
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIULIO LANZAVECCHIA

Osservazioni sull'ultrastruttura del miofilamento para-miosinico nei Molluschi

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 41 (1966), n.5, p. 374–379.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_41_5_374_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/>

Zoologia. — *Osservazioni sull'ultrastruttura del miofilamento paramiosinico nei Molluschi.* Nota (*) di GIULIO LANZAVECCHIA, presentata (**) dal Corrisp. S. RANZI.

SUMMARY. — The structure of the paramyosin filaments of various smooth muscles of *Mytilus galloprovincialis* has been studied by electron microscopy, with negative-stain technique. These filaments show a transverse period of 144 Å, and sometimes a unique superimposed dot-pattern, arranged to form a net structure. A helical structure can be excluded. The filaments do not appear flaked into ribbons. The tropomyosin A molecules are oriented parallel to the miofilament direction. A possible packing scheme for the paramyosin structure is proposed.

L'ultrastruttura dei filamenti paramiosinici presenti nella muscolatura dei Molluschi, Anellidi e forse Sipunculidi, ed il loro significato funzionale, sono ancora oggetto di controversie, ed ugualmente nulla è noto circa un eventuale significato filogenetico da attribuire alla tropomiosina A, la proteina che aggregandosi secondo un disegno organizzativo caratteristico, dà origine alle strutture paramiosiniche. È noto (Cohen e Holmes, 1963) che si tratta di una proteina formata da due α -eliche spiralizzate, con una lunghezza di 1330–1400 Å (Lowey e coll., 1963) ed un diametro di circa 20 Å. Sebbene la sua composizione in aminoacidi la faccia ritenere molto simile alla tropomiosina B, tuttavia per le sue dimensioni ed il suo peso molecolare può essere avvicinata alla meromiosina leggera (Lowy e Hanson, 1962), cioè a quella parte della miosina priva di attività ATPasica, e che aggregandosi in modo specifico forma lo scheletro dei filamenti primari nei muscoli striati.

Entrambe le proteine inoltre si aggregano *in vivo* (ed in condizioni opportune anche *in vitro*), formando strutture che all'analisi diffrattografica ai raggi X ai piccoli angoli determinano forti riflessioni meridionali sui 144 Å. Nella miosina tuttavia il periodo fondamentale risulta essere $144 \times 3 = 432$ Å, e nella paramiosina $144 \times 5 = 720$ Å.

MATERIALI E METODI.

Le osservazioni riportate in questa Nota si riferiscono a miofilamenti paramiosinici isolati da diversi muscoli (*anterior bissus retractor*, *posterior bissus retractor* e adduttore posteriore) di *Mytilus galloprovincialis*. Essi sono stati ottenuti mediante omogenizzazione dei muscoli in soluzioni di KCl 0,2 Mol.

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Zoologia dell'Università di Milano (Laboratorio di Microscopia elettronica « Fondazione C. Erba »). Gruppo di ricerca per l'embriologia e il differenziamento cellulare del C.N.R.

(**) Nella seduta del 12 novembre 1966.

a pH 7, e ripetuti lavaggi nella medesima soluzione. I filamenti isolati sono stati osservati al microscopio elettronico Hitachi HS-7, in colorazione negativa con acetato di uranile.

OSSERVAZIONI.

I filamenti isolati hanno una lunghezza che può raggiungere e talvolta superare i 30 μ , tuttavia in genere appaiono frammentati. In essi è sempre possibile osservare una striatura trasversale con un periodo di 144 Å, determinato da sottili linee chiare; talvolta tra queste linee se ne osservano altre, tuttavia meno definite (Tav. I, fig. 1). In alcuni filamenti, alla striatura trasversale, ed in fase con questa, si sovrappone un sistema regolare di punti o aree di alta densità elettronica, disposti a costituire una sorta di rete a maglie oblique, con un disegno che si ripete periodicamente sul filamento (Tav. I, figg. 1 e 2; Tav. II, fig. 4), e che corrisponde perfettamente a quello che può essere dedotto dalle osservazioni ai raggi X ai piccoli angoli (Bear e Selby, 1956). Analoga osservazione era stata fatta da Hall, Jakus e Schmitt (1945) su filamenti isolati e colorati positivamente con PTA (acido fosfotungstico). Questa rete di punti determina celle non primitive il cui asse principale è orientato parallelamente alla direzione del miofilamento, ed ha una lunghezza costante di 720 Å. La larghezza della cella invece varia considerevolmente in preparati ottenuti con diverse tecniche. Schmitt, Bear, Hall e Jakus (1947) danno un valore di 193 Å, mentre Bear e Selby (1956) mediante osservazione ai raggi X, danno un valore di 250 Å, per il materiale disidratato, e 325 Å per quello idratato. Elliott (1964 a) per contro con lo stesso metodo ottiene per il materiale disidratato 340 Å, e per quello idratato 420 Å. Nelle immagini da me ottenute la larghezza della cella risulta essere 330 Å, con lievi scarti rispetto a questo valore nei diversi preparati (fig. 1).

Secondo tutti gli Autori che si sono interessati di questo problema, i filamenti paramiosinici isolati subirebbero un processo di sfaldamento longitudinale e secondo linee preferenziali, per cui essi si frammenterebbero in tanti nastri di spessore di circa 100 Å. Tale fenomeno secondo Elliott e Lowy (1961) sarebbe correlato all'esistenza di una riflessione equatoriale sui 120 Å, rilevabile mediante diffrazione ai raggi X, e che indicherebbe una ripetizione di strutture laminari di tale spessore, disposte parallelamente tra loro, ed orientate secondo la lunghezza del filamento. Un problema di notevole interesse concerne la disposizione spaziale dei nodi della cella in una struttura tridimensionale, quale è il miofilamento paramiosinico: l'ambiguità tra una disposizione elicoidale dei medesimi, ovvero a reticolo, non può essere risolvibile, a detta degli Autori che se ne sono interessati, mediante i soli risultati di diffrazione ai raggi X. Tuttavia l'opinione più accreditata e basata sulle maggiori evidenze sperimentali propende decisamente per la disposizione a reticolo. Esiste infine il problema relativo all'impacchettamento delle molecole di tropomiosina A a costituire il miofilamento paramiosinico, ed in particolare all'orientamento delle molecole rispetto all'asse di questo. Le osservazioni ai raggi X

ai piccoli angoli non possono dare indicazioni rispetto a quest'ultimo quesito; tuttavia quelle ai grandi angoli di Cohen e Holmes (1963) indicano che l'asse delle molecole di tropomiosina A deve essere considerato pressapoco parallelo a quello del miofilamento in cui si trovano.

Secondo lo schema di Elliott (1964 *a*), un miofilamento paramiosinico sarebbe costituito da tante lamine a sviluppo parallelo al piano del reticolo, e giustapposte tra loro. Se si verificasse, durante il processo di isolamento, uno sfaldamento secondo tali linee, tutti i nastri di paramiosina che ne derivano

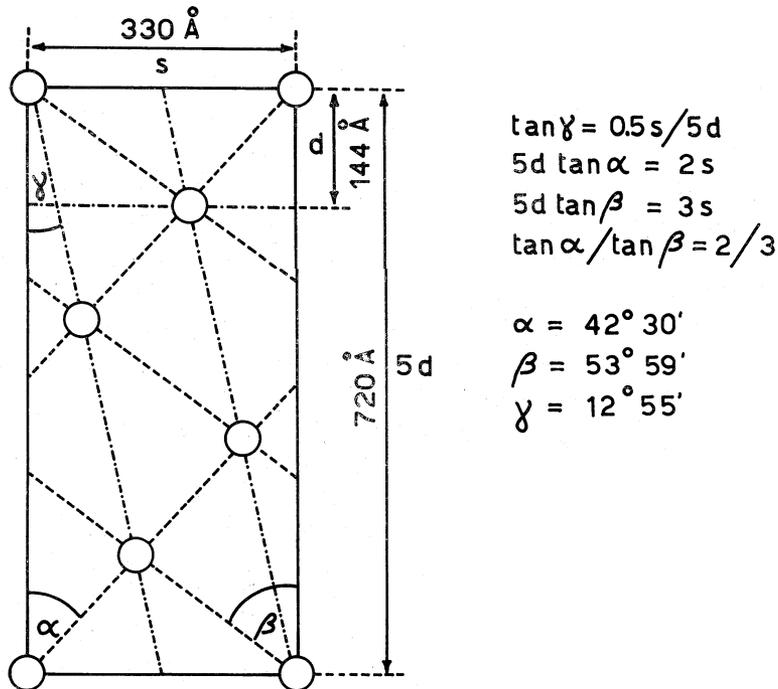


Fig. 1. - Cella di paramiosina, ricavata dalle immagini di filamenti in colorazione negativa. Essa corrisponde (salvo alcuni valori numerici) a quella ottenuta con i dati di diffrazione ai raggi X ai piccoli angoli.

dovrebbero presentare al microscopio elettronico la rete di punti opachi, oltre alla striatura trasversale. In effetti una tale condizione si verifica solo raramente (Tav. I, fig. 1). Inoltre esistono filamenti piegati o parzialmente spezzati, i quali presentano per un tratto della loro lunghezza la tipica struttura a reticolo di punti opachi giustapposti alla striatura trasversale, e solo quest'ultima immagine per un altro tratto. Il cambiamento di immagine coincide con la rottura o la piega del filamento (Tav. III, figg. 5 e 6).

Queste immagini parlano ovviamente in favore sia di una disposizione a reticolo e non elicoidale dei punti o nodi della cella, sia della conservazione della struttura cilindrica del miofilamento, e quindi dell'assenza del fenomeno di clivaggio durante l'estrazione. Solo se queste due condizioni sono soddisfatte è infatti possibile che un unico filamento rigido (quale di-

mostra essere quello paramiosinico) possa presentarsi secondo piani diversi all'osservazione, e quindi fornire differenti immagini morfologiche. La presenza nello stesso preparato, o addirittura nella stessa immagine fotografica (Tav. I, fig. 2) di due filamenti con disposizione enantiomorfa dei punti opachi indica ancora che una sistemazione elicoidale dei punti stessi non è possibile, a meno di voler ammettere la contemporanea presenza nello stesso muscolo di filamenti con eliche destrorgire e levogire. È stato comunque possibile ottenere un'immagine (Tav. II, fig. 3) che sembra risolvere in modo definitivo questo problema: si tratta di un filamento che presenta una lunga zona centrale in cui è visibile la sola striatura trasversale, mentre le zone estreme mostrano i punti opachi disposti secondo schemi tra loro speculari (immagini enantiomorfe). È evidente che tale miofilamento, nel tratto indicato, ha subito una torsione sul proprio asse di circa 180° , e che pertanto alle due estremità presenta due facce opposte del medesimo reticolo. Tale immagine permette di negare contemporaneamente una disposizione elicoidale dei punti opachi sul miofilamento, ed uno sfaldamento del medesimo in nastri sottili. È ovvio infatti che un'elica appare sempre identica qualunque sia l'angolo di osservazione rispetto al suo asse, mentre ciò non si verifica per un reticolo. Inoltre un nastro che si torcesse su se stesso di 180° dovrebbe apparire per un breve tratto disposto verticalmente rispetto al piano di osservazione, cosa che non risulta per il filamento presentato nella figura, e che non è ovviamente richiesta da una struttura pressapoco cilindrica.

In immagini ad alta risoluzione di filamenti paramiosinici, è possibile individuare dei sottili microfilamenti che decorrono parallelamente tra loro e rispetto all'asse del filamento stesso (Tav. IV, figg. 7 e 8). Essi risultano apparentemente a mutuo contatto, e la distanza tra centro e centro di due elementi contigui è di circa 22 \AA , valore questo che è molto prossimo ai 23 \AA indicati da Cohen e Holmes (1963) per la distanza tra gli assi delle molecole di tropomiosina A nel filamento paramiosinico. Per questo motivo sembra lecito poter identificare i microfilamenti descritti con le molecole di tropomiosina A, e quindi affermare che la direzione di queste è effettivamente parallela all'asse del filamento paramiosinico.

Sulla base delle osservazioni qui riportate e dei dati già in precedenza noti, è possibile presentare uno schema della probabile disposizione delle molecole di tropomiosina A nel miofilamento paramiosinico; questo schema concorda largamente con quello presentato da Elliott (1964 *b*) e dedotto da osservazioni con i raggi X (fig. 2). Le molecole proteiche vengono indicate come frecce di lunghezza di 1440 \AA , caratterizzate da una testa ed una coda. I punti ad alta densità elettronica presenti nel miofilamento sono interpretati come i punti di contatto delle estremità di molecole poste successivamente le une alle altre. Le molecole di tropomiosina A risultano raggruppate a costituire « cordoni » il cui diametro è definito dalla distanza tra due successivi punti opachi in proiezione laterale. Poiché per ogni cella vi sono in senso trasversale cinque punti opachi, e la larghezza di questa è circa 330 \AA , ogni « cordone » avrà un diametro di circa 67 \AA . Tenendo conto che la distanza misurata tra

due molecole adiacenti è di 22 \AA , sembra evidente che ogni « cordone », considerato di sezione circolare, debba essere costituito da sette molecole proteiche. I punti opachi si ripetono longitudinalmente ogni 720 \AA , valore che è pressapoco la metà della molecola di tropomiosina A; pertanto si deve pensare che all'interno di ogni « cordone » le molecole siano sfasate tra loro di mezza lunghezza. Inoltre le molecole di ogni « cordone » sono sfasate rispetto a quelle dei « cordoni » adiacenti, di un quinto della loro lunghezza (288 \AA). Uno schema siffatto è perfettamente compatibile con i dati sperimentali, e tuttavia presenta ancora alcuni punti oscuri. Le molecole infatti appaiono qui orientate tutte secondo lo stesso verso: è tuttavia impossibile stabilire o negare l'esistenza di una disposizione antiparallela all'interno di ogni « cordone », od in « cordoni » diversi.

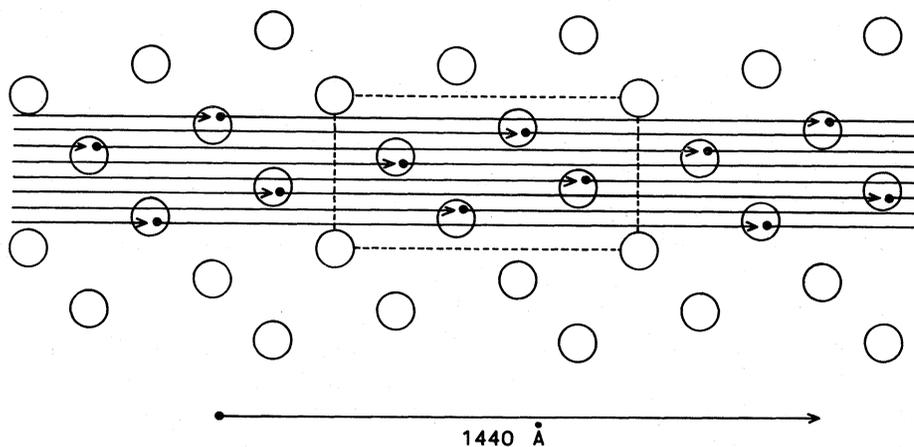
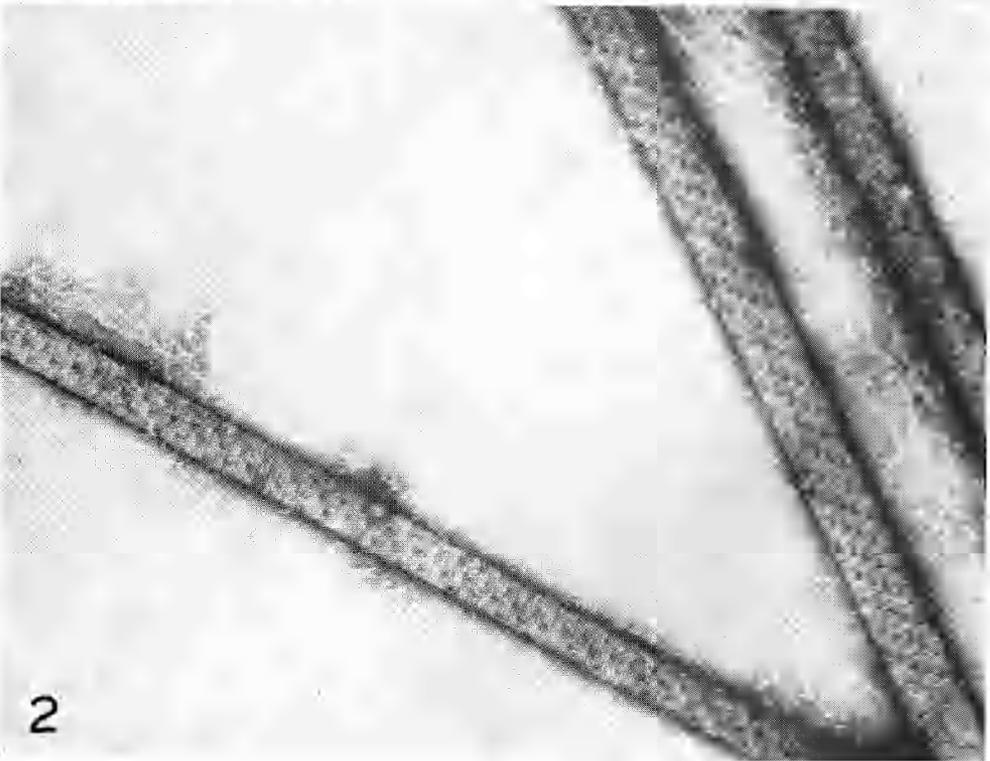
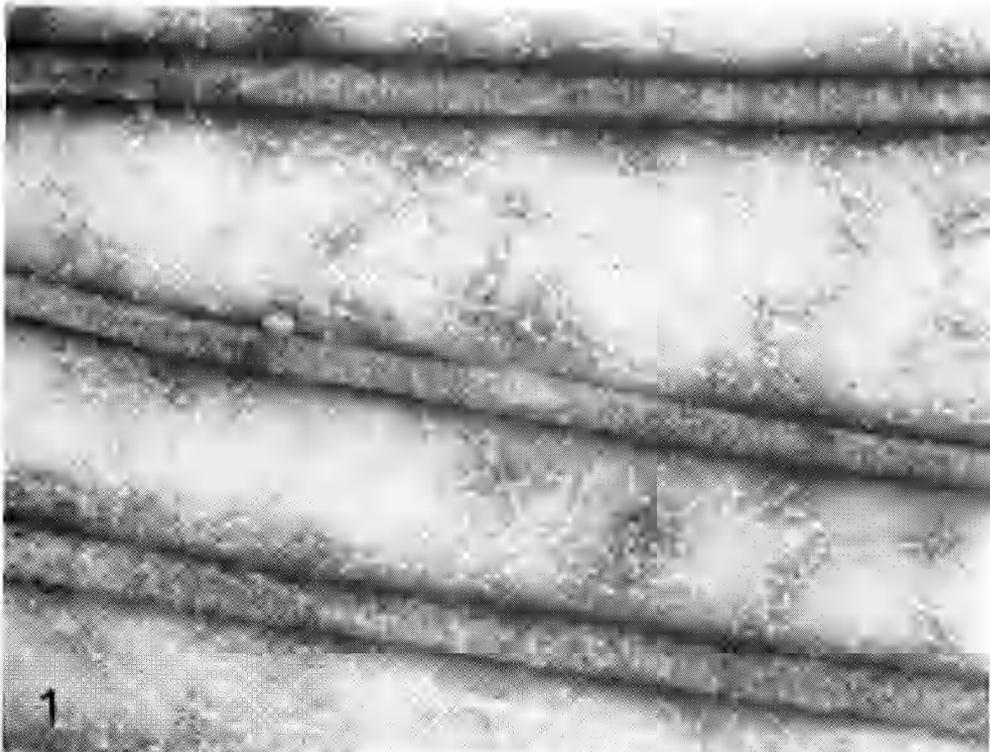


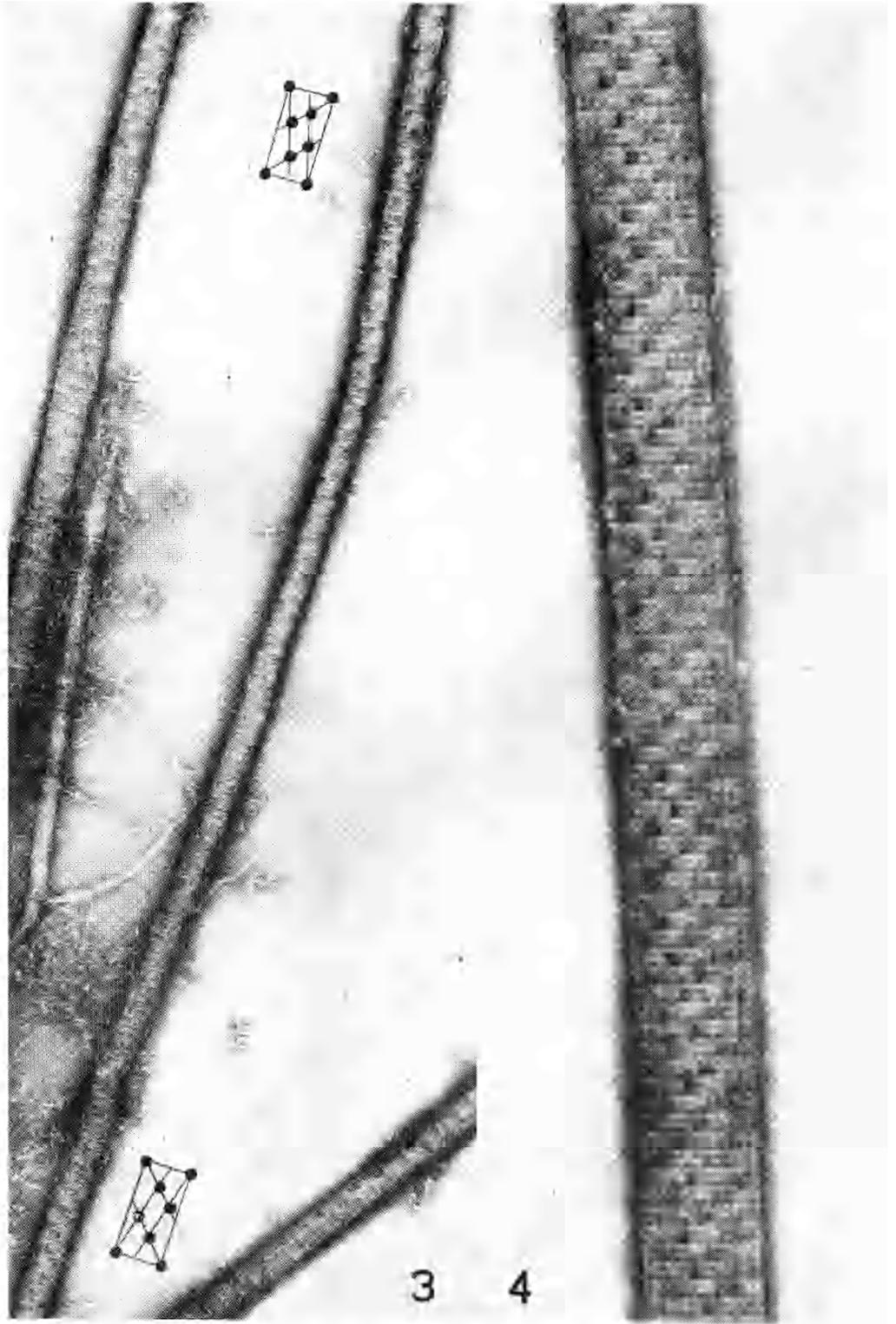
Fig. 2. - Schema illustrante la possibile disposizione delle molecole di tropomiosina A nel filamento paramiosinico.

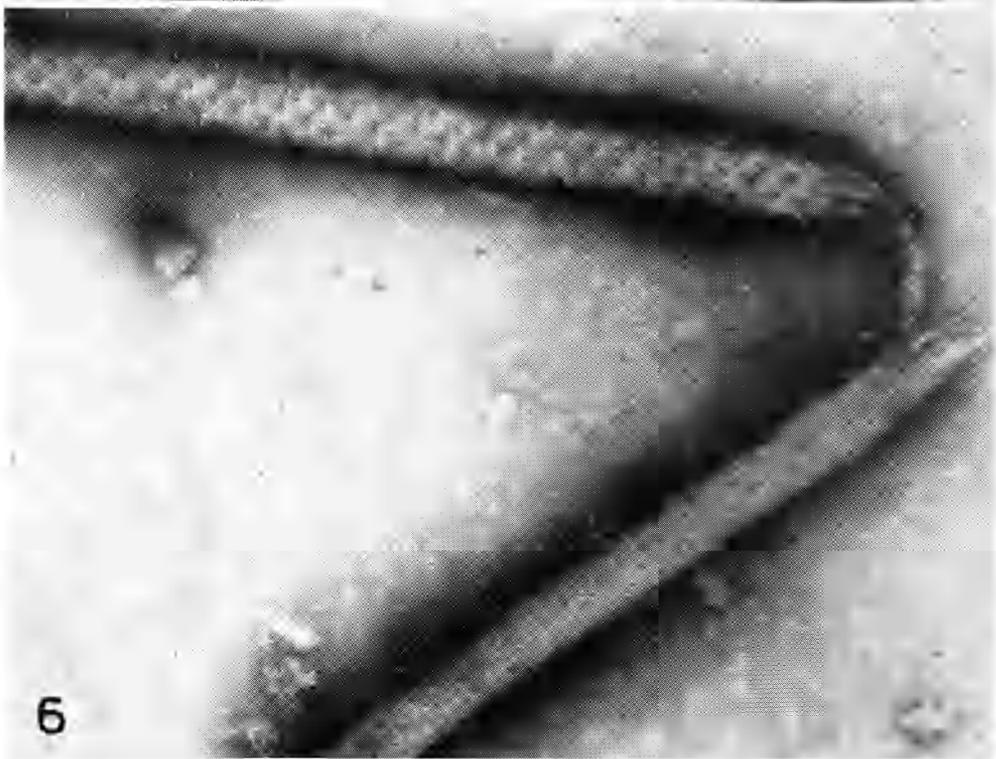
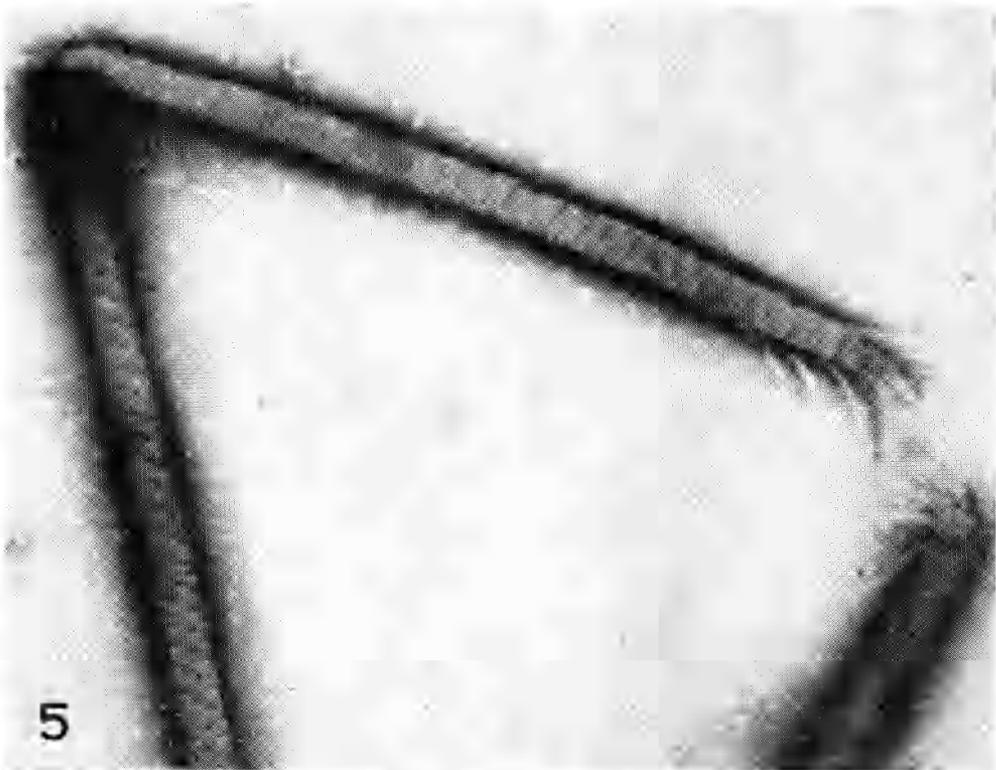
I punti densi agli elettroni (o nodi del reticolo) sono indicati come cerchi. I quattro punti uniti da linee tratteggiate, delimitano una cella paramiosinica. Le molecole di paramiosina A sono rappresentate da frecce lunghe 1440 \AA , caratterizzate da una testa ed una coda. I nodi del reticolo appaiono determinati dai punti di incontro di molecole poste successivamente le une alle altre. Indicazioni più dettagliate sono riferite nel testo.

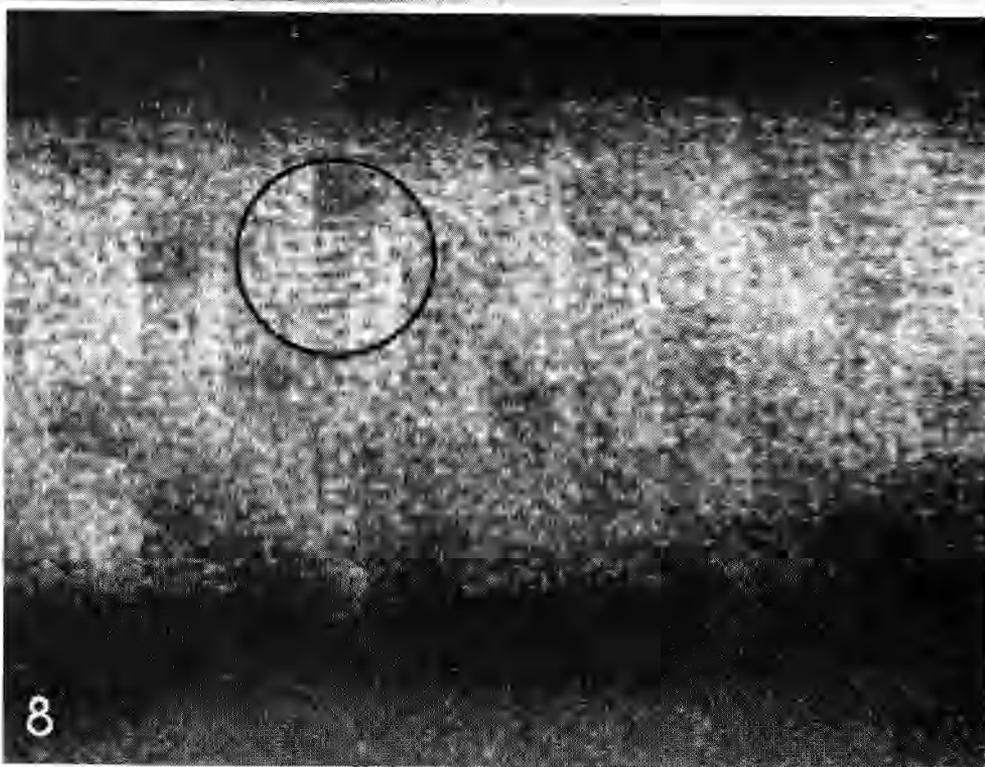
Poiché i nodi del reticolo appaiono scuri in colorazione negativa, essi devono rappresentare zone di minore densità proteica. Ciò può essere correlato al fatto che la lunghezza delle molecole di tropomiosina A è verosimilmente minore rispetto a quella di due celle del reticolo di paramiosina, per cui due molecole successive, all'interno di un cordone, possono risultare separate tra loro da un certo intervallo. Non va del resto dimenticato che secondo Cohen e Holmes (1963) le molecole in questione non sembrano essere perfettamente in registro tra loro, ma sfasate le une rispetto alle altre di $10,3 \text{ \AA}$.

Sembra infine da escludere che la striatura periodica di 144 \AA sui miofilamenti debba essere la conseguenza di una sovrapposizione dei punti densi agli elettroni, secondo quanto proposto da Elliott (1964 a), ma una reale struttura che si ripete sulle singole catene proteiche; essa infatti appare presente in tutti i filamenti, indipendentemente dal loro orientamento rispetto agli assi del reticolo.









BIBLIOGRAFIA.

- BEAR R. S. e SELBY C. C., *The structure of paramyosin fibrils according to X-ray diffraction*, « J. Biophysic. and Biochem. Cytol. », 2, 55 (1956).
- COHEN C. e HOLMES K. C., *X-ray diffraction evidence for α -helical coiled-coils in native muscle*, « J. Mol. Biol. », 6, 423 (1963).
- ELLIOTT G. F., *Electron microscope studies of the structure of the filaments in the opaque adductor muscle of the oyster*, « J. Mol. Biol. », 10, 89 (1964 a).
- ELLIOTT G. F., *X-ray diffraction studies on striated and smooth muscles*, « Proc. Roy. Soc. (London) », Series B, 160, 467 (1964 b).
- ELLIOTT G. F. e LOWY J., *Low-angle X-ray reflections from living molluscan muscles*, « J. Mol. Biol. », 3, 41 (1961).
- LOWEY S., KUCERA J. e HOLTZER A., *On the structure of the paramyosin molecule*, « J. Mol. Biol. », 7, 234 (1963).
- LOWY J. e HANSON J., *Ultrastructure of Invertebrate smooth muscles*, « Physiol. Rev. », 42 suppl. 5, 34 (1962).
- SCHMITT F. O., BEAR R. S., HALL C. E. e JAKUS M. A., *Electron microscope and X-ray diffraction studies of muscles structure*, « Ann. New York Acad. Sc. », 47, 799 (1947).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-IV

TAVOLA I.

- Fig. 1. - Filamenti paramiosinici isolati. In due in alto mostrano la sola striatura trasversale: in quello in basso è anche visibile la rete di punti opachi. $\times 100.000$.
- Fig. 2. - Filamenti con disposizione enantiomorfa dei punti opachi agli elettroni. $\times 100.000$.

TAVOLA II.

- Fig. 3. - Il filamento sottile che percorre in diagonale la figura mostra nella sua parte centrale la sola striatura trasversale, cui si sovrappone, alle due estremità, la rete di punti opachi. Questi sono disposti a formare immagini speculari tra loro. A fianco di queste zone del filamento, sono indicate le celle del reticolo, orientate secondo la disposizione dei punti. $\times 85.000$.
- Fig. 4. - Miofilamento paramiosinico a forte ingrandimento. È visibile in esso sia la striatura trasversale che la disposizione a reticolo dei punti opachi (lievemente sottofuoco). $\times 190.000$.

TAVOLA III.

- Fig. 5. - Filamento piegato. Nel tratto a sinistra è ben visibile la rete di punti opachi; in quello in alto solo la striatura trasversale. $\times 85.000$.
- Fig. 6. - Filamento quasi completamente spezzato in due parti. Nel tratto in alto si vede la rete dei punti opachi, mentre in quello in basso è evidente la sola striatura trasversale. $\times 120.000$.

TAVOLA IV.

- Fig. 7. - Immagine ad alta risoluzione di un filamento paramiosinico, che permette di osservare i microfilamenti orientati parallelamente alla direzione del miofilamento stesso. (Fotografia pressoché a fuoco). $\times 240.000$.
- Fig. 8. - Particolare della figura 7, in cui la disposizione dei microfilamenti appare più evidente, soprattutto all'interno del cerchio. $\times 750.000$.