

Ho preparato anche antisieri contro actina purificata secondo il metodo di Mommaerts, con adiuvanti.

Dopo aver constatato la presenza di anticorpi in titolo sufficientemente alto ho salassato gli animali, dopo una settimana dall'ultima iniezione. Ho scomplementato gli antisieri, i quali sono stati conservati a - 20°C, previa aggiunta di mertiolato al 0,01%.

3) *Determinazione della concentrazione proteica.* — La concentrazione delle proteine è stata determinata secondo il metodo di Lowry e coll. (1951).

4) *Sedimentazione all'ultracentrifuga.* — Onde valutare il grado di purezza dei preparati si è ricorso all'esame all'ultracentrifuga Spinco Modello E a 59.780 r.p.m.; l'actina era in soluzione di ATP 0,2 mM a pH 8.

5) *Elettroforesi su agar.* — Sono state fatte elettroforesi su agar 1% in tampone a Veronal (pH = 8,2; μ = 0,025), utilizzando il Gel-Phor (Terzano). Le lastre di agar, alte 4 mm sono state sottoposte per un'ora ad una differenza di potenziale di 13 V/cm (circa 8,2 mA per lastra). Per l'essiccamento e la colorazione sono state usate le tecniche convenzionali.

6) *Elettroforesi su gel di amido*. - Si è utilizzata la metodica di Smithies (1959) lievemente modificata. La durata dell'elettroforesi è stata di 15 ore a 200 V a temperatura ambiente.

7) *Immunodiffusione*. - Sono state usate micropiastre di agar 1,5 % in acqua distillata con lo 0,01 % di mertiolato ed il 0,003 di metilarancio. I pozzetti hanno un diametro di 3 mm ed una distanza fra loro di 3 mm.

Le micropiastre sono state tenute a + 37°C per 10 h, quindi lavate in NaCl 0,15 m, essiccate e colorate secondo le tecniche convenzionali. Sono state utilizzate anche micropiastre (diametro dei pozzetti di 6 mm, varie distanze); esse sono state tenute a temperatura ambiente in camera umida per 2 o 3 giorni.

8) *Immunoelettroforesi*. - Le lastre di agar, dopo l'elettroforesi eseguite come prima indicato, sono state poste in camera umida per 2 giorni, a temperatura ambiente. Il diametro dei pozzetti era di 1,5 mm e la loro distanza dalla fenditura centrale di 3 mm.

L'elettroforesi dell'actina di chiocciola, in presenza di ATP 0,2 mM e ascorbato, su gel d'amido ha mostrato che essa ha una velocità di migrazione simile a quella della albumina del siero di coniglio (fig. 2).

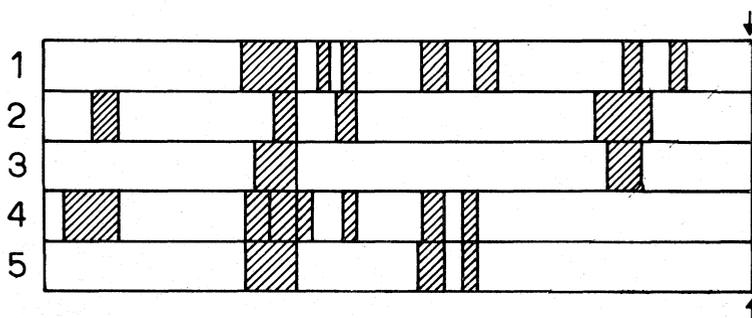


Fig. 2.

(1) Elettroforesi su gel d'amido di siero di coniglio; (2) actina impura di chiocciola; (3) actina purificata di chiocciola; (4) actina impura di coniglio; (5) actina purificata di coniglio. Le frecce indicano la linea di partenza.

Nel preparato di actina impura di chiocciola sono evidenziabili elettroforeticamente tre frazioni delle quali quella prossima all'origine è probabilmente costituita da un miscuglio di contaminanti; dopo purificazione la banda prossima all'origine risulta meno intensa mentre scompare la frazione intermedia.

Nel preparato di actina impura del coniglio sono presenti 6 frazioni che si riducono a 3 dopo purificazione. Sia nel caso della chiocciola che nel coniglio la actina dopo la purificazione non presenta più il componente più veloce.

Sono state fatte delle elettroforesi su gel di agar onde caratterizzare i preparati prima di farne l'analisi immunologica; mentre il preparato di actina impura di chiocciola presenta più bande, quello di actina purificata sia di chiocciola che di coniglio presenta un solo componente con la stessa velocità di migrazione dell'albumina di siero di coniglio.

Le immunoelettroforesi delle actine impure di chiocciola e *Helix lucorum* in presenza di antisiero anti-actina impura di chiocciola permettono di porre

in evidenza almeno otto archi di precipitato (fig. 3). Gli stessi preparati in presenza di antisiero anti-actina purificata di chiocciola danno solo tre archi di precipitato. Le actine impure di tutti gli altri Molluschi studiati contro anti-actina purificata di chiocciola formano un unico arco di precipitato che corrisponde al più lento dei due archi della reazione tra actina impura di chiocciola ed anti-actina purificata.

Le actine impure delle specie studiate danno contro l'antisiero anti-actina impura di chiocciola un arco che corrisponde a quello formato contro l'anti-actina purificata; in alcuni casi si forma un secondo arco per altro molto debole e non più visibile dopo colorazione con nero amido.

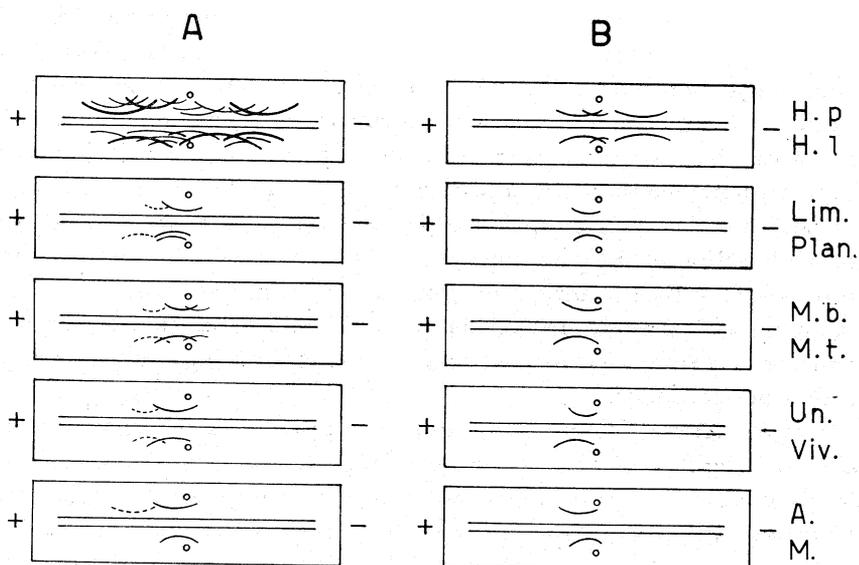


Fig. 3. - Immunolettroforesi delle actine di Molluschi.

A = antisiero anti-actina impura di chiocciola; B = antisiero anti-actina purificata di chiocciola; H.p = *Helix pomatia*; H.l. = *Helix lucorum*; Lim. = *Limnaea peregra*; Plan. = *Planorbarius corneus*; M.b. = *Murex brandaris*; M.t. = *Murex trunculus*; Un. = *Unio mancus*; Viv. = *Viviparus costectus*; A. = *Aplysia depilans*; M. = *Mytilus galloprovincialis*.

In tratteggio gli archi non più visibili dopo colorazione con nero amido.

L'immunodiffusione in micropiastre ha confermato i dati delle immunolettroforesi ad eccezione di *Murex trunculus*, *Murex brandaris* e *Limnaea peregra*. I preparati di actina impura di queste specie formano in presenza sia di anti-actina impura che di anti-actina purificata due archi di precipitato. Le altre specie danno un unico arco di precipitato con l'antisiero anti-actina purificata. Sono state osservate delle reazioni di somiglianza parziale tra le varie actine, peraltro la non grande intensità degli archi rende difficoltoso il rilevamento degli eventuali *spur*.

I preparati di actina impura di chiocciola danno nelle micropiastre più archi contro l'antisiero anti-actina impura, due archi evidenti ed un terzo mal definito contro anti-actina purificata. I preparati di actina purificata di

chiocciola danno due soli archi con ambedue i tipi di antisiero. Il fatto che si sia riusciti a produrre anticorpi nel coniglio contro l'actina di chiocciola indica che l'actina di coniglio ha proprietà antigeniche differenti da quella di chiocciola. Naturalmente la actina del coniglio non reagisce con l'antisiero anti-actina di chiocciola.

I risultati prima esposti permettono di fare alcune osservazioni su due diversi argomenti: purificazione dell'actina e sua specificità dal punto di vista tassonomico.

Dei metodi da me usati per la purificazione della actina (trasformazione di G-actina in F-actina e viceversa, separazione su colonna di Sephadex G-200) ritengo che il secondo sia di difficile applicazione. Particolarmente interessante ad ogni modo si presenta il fatto che la actina impura di coniglio presenta un tipo di contaminazione differente da quello della chiocciola come indicano le differenti curve (fig. 1). Le tecniche immunologiche sono di notevole aiuto nel seguire il processo di purificazione come è indicato chiaramente sia dai risultati conseguiti con le micropiastre che con le immunoelettroforesi. Di notevole interesse si presenta il fatto che le impurità sono specie-specifiche o per lo meno gruppo-specifiche come è indicato dal fatto che i preparati di actine eterologhe impure formano in pratica lo stesso numero di archi sia con l'antisiero antiactina impura che con quello preparato contro actina pura, a differenza dell'actina pura di chiocciola che da un numero di archi ben inferiore a quello del preparato di actina impura (due nel primo caso, otto nel secondo).

Da molto tempo l'actina (come anche le proteine della lente dell'occhio) è stata considerata un tipico esempio di proteina organo-specifica. Ciò è senz'altro vero; ma se parte della molecola è simile in specie anche lontane, come indicano gli esperimenti di Cigada e coll. (1948) di formazione di actomiosine con actine e miosine eterologhe, e alcuni dati immunologici (Kestzyüs, 1950) relative ad actine di Vertebrati, il rimanente è per contro differente nei diversi gruppi animali. Ciò è indicato, oltre che dai risultati qui presentati, dalla composizione in aminoacidi, peptidi quale risulta dal lavoro di Carsten e Kantz.

L'identità del peso molecolare del monomero in actine di diverse specie animali studiate, la possibilità di ottenere actomiosine ibride, depongono a favore dell'ipotesi che le actine siano proteine molto antiche. Peraltro, pur avendo conservato il loro ruolo nella contrazione muscolare, esse si sono diversificate nelle varie specie animali, anche se tale processo non ha interessato, per lo meno all'interno dei vari Tipi animali, una troppo estesa porzione della molecola come è indicato dalla presenza di reazioni crociate tra le actine dei Gasteropodi e quelle dei Bivalvi, nei Molluschi, e tra le differenti actine dei Vertebrati.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] ASAKURA S., *Preparazione delle proteine della muscolatura (Actina)*. (In Giapponese) « Protein, Nucleic acid, Enzyme », 2, 282-286 (1957).
- [2] BASTIDE P., *Enzymes of Helix pomatia L.*, « Ann. Biol. Clin. », 12, 586-589 (1954), « Chemical Abstract », 49, 7765b (1955).
- [3] BOLOGNANI FANTIN A. M. e BOLOGNANI L., *Dati biochimici e istochimici sulla mucinogenesi in Helix pomatia*, « Istituto Lombardo (Rend. Sc.) », 98, 343-354 (1964).
- [4] CARSTEN M. E. and MOMMAERTS W.F.H.M., *A study of actin by means of starch gel electrophoresis*, « Biochemistry », 2, 28-32 (1963).
- [5] CARSTEN M. E. and KANTZ A. M., *Actin: A comparative study*, « Biochim. Biophys. Acta », 90, 534-541 (1964).
- [6] CIGADA M., CITTERIO P., ORLANDI A., RANZI S. e TOSI L., *Ricerche sulle proteine cellulari*, « Istituto Lombardo (Rend. Sc.) », 82, 351-386 (1949).
- [7] CIGADA M., CITTERIO P., RANZI S. e TOSI L., *On the zoological specificity of myosin and actin*, « Experientia », 4, 480-481 (1948).
- [8] FURMINGER I. G. S., *The antigenic constituents of myosin preparations*, « Biochim. Biophys. Acta », 90, 521-523 (1964).
- [9] KESZTYÜS L., NIKODÉMUSZ S. and SZILÁGYI T., *Antigenic activity of myosin and actin*, « Nature », 163, 136 (1949).
- [10] KESZTYÜS L., NIKODÉMUSZ S. and SZILÁGYI T., *Über die Artspezifität von actin*, « Experientia », 6, 342-343 (1950).
- [11] KRANS H. M. J., VAN HEIJK H. G. and WESTENBRINK H. G. K., *Starch-Gel Electrophoresis and Ultracentrifugation of actin*, « Biochim. Biophys. Acta », 65, 166-168 (1962).
- [12] KRANS H. M. J., VAN HEIJK H. G. and WESTENBRINK H. G. K., *A study of G-actin*, « Biochim. Biophys. Acta », 100, 193-201 (1965).
- [13] KUBIŠTA V., *Flavones in Helix pomatia L.* « Experientia », 6, 100 (1950).
- [14] IRISAWA H. and IRISAWA A., *Paper electrophoresis of the invertebrates body fluid protein*, « J. Hiroshima Med. Ass. », 7, 436-438 (1954).
- [15] LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. and RANDALL R. G., *Protein measurement with the folin phenol reagent*, « J. Biol. Chem. », 193, 265-275 (1951).
- [16] MOMMAERTS W.F.H.M., *Reversible polymerization and ultracentrifugal purification of actin*, « J. Biol. Chem. », 188, 559-565 (1951).
- [17] MOMMAERTS W.F.H.M., *The molecular transformations of actin*, « J. Biol. Chem. », 198, 445-457 (1952).
- [18] MOMMAERTS W.F.H.M., *Chemical investigation of muscular tissues*, « Methods in Medical Research, Chicago the Year Book publishers, Inc. », 7, 1 (1958).
- [19] POULIK M. D., *Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers*, « Nature », 180, 1477-1479 (1957).
- [20] RANZI S., *Alcune questioni sulle proteine protoplasmatiche*, « Bollettino Società Italiana Biologia Sperimentale », 58, 487-511 (1952).
- [21] SELBY C. C. and BEAR R. S., *The structure of actin-rich filaments of muscles according to x-ray diffraction*, « J. Biophysic Biochem. Cytol. », 2, 71-85 (1956).
- [22] SMITHIES O., *Zone electrophoresis in starch gel and its application to studies of serum proteins*, « Advances in Protein Chemistry », 14, 56-113 (1959).
- [23] TRAN VAN KY P., ROSE F. et LANDE F., *L'étude immunoelectrophoretique de la structure antigénique des Mollusques est-elle susceptible de résoudre certaines difficultés de résoudre certaines difficultés de leur taxonomie?* « C. R. Acad. Sc. Paris », 255, 366-367 (1962).

SUMMARY. — The results of the purification of actin from foot muscles of the snail *Helix pomatia* L. as well as those of the immunological and electrophoretic research carried out on the same protein are reported here.

Actin was purified following Mommaerts's procedure which is based on the reversible transformation of G-actin into F-actin; the purity of the protein was tested by running it through Sephadex-200 columns.

The presence of impurities was observed in the crude preparations by means of electrophoresis on starch gel, immunoelectrophoresis and immunodiffusion on microdishes. After purification, this foreign matter could no longer be detected.

A comparative analysis was performed on actins from other species of Molluscs and from the striated muscles of the rabbit. The rabbit actin is immunologically different from that of the Gastropoda and the Lamellibranchia studied in the present investigation.