

5) I SISTEMI TRASDUTTORI A LIVELLO MUSCOLARE

5.1) Energia primaria ed energia di equilibrio

Le cellule viventi catalizzano una grande varietà di trasformazioni di energia, come è stato riportato nella Tabella 1.1. E' utile fare una distinzione fra: (a) trasformazioni di energia in cui l'energia entrante nel sistema è conservata o utilizzata per compiere un lavoro (trasformazioni di energia primaria); (b) trasformazioni energetiche in cui l'energia entrante regola semplicemente la liberazione di energia potenziale già accumulata per mezzo di un meccanismo indipendente (trasformazioni di energia di equilibrio). I mitocondri e l'actomiosina sono esempi di trasduttori di energia primaria; mentre le membrane dei nervi sensoriali sono esempi di trasduttori di energia di equilibrio. I sistemi primari si attuano per mezzo dell'ATP e sono anche in grado di produrre ATP, mentre i sistemi in equilibrio sono attivati per merito di un altro sistema che opera delle trasformazioni primarie ed accumula l'energia. Quindi: (a) nei sistemi primari, l'energia liberata serve per compiere un lavoro attuale o potenziale; (b) nei sistemi in equilibrio, l'energia liberata serve per modulare l'utilizzazione di energia accumulata in precedenza ad opera di altri sistemi.

Tutte le trasformazioni di energia che si attuano per mezzo dei sistemi di membrana, o del sistema contrattile funzionalmente equivalente ai sistemi di membrana, sono riconducibili ad un insieme di principi generali. Il primo concetto fondamentale è il cambiamento conformazionale molecolare come base della trasformazione di energia; infatti, nella trasformazione di energia che entra in un sistema in una forma diversa da quella uscente, il meccanismo che lega le due forme è costituito da un riadattamento conformazionale del sistema stesso. Così, nella conversione, da parte del muscolo, dell'energia di legame dell'ATP in lavoro meccanico di accorciamento, il sistema è sottoposto a profondi cambiamenti conformazionali indotti dall'idrolisi dell'ATP, e questi cambiamenti si realizzano nella contrazione, cioè nell'accorciamento della distanza tra due punti del sistema.

Nei sistemi di trasformazioni di energia primaria, il lavoro è compiuto dal sistema in stato di attivazione energetica. In altri termini, è l'energia conformazionale che dà le varie capacità di lavoro ad un dato sistema trasduttore. Nei mitocondri, le particelle elementari che si trovano in uno stato di attivazione energetica possono sintetizzare ATP, trasportare elet-

troni contrò corrente, trasferire ioni idrogeno dal NADH al NADP⁺ e condensare cationi bivalenti o monovalenti. Sembra che, di regola, il sistema trasduttore si debba prima trovare in uno stato di attivazione energetica conformazionale, che è quello in grado di operare la trasformazione di energia intrinseca in produzione di lavoro. I sistemi biologici trasduttori di energia possono dipendere da una singola molecola, da un insieme di molecole, o da un complesso di parecchie proteine diverse, come, ad esempio, il complesso dell'actomiosina. Se si analizza l'intima natura delle modificazioni che avvengono durante i processi di trasduzione, la trasformazione di energia nei sistemi biologici può essere considerata come un processo essenzialmente molecolare. Una semplice molecola, od un insieme di molecole, od un complesso multiproteico rappresentano l'unità reale molecolare della trasduzione; il microprocesso fondamentale di ciascuna unità trasduttrice si realizza nella macrotrasduzione del sistema semplicemente per la ripetizione della microtrasduzione di un grande numero di microunità trasduttrici poste in serie ed in parallelo.

5.2) Strutturazione del muscolo striato

Il muscolo striato è costituito da un insieme di fibre muscolari, elementi cellulari cilindrici molto allungati che possono raggiungere anche parecchi centimetri. La fibra muscolare striata è perciò di grandi dimensioni se confrontata con le cellule degli altri tessuti; essa presenta una caratteristica striatura trasversa dovuta al fatto che si alternano lungo il suo decorso zone mono e bi-rifrangenti. Nella fibra striata si distinguono: (1) il sarcolemma: membrana molto sottile che riveste tutta la fibra e che presenta numerosi pori disposti in corrispondenza di particolari zone dell'apparato miofibrillare contenuto nella fibra; (2) il sarcoplasma: parte citoplasmatica della fibra muscolare, molto scarso e spesso limitato ad un sottile strato disposto sotto il sarcolemma, dove sono disposti numerosi nuclei; (3) le miofibrille: apparato contrattile vero e proprio, costituito da formazioni filiformi molto numerose che percorrono la fibra da un estremo all'altro. Le miofibrille conferiscono alla fibra muscolare la striatura trasversa; infatti, lungo ogni fibrilla, si alternano le già ricordate zone mono- e bi-rifrangenti e, nella fibra, le corrispondenti zone di tutte le miofibrille sono perfettamente allineate in senso trasversale (Fig. 5.1). La striatura della miofibrilla deriva dal ciclico replicarsi, per la sua intera lunghezza, di una unità strutturale cui è stato dato il nome di sarcomero.

I sarcomeri sono delimitati da strie Z che cadono a metà della zona monorifrangente; la parte centrale del sarcomero è occupata dalla zona birifrangente, al centro della quale vi è una zona otticamente meno densa. Il sarcomero è costituito da una serie ordinata di filamenti proteici disposti in senso longitudinale (vedi Fig. 5.1) ed è delimitato dalle strie Z che hanno i caratteri di veri e propri diaframmi che attraversano la miofibrilla. Esistono due tipi di filamenti, rispettivamente « sottili » di actina e « spessi » di miosina, la cui disposizione è tale per cui nella zona monorifrangente vi sono filamenti sottili, mentre nella zona birifrangente vi sono sia filamenti sottili che filamenti spessi, ad eccezione della parte centrale in cui vi sono solo filamenti spessi. E' da ricordare inoltre che dove sono presenti sia i filamenti sottili che quelli spessi (zona birifrangente), essi sono disposti secondo una simmetria esagonale nel senso che ogni filamento di miosina è regolarmente circondato da sei filamenti di actina. Tra i filamenti spessi e quelli sottili si può dimostrare l'esistenza di « ponti » ove tra le proteine costitutive dei due tipi di filamenti si stabiliscono legami chimici. Alla costituzione dei filamenti sottili, oltre all'actina, concorrono anche la troponina e la tropomiosina, con funzioni ben definite e caratteristiche.

Accanto alle miofibrille sono presenti numerosi mitocondri e la mioglobina, che, ossigenata, costituisce nella fibra muscolare un deposito di O₂ disponibile per i processi ossidativi della fibra stessa. Le due proteine contrattili di base, actina e miosina, presentano interessanti caratteristiche anche quando vengano studiate « in vitro ». Si è osservato ad esempio, che una miscela di quantità adeguate di actina e di miosina dà

origine alla formazione di un complesso, detto actomiosina, che possiede la proprietà di modificare profondamente il proprio grado di dispersione nella soluzione quando a questa venga aggiunto ATP. Il fenomeno prende il nome di « superprecipitazione dell'actomiosina », in quanto la proteina si separa sotto forma di un compatto coagulo e comporta la scissione dell'ATP in ADP e P_i. La superprecipitazione dell'actomiosina è stata interpretata come un equivalente in vitro della contrazione delle miofibrille nella fibra vivente. Sebbene non esista una corrispondenza esatta tra i due fenomeni, è certo che la reazione fra ATP e proteine costitutive delle miofibrille è il momento iniziale della contrazione muscolare.

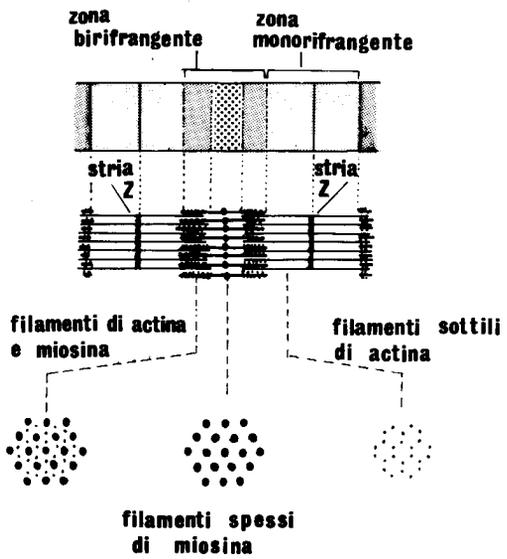
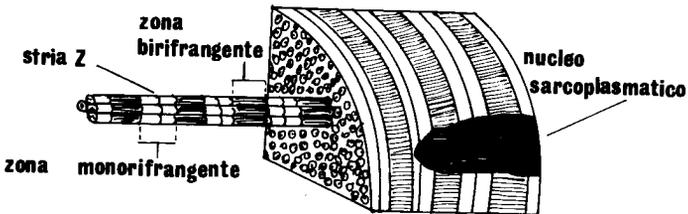


FIGURA 5.1

Va ricordato che, durante il ciclo di contrazione muscolare, vi è una produzione di calore, attuata in una maniera molto caratteristica. Prima di tutto, anche a riposo i muscoli liberano calore a velocità bassa ma costante, espressione della funzionalità dei processi basali muscolari: « calore di base o di riposo o resting heat ». Durante la fase di sviluppo della tensione e della contrazione, si ha la liberazione di una notevole quantità di calore, detto « calore iniziale od initial heat », a sua volta suddivisibile in due frazioni: una quota che viene liberata durante lo stato di tensione, prima dell'accorciamento, e la quota rimanente che si libera durante il processo di accorciamento vero e proprio. Al termine della singola contrazione, allorché il muscolo si rilassa, subentra

infine una lunga fase di sviluppo di calore, chiamato « calore di ripristino o recovery heat », espressione dei processi di ricarica a mezzo della respirazione mitocondriale. L'indice di efficienza muscolare (IEM) è definito dalla semplice espressione:

$$IEM = \frac{\text{lavoro meccanico effettuato}}{\text{calore liberato} + \text{lavoro effettuato}} \times 100;$$

in condizioni ottimali questo indice è circa 20.

5.3) Applicabilità della trasduzione energetica al sistema contrattile

Il sistema contrattile, dovunque esso sia, è la sola eccezione conosciuta alla norma che i sistemi di trasduzione sono parte essenziale delle membrane. Se si esamina attentamente il sistema contrattile si può capire perché la contrazione muscolare impone una differente modalità di strutture molecolari dei sistemi di trasduzione. Perché avvenga una contrazione simmetrica del muscolo intero, è necessario che un gruppo di fibre scorra sopra un altro gruppo interdigitato, poiché il movimento relativo avviene lungo l'asse del fascio. Ogni fibra è costituita da un insieme lineare polimerico di subunità di miosina e di actina: le fibre sono disposte in un fascio con un ben definito disegno trasversale, in quanto ogni fibra di miosina è circondata da sei fibre di actina, ed ogni fibra di actina è vicina a tre fibre di miosina. La polimerizzazione lineare (ossia una disposizione lineare a catena delle varie molecole) è essenziale per permettere ad ogni fibra di miosina di interagire e muoversi monodirezionalmente rispetto a tutte le fibre che la circondano (vedi Fig. 5.1). Una polimerizzazione bidimensionale darebbe luogo ad uno scorrimento laminare asimmetrico rispetto all'asse di movimento, e quindi sarebbe poco economica nell'operare la contrazione. Un complesso di fosfolipidi interposto fra le varie catene, costituite dalle molecole di actina e miosina, è uno degli elementi atti ad impedire l'attuazione di legami in due dimensioni: così ha luogo una disposizione lineare di subunità proteiche. L'azione « isolante » dei fosfolipidi sulle catene lineari di subunità proteiche è analoga a quella di una parziale guaina flessibile che, pur lasciando scorrere all'interno il filo metallico che contiene, impedisce che lo stesso venga trascinato lateralmente da altri fili, dato che anche questi sono protetti da guaine. In realtà i fosfolipidi sono uno dei parecchi fattori che possono limitare l'interazione bidimensionale fra le catene di subunità proteiche. Il loro effetto di separazione lineare fra le catene di subunità proteiche è fortemente potenziato da altri gruppi saturi che fanno parte della proteina stessa e che sono localizzati nei « siti » delle subunità polimerizzate. Nel caso del sistema contrattile, esso è infatti saturo di gruppi che, sulle subunità proteiche, determinano le modalità di polimerizzazione, e probabilmente sono proprio questi i gruppi implicati anche nel processo di trasduzione stesso.

Le cellule viventi sono dotate di una grande varietà di sistemi (muscolo scheletrico, muscolo cardiaco, flagelli, ciglia, tricociti, ecc.) per compiere movimenti di rotazione o di traslazione di una parte di un organismo multicellulare rispetto alle altre parti, o di un settore di una cellula rispetto agli altri settori. La caratteristica del sistema contrattile

è la rapidità e la forza del movimento, in qualunque modo esso avvenga. Il mezzo molecolare comune a tutti i sistemi contrattili è il sistema dell'actomiosina, che è un sistema di due catene di molecole polimeriche interdigitate. Nel caso del muscolo, la via più facile per studiare il processo di trasduzione (contrazione) è quella di vederla nel suo svolgersi, cosa che esige un esame molto complesso delle ultrastrutture; in termini di ultrastruttura, la contrazione delle miofibrille può essere definita come scorrimento di un insieme di filamenti su un altro (Fig. 5.2), senza, almeno in un

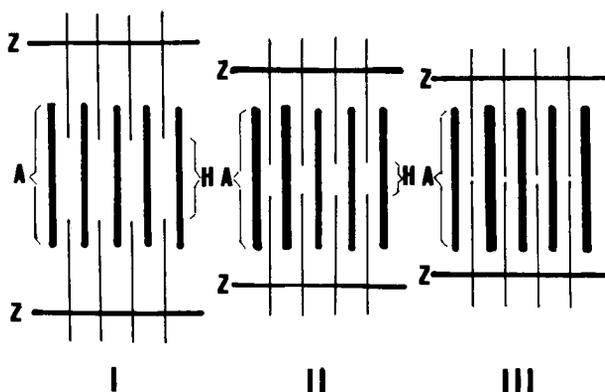


FIGURA 5.2

primo momento, alcun accorciamento o ispessimento dei filamenti stessi. I filamenti spessi sono degli aggregati di miosina (che rappresenta circa il 40% del contenuto proteico totale del muscolo scheletrico dei vertebrati), mentre i filamenti sottili sono costituiti per lo più da fibre di actina (che rappresenta circa il 15% del contenuto proteico muscolare totale). Si conosce perfettamente il meccanismo con cui le molecole di miosina si possono unire in fibre o suddividere in subunità di « meromiosina ». Si sa anche che la miosina ha una caratteristica attività « ATP-asi », ossia può scindere l'ATP in ADP + P_i con liberazione di energia. L'actina può essere depolimerizzata reversibilmente in unità di forma globulare (actina G) e ripolimerizzata in fibre di actina (actina F): l'insieme di actina e miosina forma il complesso denominato « actomiosina ». Anche quando il complesso si forma in vitro, l'actomiosina può essere isolata sotto forma di un filo con proprietà meccaniche e chimiche molto simili a quelle dell'actomiosina in vivo. Tuttavia le caratteristiche chimiche devono essere interpretate sulla base delle caratteristiche ultrastrutturali: infatti, il processo chimico, che sta alla base della contrazione, deve essere descritto in modo tale che spieghi i movimenti vettoriali del filamento di actina lungo i filamenti di miosina senza il simultaneo accorciamento di nessuna delle due. C'è tuttavia da porre la riserva che lo studio approfondito ultrastrutturale dell'attività ATP-asi della miosina, o della trasformazione della F-actina in G-actina, o della proprietà dei filamenti

di actomiosina di poter essere sfilati, ecc., dia luogo ad artefatti sperimentali che celino proprietà più pertinenti e più importanti. Scartando tale possibilità, come premessa, a quanto verrà esposto ed illustrato, deve essere tenuta presente la seguente nomenclatura: (a) la F-actina è una doppia elica aperta di subunità globulari di G-actina, con circa quindici unità per giro di spirale; (b) ogni fibra di miosina è un polimero di circa duecento molecole di miosina, formate da subunità nelle quali la porzione più importante (vedi Capitolo 5.4.1) è costituita da H-meromiosina; (c) alla costituzione dei filamenti sottili, oltre all'actina, partecipano anche la troponina e la tropomiosina: la funzione di tali proteine verrà espressa nel capitolo 5.4.2).

Per semplicità, si descrive ora un modello elementare che delucida le modalità della contrazione muscolare, durante la quale le fibre sottili si avvicinano una all'altra nello spazio virtuale esistente tra le note fibre spesse, per incontrarsi o per sovrapporsi, al loro centro (vedi Fig. 5.2). La fibra polimerica di miosina è « polarizzata » attorno a questo centro e la polimerizzazione avviene in modo tale che le fibre di miosina (costituite da H-meromiosina) si distendano sulle fibre di actina, cosicché le subunità di ogni fibra di actina sono di fronte ad una identica fila di H-subunità delle fibre di miosina. Da ogni H-subunità si distende una catena polipeptidica carica negativamente diretta lontano dall'asse della fibra; l'ATP è legato alla estremità di questa catena polipeptidica che, in virtù della sua carica negativa di repulsione, si mantiene distesa e si prolunga come una frusta (Fig. 5.3, 1). La contrazione inizia con la liberazione di Ca^{++} dal reticolo sarcoplasmatico, liberazione che si attua, a seguito dell'impulso nervoso, in concomitanza dell'insorgenza dell'onda di depolarizzazione trasmessa dal sarcolemma; ogni Ca^{++} liberato (Fig. 5.3, 2) forma un forte chelato, ossia collega a ponte un ADP, che si trova su una subunità di G-actina, con un ATP situato all'estremo della catena polipeptidica che si prolunga a frusta. Questa chelazione costituisce un punto di « ancoraggio elettrostatico » e neutralizza l'eccessiva carica negativa della catena polipeptidica: ciò permette alla catena polipeptidica stessa di passare dalla forma distesa « a frusta » alla forma di « α -elica » od « a spirale », le cui spire sono stabilizzate da legami ad idrogeno e da interazioni idrofobiche. La considerazione più importante è che, passando dalla conformazione « a frusta » alla conformazione « a spirale » la catena polipeptidica si accorcia come una molla distesa che venga liberata ad un capo, e trascina la fibra di actina lungo la fibra di miosina utilizzando come punto di trascinamento l'ancoraggio elettrostatico di cui sopra (Fig. 5.3, 3). La somma di questi trascinamenti determina la contrazione muscolare. E' ovvio che, per rimettere il sistema in condizioni di rifunzionare, bisogna ridistendere la molla « a spirale »; ossia la catena polipeptidica deve ritornare nella sua conformazione « a frusta ». Ciò si attua utilizzando l'energia che si libera dall'idrolisi della molecola di ATP che fa da ponte, ottenendosi così la rottura del ponte ionico stesso e quindi il disancoraggio della spirale; un lato della catena avvolta a spirale mantiene ora attaccata una molecola di ADP (Fig. 5.3, 4). La fosforilazione di questa molecola, per mezzo del trasferimento catalizzato di un radicale fosforico energetico dalla fosfocreatina, porta alla formazione di ATP ed introduce di nuovo un eccesso di carica negativa in quel lato della catena: le spire si respingono allora

reciprocamente e la catena si svolge ed è così ricaricata per un altro ciclo di attività, assumendo la conformazione iniziale scarsamente elicizzata. Va tuttavia notato che il meccanismo contrattile può attuarsi anche in assenza di creatin-fosfato: in questo caso la ricarica dell'ADP è operata direttamente dal meccanismo mitocondriale, senza la mediazione del sistema del creatin-fosfato.

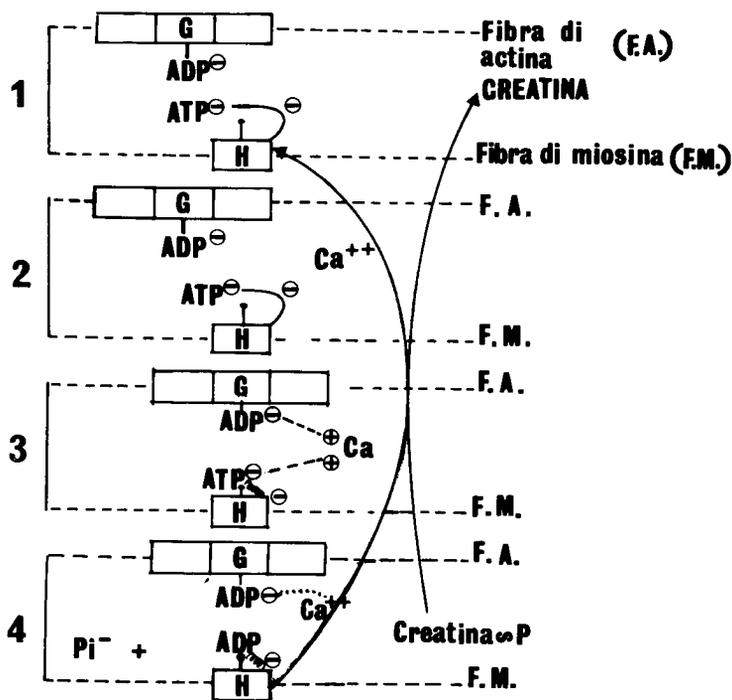


FIGURA 5.3

Le miofibrille continuano a contrarsi in questo modo finché il ciclo si ferma per l'intervento dei « fattori rilassanti ». Probabilmente tali fattori sono deputati alla rimozione dei Ca^{++} ; infatti, il fattore chiave per la contrazione è il reticolo sarcoplasmatico che accumula attivamente Ca^{++} a mezzo di un processo di traslocazione che implica una attivazione energetica. La spesa energetica di tale attivazione è sostenuta dall'ATP per cui si manifesta come una attività ATP-atica Ca^{++} -dipendente. Non c'è alcun dubbio che: (1) l'ATP attiva il processo della contrazione muscolare con il trasferimento del Ca^{++} ; (2) il Ca^{++} modula la scarica dello stato energetico (attuantesi con la conformazione a spirale della catena originariamente distesa); (3) tale scarica porta ad un movimento delle fibre di actina rispetto alle fibre di miosina; (4) ogni ciclo richiede un processo di ricarica operato dall'ATP.

Di particolare interesse per la teoria delle trasduzioni di energia nei sistemi di membrana è il fatto che l'ATP provoca una serie di cambiamenti conformazionali, per mezzo dei quali un gruppo di fibre può scorrere rispetto ad un altro. Il sistema contrattile opera in un solo senso; ossia l'ATP può produrre la contrazione, ma la distensione del muscolo non porta alla sintesi di ATP: questo non deve sorprendere, poiché il sistema contrattile non è concepito per funzionare come un sistema in equilibrio reversibile. L'ATP-asi legata a preparati di actomiosina non è in grado di idrolizzare l'ATP in assenza di ioni di metalli bivalenti quali Mg^{++} o Ca^{++} ; quando si isola dal preparato una particolare frazione proteica, tale esigenza è soddisfatta da Mg^{++} , ma non da Ca^{++} ; quando invece tale proteina si ricombina con il sistema actomiosinico, allora il Ca^{++} può di nuovo intervenire nel controllo dell'idrolisi dell'ATP. Il Ca^{++} non è attivo su tutte le attività ATP-asiche della membrana mitocondriale interna, ma solo su alcune di esse, ed in particolare su quelle della base; in tali condizioni l'attività ATP-asica attivata dal calcio porta al trasferimento di Ca^{++} e P_i .

Il sistema dell'actomiosina è parte integrante della struttura della cellula muscolare; la disposizione regolare delle fibre di actomiosina si adatta ad una regolare disposizione dei mitocondri e dei tubuli del reticolo sarcoplasmatico; infatti i mitocondri generano l'ATP nelle immediate vicinanze di un gruppo di fibre di actomiosina, ed il reticolo sarcoplasmatico controlla la liberazione e la captazione di Ca^{++} per lo stesso gruppo di fibre. Così numerose serie di organelli tutti uguali e di dominio della cellula muscolare partecipano all'adempimento della contrazione e del rilassamento.

5.4) Le proteine della contrazione

Impostato il discorso relativamente alle supposte modalità elementari con cui si attua la contrazione muscolare, è necessario considerare con maggior profondità il problema delle proteine implicate nella costituzione della miofibrilla e del ruolo da esse sostenuto.

5.4.1) I filamenti spessi

La forma della molecola della miosina fu identificata dapprima in un bastoncino sottile, lungo circa 1500 Å, e con peso molecolare 500.000; poi in un fiammifero di legno, in cui: (a) nella estremità bulbare venivano localizzate sia le proprietà ATP-asiche che la capacità di legarsi con l'actina; e (b) la porzione bastoncellare era caratterizzata da una struttura ad α -elica. Più recentemente si è dimostrato che le estremità bulbari di miosina sono libere di muoversi, giacché l'angolo che esse formano con l'asse della fibra varia nelle diverse fasi della contrazione e nel rilasciamento muscolare. L'unità funzionale della miosina è costituita da due molecole disposte a forma di Y, cioè l'unità è un dimero (come indicato nella Fig. 5.4) con due serie di cardini necessari perché l'impulso per lo scivolamento dei due filamenti del sarcomero uno sull'altro rimanga co-

stante durante tutta la contrazione. In tal modo le porzioni globulari di miosina possono avere un movimento oscillatorio ciclico (con contatto con i filamenti di actina), similmente ai remi nell'acqua; questo impulso rimorchia i filamenti di actina verso il centro del sarcomero.

In generale si attribuiscono quindi alla molecola della miosina la presenza sia di una coda sottile che di una testa (o porzione globulare) alla quale è correlata la specifica attività biologica; la testa rappresenta un inspessimento dovuto ad un ripiegamento delle catene polipeptidiche longitudinali che costituiscono la miosina, oppure alla sovrapposizione, sulla parte terminale di dette catene longitudinali, di altre catene polipeptidiche più brevi.

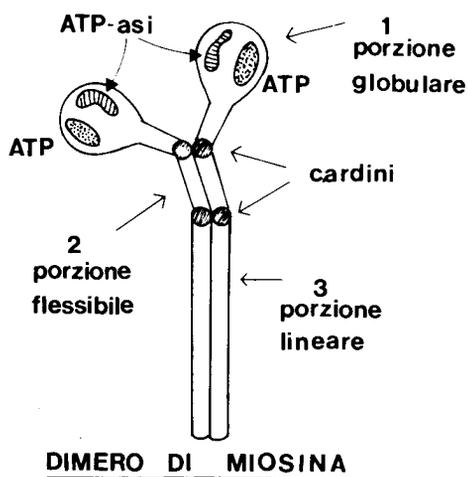


FIGURA 5.4

La miosina è, nel complesso, costituita da catene polipeptidiche, ossia da catene di varie molecole proteiche unite fra loro da legami peptidici. Per studiare la struttura della miosina si può quindi applicare il metodo generale della frammentazione delle catene costitutive in subunità più semplici. Ciò è ottenibile in vari modi, tra cui: a) uso di enzimi che scindono i legami peptidici (enzimi proteolitici o triptici); b) uso di sostanze (urea, guanidina, sodio dodecilsolfato, ecc.) che rigonfiano e dissociano la molecola per mezzo di forze repulsive di carica, oppure mediante la rottura di legami non peptidici, quali sono quelli in cui l'idrogeno fa da ponte di connessione.

Con questi ultimi metodi è stato possibile separare un complesso di subunità a basso peso molecolare, costituenti la LMP (Low Molecular weight Protein), senza alcuna perdita nella attività biologica legata alla liberazione di energia (attività ATPasica). La LMP della miosina può essere scissa nei suoi componenti minori, i quali possono essere poi riassociati alla porzione molecolare principale della miosina stessa.

Con il metodo della digestione triptica (ossia mediante l'uso di quel tipico enzima proteolitico che è la tripsina) si ottiene la miosina in forma solubile, scindendola nei due frammenti LMM (Ligh MeroMyosin: meromiosina leggera) ed HMM (Heavy MeroMyosin: meromiosina pesante); l'attività biologica ATPasica permane collegata al frammento HMM. La formazione di meromiosina è la risultante della rottura dei legami polipeptidici particolarmente labili localizzati al centro della coda della miosina; la HMM è costituita quindi dalla testa e da una parte della coda della miosina. La H-meromiosina ha un peso molecolare elevato (350.000) e possiede due caratteristiche di base della miosina: 1) la attività biologica ATPasica e 2) la capacità a legarsi con l'actina; essa può ancora essere scissa (per ulteriore trattamento con tripsina o con chemotripsina) in altri due frammenti, detti subunità S_1 e S_2 . La subunità 2 ha la struttura ad α -elica che è tipica della coda della miosina, per cui si può considerarla come la porzione della coda della miosina rimasta nella HMM dopo la prima digestione con tripsina. La subunità 1 è invece considerabile quale la testa della miosina, di cui possiede appunto sia la attività ATPasica che la capacità di combinarsi con l'actina.

La L-meromiosina ha un peso molecolare minore (150.000) ed è priva dell'attività biologica legata alla liberazione di energia; mediante trattamento alcolico separa una frazione LMM 1 che mostra la tipica struttura ad α -elica della coda. Trattata con urea, la LMM si depolimerizza liberando protomiosina, ossia una miscela di vari polipeptidi (peso molecolare : 5.000 — 10.000), i quali erano assemblati fra di loro a costituire la α -elica dissociata dall'urea stessa.

Nel complesso, i vari frammenti in cui può essere scissa la miosina sono schematizzati nella Fig. 5.5.

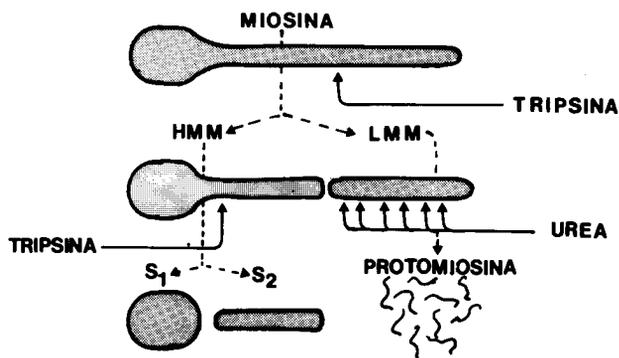
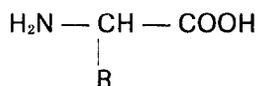


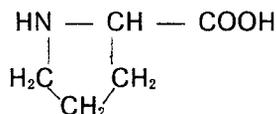
FIGURA 5.5

Indagini laboratoristiche accurate sono state effettuate anche per individuare le strutture primaria, secondaria e terziaria della miosina. La « struttura primaria » permette di conoscere quali sono le varie unità costitutive di una singola catena polimerica; nel caso di una proteina,

quale è la miosina, sono gli aminoacidi le unità strutturali che, con la loro costituzione, il loro numero e la loro sequenza, condizionano la struttura primaria. Tali aminoacidi, ad eccezione della prolina (che di fatto è un iminoacido), hanno tutti lo schema di base



dove R costituisce l'elemento differenziativo, ma in ogni caso non partecipante al legame peptidico ($-\text{CO} - \text{NH} -$); pertanto lo schema di una catena polipeptidica è rappresentato dalla ripetizione della sequenza $-\text{HN} - \text{RCH} - \text{CO} -$, interrotta solo dalla prolina, che ha formula



In genere nella miosina si è riscontrata la presenza di tirosina, fenilalanina e triptofano, in concentrazione particolarmente elevata nella H-meromiosina (subunità 1) piuttosto che nella LMM; notevole la concentrazione di cisteina nella parte globulare. Caratteristica nella miosina è la presenza di un aminoacido non comune: la 3-metilistidina.

In base sia alla costituzione ed al numero degli aminoacidi identificati, che alla struttura di alcuni frammenti di miosina derivanti dalla digestione triptica, si è indagata anche la « struttura secondaria », ossia la disposizione che assumono nello spazio gli elementi costitutivi.

Un modello pratico proposto per la miosina prevede che gli aminoacidi siano assemblati in due catene polipeptidiche a guisa di una spirale destrorsa (disposizione ad α -elica) intorno alle quali, solo nella porzione della testa, si affiancherebbero altre due catene più brevi. La conformazione elicoidale è resa stabile da almeno tre tipi di forze: (1) i legami ad idrogeno, consistenti nella messa in comune di un atomo di H tra un gruppo $-\text{CO} -$ ed un gruppo $-\text{NH} -$. In generale i legami ad idrogeno si attuano quando il gruppo donatore (per lo più acido) e quello accettore (per lo più basico) si trovano ad una distanza di circa 3 Å; ciò è ottimale nel caso dell' α -elica in cui i gruppi si trovano anti-stanti ad una distanza di 2,8 Å; (2) forze dipolari, dovute al fatto che le molecole sono composte da atomi diversi ed hanno dei centri di carica negativa e positiva non in equilibrio, per cui si stabilisce una differenza di potenziale, ossia un momento dipolare; l'interazione dipolo-dipolare si instaura fra il polo negativo di una molecola e quello positivo di un'altra, e viceversa; (3) le forze di Van der Waals, ossia di quelle forze (che si instaurano fra due strutture molecolari complementari assai vicine) dovute al fatto che anche le molecole elettricamente neutre presentano in continuazione dei momenti dipolari transitori; infatti questi momenti dipolari, pur avendo in media valore zero (di qui la neutralità globale), hanno valori istantanei diversi da zero dovuti alle istantanee differenze di potenziale fra elettroni e nuclei; in tal modo si hanno dei

dipoli transitori oscillanti che, se trovano riscontro in un'altra molecola analoga, possono dar origine a forze di interazione attrattiva.

La struttura primaria, ossia la sequenza degli aminoacidi, condiziona la struttura secondaria e quindi può determinare la presenza, nella molecola elicizzata della miosina, anche di tratti non elicizzati; ciò si verifica quando nella sequenza compare la prolina in cui, come già detto, non esiste l'usuale gruppo amidico ($-\text{CO}-\text{NH}$), ma quello inusuale imidico ($-\text{CO}-\text{N}=\text{}$), nel quale manca ovviamente l'atomo di idrogeno disponibile per costituire un ponte ad idrogeno. Ciò costituisce una situazione di disordine nella struttura elicoidale che si ferma prima della prolina e ricomincia dopo di essa. Non essendovi d'altra parte i rigidi legami ad idrogeno, ma solo i più labili legami descritti in (2) e (3), la molecola è in questi punti più libera di movimento, tanto da permettere all'asse dell'elica di cambiare direzione. La struttura secondaria ad α -elica la si riscontra in maniera assoluta solo nella parte terminale della coda (frammento LMM-1) mentre va decrescendo man mano che si avvicina alla porzione globulare (frammento S-1).

Studi particolari hanno poi permesso di conoscere alcuni dati di base sulla « struttura terziaria », ossia sulle modalità con le quali le varie catene elicoidali sono impacchettate nella molecola di miosina. I legami responsabili della struttura terziaria sono in genere gli stessi considerati nella struttura secondaria, solo che, mentre questi ultimi sono intracatena, i primi sono ovviamente intercatena. Quindi la presenza di una struttura terziaria pone ulteriori limiti alla reattività chimica della catena polipeptidica, in aggiunta a quelli già determinati dalla elicizzazione. Infatti la formazione dei ponti di connessione coinvolge un gran numero di gruppi reattivi che non sono più disponibili per una interazione con strutture extracatena. L'HMM dimostra di possedere il più alto numero di gruppi assolutamente non disponibili per scambi extracatena, ed in effetti l'HMM (ed in particolare la subunità 1) ha una struttura molto compatta, a differenza di quanto avviene per la LMM. In particolare la zona centrale della coda ha una grande disponibilità di gruppi che determina la mancanza di una struttura terziaria compatta; ciò è dovuto alla abbondanza di prolina che inibisce la formazione di legami ad idrogeno.

5.4.2) I filamenti sottili

La capacità di risposta agli ioni calcio da parte del sistema contrattile (actomiosina) dipende dalla presenza di due proteine, la troponina e la tropomiosina, che si trovano lungo l'intera lunghezza dei filamenti sottili del sarcomero (actina). La troponina è la sola proteina del sistema contrattile che è in grado di rispondere funzionalmente agli ioni calcio: essa ha forma globulare e peso molecolare di circa 50.000. Le molecole di troponina sono distribuite lungo l'intera lunghezza del filamento di actina ad intervalli di circa 400 Å, e ciò potrebbe derivare dal fatto che la tropomiosina è una proteina fibrosa di circa 400 Å di lunghezza, disposta lungo il filamento sottile del sarcomero, come rappresentato in Fig. 5.6. Il calcio agisce rimuovendo la continua inibizione alla contrazione presente nello stato di rilasciamento: l'effetto inibente della troponina, in assenza di

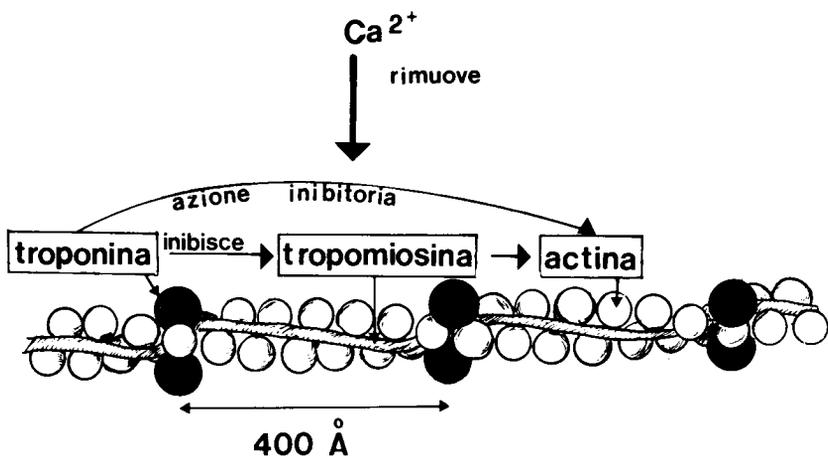


FIGURA 5.6

ioni calcio è esercitato sull'actina a mezzo della tropomiosina. Gli ioni calcio inducono una variazione della struttura molecolare della tropomiosina solo in presenza di troponina, ed una variazione conformazionale dell'actina solo in presenza di troponina e tropomiosina. Il calcio liberato dal reticolo sarcoplasmatico si combina con la troponina: la rimozione dell'inibizione che quest'ultima esercita fa sì che scatti il meccanismo della contrazione.

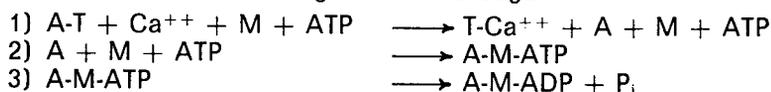
Verranno ora illustrati i dati sperimentali che danno supporto a queste vedute. Il meccanismo essenziale della contrazione muscolare è costituito dalla interazione fra actina e miosina in presenza di ATP. A riposo, l'ATP mantiene il muscolo flaccido ed estensibile; dopo stimolazione, l'ATP-asi della miosina trasforma l'ATP in ADP, con rottura di un legame ad alto contenuto energetico che fornisce energia. L'actina e la miosina possono reagire spontaneamente per formare un complesso rigido, l'actomiosina: aggiungendo ATP la rigidità scompare, l'ATP si scinde e l'actomiosina induce la contrazione. Tuttavia, un sistema costituito da pura actina e pura miosina non reagisce al calcio, pur essendo noto il ruolo fondamentale del Ca^{++} nei riguardi della contrazione: ciò indica che qualche altro fattore diverso dalla pura actina e dalla pura miosina deve intervenire. È risaputo che si hanno due tipi di actomiosina: una sintetica ricostituita, e l'altra naturale, detta anche miosina B. L'actomiosina sintetica ricostituita risulta dalla combinazione di miosina pura e di actina pura. L'actomiosina naturale o miosina B viene estratta dal muscolo e contiene altre proteine muscolari oltre la miosina. Nel passato le due preparazioni erano state considerate equivalenti; tuttavia ulteriori indagini hanno evidenziato delle nette differenze fra le due actomiosine, dovute a caratteristiche peculiari della preparazione di actina e non di quella di miosina. La preparazione di actina naturale contiene un'altra proteina che fu chiamata « tropomiosina nativa », da cui è stata poi separata un'altra proteina denominata « troponina ». L'analisi chimica ha dimostrato che la tropomiosina nativa è formata da molecole di tropomiosina accoppiate a troponina. La tropomiosina

nativa ed il complesso troponina-tropomiosina esplicano un effetto notevole sulle proprietà fisico-chimiche della F-actina, mentre la tropomiosina da sola non esercita alcuna azione sulla F-actina. Poiché la troponina non agisce direttamente sulla F-actina, essa farebbe sentire la sua influenza indirettamente attraverso la molecola di tropomiosina associata alla F-actina. Al microscopio elettronico la F-actina preparata da muscoli già privati della tropomiosina nativa è profondamente diversa dalla F-actina ottenuta nelle preparazioni usuali (cioè senza che sia stata precedentemente estratta la tropomiosina nativa). Qui i filamenti di actina sono più sottili, non presentano la abituale struttura elicoidale e si allineano comunemente in due o tre catene: se si aggiunge ad una tale preparazione della tropomiosina nativa si possono ristabilire le abituali proprietà della F-actina: i suoi filamenti appaiono ora più spessi, più rigidi e dritti. Si ritiene che il filamento sottile del muscolo, del diametro di 40 Å, dovrebbe avere le proprietà del complesso F-actina-tropomiosina nativa, piuttosto che quelle della F-actina sola. La tropomiosina nativa si lega alla F-actina e non alla miosina, e pertanto la tropomiosina nativa è associata con il filamento sottile delle miofibrille.

Sia la tropomiosina che la troponina sono distribuite lungo l'intero filamento sottile del muscolo; la troponina può anche mancare in corrispondenza della linea Z, mentre vi si trova la tropomiosina. La troponina è legata alla tropomiosina, ma non alla actina, ed è disposta in superficie per cui è facilmente accessibile dall'esterno, e ciò è assai importante perché l'azione dei Ca^{++} si estrinsechi sulla troponina. E' risaputo che il filamento sottile possiede striature ad andamento trasversale con periodo di 400-410 Å: gli spazi di 400-410 Å sono riempiti dalla tropomiosina, che è lunga circa 400 Å. La troponina, che ha forma globulare, sarebbe distribuita lungo l'asse del filamento sottile con un periodo di 400 Å. Due molecole di troponina ed una di tropomiosina sarebbero associate con 15 di actina: la F-actina consta di due filamenti disposti ad elica: ciascun passo della doppia elica dovrebbe contenere 15 molecole di G-actina, per cui vi dovrebbero essere 7,5 molecole di G-actina per ogni filamento in ciascun passo dell'elica (vedi Fig. 5.6). Per quanto riguarda la capacità di legare e di cedere il Ca^{++} delle proteine implicate nel processo della contrazione muscolare si possono scartare l'actina, la tropomiosina e la miosina; solo la troponina è la proteina muscolare che ha la reale attitudine a fissare il calcio. La troponina è la proteina « chiave » attraverso la quale l'influenza del calcio è mediata al sistema contrattile: in assenza di calcio essa esercita una inibizione o meglio una « repressione » sulla interazione fra actina e miosina, repressione che scompare dopo che ha fissato il calcio.

5.4.3) Il meccanismo a pendolo

Indicando con A = actina, M = miosina e T = troponina, la sequenza di eventi che si attuano in ogni sito è la seguente:



Il legame A-M subisce uno spostamento angolare: la deformazione angolare da esso subita trascina il filamento di actina rispetto a quello di miosina.



Il legame A-M viene rotto e si ha un ritorno alla situazione originaria. Nel complesso il meccanismo di trazione operato dal legame A-M determina uno spostamento a « pendolo » della testa di miosina che trascina l'actina (Figura 5.6): quindi l'entità dell'impegno energetico totale di un sarcomero è proporzionale al numero di legami che si formano complessivamente, poiché a ciascuno compete una quota fissa di energia liberata. La probabilità che si formino legami è decisamente maggiore quando il filamento di actina scorre rispetto a quello di miosina, piuttosto che in condizioni isometriche; infatti maggiore è la probabilità che siti reattivi delle due subunità di actina e di miosina si vengano a trovare prima o poi a coincidere: la contrazione isotonica comporta quindi un maggiore impegno energetico di quella isometrica. La forza che viene ad agire in corrispondenza di ogni legame è inversamente proporzionale alla deformazione angolare del ponte A-M, mentre la velocità di risoluzione del legame aumenta in funzione di questa; perciò la forza totale esercitata dal sarcomero: (a) sarà massima in condizione isometrica, perché tutti i legami si troveranno nella posizione più favorevole per spingere l'actina verso il centro; e (b) diminuirà con l'aumentare della velocità perché aumenterà la probabilità di trovare legami in posizione dinamicamente sfavorevole.

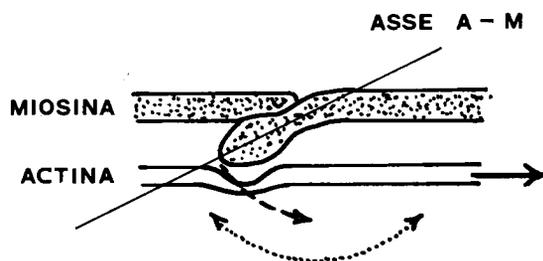


FIGURA 5.6

Osservazioni al microscopio elettronico hanno evidenziato che, nel meccanismo a pendolo, i ponti che si prolungano dalla miosina ai filamenti sottili (entro lo spazio intrafilamentoso) sono costituiti dalla porzione globulare della H-meromiosina, che è quindi il supporto morfologico dei legami A-M. Il meccanismo a pendolo può indurre la contrazione: (a) mediante un movimento a cremagliera, per cui i punti di attacco dei filamenti sottili sono spostati dal moto alterno delle teste di H-meromiosina; oppure (b) mediante un solo movimento di trascinamento operato dalla porzione globulare su un solo punto di attacco del filamento sottile.