

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

GIUSEPPINA AMBROSOLI MOGNONI

**Ricerche sull'actina di muscolatura liscia e striata**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 44 (1968), n.1, p. 107–115.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1968\\_8\\_44\\_1\\_107\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_44_1_107_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/>



### SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

**Zoologia.** — *Ricerche sull'actina di muscolatura liscia e striata.*

Nota di GIUSEPPINA AMBROSOLI MOGNONI (\*), presentata (\*\*), dal Corrisp. S. RANZI.

SUMMARY. — The sedimentation constant of actin of smooth muscle (3,6 S) is higher than that of striated muscle (3,0 S).

The effect of denaturant (urea) and reducing (guanidine and tyoglicolic acid) substances on the two proteins is different.

Small differences are remarked in the possibility of polimerization and reaction with myosin.

Immunological tests have been used to investigate the difference between the two proteins after purification by gel filtration.

Carsten e Katz [1] hanno messo in evidenza delle differenze di composizione in aminoacidi e di comportamento elettroforetico tra l'actina di muscolatura scheletrica di Mammiferi e quella di Anfibi, di Pesci e di Molluschi. Nessuna differenza è stata però osservata nella velocità di sedimentazione che è sempre risultata 2,8 S alla concentrazione di 3,0 mg/ml.

In un lavoro successivo, Carsten [2] ha esteso lo studio all'actina estratta da utero di uomo e di pecora, trovando costanti di sedimentazione rispettivamente di 3,72 e 3,85 S, che diminuiscono per dialisi prolungata contro ATP-acido ascorbico a 3,67 e 3,78 S; la differenza tra i valori suddetti e quelli ottenuti per l'actina di muscolatura scheletrica vengono posti in rapporto ad una possibile contaminazione di tropomiosina nel caso dell'actina di utero. Carsten nota però che i valori non risultano modificati estraendo l'actina secondo il metodo di Tsao e Bailey che non permette l'estrazione di tropomiosina.

Hanson e Lowy [3] hanno studiato al microscopio elettronico filamenti di F-actina, isolati da muscolatura liscia e striata di animali appartenenti a gruppi zoologici diversi, e non hanno osservato differenze né tra le diverse specie né in rapporto al tipo di muscolatura considerato.

In base ai dati sopra citati è parso interessante, continuando ricerche già eseguite in questo laboratorio [4], approfondire lo studio dell'actina da un punto di vista comparativo, con particolare riferimento alle differenze esistenti tra l'actina della muscolatura liscia e quella della muscolatura striata di animali appartenenti a gruppi zoologici diversi.

(\*) Gruppo di ricerca per l'Embriologia del CNR per lo studio del differenziamento presso l'Istituto di Zoologia dell'Università Statale di Milano.

(\*\*) Nella seduta del 13 gennaio 1968.

L'actina è stata preparata da muscolo striato di coniglio e di colombo e da muscolo liscio di coniglio, colombo e chiocciola con il metodo di Straub e coll., descritto da Cigada e coll. [4]. La polvere acetonica è stata però sempre usata entro una settimana dalla preparazione, per prevenire processi di denaturazione. Soltanto negli esperimenti di immunologia, è stata usata la stessa soluzione di actina conservata a  $-20^{\circ}\text{C}$  per tutta la durata dell'esperimento.

Le costanti di sedimentazione delle proteine così preparate, in soluzione acquosa, sono state determinate in ultracentrifuga analitica Spinco modello E, dotata del dispositivo RTCH, mantenendo la temperatura a circa  $20^{\circ}\text{C}$ .

È stato applicato il metodo di purificazione di Mommaerts [5] trasformando due volte la G-actina in F-actina, che è stata separata dalla soluzione per centrifugazione a 30.000 RPM per due ore in ultracentrifuga preparativa Spinco modello L ed è stata ripresa in acido ascorbico 0,02 mM e ATP 0,2 mM.

È stato applicato il metodo di purificazione per gel filtrazione su colonna di Sephadex G-200, secondo il metodo di Adelstein, Godfrey e Kielley [6]. In questi esperimenti, la polvere acetonica è stata estratta con ATP  $10^{-4}\text{M}$  pH 8 per 45' a  $4^{\circ}\text{C}$  e la soluzione è stata passata su colonna Sephadex G-200 equilibrata con ATP  $10^{-4}\text{M}$  pH 8, dell'altezza di cm. 34 e del diametro di cm. 2,5. Sono state raccolte frazioni di 4 ml.

È stato studiato l'effetto di varie sostanze denaturanti e riducenti (urea, acido tioglicolico 5% pH 2,2, guanidina-HCl 5M), dializzando le soluzioni acquose di actina contro soluzioni delle sostanze in questione. Nel caso dell'urea, le soluzioni sono state successivamente dializzate contro acqua distillata per 24 h, prima dell'analisi all'ultracentrifuga.

Sono stati preparati antisieri, iniettando actina di colombo, purificata su colonna, per via intramuscolare con adiuvante completo Freund (DIFCO). Sono state fatte 4 iniezioni. Gli antisieri sono stati conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La superprecipitazione dell'actomiosina è stata ottenuta secondo il metodo di Szent-Györgyi [7].

La concentrazione proteica nelle determinazioni di costante di sedimentazione è stata calcolata dalla lastra ottenuta all'ultracentrifuga. Negli esperimenti di immunologia, la concentrazione proteica è stata determinata con il metodo del biuretto.

È stata compiuta una serie di determinazioni di costante di sedimentazione di actina estratta da muscolatura liscia di vari organi di animali diversi, confrontandola, quando è possibile, con la costante di sedimentazione di actina estratta dalla muscolatura scheletrica degli stessi animali.

I valori ottenuti sono riportati nella seguente tabella:

	m. striata	m. liscia
chiocciola . . . .		4,9 S (piede)
coniglio . . . . .	3,0 S (scheletrica)	3,6 S (intestino)
	3,2 S (cardiaca)	4,3 S (stomaco)
colombo . . . . .	3,2 S (scheletrica)	3,6 S (intestino)
		4,0 S (stomaco).

Le costanti di sedimentazione sono state ottenute estrapolando, a concentrazione 0, i coefficienti di sedimentazione ottenuti alle varie concentrazioni. Quelle dell'actina di muscolatura liscia presentano valori abbastanza diversi tra loro, ma sono sempre più elevate di quelle ottenute per la muscolatura striata. Inoltre, come si può rilevare dai grafici di estrapolazione a concentrazione 0 dei coefficienti di sedimentazione (fig. 1), nel caso delle actine di muscolatura liscia la dipendenza dalla concentrazione è più marcata.

Poiché le soluzioni di actina a cui si riferiscono i valori sopra riportati non sono state in alcun modo purificate, e dato che è stata dimostrata da Sawada (op. cit.), con metodo immunologico, la gruppo specificità delle impurezze dell'actina, è necessario dimostrare che i valori ottenuti nel caso dell'actina di muscolatura liscia si riferiscono effettivamente all'actina e non alla presenza di impurezze gruppo-specifiche.

Per chiarire questo punto, sono stati applicati, su actina estratta da muscolatura scheletrica e da muscolatura liscia (parete intestinale) di coniglio, il metodo di purificazione di Mommaerts e il metodo di gel filtrazione di Adelstein, Godfrey e Kielley.

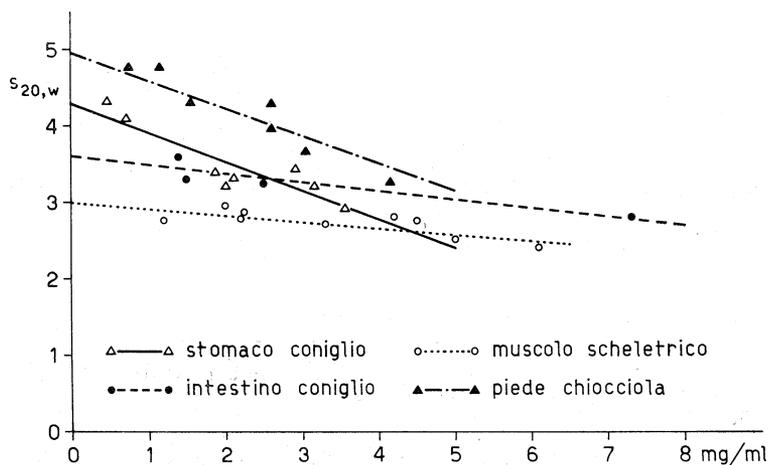


Fig. 1. - Grafici di estrapolazione a concentrazione 0 dei coefficienti di sedimentazione ( $s_{20,w}$ ) ottenuti alle varie concentrazioni.

Il metodo di Mommaerts ha dato buoni risultati nel caso dell'actina estratta da muscolatura scheletrica. I coefficienti di sedimentazione ottenuti con soluzioni di actina purificata (2,8 S alla concentrazione di 2,7 mg/ml) sono in perfetto accordo con i dati ottenuti con soluzioni di actina impura (fig. 1). L'entità delle impurezze è in questo caso troppo bassa per interferire sulla velocità di sedimentazione dell'actina.

Non è stato invece possibile applicare questo metodo all'actina estratta da muscolatura liscia, in quanto non si è potuto ottenere, dopo l'ultima depolimerizzazione, la G-actina in concentrazione adeguata. Ciò può essere dovuto ad una forte quantità di impurezze, che abbassa il rendimento del processo di purificazione, ovvero al fatto che l'actina non passa facilmente dalla forma F alla forma G. Quando infatti è stato possibile osservare all'ultracentrifuga il prodotto finale della purificazione, è sempre apparso in stadi di elevata polimerizzazione e quindi inadeguato al controllo della velocità di sedimentazione del monomero.

È stata controllata l'entità delle impurezze rimaste nel supernatante dopo separazione dell'F-actina. Nel caso della muscolatura liscia, la quantità

di impurezze è molto elevata ed è possibile osservare all'ultracentrifuga un componente con costante di sedimentazione di 2,9 S circa. Questo valore non può riferirsi all'actina, che, in queste condizioni, si presenterebbe nella forma F.

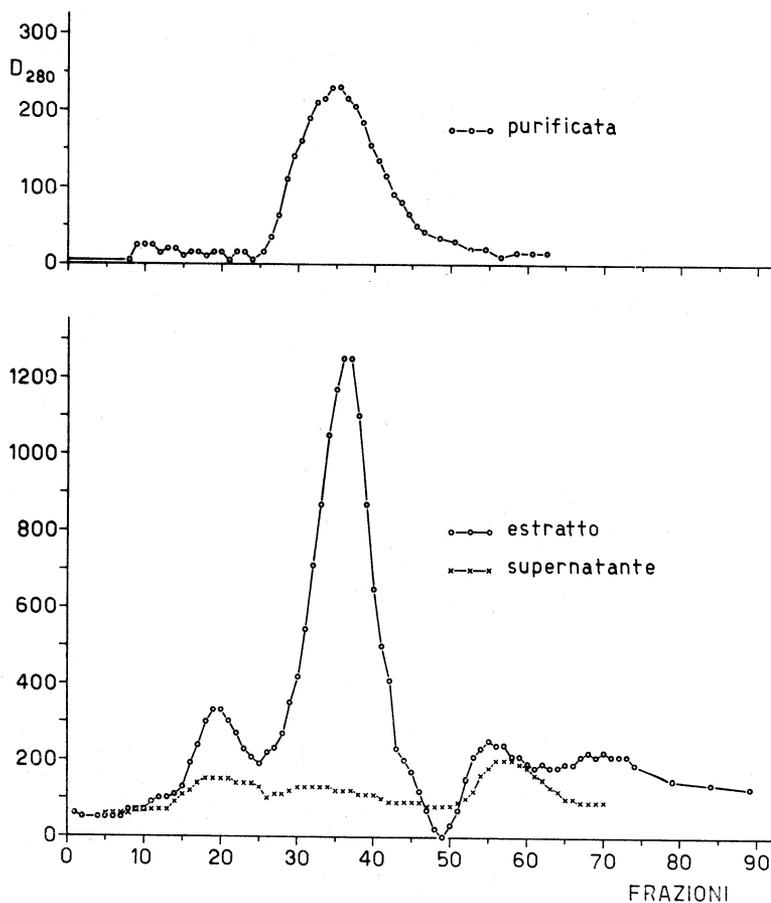


Fig. 2. - Diagramma di gel filtrazione di actina di muscolatura scheletrica di coniglio prima e dopo separazione dell'F-actina. In alto, diagramma di gel filtrazione della stessa soluzione di actina purificata secondo il metodo di Mommaerts (colonna di Sephadex G-200, alta 34 cm e larga 2,5 cm. Solvente:  $\text{ATP } 10^{-4}\text{M}$ ).

Il processo di purificazione è stato quindi condotto su colonne di Sephadex G-200. I diagrammi ottenuti con le soluzioni di actina di muscolo striato (fig. 2) in accordo con i dati di Adelstein e coll., mostrano un primo picco, attribuito dagli autori suddetti ad una miscela di tropomiosina e di actina denaturata, un picco principale, dovuto alla G-actina, ed un terzo picco minore, negativo al biureto, attribuito ad una miscela di nucleotidi. La stessa actina, purificata secondo il metodo di Mommaerts, mostra un unico picco, corrispondente al picco principale (fig. 2).

Nel caso di actina di muscolatura liscia, il diagramma mostra un primo picco, spostato a sinistra, molto concentrato e d'aspetto molto puro, e due picchi meno concentrati, ma sempre in concentrazione cospicua rispetto al picco principale (fig. 3).

Anche nei diagrammi di gel filtrazione ottenuti da Sawada, che mostrano però una risoluzione molto inferiore, si può vedere che il componente principale dell'actina di chiocciola viene raccolto in frazioni precedenti a quello dell'actina di muscolo scheletrico di coniglio.

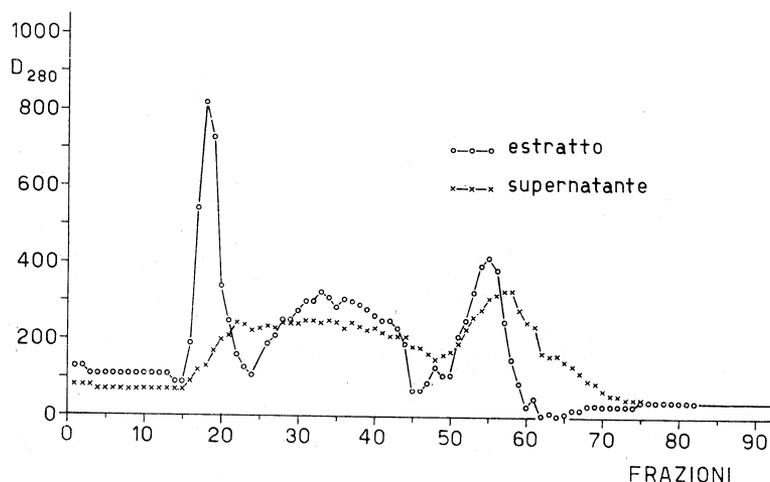


Fig. 3. - Diagramma di gel filtrazione di actina di muscolatura liscia di coniglio prima e dopo separazione dell'F-actina (stessa colonna della fig. 2).

Poiché i valori di costante di sedimentazione ottenuti si riferiscono al componente più concentrato, è necessario dimostrare che i componenti che appaiono più concentrati nei diagrammi ottenuti, dopo passaggio attraverso la colonna di Sephadex, sono dovuti all'actina e non alle impurezze presenti in soluzione.

L'actina è stata polimerizzata portandola in una soluzione di 0,1 M KCl e l'F-actina così ottenuta è stata separata per centrifugazione; il supernatante è stato passato attraverso la colonna. I diagrammi ottenuti (figg. 2 e 3) hanno mostrato che, allontanando l'F-actina, scompare il componente più concentrato, e cioè il secondo nel caso dell'actina di muscolatura striata e il primo nel caso dell'actina di muscolatura liscia.

Nel supernatante delle soluzioni di estratto da muscolatura liscia si osserva un componente a 2,9 S, in accordo con i diagrammi ottenuti alla colonna, in quanto le impurezze dell'actina di muscolo liscio si raccolgono nelle stesse frazioni in cui si raccoglie il componente principale dell'actina di muscolo striato (3,0 S).

I diagrammi di gel filtrazione dell'actina estratta dalle due diverse muscolature del colombo (figg. 4 e 5) sono notevolmente simili a quelli ottenuti

per il coniglio. Purificando su colonna e concentrando le frazioni corrispondenti all'actina, sono stati preparati antisieri con le due diverse actine di colombo.

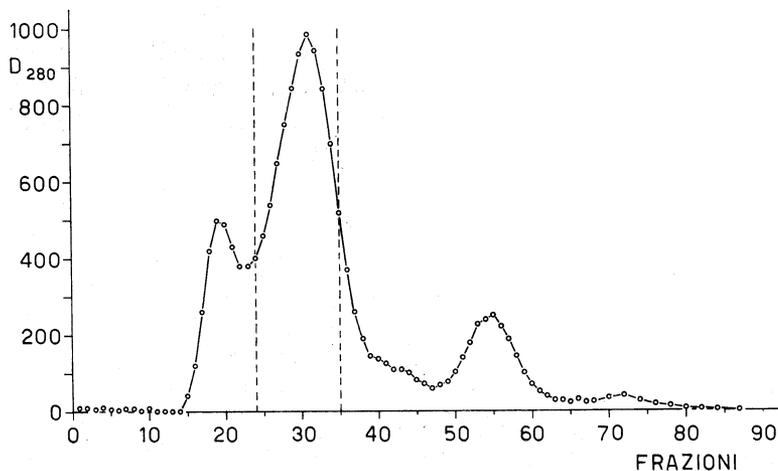


Fig. 4. - Diagramma di gel filtrazione di actina estratta da muscolatura scheletrica di colombo. Tra le due righe tratteggiate le frazioni raccolte e concentrate per la preparazione degli antisieri (stessa colonna della fig. 2).

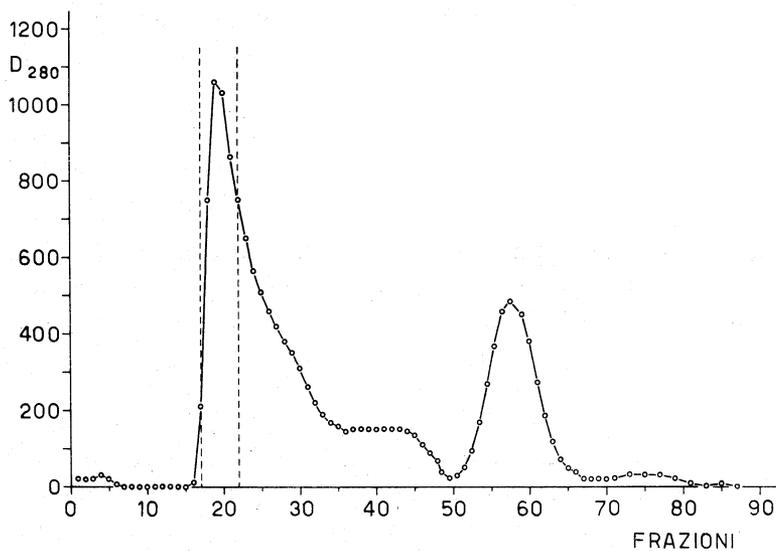


Fig. 5. - Diagramma di gel filtrazione di actina estratta da muscolatura liscia di colombo. Tra le due righe tratteggiate le frazioni raccolte e concentrate per la preparazione degli antisieri (stessa colonna della fig. 2).

Gli antisieri ottenuti hanno dato risultato positivo, mostrando l'anello di precipitato (ring-test) sia a contatto con le frazioni purificate che a contatto con actine di provenienza diversa (mitilo, astaco) non purificate, osservazione che condusse i precedenti ricercatori ad affermare che l'actina è antigene organospecifico e non speciespecifico.

Con l'antisiero contro actina di muscolatura striata sono stati condotti esperimenti di immunodiffusione, che hanno dato i risultati che riporto indicando con S l'actina di muscolatura striata di colombo e con L quella di muscolatura liscia dello stesso animale.

anti S + S: si osserva sempre un arco di precipitato netto, eventualmente associato a due archi minori, visibili sia a fresco che dopo colorazione con nero amido. Nel caso di actina non purificata, i due archi minori sono più evidenti.

anti S + L: si osserva una debole reazione con un unico arco, di cui è dubbia la completa fusione con l'arco dell'actina di muscolatura striata.

anti S + actina mitilo: non si osserva reazione oppure si osserva un arco appena visibile solo a fresco.

Nell'intento di approfondire lo studio delle differenze tra le due actine, è stato studiato l'effetto di sostanze denaturanti e riducenti.

È stato esaminato l'effetto dell'urea a forte concentrazione (15%–30%) per tempi diversi su soluzioni di actina impura di muscolo liscio e striato di coniglio. Sono stati controllati i valori dei coefficienti di sedimentazione dopo il trattamento.

Sono stati ottenuti i seguenti risultati completamente ripetibili:

#### Esperimento 1.

	$s_0$		nativa	urea 30% 1 h	urea 30% 24 h
actina di m. striato	3,0	$s_{20,w}$	2,9	4,2	3,9–8,6
		$D_{280}$	8,600	6,400	3,650
actina di m. liscio	3,6	$s_{20,w}$	3,2	3,2	non misur.
		$D_{280}$	17,000	7,500	4,600

#### Esperimento 2.

	$s_0$		nativa	urea 15% 1 h	urea 15% 24 h
actina di m. striato	3,0	$s_{20,w}$	2,9	2,8–4,9	4,1
		$D_{280}$	8,400	5,600	5,300
actina di m. liscio	3,6	$s_{20,w}$	3,3	3,3	3,1
		$D_{280}$	12,300	6,800	8,00

$s_0$  = costante di sedimentazione;

$s_{20,w}$  = coefficienti di sedimentazione corretti;

$D_{280}$  = densità ottica alla lunghezza d'onda di 280 m $\mu$ .

I valori sopra riportati indicano che, per effetto dell'urea, l'actina di muscolatura striata tende a dare componenti di circa 4 S, mentre l'actina di muscolatura liscia dà un componente con coefficiente di sedimentazione inferiore a quello della forma nativa (3,2 S a concentrazioni molto più basse delle soluzioni di partenza, come è indicato da  $D_{280}$ ).

Risultati analoghi sono stati ottenuti controllando la denaturazione dovuta al semplice invecchiamento delle soluzioni di actina, conservate a  $+4^{\circ}\text{C}$ . Anche in questo caso, l'actina di muscolatura striata tende a dare componenti di 4-5 S, mentre l'actina di muscolatura liscia mostra un componente di circa 3,0 S.

La comparsa di un componente a 4 S nelle soluzioni di actina estratta da muscolo striato, tenute per pochi giorni a  $+4^{\circ}\text{C}$ , è stata osservata anche da Mihaski [8], che non sa se attribuirlo ad un breve polimero di actina o all'effetto della disordinata distribuzione spaziale di alcune molecole di actina denaturata. Le ricerche di Nagy e Yenks [9], che dimostrano una totale perdita di  $\alpha$ -eliche nell'actina trattata con urea a forte concentrazione, rendono più probabile la seconda ipotesi.

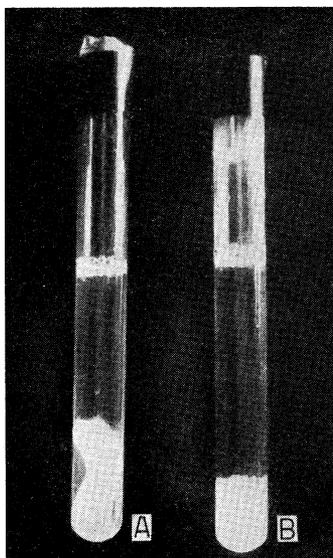


Fig. 6. - Superprecipitazione di actomiosina. Miosina di muscolo striato in A con actina di muscolo striato, in B con actina di muscolo liscio.

Per trattamento con sostanze riducenti (ac. tioglicolico 5% pH 2,2) l'actina di muscolo striato mostra all'ultracentrifuga un componente di circa 8 S, mentre l'actina di muscolo liscio dà un componente di circa 5 S. Poiché i gruppi S-S ridotti non sono stati bloccati, è verosimile pensare che i gruppi SH, ottenuti dopo la riduzione, abbiano nuovamente reagito tra di loro,

portando alla formazione dei componenti osservati. Anche in questo per emerge una diversa reazione delle due actine.

Un effetto riducente irreversibile è invece provocato da guanidina-HCl 5 M, che provoca la formazione di componenti di circa 1,0 S nel caso dell'actina di muscolo striato, e di circa 1,5 S nel caso dell'actina di muscolo liscio. Pare comunque che la guanidina non scinda l'actina in subunità, ma rompa anche i ponti S-S all'interno della molecola, il cui peso molecolare resta invariato, come è stato osservato da Krans, Van Eijk e Westenbrink [10]. Si tratterebbe quindi anche in questo caso di cambiamento della struttura spaziale.

È stata infine osservata la capacità delle due actine di legarsi alla miosina formando actomiosina. Sono stati eseguiti esperimenti di superprecipitazione dell'actomiosina secondo il metodo di Szent-Györgyi, in base al quale, l'F-actina, in presenza di miosina, di tracce di  $\text{MgCl}_2$  e di ATP dà un precipitato compatto di actomiosina. Gli esperimenti sono stati condotti

facendo reagire miosina di muscolatura striata con le due diverse actine. In entrambi i casi si è ottenuto un superprecipitato che appare più compatto nel caso di actina di muscolo striato (fig. 6).

Queste ricerche inducono a ritenere parzialmente diverse le molecole di actina dei muscoli lisci e striati.

Le due proteine non solo mostrano una diversa costante di sedimentazione, ma hanno anche un diverso comportamento per effetto di sostanze denaturanti e riducenti.

I diagrammi ottenuti purificando le diverse actine su colonna di Sephadex mostrano una differenza tra actina di muscolatura liscia e actina di muscolatura striata, e forti similitudini tra i diversi animali.

D'altra parte le possibilità di polimerizzare e di formare actomiosina dimostrano che l'actina di muscolatura liscia ha le caratteristiche funzionali note per l'actina di muscolo striato.

Non si può scartare l'ipotesi che l'actina di muscolo liscio rappresenti un polimero stabile di un monomero identico all'actina di muscolo striato, anche se le tecniche qui impiegate non hanno permesso di ottenere questo monomero. Questa ipotesi non sembra però conciliabile con il diverso comportamento, osservato in presenza di sostanze denaturanti e riducenti, né conciliabile con i dati immunologici.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] CARSTEN M. E. e KATZ A. M., « *Bioch. Bioph. Acta* », 90, 534 (1964).
- [2] CARSTEN M. E., « *Biochemistry* », 4, 1049 (1965).
- [3] HANSON J. e LOWY J., « *J. Mol. Biol.* », 6, 46 (1963).
- [4] Cfr. specialmente: CIGADA M., CITTERIO P., ORLANDI A., RANZI S. e TOSI L., « *Ist. Lomb. Rend. Sc.* », 82, 351 (1949); RANZI S., « *Monit. Zool. Ital.* », Supplem., 66, 1 (1958); AMBROSOLI MOGNONI G., « *Ist. Lomb. Rend. Sc.* »; B 96, 154 (1962); SAWADA H., « *Accad. Naz. Lincei (Rend. Sc. fis.)* », 39, 352 (1965).
- [5] MOMMAERTS W. F. H. M., « *J. Biol. Chem.* », 198, 445 (1952).
- [6] ADELSTEIN R. S., GODFREY J. E. e KIELLEY W. W., « *Biochem. Bioph. Res. Commun.* », 12, 34 (1963).
- [7] SZENT-GYÖRGYI A., *Chemistry of muscular contraction*, « Academic Press Inc. », New York, 2nd edition (1951).
- [8] MIHASHI K., « *Arch. Bioch. Bioph.* », 107, 441 (1964).
- [9] NAGY B. e YENKS W., « *Biochemistry* », 1, 987 (1962).
- [10] KRANS H. M., VAN EIJK H. G. e WESTENBRINK H. G. K., « *Bioch. Bioph. Acta* », 100, 193 (1965).