
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIUSEPPINA AMBROSOLI MOGNONI, GIULIO
LANZAVECCHIA

**Studi sulla muscolatura elicoidale e paramiosinica.
III. Osservazioni comparative sulle proteine
muscolari di mitilo e oloturia**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 46 (1969), n.5, p. 610–618.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1969_8_46_5_610_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. — *Studi sulla muscolatura elicoidale e paramiosinica.*
III. *Osservazioni comparative sulle proteine muscolari di mitilo e oloturia.* Nota (*) di GIUSEPPINA AMBROSOLI MOGNONI e GIULIO LANZAVECCHIA, presentata (**) dal Corrisp. S. RANZI.

SUMMARY. — Some proteins obtainable from the primary myofilaments (paramyosinic) of *Mytilus* muscles (*anterior* and *posterior byssus retractor*, and *anterior adductor*) have been investigated. The proteins have been extracted from myofilaments in a low ionic force medium. No organic solvent has been used. In the crude extracts of the muscle two components have been found: tropomyosin A (93–94%) and another fraction (6–7%) which is prominently myosin.

Tropomyosin A was purified by a double crystallization at a low ionic force. The fractions purity was checked by ultracentrifugation (fig. 1) and by gel filtration (fig. 2).

In order to prevent the possibility of polymerization at pH 7, the physicochemical properties of the tropomyosin A have tested at pH 9; under these conditions, the value of the sedimentation constant was found to be 3.2 (fig. 3), and $[\eta]$ was 180 (where c is expressed by g/ml).

Tropomyosin A did not show any ATPase activity. At low ionic force it crystallized and crystals showed a period of about 144 Å (Tav. I, fig. 1 c). By using a specific method for the extraction of myosin, we succeeded in increasing the concentration of myosin up to 50% (fig. 6); the ATPase activity was always correlated to the myosin concentration. The ATPase activity was higher at pH 9 than at pH 7, and it was more Ca^{++} than Mg^{++} dependent. The specific activity of the myosin was about 4000 unities Q_P ; this value corresponds approximately to a number of turnover of 1500, assuming for the myosin a molecular weight of 500.000 (figs. 5 and 7). This specific activity seems to be of the same range of magnitude of that of the Mammals skeletal muscles. These data disagree with Bårány's papers, according to which the contraction speed of muscles would depend on the ATP activity of myosin.

Proteins have been obtained also from longitudinal radial muscles of *Holothuria*. A protein with similar physico-chemical properties as the tropomyosin A of *Mytilus* has been extracted. It crystallized at low ionic force, with a period of 144 Å. It was impossible to obtain this protein in the monomeric form, because it had the tendency to polymerize also at pH 9. Nevertheless we could observe some depolymerization (Tav. I, fig. 2) repeating the controls at intervals.

It was possible to observe the ATPase activity only in the crude extracts of the muscle. Purified tropomyosin A never showed the ATPase activity. The behaviour of the ATPase activity of the myosin of *Holothuria* seems to be like that of myosin of *Mytilus*.

I problemi attuali relativi alle caratteristiche ed al significato della tropomiosina A nei muscoli di Anellidi, Sipunculidi e Molluschi, sono stati recentemente riassunti da Gergely (1966). Tutti gli studi sulla struttura e sulle proprietà chimico fisiche della tropomiosina A sono stati finora condotti su proteine estratte con il metodo di Bailey (1957) o di Johnson, Kahn e Szent Györgyi (1959). Questi metodi si basano su di una precipitazione

(*) Lavoro eseguito nel Laboratorio di Zoologia dell'Università di Milano. Gruppo di ricerca per l'Embriologia del C.N.R.

(**) Nella seduta del 10 maggio 1969.

delle proteine con alcool etilico, e potrebbero quindi modificarne le proprietà, in particolare una eventuale attività enzimatica. Johnson e coll. affermano che la tropomiosina A dei muscoli paramiosinici dei Molluschi è priva di attività ATPasica, mentre Locker e Schmitt (1957), impiegando un metodo di estrazione differente e meno preciso, osservano una debole attività enzimatica. Questi Autori tuttavia non escludono la possibilità di una contaminazione con miosina, che potrebbe essere la causa dell'attività asservata.

Kahn e Johnson (1960) hanno dimostrato la presenza di attività ATPasica nell'estratto di muscolo *anterior byssus retractor* di mitilo, e sulla base di osservazioni di microscopia elettronica su materiale estratto con solventi opportuni, hanno ipotizzato l'esistenza di un involucro di miosina attorno ad un asse paramiosinico. Le immagini elettroniche non sono tuttavia convincenti, e sembrano in contrasto con talune osservazioni che si possono fare su filamenti paramiosinici isolati; in colorazione negativa essi mostrano infatti la tipica disposizione cristallina della paramiosina, non mascherata da un involucro di miosina (Lanzavecchia, 1966).

Queste ricerche hanno lo scopo di chiarire alcuni punti relativi alla funzione della tropomiosina A, alla sua distribuzione in gruppi zoologici differenti e lontani tra loro, e dimostrare la presenza di miosina nei miofilamenti paramiosinici.

MATERIALI E METODI.

Sono stati impiegati i muscoli: *anterior byssus retractor*, *anterior adductor* e *posterior byssus retractor* di *Mytilus galloprovincialis* L., e i muscoli longitudinali radiali di *Holothuria tubulosa* GMELIN; i metodi di estrazione delle proteine muscolari sono descritti nella parte sperimentale.

Ultracentrifugazione. Le analisi sono state condotte con un'ultracentrifugà analitica Spinco model E, alla temperatura di circa 20°C, salvo indicazioni in proposito. I dattaggi delle analisi sono indicati nelle spiegazioni delle figure.

Microscopia elettronica. I filamenti paramiosinici isolati (vedi parte sperimentale) sono stati osservati in colorazione negativa con acetato di uranile 1% pH 4.5, e in colorazione positiva con Na fosfotungstato 1% pH 6.5; i cristalli di paramiosina ottenuti *in vitro* sono stati osservati in colorazione positiva con Na fosfotungstato. Le osservazioni sono state fatte con il microscopio elettronico Hitachi HS 7.

Viscosità. Le misure di viscosità sono state fatte con viscosimetri Ostwald, a $20 \pm 0.02^\circ\text{C}$. I tempi di flusso per il solvente (soluzione 0,6 M. KCl, pH 9.2, tampone carbonati) sono dell'ordine di 200 sec. Non sono state fatte correzioni per l'energia cinetica, che costituisce in queste condizioni un fattore trascurabile. La concentrazione proteica è stata determinata con il micrometodo di Kjeldhal, considerando 18.2 come valore percentuale in azoto per la paramiosina (Bailey e Ruegg, 1960).

Attività ATPasica. È stata determinata in un mezzo contenente KCl 0.6M., tampone glicina o Tris 0.1 M., CaCl_2 o MgCl_2 0.01 M., ATP 0.0075 M., a 25°C. La reazione viene arrestata ad intervalli di tempo opportuni con acido tricloroacetico (TCA) 15% (concentrazione finale 5%). Il fosforo inorganico è stato determinato con il metodo di Fiske e SubbaRow. L'attività ATPasica viene espressa in unità Q_p di Bailey ($Q_p = 22.4 \mu\text{Moli di } P_i \text{ liberato da ATP in un'ora, da 1 mg di enzima}$).

Cromatografia su Sephadex. È stata usata una colonna di Sephadex G-200 alta 30 cm, del diametro di 2.5 cm. Sono state raccolte frazioni di 4 ml.

PARTE SPERIMENTALE.

Tropomiosina A di Mytilus. - È stata estratta impiegando il metodo utilizzato da Hanson e coll. (1957) per la preparazione dei cristalli di paramiosina *in vitro*. Il processo di cristallizzazione è stato tuttavia ripetuto due volte per eliminare le impurezze: si ottiene un abbondante precipitato che cristallizza rapidamente, formando cristalli aghiformi che mostrano al microscopio elettronico il tipico periodo della paramiosina (Tav. I, fig. 1 c).

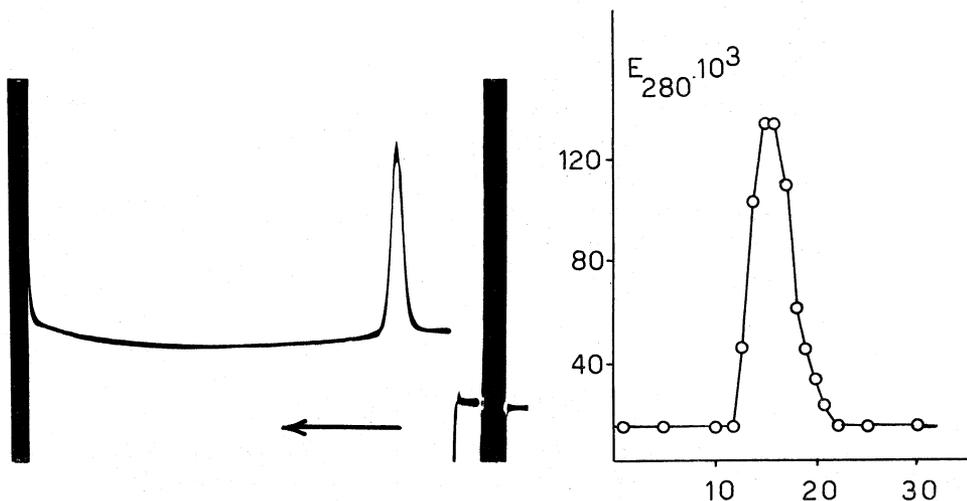


Fig. 1. - Diagramma di ultracentrifugazione di tropomiosina A di mitilo, cristallizzata due volte, a pH 9.

Fig. 2. - Analisi cromatografica su Sephadex G-200, di tropomiosina A di mitilo, cristallizzata due volte, a pH 9.

Questi cristalli, ripresi in KCl 0.6M a pH 7 o 9.2 appaiono costituiti da una proteina, apparentemente pura sia all'ultracentrifuga (fig. 1), sia all'analisi cromatografica su Sephadex (fig. 2). A pH 7 si ottengono coefficienti di sedimentazione più elevati rispetto a quelli tipici della tropomiosina A (estratta con il metodo di Bailey), alle concentrazioni corrispondenti. A 20°C inoltre, sempre a pH 7, si osserva costantemente una graduale diminuzione della velocità di sedimentazione nel corso di ogni centrifugazione; ciò rende impossibile la determinazione della costante di sedimentazione. Questo fenomeno, che non è stato mai osservato da noi per la tropomiosina A ottenuta con il metodo di Bailey o di Johnson e coll. viene annullato se la temperatura, nel corso dell'ultracentrifugazione, è inferiore a 10°C (Tabella I). Normali diagrammi di ultracentrifugazione si possono tuttavia ottenere se la soluzione proteica viene mantenuta a 20°C per qualche ora, o a 4°C per alcuni giorni; in entrambi i casi tuttavia si assiste ad una certa denaturazione, che si manifesta con la comparsa di una frazione ad elevata velocità di sedimentazione.

TABELLA I.
Tropomiosina A estratta secondo Hanson e coll., a pH 7.

TEMPERATURA	9.4° C	20° C
Coefficienti di sedimentazione tra successivi fotogrammi	— (*)	5.25
	2.40	4.27
	2.35	4.15
	2.42	3.99
	2.43	3.88
Concentrazione in mg/ml	4.80	3.40

(*) Valori non corretti per la temperatura.

Se i cristalli sono disciolti in KCl 0.6M a pH 9.2 (tamponi glicina o carbonato), si ottengono diagrammi di sedimentazione regolari, e la proteina presenta una costante di sedimentazione di 3.2 S, analoga a quella riportata in bibliografia per la tropomiosina A (Kay, 1958; Riddiford e Sheraga, 1962; Lowey, Kucera e Holtzer, 1963) (fig. 3).

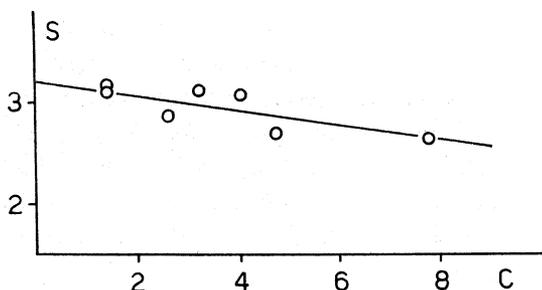


Fig. 3. - Costante di sedimentazione di tropomiosina A di mitilo, a pH 9. La concentrazione C sulle ascisse è espressa in mg/ml.

Le misure di viscosità (η_{sp}/c , ove c è espresso in g/ml), effettuate sulla proteina a pH 9, danno un valore di viscosità intrinseca di 180, simile a quello ottenuto da Lowey e coll. (1963) (fig. 4).

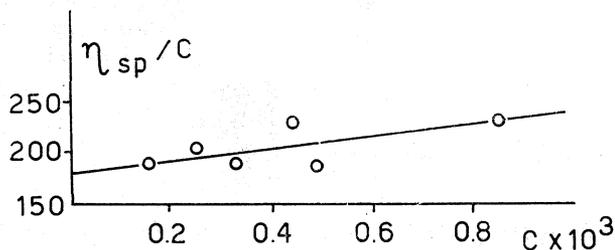


Fig. 4. - Viscosità intrinseca di tropomiosina A di mitilo, a pH 9. La concentrazione C è espressa in g/ml.

Attività ATPasica. - È stata determinata sui miofilamenti paramiosinici isolati mediante omogeneizzazione dei muscoli e ripetuti lavaggi in KCl 0.04M, pH 7 (la loro purezza è stata controllata al microscopio elettronico).

Come risulta dalla fig. 5, è maggiore a pH 9 che a pH 7, ed appare chiaramente Ca^{++} dipendente, ed in minor misura Mg^{++} dipendente. Durante il corso della determinazione i miofilamenti conservano inalterata la loro struttura, come risulta da controlli al microscopio elettronico. L'attività non

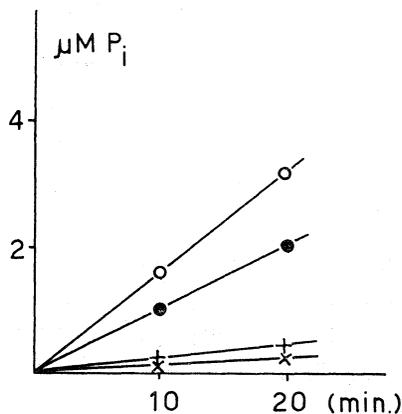


Fig. 5. - Attività ATPasica di miofilamenti isolati di mitilo: pH 9, Ca^{++} o—o; pH 9, Mg^{++} ●—●; pH 7, Ca^{++} +—+; pH 7, Mg^{++} ×—×.

varia se i miofilamenti sono sciolti in KCl 0.6M; riferita alla concentrazione totale è di circa 200 unità Q_p . Il diagramma di sedimentazione delle proteine estratte dai miofilamenti isolati presenta due frazioni: un componente 3 S (93-94 %) omogeneo, ed un componente ~ 6 S (6-7 %) eterogeneo.

La tropomiosina A cristallizzata una sola volta presenta una debole attività ATPasica, e nei diagrammi di ultracentrifugazione appaiono sempre due frazioni, 3 S e 5-6 S (fig. 8). In tutte le esperienze effettuate l'atti-

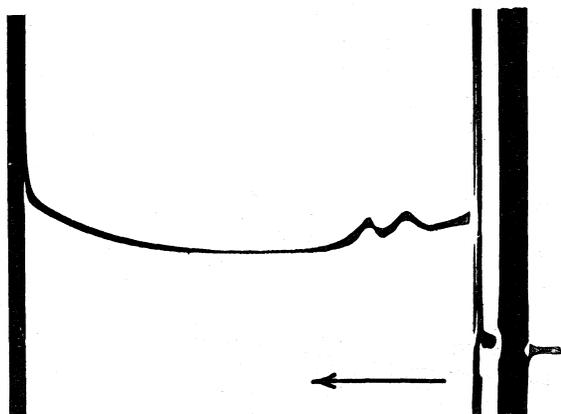


Fig. 6. - Diagramma di sedimentazione di tropomiosina A (componente lento) e di miosina (componente veloce) in parti pressapoco uguali (Muscoli di mitilo).

vità ATPasica è quasi perfettamente proporzionale alla concentrazione del componente 6 S. L'isolamento di tale componente, che sembra quindi doversi identificare con la miosina, è difficile, poiché le proprietà chimico-fisiche della miosina e della tropomiosina A sono simili, soprattutto per quanto riguarda i limiti di solubilità. Impiegando il metodo di Szent Györgyi (1947), specifico per la miosina, si è ottenuto un aumento del componente 6 S, fino ad una concentrazione pari al 50 % (fig. 6) circa; gli altri componenti presenti

sono una proteina 3 S (tropomiosina A) e talvolta una 23 S (actomiosina) in piccolissima concentrazione e facilmente eliminabile. L'attività ATPasica in tali preparazioni è Ca^{++} dipendente, ed in minor misura Mg^{++} dipendente; è più alta a pH 9 che a pH 7. L'attività specifica è di circa 2000 unità Q_P se

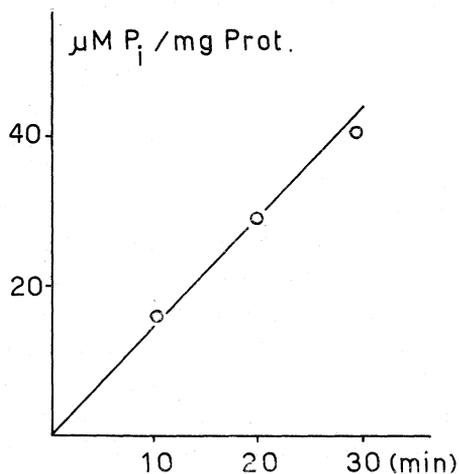


Fig. 7. - Attività ATPasica della miosina di mitilo (preparazione della figura 6; la scala sulle ordinate si riferisce alla concentrazione proteica totale).

riferita alla concentrazione proteica totale (fig. 7); poiché tutte le esperienze effettuate indicano che il solo componente 6 S è capace di idrolizzare ATP, la sua attività specifica deve essere di circa 4000 unità Q_P . Un valore molto simile di attività specifica per la miosina ATPasi di mitilo si ricava da tutte le esperienze che sono state condotte, qualunque sia la concentrazione della miosina (componente 6 S) rispetto alla tropomiosina A. Piccole differenze

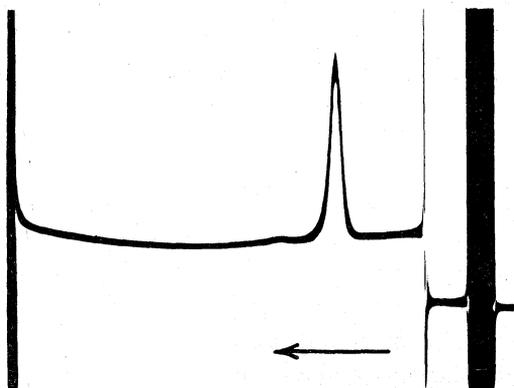


Fig. 8. - Diagramma di ultracentrifugazione di tropomiosina A di mitilo cristallizzata una volta. È visibile un piccolo componente veloce, ~6 S (4% della concentrazione proteica totale).

possono essere in parte spiegate tenendo conto dell'effetto Ongston Johnston nella determinazione della concentrazione parziale dei singoli componenti in soluzioni polidisperse.

Tropomiosina A di Holothuria. - Estrahendo la tropomiosina A dai muscoli longitudinali radiali di *Holothuria* con il metodo di Jonson e coll. (1959), si ottiene una miscela di due componenti, il più lento dei quali ha un coefficiente di sedimentazione di circa 3 S. Poiché l'estrazione condotta con tale

metodo ha un rendimento molto scarso, è stato impiegato anche per l'*Holothuria* il metodo indicato per il *Mytilus*. Anche in questo caso si ottengono più componenti (due o tre) in percentuali variabili nelle varie estrazioni. I risultati più facilmente interpretabili e quasi perfettamente riproducibili sono stati ottenuti a pH 9, e sembrano dimostrare che i diversi componenti sono polimeri della medesima proteina. Si osserva infatti nel tempo una graduale diminuzione del componente a maggiore velocità di sedimentazione, ed un aumento dei componenti più lenti. Non è mai stato possibile ottenere puro il componente più lento (circa 3 S), neppure in esperimenti protratti per vari giorni. I risultati di un tipico esperimento sono riportati nella Tav. I, fig. 2. Il componente 12 S va gradatamente scomparendo per incrementare la frazione 5 S (che appare chiaramente eterogenea) e la 3 S (apparentemente monodispersa). Il componente 17 S che compare nel diagramma di sedimentazione al sesto giorno, è probabilmente un prodotto di denaturazione. Anche nella tropomiosina A di mitilo conservata a lungo a 4°C si nota la comparsa di un componente ad alto coefficiente di sedimentazione. Le proteine estratte dai muscoli di oloturia sono in grado di formare cristalli che al microscopio elettronico presentano il tipico periodo di circa 144 Å (Tav. I, fig. 1 d). Risultati analoghi sono stati ottenuti da Baccetti e Rosati (1966; 1968). Queste proteine sono estremamente asimmetriche, ed i dati di viscosità danno valori di η_{sp}/c (ove c è espresso in g/ml) prossimi a 200. Si tratta di valori abbastanza variabili, in rapporto alla presenza di polimeri diversi.

I dati riportati inducono a ritenere che nei muscoli delle oloturie sia presente la tropomiosina A, tuttavia con caratteristiche chimico-fisiche in parte differenti da quelle dell'analogha proteina del mitilo.

La tropomiosina A di oloturia non presenta mai attività ATPasica, e non appare mai associata ad una frazione 6 S. Tale attività enzimatica è invece presente nell'estratto totale di muscolo (in KCl 1 M); essa è chiaramente Ca⁺⁺ dipendente, ed in minor misura Mg⁺⁺ dipendente.

DISCUSSIONE.

I dati di sedimentazione e di viscosità, e le capacità di formare cristalli con il tipico periodo di 144 Å, dimostrano che la proteina estratta dai muscoli del mitilo con il metodo seguito in questa ricerca corrisponde alla tropomiosina A estratta con i metodi consueti. La proteina può essere estratta in condizioni di elevata purezza, come dimostrano i diagrammi di sedimentazione, la cromatografia su colonna e la mancanza di attività ATPasica. Anche una piccola contaminazione di miosina può infatti essere rivelata, a causa della sua elevata attività specifica (4000 unità Q_P). La mancanza di attività ATPasica nella tropomiosina A estratta secondo Bailey (1957) o Johnson e coll. (1959) può essere imputata ad una denaturazione conseguente al trattamento con alcool etilico; nelle condizioni sperimentali seguite nella presente ricerca risulta invece chiaramente dimostrato che la tropomiosina A è effettivamente priva di attività ATPasica. Questa è legata ad una frazione 6 S, che può

essere parzialmente purificata impiegando un metodo di estrazione specifico per la miosina; sembra pertanto logico identificare tale proteina con la miosina. Essa è sicuramente localizzata nei miofilamenti paramiosinici, in quanto i miofilamenti isolati e controllati al microscopio elettronico per la loro purezza hanno attività ATPasica. Nei diagrammi di sedimentazione degli estratti totali di miofilamenti vi è un componente ~ 6 S eterogeneo; sulla base della determinazione dell'attività ATPasica si può dedurre che la miosina rappresenta circa il 5% delle proteine presenti nei miofilamenti paramiosinici di mitilo (attribuendo alla miosina una attività specifica di 4000 unità Q_P). I siti attivi della miosina (meromiosina pesante) sono probabilmente sulla superficie dei miofilamenti: questi ultimi sono infatti in grado di idrolizzare ATP in condizioni sperimentali che ne garantiscono la perfetta conservazione.

La miosina estratta dal mitilo e parzialmente purificata mostra una forte attività ATPasica, pari a circa 4000 unità Q_P (riferita al solo componente 6 S). Ciò corrisponde ad un numero di turnover di circa 1400 μ Moli ATP/ μ Mole miosina/minuto (attribuendo alla miosina il peso molecolare di 500.000). Secondo Båràny (1967) il numero di turnover della miosina di mitilo è di appena 6; l'attività specifica della miosina, secondo tale autore, costituirebbe del resto un carattere differenziale nei diversi animali e nei diversi muscoli, e sarebbe direttamente proporzionale alla velocità di contrazione di ogni singolo muscolo. Tuttavia i valori di attività specifica calcolabili dai dati di Båràny (1967) e di Båràny e coll. (1965) presentano una notevole variabilità per uno stesso muscolo, e sono sempre inferiori ai valori riportati dagli altri autori. Nei due lavori di Båràny ricordati, il muscolo *soleus* di gatto presenta valori di Q_P di 600 e di 200 rispettivamente, e l'*extensor digitorum lunus*, sempre di gatto, di 1650 e di 900. L'adduttore striato del *Pecten* secondo Båràny ha un'attività di 250 unità Q_P , contro le 2700 trovate da Ruegg (1957), che osserva del resto un medesimo valore per l'adduttore liscio dello stesso animale, che si contrae molto lentamente. Infine, mentre Båràny trova per la miosina dell'utero di coniglio un Q_P di 38, Needham (1958) ha ottenuto un valore di 1180. Sembra quindi difficile condividere l'ipotesi di Båràny per cui lungo la scala zoologica, od in uno stesso animale, vi sarebbero tante miosine a numero di turnover decrescente parallelamente al decrescere della velocità di contrazione. Sembra invece più probabile, per spiegare le differenti velocità di contrazione nei diversi muscoli, riferirsi ad altre cause, quali un diverso sviluppo del reticolo sarcoplasmatico e del sistema T (Smith, 1966), una diversa lunghezza dei sarcomeri per i muscoli striati ed elicoidali, o dei miofilamenti in genere per quelli lisci (Pringle, 1967; Lanzavecchia, 1967 a), o una diversa innervazione (Prosser, 1960). In accordo con quest'ultima ipotesi sono le esperienze di innervazione crociata in muscoli veloci e lenti su di uno stesso animale (vedi ad esempio Prewitt e Salafsky, 1967).

I muscoli longitudinali radiali dell'oloturia sono stati recentemente studiati al microscopio elettronico (Kawaguti e Ikemoto, 1965; Lanzavecchia, 1967 b; Baccetti e Rosati, 1966; 1968), ed hanno mostrato una struttura molto simile a quella dei muscoli paramiosinici dei Molluschi.

È stato possibile estrarre dai muscoli dell'oloturia delle proteine con comportamento simile a quello della tropomiosina A del mitilo; i dati di ultracentrifugazione suggeriscono che si tratti di una sola proteina in vari stati di aggregazione. Si tratta di proteine fortemente asimmetriche, capaci di formare *in vitro* dei cristalli con periodo di circa 144 Å. Sembra quindi che nelle oloturie sia presente una tropomiosina A con caratteristiche lievemente diverse da quelle dei Molluschi.

L'esistenza di tropomiosina A in animali così lontani tra loro nella scala zoologica (Anellidi, Molluschi e Sipunculidi sono infatti Protostomi, mentre gli Echinodermi sono Deuterostomi) potrebbe indurre a formulare considerazioni di carattere funzionale in rapporto alla meccanica della contrazione muscolare. Considerazioni del genere esulano tuttavia dagli scopi di questo lavoro, e richiederebbero in ogni caso una più approfondita conoscenza della distribuzione e delle caratteristiche di questa proteina lungo la scala zoologica. Il problema appare ancora complicato dal fatto che nella corda dorsale dell'anfiosso sono stati trovati dei filamenti paramiosinici (Flood, 1968).

LAVORI CITATI.

- BACCETTI B. e ROSATI F., «Atti Accad. Fisiocritici», 15, 183-204 (1966).
 BACCETTI B. and ROSATI F., «J. Microscopie», 7, 455-458 (1968).
 BAYLEY K., «Pubbl. Staz. Zool. Napoli», 29, 96-108 (1967).
 BAILEY K. and RUEGG J. C., «Biochim. Biophys. Acta», 38, 239-245 (1960).
 BÀRANY M., «J. Gen. Physiol», 50 part 2, 197-216 (1967).
 BÀRANY M., BÀRANY K., RECKARD T. and VOLPE A., «Arch. Biochem. Biophys.», 109, 185-191 (1965).
 FLOOD R., «Electron Microscopy. IV Eur. Reg. Conf. on Electr. Micr.», Roma, 1968, Vol. 2, pp. 291-292.
 GERGELY J., «Ann. Rev. of Biochem.», 35, 691-722 (1966).
 HANSON J., LOWEY J., HUXLEY H. E., BAILEY K., KAY C. M. and RUEGG J. C., «Nature», 180, 1134-1135 (1957).
 JOHNSON W. H., KAHN J. S. and SZENT GYÖRGYI A. G., «Science», 130, 160-161 (1959).
 KAHN R. H. and SCHMITT F. O., «Arch. Biochem. Biophys», 86, 138-143 (1960).
 KAWAGUTI S. and IKEMOTO N., in: Ebashi S., Oosawa F., Sekine T. and Tonomura Y., Eds., *Molecular Biology of Muscular Contraction*. Igaku Shoin Ltd., Tokyo, 1965, pp. 124-131.
 KAY C. M., «Biochim. Biophys. Acta», 27, 469-477 (1958).
 LANZAVECCHIA G., «Accad. Naz. Lincei (Rend. Sci. fis. mat. nat.)», 41, 374-379 (1966).
 LANZAVECCHIA G., «Istituto Lombardo (Rend. Sc.)», B 101, 233-328 (1967 a).
 LANZAVECCHIA G., «Accad. Naz. Lincei (Rend. Sci. fis. mat. nat.)», 42, 894-901 (1967 b).
 LOCKER R. H. and SCHMITT F. O., «J. Biophys. Biochem. Cytol.», 3, 889-895 (1957).
 LOWEY S., KUCERA J. and HOLTZER A., «J. Mol. Biol.», 7, 234-244 (1963).
 NEEDHAM D. M. and CAWKWELL J. M., «Biochem. J.», 68, 31 P (1958).
 PREWITT M. A. and SALAFSKY B., «Am. J. Physiol.», 213, 295-300 (1967).
 PRINGLE J. W. S., «J. Gen. Physiol.», 50, part 2, 216-217 (1967).
 PROSSER G. L., in: Bourne G. H. Ed., *The Structure and Function of Muscle*. Academic Press, New York and London, 1960, Vol. 2, pp. 387-434.
 RIDDIFORD L. and SHERAGA H., «Biochemistry», 1, 95 C (1962).
 RUEGG J. C., «Helv. Physiol. Pharmacol. Acta», 15, C 33 (1957).
 SMITH D. S., «Progr. in Biophys.», 16, 109-142 (1966).
 SZENT GYÖRGYI A. G., *Chemistry of Muscular Contraction*, Academic Press, New York, 1947, pp. 146-148.

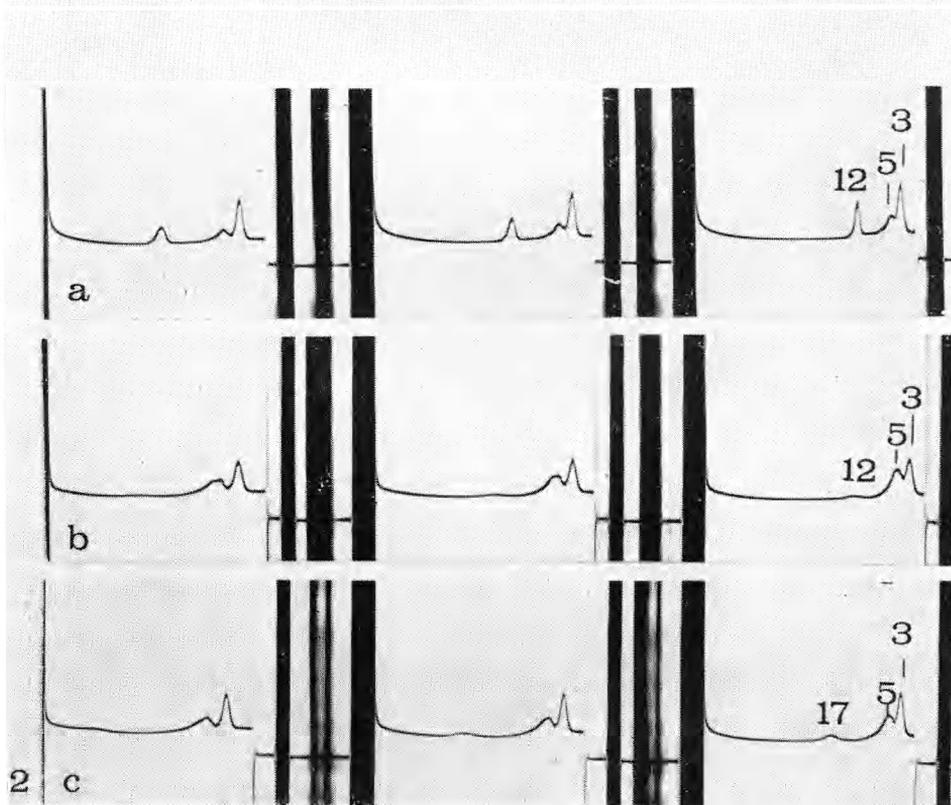
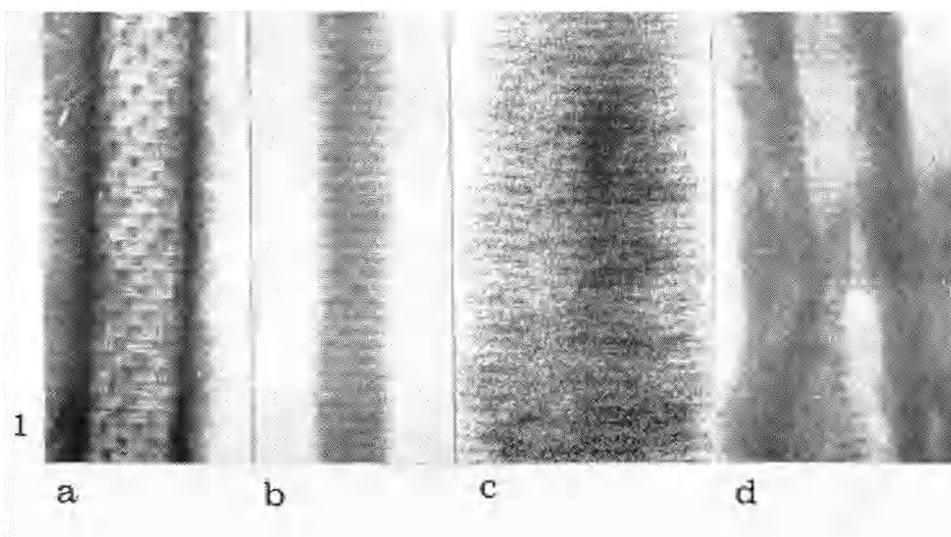


Fig. 1. - Aspetto delle strutture paramiosiniche al microscopio elettronico ($\times 125.000$):
a) miofilamento di mitilo in colorazione negativa con acetato di uranile; *b*) miofilamento
di mitilo in colorazione positiva con Na fosfotungstato; *c*) cristallo di paramiosina di mitilo,
in colorazione positiva con Na fosfotungstato; *d*) cristallo di paramiosina di oloturia, in colo-
razione positiva con Na fosfotungstato.

Fig. 2 - Diagrammi di ultracentrifugazione di «tropomiosina» A di oloturia: *a*) al termine
del processo di preparazione; *b*) dopo tre giorni a 4°C ; *c*) dopo sei giorni a 4°C . (I numeri nei
primi diagrammi di ogni serie indicano i coefficienti di sedimentazione di ciascuna frazione).