

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

SANDRA CITI, ROSS JAKES, JOHN KENDRICK-JONES

**Purificazione e caratterizzazione della cingolina, una nuova proteina della giunzione serrata (zonula occludens) di cellule epiteliali intestinali**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 83 (1989), n.1, p. 241–247.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1989\\_8\\_83\\_1\\_241\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1989_8_83_1_241_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.** — *Purificazione e caratterizzazione della cingolina, una nuova proteina della giunzione serrata (zonula occludens) di cellule epiteliali intestinali.* Nota di SANDRA CITI (\*\*), ROSS JAKES (\*\*), e JOHN KENDRICK-JONES (\*\*), presentata (\*\*\*) dal Corrisp. D. CAVALLINI.

ABSTRACT. — *Purification and characterization of cingulin.* Cingulin, a new peripheral component of the *zonula occludens* in chicken epithelial cells, was purified from intestinal brush border cells by a procedure involving ammonium sulphate fractionation and anion exchange chromatography of cell extracts. Purified cingulin is heat stable and migrates in SDS-containing polyacrylamide gels as a polypeptide of apparent  $M_r$  of 180 kD, as detected by immunoblotting with monoclonal anti-cingulin antibodies. In the electron microscope, cingulin molecules shadowed with platinum appear to have an elongated, rod-like shape, with a mean length of  $\sim 130$  nm. The amino acid composition of cingulin shows a high content in charged amino acids and a low content in aromatic amino acids.

KEY WORDS: Cingulin; Zonal occludens; Brush border; Cytoskeleton.

RIASSUNTO. — La cingolina, un nuovo componente periferico della *zonula occludens* in cellule epiteliali di pollo, è stata purificata da cellule intestinali con orletto a spazzola mediante un procedimento che comprende frazionamento con solfato d'ammonio e cromatografia a scambio anionico di estratti cellulari. La cingolina purificata è stabile al calore, e migra in gels di poliacrilammide contenenti SDS come un polipeptide di p.m. apparente 108 kD, come dimostrato con la tecnica dell'immunoblot con anticorpi monoclonali anticingolina. Al microscopio elettronico, le molecole di cingolina hanno un aspetto allungato, a forma di bastoncino, con una lunghezza media di  $\sim 130$  nm. La composizione aminoacidica della cingolina mostra un elevato contenuto in aminoacidi carichi ed un basso contenuto in aminoacidi aromatici.

#### INTRODUZIONE.

La giunzione serrata (*zonula occludens*) è il componente più apicale del complesso giunzionale di epitelii polarizzati, ed ha funzione di impedire il passaggio di grosse molecole attraverso gli spazi intercellulari [1, 2]. Le giunzioni serrate sono state implicate nella separazione tra i compartimenti epiteliali luminali e basolaterali, e nella formazione e mantenimento della polarità della cellula [2]. Al microscopio elettronico, in sezioni sottili, le giunzioni serrate appaiono come regioni focali di apparente fusione tra le membrane di cellule vicine [1]. Con la tecnica del criodecappaggio, la membrana giunzionale mostra una rete elaborata di fibrille anastomatizzate e ramificate, la cui natura molecolare non è ancora stata stabilita [3]. Nonostante la ricchezza di dati ultrastrutturali, si conosce molto poco della composizione molecolare delle giunzioni serrate [4].

La cingolina è una nuova proteina specifica delle giunzioni serrate, identificata in cellule epiteliali intestinali con l'orletto a spazzola [5]. L'orletto a spazzola consiste in una serie di processi ditoformi (microvilli), contenenti fasci di filamenti di actina,

(\*) Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica «Mario Aiazzi Mancini», Università di Firenze, Italia.

(\*\*) MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Inghilterra.

(\*\*\*) Nella seduta del 26 novembre 1988.

inseriti su una regione sottostante, la trama terminale, che contiene numerose altre proteine citoscheletriche [6]. Nella trama terminale, le membrane laterali mostrano un caratteristico complesso giunzionale tripartito, contenente la *zonula occludens* (nella zona apicale), la *zonula adhaerens* (nella zona intermedia), e il desmosoma (nella zona basale) [6]. L'analisi in immunofluorescenza di cellule con orletto a spazzola con anticorpi monoclonali anti-cingolina mostra una intensa colorazione a forma di anello nella zona apicale della trama terminale [5]. Con l'immunomicroscopia elettronica di sezioni congelate ultrasottili di villi intestinali è stato dimostrato che la cingolina è localizzata a livello della *zonula occludens*, in posizione intracellulare [5]. In questo lavoro è descritta la purificazione della cingolina, esperimenti biochimici, immunochimici e di microscopia elettronica condotti allo scopo di definire le caratteristiche molecolari di questa proteina.

#### MATERIALI E METODI.

*Purificazione della cingolina.* Le cellule intestinali di pollo sono state preparate come descritto in precedenza [7]. Il precipitato cellulare dopo centrifugazione (~100 g) è stato omogenato in tre volumi di 0.6 M NaCl, 0.3 M saccarosio, 5 mM EGTA, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM fosfato di sodio, 0.1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, a 4°C. Il residuo non estratto è stato separato con centrifugazione a 50,000 × g per 90 min, e il supernatante dell'estratto è stato portato al 40% di saturazione in solfato d'ammonio. Il risultante precipitato è stato centrifugato, ridisciolti e dializzato contro 0.3 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 20 mM tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM DTT. Il materiale dializzato è stato chiarificato per centrifugazione a 18 000 × g per 15 min, ed il supernatante è stato riscaldato e agitato a ~100°C per 5 min, poi raffreddato e centrifugato a 28 000 × g per 15 min. Il supernatante è stato dializzato in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EGTA, 0.1 mM DTT, e caricato su una colonna (10 × 3 cm) di DEAE Sephacryl (Pharmacia), equilibrata nella stessa soluzione. La colonna è stata lavata ed eluita con un gradiente di NaCl (da 20 a 600 mM) nella soluzione di equilibratura. Le frazioni venivano monitorate misurando la loro assorbanza a  $\lambda = 280$  nm, e testate per la presenza di cingolina usando un test ELISA con gli anticorpi monoclonali. Le frazioni positive per la cingolina venivano concentrate per ultrafiltrazione (Amicon membrana PM 30) e dializzate in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM DTT. Il materiale dializzato (2.5 ml) veniva caricato su una colonna di HPLC Pharmacia Mono-Q (cromatografia a scambio anionico) ed eluito con un gradiente di NaCl da 0 a 600 mM. La cingolina veniva eluita come un picco simmetrico a ~500 mM NaCl, come determinato dal monitoraggio dell'assorbimento a  $\lambda = 230$  nm, e da test ELISA e western blot delle frazioni. La densitometria dei gel dimostrava che la cingolina era >95% pura.

*Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE) e western blotting.* L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) veniva condotta secondo il metodo di Matsudaira & Burgess [8], usando minigels con gradienti di poliacrilammide di 5-20%, ed un carico di 2-10  $\mu$ l per corsia. I gels venivano trasferiti elettroforeticamente su nitrocellulosa, e le strisce di nitrocellulosa colorate con una miscela 1:1:1 degli anticorpi monoclonali Ci6, Ci12 e Ci14 (fluido ascite) 1:100 in

PBS contenente 2% BSA, seguita da secondo anticorpo (anticorpo di coniglio marcato con HRP contro la frazione Ig di siero di topo, Dako Patts) [9].

*Microscopia elettronica.* Per l'ombreggiatura rotatoria con platino, 150  $\mu$ l di cingolina pura (0.6 mg/ml, in 500 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EGTA, 0.1 mM DTT) venivano diluiti con un egual volume di glicerolo, mescolati ed immediatamente spruzzati su mica appena clivata. La mica veniva ombreggiata con platino sotto vuoto ad un angolo di  $\sim 5^\circ$  e ad una pressione di  $\sim 1 \cdot 10^{-5}$  atm, e ricoperta con un film di carbone [10]. Le grigliette con le repliche venivano esaminate in un microscopio Philips EM 400 ad una tensione di 80 kV.

*Analisi di aminoacidi.* I campioni proteici (100-200 pmoli) sono stati analizzati in un analizzatore di aminoacidi Durrum 500, dopo idrolisi acida in 6 N HCl, 0.1% fenolo, sotto vuoto a 105  $^\circ$ C. Campioni in duplicato sono stati presi dopo 24, 48 e 72 hr.

## RISULTATI.

Per determinare la specificità degli anticorpi monoclonali anti-cingoline e il peso molecolare dell'antigene da essi riconosciuto, omogenati totali di cellule epiteliali intestinali di pollo sono stati analizzati con la tecnica di elettroforesi su gel di poliacrilammide contenente SDS (SDS-PAGE) e western blotting. La Fig. 1 mostra che gli anticorpi anti-cingolina cross-reagiscono con due polipeptidi principali, di massa molecolare apparente  $M_r$ ,  $\sim 140$  (cingolina-140) e  $\sim 108$  kD (cingolina-108) (Fig. 1, *a* e *b*). Una colorazione simile veniva ottenuta su blot di orletti a spazzola isolati (Fig. 2, *c*). La presenza di queste due forme di cingolina, a diverso peso molecolare, può essere dovuta a degradazione proteolitica della forma a  $M_r$ , 140 kD. L'estrazione della cingolina dalle cellule intestinali veniva fatta in condizioni di forza ionica pressoché fisiologiche. Quando gli estratti cellulari frazionati con solfato d'ammonio venivano trattati con calore (100  $^\circ$ C per 5 min), la maggior parte delle proteine precipitavano, mentre  $\geq 95\%$  della banda immunoreattiva della cingolina-108 rimaneva solubile, ed era la prevalente specie ad alto peso molecolare presente (Fig. 1, *a* e *b*). La cingolina-108 è stata purificata ( $> 95\%$  omogeneità) usando cromatografia a scambio ionico HPLC, usando condizioni di eluizione di elevata forza ionica, il che suggerisce che la cingolina abbia una carica negativa.

La tabella 1 mostra i risultati della analisi della composizione aminoacidica della cingolina. In base a questa analisi, non ci sono somiglianze significative tra la cingolina e diverse proteine associate a microfilamenti, quali il caldesmon [11] ( $M_r$ ,  $\sim 135$  kD), la coda della miosina [12] ( $M_r$ ,  $\sim 120$  kD), la vincolina [13] ( $M_r$ , 130 kD), l'alfa-actinina [14] ( $M_r$ , 95 kD), e la spectrina [15] (subunità di  $M_r$ , 240 kD). Nonostante che l'elevato rapporto tra i residui carichi ed i residui apolari suggeriscano che la cingolina sia una proteina con un elevato contenuto in struttura ad alfa elica, la presenza di residui di prolina (28 nmol/mol) esclude la possibilità che la cingolina sia una proteina completamente ad alfa elica. Inoltre, analisi immunochimiche (western blot e immunofluorescenza) indicano che la cingolina è distinguibile antigenicamente dalla miosina e i suoi frammenti, dalle spectrine (vedi anche Fig. 1 *c*), dalla alfa-actinina di

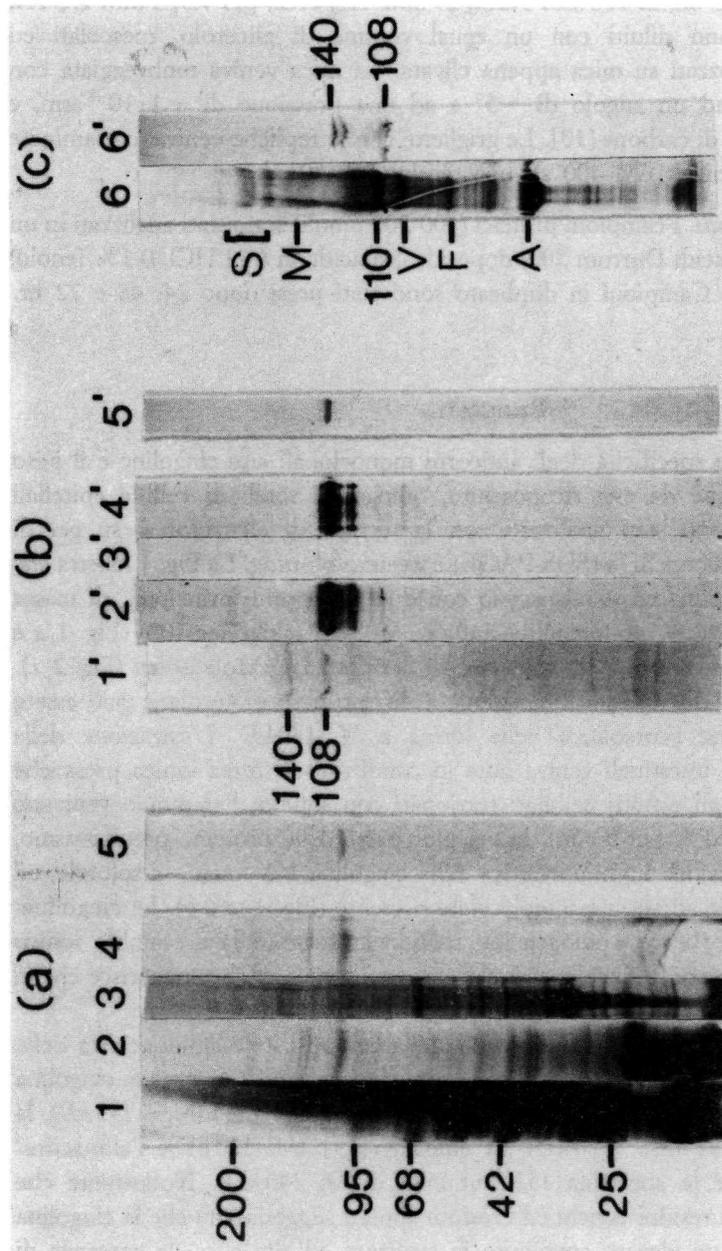


Fig. 1. - Elettroforesi su gel di poliaccrilamide (SDS-PAGE) (a) e analisi con immunoblot con anticorpi monoclonali anti-cingolina (b) di frazioni durante la preparazione della cingolina. Corsia 1 = estratto crudo di cellula con orletto a spazzola (notare che la debole colorazione delle due bande immunoreattive è probabilmente dovuta alle quantità molto piccole di cingolina presenti nella cellula). Corsia 2 = supernatante dopo aver riscaldato l'estratto a 100°C per 5 min, e centrifugato a 28000 x g per 15 min; notare l'arricchimento notevole nella banda immunoreattiva di M, 108 kD. Corsia 3 = materiale sedimentato dopo trattamento a 100°C. Corsia 4 = frazioni contenenti la cingolina eluite dalla colonna di cromatografia a scambio ionico, e concentrate per ultrafiltrazione. Corsia 5 = cingolina purificata, eluita dalla colonna HPLC Mono-Q. (c). SDS-PAGE (Corsia 6) e corrispondente western blot con anticorpi monoclonali anti-cingolina (Corsia 6') di orletti a spazzola isolati. Markers: S = molecole spettro-simili dell'orletto a spazzola (M, 220-260 kD), M = catena pesante della miosina (M, 200 kD), 110 = proteina del microvillo di M, 110 kD, V = villina (M, 95 kD), F = fimbrina (M, 68 kD), A = actina (M, 42 kD)

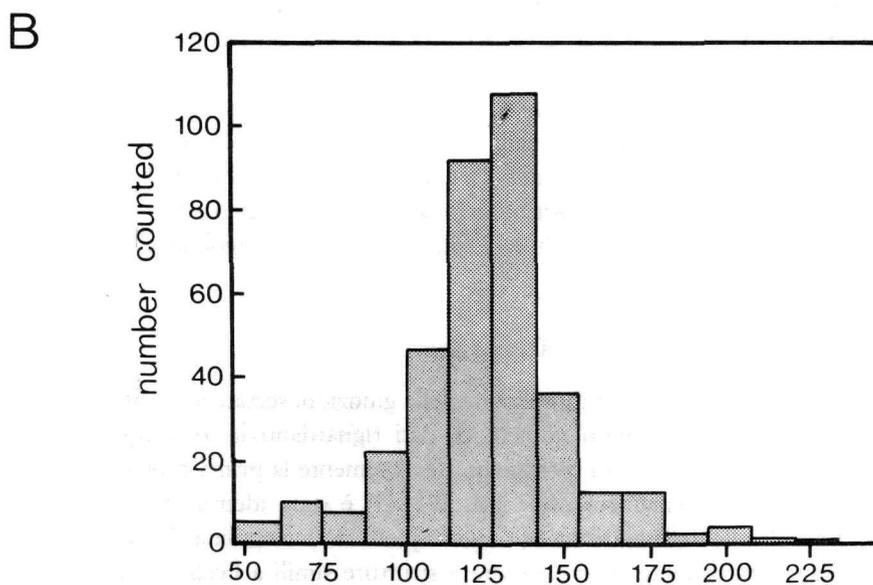
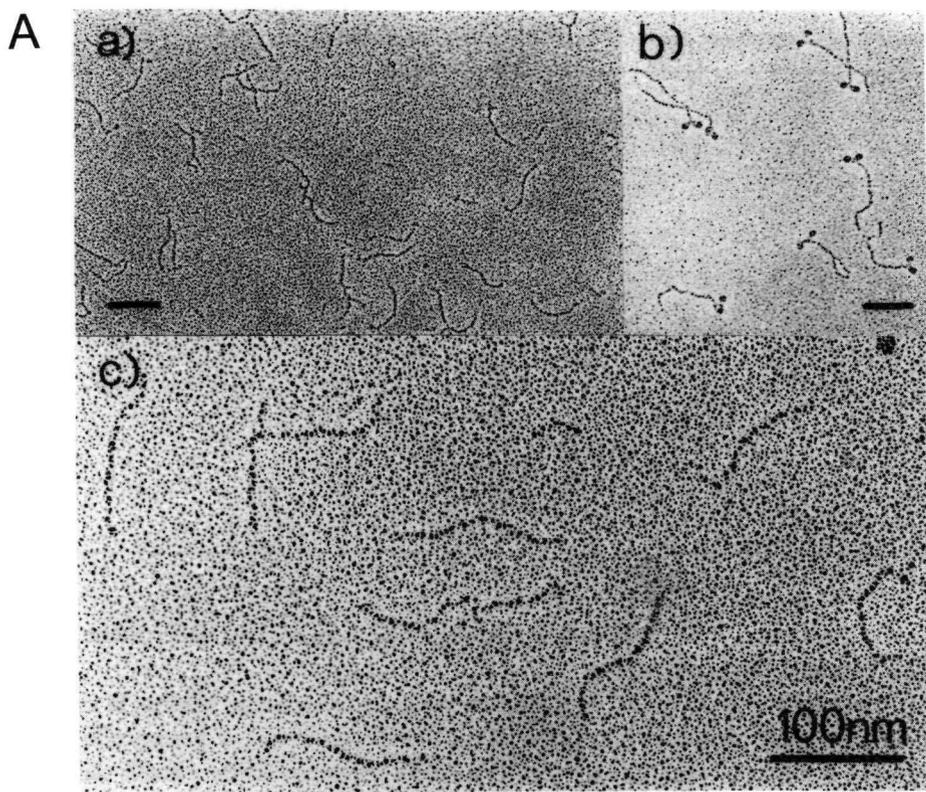


Fig. 2. - Forma molecolare della cingolina purificata. (A): (a) micrografia elettronica che mostra un campo di molecole di cingolina purificata, dopo ombreggiatura rotatoria con platino. (b) Molecole di miosina dell'orletto a spazzola dopo ombreggiatura rotatoria di platino, allo stesso ingrandimento della micrografia (a), per confronto. (c) micrografia elettronica ad alto ingrandimento di molecole di cingolina. Linea = 100 nm. (B): Istogramma della lunghezza di molecole di cingolina (in nm) misurate su micrografie elettroniche all'ingrandimento mostrato in (a).

TABELLA 1. - *Composizione aminoacidica della cingolina (nmoli/mole).*

---

|     |     |
|-----|-----|
| ASP | 74  |
| THR | 40  |
| SER | 65  |
| GLU | 300 |
| PRO | 28  |
| GLY | 45  |
| ALA | 106 |
| VAL | 37  |
| MET | 19  |
| ILE | 22  |
| LEU | 120 |
| TYR | 9   |
| PHE | 10  |
| LYS | 82  |
| HIS | 17  |
| ARG | 135 |

---

muscolo scheletrico, e dal caldesmon, dalla vincolina e dalla cinasi delle catene leggere della miosina del muscolo liscio.

Al microscopio elettronico, dopo ombreggiatura rotatoria con platino, la cingolina appare come una molecola allungata, asimmetrica, con forma a bastoncino, e una lunghezza di  $130 \pm 32$  nm ( $N = 381$ ), ed una larghezza molto simile a quella della coda della miosina, cioè 2-3 nm (Fig. 2). La lunghezza della cingolina è in buon accordo con quella (122 nm) prevista per una molecola a doppia alfa elica con peso unitario di catena pari a 108 kD [16]. Spesso i bastoncini della cingolina apparivano curvi, o piegati a vari angoli (tra  $25^\circ$  e  $150^\circ$ ), ed a varie posizioni lungo la molecola, il che indicava un certo grado di flessibilità nella molecola. La forma allungata della cingolina e la sua termostabilità la rendono simile ad altre proteine citoscheletriche (coda della miosina, tropomiosina, spectrine/fodrine, e il caldesmon), ma fino ad ora non si sono evidenziate altre analogie strutturali e/o funzionali tra la cingolina e queste altre proteine.

#### DISCUSSIONE.

Lo studio dei rapporti struttura/funzione nelle giunzioni serrate a livello molecolare sono stati ostacolati dal limitato numero di dati riguardanti la loro organizzazione architetturale e l'identità dei vari costituenti. Recentemente la prima proteina specifica della *zonula occludens*, chiamata ZO-1 ( $M$ , 225 kD) è stata identificata [4], e la sua localizzazione a livello della giunzione è simile a quella della cingolina [5], perciò queste due proteine probabilmente sono associate a strutture simili a livello della giunzione serrata. Tuttavia troppo poco è noto sulle proprietà biochimiche della proteina ZO-1 per poterla ulteriormente paragonare alla cingolina.

L'osservazione che la cingolina può essere estratta dagli orletti a spazzola in condizioni di forza ionica pressoché fisiologiche, e senza detergenti, e la immunolocalizzazione al microscopio elettronico [5] suggeriscono che la cingolina sia un

componente periferico della giunzione serrata, e non un componente integrale di membrana. Uno stimolante problema per studi futuri sarà determinare quali siano gli elementi della giunzione con cui la cingolina interagisce, e quale sia il ruolo della cingolina nel mantenere la struttura e la funzione di questa giunzione specializzata.

Ringraziamenti: S.C. ringrazia l'Istituto Roussel Italia, la Sigma-Tau (Forum Studenti) e la Fondazione Thomas C. Usber per il loro supporto.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] FARQUHAR M. G. - PALADE G, 1963. *Junctional complexes in various epithelial*. Journal of Cell Biology, 17: 375-412.
- [2] SIMONS K. - FULLER S. D, 1985. *Cell surface polarity in epithelia*. Annual Review of Cell Biology, 1: 243-288.
- [3] PINTO DA SILVA P. - KACHAR B, 1982. *On tight junction structure*. Cell, 28: 441-450.
- [4] STEVENSON B. R. - SICILIANO J. D. - MOOSEKER M. S. - GOODENOUGH D. A, 1986. *Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia*. Journal of Cell Biology, 103: 755-766.
- [5] CITI S. - SABANAY H. - JAKES R. - GEIGER B. - KENDRICK-JONES J, 1988. *Cingulin, a new peripheral component of tight junctions*. Nature 333: 272-276.
- [6] MOOSEKER M. S, 1985. *Organization, chemistry and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border*. Annual Review of Cell Biology, 1: 209-241.
- [7] CITI S. - KENDRICK-JONES J, 1986. *Regulation in vitro of brush border myosin by light chain phosphorylation*. Journal of Molecular Biology, 188: 369-382.
- [8] MATSUDAIRA P. T. - BURGESS D. R, 1978. *SDS microslab linear gradient polyacrylamide gel electrophoresis*. Analytical Biochemistry, 87: 386-396.
- [9] BURNETTE W. N, 1981. *Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein A*. Analytical Biochemistry, 112: 195-203.
- [10] BURKE B. E. - SHOTTON D. M, 1982. *Dissection of the human erythrocyte spectrin molecule using monoclonal antibodies*. European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal, 1: 505-508.
- [11] NGAI P. K. - WALSH M. P, 1985. *Properties of caldesmon isolated from chicken gizzard*. Biochemical Journal, 230: 695-707.
- [12] LOWEY S. - SLAYTER H. S. - WEEDS A. - BAKER H, 1969. *Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin produced by enzymatic digestion*. Journal of Molecular Biology, 42: 1-29.
- [13] JOCKUSH B. M. - ISENBERG G, 1981. *Vinculin and  $\alpha$ -actinin: interaction with actin and effect on microfilament network formation*. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 46: 613-623.
- [14] EBASHI S. - EBASHI F, 1965. *Alpha actinin, a new structural protein from striated muscle. I. Preparation and action on actomyosin-ATP interaction*. Journal of Biochemistry (Tokyo), 58: 7-12.
- [15] GLENNEY J. R. - GLENNEY P. - WEBER K, 1982. *F-actin-binding and cross-linking properties of porcine brain fodrin, a spectrin-related molecule*. Journal of Biological Chemistry, 257: 9781-9787.
- [16] STEWART M. - EDWARDS P, 1984. *Length of myosin rod and its proteolytic fragments determined by electron microscopy*. FEBS Letters, 168: 75-78.