



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN "BIOLOGIA CELLULARE E DELLE STRUTTURE SOPRAMOLECOLARI"

CICLO XXI

COORDINATORE Prof. Grazi Enrico

DEFINIZIONE ED INTERPRETAZIONE DI PARAMETRI
FONDAMENTALI DELLA CONTRAZIONE MUSCOLARE:
LA DISTRIBUZIONE DELLA LUNGHEZZA DEI FILAMENTI DI
ACTINA, L' ACCELERAZIONE DEL CARICO,
LA MANOVRA DI HUXLEY-SIMMONS.

Settore Scientifico Disciplinare BIO/10

Dottorando
Dott.ssa Pozzati Sara

Tutore
Prof. Grazi Enrico

Anni 2006/2008

INDICE

<i>Introduzione</i>	1
<i>La contrazione muscolare: generalità</i>	2
<i>L' actina</i>	5
<i>Gli studi con la protamina</i>	8
<i>La polimerizzazione dell'actina</i>	13
<i>La concentrazione macromolecolare</i>	20
<i>Acqua e contrazione muscolare</i>	26
<i>La distribuzione di lunghezza dei filamenti di actina: il modello di Biron</i>	40
<i>La pressione osmotica proteica modula la distribuzione di lunghezza dei filamenti di actina</i>	45
<i>Dialisi dell'actina F</i>	45
<i>Dialisi dell'actina F contro polietilenglicole 40,000</i>	46
<i>Pressione osmotica macromolecolare indotta dal polietilenglicole</i>	47
<i>Pressione osmotica proteica associata a soluzioni di actina F</i>	47
<i>Soluzioni di actina F equilibrate contro soluzioni di polietilenglicole 40,000</i>	47
<i>Pressione osmotica macromolecolare ed energia libera del monomero di actina</i>	49
<i>Calcolo della distribuzione di lunghezza dei filamenti allo stato stazionario</i>	50
<i>Distribuzione dei filamenti associata al loro minimo di energia libera</i>	51
<i>Effetto della dialisi contro polietilenglicole sulla distribuzione di lunghezza dei filamenti</i>	53
<i>Le nostre conclusioni</i>	55
<i>Contrazione isometrica e contrazione isotonica</i>	57
<i>La manovra di Huxley-Simmons</i>	62
<i>L'accelerazione del carico: un parametro negletto nella contrazione muscolare</i>	70
<i>Il modello</i>	70

<i>Effetto dell'accelerazione del carico sulla forza iniziale</i>	71
<i>Effetti dell'accelerazione del carico sulla rigidità iniziale della miofibrilla</i>	74
<i>Effetto dell'accelerazione del carico sulla viscosità</i>	75
<i>Appendice</i>	76
Conclusioni	79
Bibliografia	83

Introduzione

Si presenta una panoramica degli ultimi trent'anni di ricerca sulla contrazione muscolare e sulle strutture sopramolecolari in essa coinvolte. Particolare attenzione è stata rivolta all'actina, una delle più importanti proteine strutturali del citoscheletro, fondamentale per il processo contrattile.

La polimerizzazione dell'actina in filamenti (microfilamenti) e la loro successiva organizzazione sono fenomeni molto complessi, che richiedono anche l'intervento di proteine ausiliarie. In questa tesi, consideriamo l'effetto di vari parametri (temperatura, forza ionica, cationi multivalenti) sulla polimerizzazione dell'actina e l'effetto della concentrazione macromolecolare sulle associazioni delle strutture del citoscheletro.

Lo studio della contrazione muscolare ha portato a definire il sistema contrattile come una "soluzione" non ideale e a valutare correttamente l'importanza della pressione osmotica macromolecolare nell'organizzazione e nell'induzione della funzione del sistema contrattile.

Nei tre anni di dottorato ho svolto ricerche sia sperimentali che teoriche. Nella parte sperimentale, abbiamo correlato le variazioni della pressione osmotica proteica associata a soluzioni di actina F, alle variazioni di energia libera dei monomeri liberi dell'actina. Ciò è stato possibile integrando il modello di Biron e collaboratori, pubblicato nel 2006, (che correla la variazione dell'energia libera dei monomeri liberi dell'actina alla variazione della distribuzione della lunghezza dei filamenti di actina) con i risultati dei nostri studi sull'effetto della pressione osmotica macromolecolare sull'energia libera dei monomeri liberi dell'actina.

Su queste basi, si è proposto che la distribuzione della lunghezza dei filamenti di actina sia regolata

- a. dall'energia libera dell'idrolisi dell'ATP
- b. dalla pressione osmotica macromolecolare.

Nella parte teorica, abbiamo studiato l'effetto della variazione dell'accelerazione associata al carico sulla contrazione del muscolo ed indagato sull'interpretazione degli effetti della manovra di Huxley-Simmons (Huxley e Simmons, 1971), ovvero il rilascio "istantaneo" del muscolo in contrazione isometrica e il successivo recupero della tensione.

La contrazione muscolare: generalità

Tutti i muscoli scheletrici sono costituiti da numerose fibre di diametro compreso tra 10 e 80 μm . Come si può osservare in Figura 1, ciascuna di queste fibre, a sua volta, può essere ripartita in subunità via via più piccole. Nella maggior parte dei muscoli, le fibre si estendono per tutta la lunghezza del muscolo stesso e, ad esclusione del 2% di esse, sono tutte innervate da un'unica terminazione nervosa, che si trova all'incirca a metà della lunghezza della fibra.

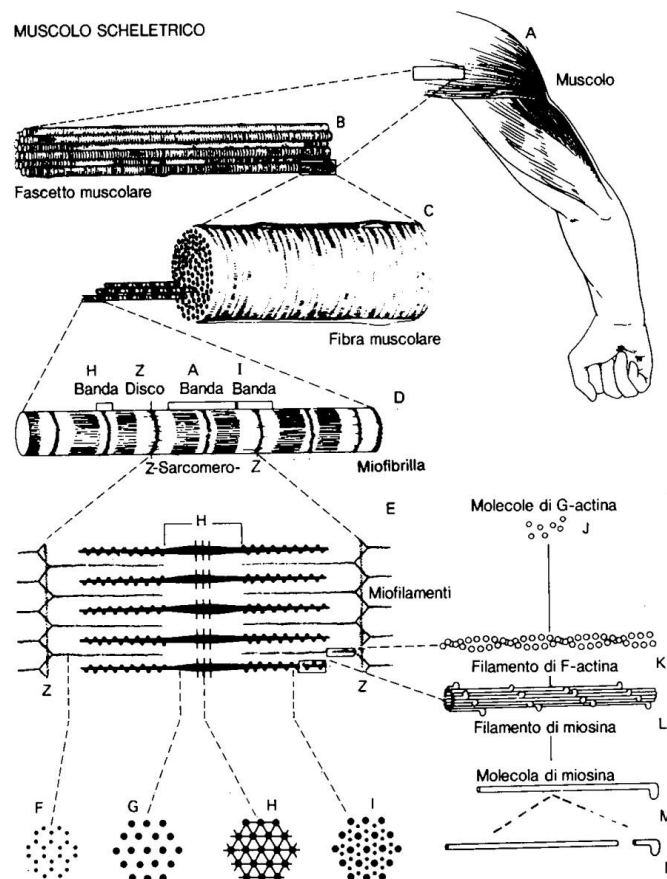


Figura 1. Rappresentazione generale dell'organizzazione del muscolo scheletrico.

Il sarcolemma è la membrana cellulare della fibra muscolare. È costituito da una membrana cellulare propriamente detta, indicata come membrana plasmatica, e da un rivestimento esterno costituito da un sottile strato di materiale polisaccaridico, contenente numerose

fibrille collagene. Alle estremità delle fibre muscolari, tale strato si fonde con una fibra tendinea; le fibre tendinee a loro volta si riuniscono in fascicoli e formano i tendini muscolari, che si inseriscono nelle ossa.

Ogni fibra muscolare contiene da parecchie centinaia a molte migliaia di miofibrille, che nella sezione trasversale, illustrata nella Figura 1 C, compaiono come tanti piccoli punti. Ogni miofibrilla (Figura 1 D) contiene, affiancati l'uno accanto all'altro, circa 1.500 filamenti di miosina e 3.000 filamenti di actina, costituiti da grosse molecole proteiche polimerizzate, che sono responsabili della contrazione muscolare. Tali filamenti sono illustrati in Figura 1, da E a L, i più spessi costituiscono la miosina e i più sottili l'actina.

Tali filamenti sono tra loro interdigitati, sicché le miofibrille presentano strie chiare alternate a strie scure. Le prime, costituite unicamente dai filamenti di actina, vengono dette bande I, in quanto isotrope (presentano le stesse proprietà in tutte le direzioni) alla luce polarizzata. Le strie scure, costituite dai filamenti di miosina e dalle estremità dei filamenti di actina, sono dette bande A, perché sono anisotrope (le cui caratteristiche sono differenti in direzione longitudinale e trasversale) alla luce polarizzata. Si noti altresì che i filamenti di miosina proiettano lateralmente piccolissimi processi, i cosiddetti ponti trasversali (Foto 1), che protrudono dalla superficie dei filamenti per tutta la loro lunghezza. La contrazione si attua per interazione di questi ponti trasversali con i filamenti di actina.



Foto 1. Ponti trasversali osservati al microscopio elettronico.

La Figura 1 E illustra ancora come i filamenti di actina si trovino attaccati con una estremità al cosiddetto disco Z, mentre con l'altra si proiettano verso il centro del sarcomero, la porzione di miofibrilla compresa tra due successivi dischi Z, interdigitandosi con i filamenti di miosina. Il disco Z, che è costituito da proteine filamentose differenti dai filamenti di actina e di miosina, decorre da una miofibrilla a quelle adiacenti, conservando così la propria continuità per tutto lo spessore di una fibra muscolare. Perciò, in tutta la fibra, si osserva una perfetta corrispondenza di alternanza di bande chiare e di bande scure, come per ogni singola miofibrilla. Sono queste bande che conferiscono al muscolo scheletrico e a quello cardiaco il loro aspetto striato.

Quando una fibra muscolare si trova nella sua normale lunghezza di riposo, ogni sarcomero è lungo circa 2 μm . In tale condizione, i filamenti di actina ricoprono completamente i filamenti di miosina e sono sul punto di sovrapporsi con le estremità dei filamenti di actina provenienti dall'opposto disco Z. Si vedrà più avanti che è a questa lunghezza che il sarcomero è capace di esprimere la massima forza di contrazione.

Nella fibra muscolare, le miofibrille si trovano immerse in una matrice fluida, detta sarcoplasma, nella quale sono presenti i comuni costituenti intracellulari. Vi si trovano elevate quantità di potassio, magnesio, fosfati e proteine con funzione enzimatica. È presente, inoltre, un numero molto grande di mitocondri, disposti tra le miofibrille e parallelamente ad esse, ad indicare che esse richiedono elevate quantità di ATP per la contrazione.

L'avvio e il corso della contrazione muscolare hanno luogo secondo una sequenza di eventi:

1. Un potenziale d'azione viaggia lungo una fibra nervosa motrice fino alle sue terminazioni su un certo numero di fibre muscolari.
2. A livello di ciascuna terminazione, la fibra nervosa secerne una piccola quantità di una sostanza neurotrasmettitrice, l'acetilcolina.
3. L'acetilcolina agisce su un' area circoscritta della membrana della fibra muscolare, determinando l'apertura di molteplici canali ionici ligando-dipendenti (colinergici nicotinici) presenti nella membrana stessa.
4. L'apertura di questi canali permette l'ingresso di grandi quantità di ioni sodio all' interno della membrana della fibra muscolare, nel punto in cui termina la fibra nervosa.

5. Si genera così un potenziale d'azione, che si propaga lungo la membrana della fibra muscolare.
6. Il potenziale d'azione depolarizza la membrana della fibra muscolare e si propaga anche in profondità della fibra stessa. Qui provoca la liberazione di grandi quantità di ioni calcio dal reticolo sarcoplasmatico.
7. Gli ioni calcio innescano un processo che dà origine a forze di attrazione tra i filamenti di actina e quelli di miosina che, scorrendo gli uni sugli altri, determinano la contrazione della fibra muscolare.
8. Dopo una frazione di secondo, gli ioni calcio vengono richiamati all'interno del reticolo sarcoplasmatico, dove rimangono immagazzinati, sino a che la fibra muscolare non è investita da un nuovo potenziale d'azione, e ha termine la contrazione muscolare.

L' actina

L'actina è una proteina di forma globulare, con un diametro di circa 7 nm, dal peso di 43 kDa e costituisce il 5-10% di tutte le proteine delle cellule eucarioti. La più alta presenza di actina si verifica nelle cellule del tessuto muscolare, dove è fondamentale per il processo di contrazione.

Ogni singola subunità di actina (detta actina G, cioè globulare) si può legare ad altre due subunità, formando così un polimero lineare. Due polimeri avvolti tra di loro danno origine ad un microfilamento. L'assemblaggio dei filamenti di actina è dipendente dalle condizioni dell'ambiente interno alla cellula, il citosol, ed in particolare dagli ioni presenti, dalle loro concentrazioni e dal legame con l'ATP. La polimerizzazione è infatti favorita da una concentrazione salina pari a quella corporea; inoltre, i monomeri di actina legati ad ATP tendono ad aggiungersi e a rimanere legati al filamento con maggiore facilità rispetto ai monomeri legati ad ADP.

La struttura molecolare del monomero di actina nel suo stato non complesso è stata ricostruita con la diffrazione a raggi X, nel 2001 (Figura 2).

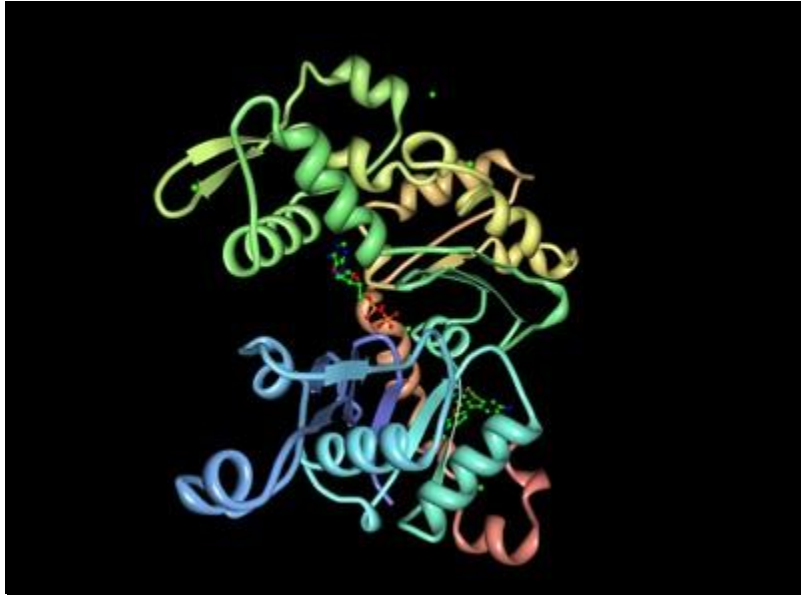
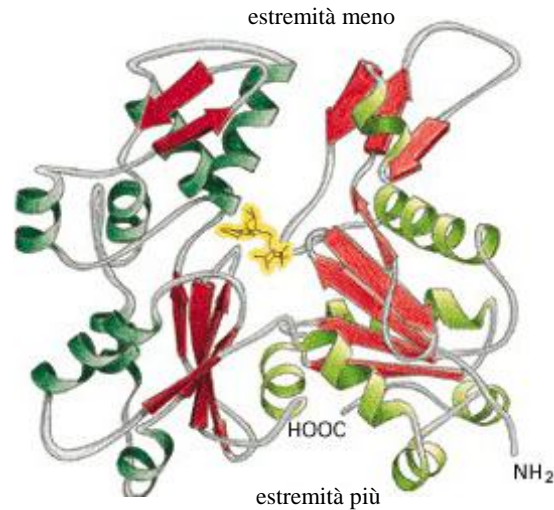


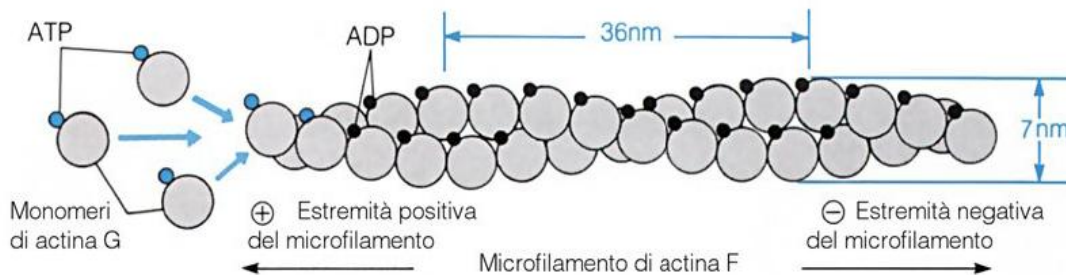
Figura 2. Struttura cristallina di actina in presenza di ADP. L.R. Otterbein, P. Graceffa, R. Dominguez. *Science* v. 293 pp.708-711 , 2001.

Le attuali conoscenze sulla struttura dei microfilamenti di actina sono basate su fotografie ottenute al microscopio elettronico e su modelli derivanti da studi ai raggi X di gel orientati di actina F. Tali modelli evidenziano che il polimero di actina è una catena doppia, in cui ciascuna subunità interagisce con altre quattro. Le varie subunità, disposte in fila all'interno di una catena, risultano ruotate di circa 167° l'una rispetto all'altra. Ciascuna di esse presenta, inoltre, lo stesso orientamento testa-coda, in modo che la fibra intera abbia una precisa polarità.

La presenza di un capo del filamento caratterizzato da actina legata ad ATP identifica l'estremità (+), mentre l'altro capo, dove l'actina è legata ad ADP, costituisce l'estremità (-) del filamento.



A causa di tale differenza strutturale fra le due estremità, la velocità di aggiunta di subunità è maggiore all'estremità (+) che, di conseguenza, cresce in lunghezza più rapidamente rispetto all'estremità (-).



I singoli microfilamenti vengono generalmente organizzati e integrati da proteine leganti l'actina (Actin Binding Proteins). A questa famiglia appartengono proteine che favoriscono la formazione dei filamenti (come, ad esempio, la profilina), o che la ostacolano (severina, limosina, gelsolina e katanina), alcune che organizzano i microfilamenti in fasci paralleli (fibrina, α -actinina, tropomiosina, fodrina, villina) e in reticoli (filamina), altre che li collegano alla membrana plasmatica (spettrina, distrofina, vinculina, talina, tensina) e proteine che si muovono sui microfilamenti (miosina).

Gli studi con la protamina

In un lavoro di Magri e collaboratori (1978a), viene riportata l'interazione dell'ATP-actina G con la protamina, una proteina basica ad elevato contenuto di arginina. In seguito a questa interazione, si assiste alla conversione dell'ATP-actina G in ADP-actina G.

Inoltre, diminuendo la concentrazione del Mg^{2+} libero fino a $0.1\mu M$, l'actina G è indotta dalla protamina a comportarsi come un'ATPasi, con la conversione ciclica dell'ATP-actina G in ADP-actina G (Magri et al., 1978b). Questa attività ATPasica può essere studiata misurando colorimetricamente il P_i rilasciato dopo precipitazione della proteina con acido tricloroacetico (che causa l'immediato rilascio del P_i dall'intermedio P_i -ADP-G-actina), o seguendo l'incremento della conducibilità della soluzione, dovuta alla liberazione spontanea del fosfato inorganico dall'intermedio P_i -ADP-G-actina. Si assiste, inizialmente, ad un rapido rilascio di P_i , come illustrato in Figura 3.

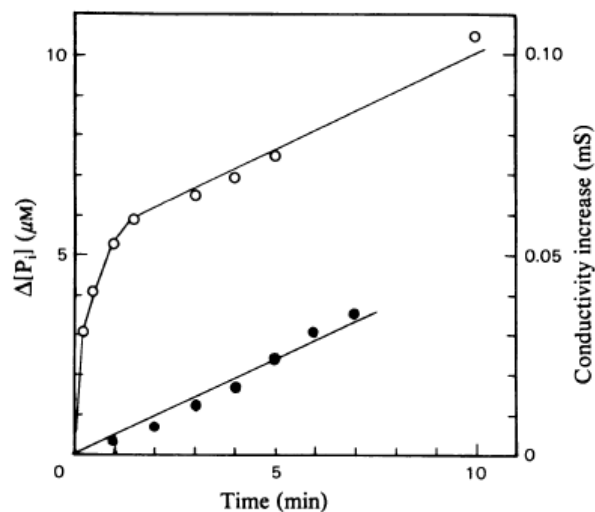


Figura 3: Attività ATPasica dell'ATP-actina G indotta dalla protamina. Le soluzioni di incubazione (5ml) contenevano 0.5mM EDTA, $20\mu M$ $CaCl_2$, $50\mu M$ $MgCl_2$, $200\mu M$ ATP, $5.7\mu M$ ATP-actina G e $2\mu M$ protamina, a $23^\circ C$ e pH 7.0.

○ rilascio di P_i

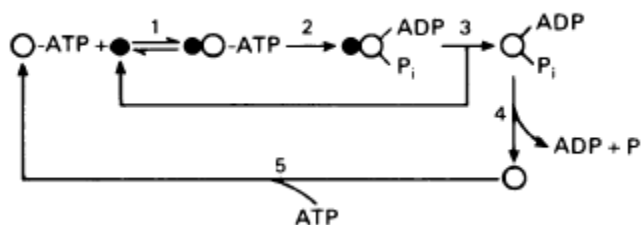
● incremento di conduttanza

$\Delta [P_i]$ = differenza tra il P_i rilasciato nel sistema e nei campioni di controllo senza protamina.

La durata della fase rapida aumenta con la concentrazione di protamina (Magri et al., 1978b) e la sua ampiezza equivale alla concentrazione iniziale di ATP-actina G.

L'idrolisi dell'ATP, durante lo stato stazionario, è 0.1-0.2moli/min per mole di actina. L'assenza di una fase rapida, nel saggio conduttometrico in Figura 3, indica che il rilascio spontaneo del fosfato è la tappa limitante della trasformazione idrolitica dell'ATP-actina G in P_i -actina G-ADP.

La protamina induce la formazione di piccoli nuclei, formati da 3-4 molecole di ATP-actina G, che vengono rapidamente trasformate in ADP-actina G. Quando l'actina presente nel campione supera il rapporto di 3-4 moli/mole di protamina, la velocità della defosforilazione diminuisce, anche se rimane comunque più elevata rispetto alla velocità della defosforilazione in assenza di protamina. Lo scambio tra molecole di actina legata a protamina e quelle di actina libera è più rapido del rilascio dei prodotti di idrolisi. Di conseguenza, il rilascio di actina dalla protamina (Schema 1, fase 3) precede il rilascio di P_i e ADP dall'actina (fase 4). La formazione di ATP-actina G da actina e ATP (fase 5) completa il ciclo dell'attività ATPasica dell'actina G indotta dalla protamina.



Schema 1. Interazione dell'ATP-actina G con la protamina.

- protamina
- actina

In presenza di elevate forze ioniche, 2-4 μM di protamina e 0.1-0.2 μM di istone H1 accelerano di 3-4 volte la polimerizzazione dell'ATP-actina G.

A basse forze ioniche, sia la protamina 2-4 μM che l'istone H1 1-2 μM inducono la nucleazione e la defosforilazione dell'actina presente nel campione.

I complessi che si formano tra actina e protamina non sono semplici entità bi- o trimolecolari, ma grandi strutture sopramolecolari, le cui forme e proprietà dipendono dal rapporto molare in cui si trovano le due proteine e dalla concentrazione ionica del mezzo (Grazi et al., 1982).

Di particolare importanza biologica è la dimostrazione che, in presenza di elevate concentrazioni ioniche, la protamina spezza i lunghi filamenti di actina F in piccoli oligomeri, che tendono ad aggregarsi latero-lateralmente, e che, quando la concentrazione molare dell'actina non supera quella della protamina, si forma un polimero misto, costituito da actina-protamina, invece che da actina F.

Il complesso actina-protamina può essere separato dall'actina G libera, tramite filtrazione attraverso filtri Millipore. In questo modo, è stato possibile determinare la corretta stechiometria dei complessi actina G-protamina, valutare il tipo di scambio tra actina libera e actina legata alla protamina e la relazione tra questo scambio e l'attività ATPasica del complesso.

L'interazione tra actina e protamina viene rivelata dalla torbidità che si forma quando vengono mescolate le soluzioni delle due proteine, solamente in presenza di ATP, sia libero che legato al Ca^{2+} . Da queste osservazioni si è pensato che le variazioni nella torbidità potessero riflettere la formazione di differenti strutture sopramolecolari tra le due proteine. Questa supposizione è stata in seguito confermata grazie alla microscopia elettronica.

In presenza di bassa forza ionica, con protamina 4 μM e actina G 1 μM , si formano aggregati globulari, anche quando la concentrazione dell'ATP nel campione è al di sotto di 3 μM . Alcuni di questi aggregati sono evidenziati dalla freccia, nell'immagine qui sotto riportata. In presenza di protamina 2 μM e actina 1 μM , essi sono trasformati in strutture più estese di diametro variabile (Foto 2a).

Con protamina 1 μM e actina G 1 μM , sono visibili numerosi filamenti di diametro uniforme (17-18 nm), che a volte raggiungono lunghezze intorno a 1.5 μm . Essi sono privi di una struttura microfibrillare e sono costituiti da piccoli frammenti (Foto 2b).

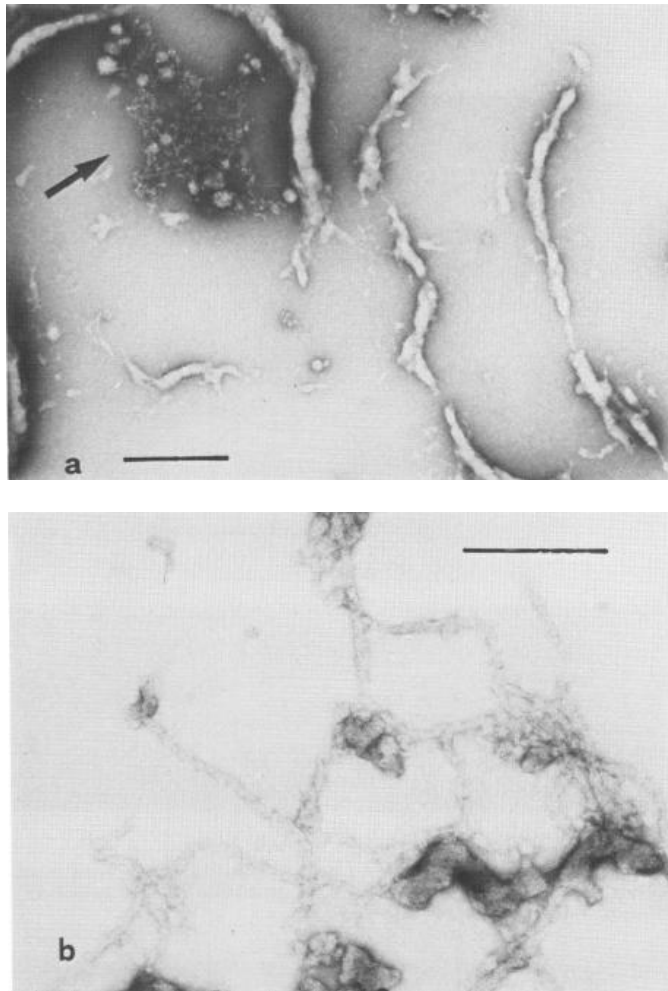


Foto 2. Micrografia elettronica dei complessi protamina:actina G a bassa concentrazione ionica.

a. protamina 2 μM , actina G 1 μM , ATP 7 μM , CaCl_2 2 μM , Tris/HCl buffer 2 mM, pH 8.0.

b. protamina 1 μM , actina G 1 μM , ATP 7 μM , CaCl_2 2 μM , Tris/HCl buffer 2 mM, pH 8.0.

bar = 200 nm

Campioni incubati per 3 min a 22°C.

Al fine di studiare le cinetiche di scambio tra l'actina libera e i filamenti formati dall'interazione di quantità equimolari di actina e protamina, queste strutture sono state isolate mediante filtrazione con filtri Millipore 0.45 μm (Grazi e Magri, 1981). Il rapporto moli di actina legata/moli di protamina è 1 quando l'actina è in eccesso rispetto alla protamina; lo stesso rapporto finale è ottenuto portando l'actina G fino a 8 μM , a concentrazione costante di protamina, 4 μM . Questi risultati dimostrano che, quando la

protamina è in eccesso rispetto all'actina, si lega più di una mole di protamina per mole di actina, ma si ha solamente la formazione del complesso 1:1, quando l'actina è in eccesso rispetto alla protamina.

Come già detto, quando la concentrazione di Mg^{2+} è mantenuta intorno a $0.1 \mu M$ con l'aggiunta di EDTA, il complesso actina:protamina opera come un' ATPasi. Alle stesse condizioni, si assiste alla formazione di una particolare struttura sopramolecolare, caratterizzata da un rapporto actina-protamina 2:1. Queste strutture hanno generalmente la forma di bastoncini irregolari di diametro compreso tra 15 e 20 nm e una lunghezza media pari a $0.5 \mu m$, nonostante abbiano talvolta lunghezze superiori a $2 \mu m$ (Foto 3c). Al contrario dei filamenti riscontrati precedentemente (vedi Foto 2b), questi bastoncini possiedono una struttura microfibrillare, con due o tre filamenti che decorrono paralleli l'uno rispetto all'altro.

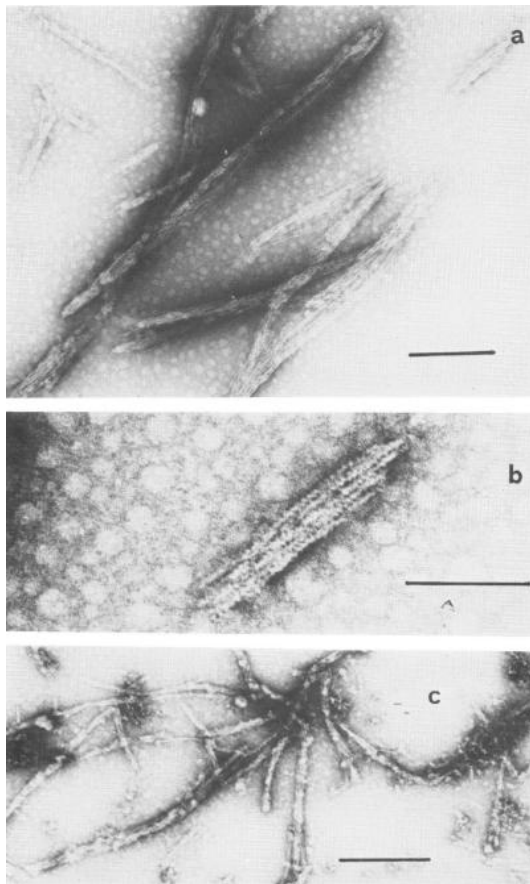


Foto 3. Micrografia elettronica di un campione contenente (a, b) protamina $1 \mu M$ e actina $1 \mu M$ e (c) protamina $1 \mu M$ e actina $2 \mu M$ in $20 \mu M$ $CaCl_2$, 0.2 mM ATP, 0.1 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 2 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0. Campioni incubati per 3 min a $22^\circ C$. bar = 200nm (a, c), 100nm (b)

Studi sono stati condotti anche sul comportamento di actina G 1 μM e protamina 1 μM , in soluzioni ad elevata intensità ionica. In questo caso, si formano strutture simili a corde che si possono aggregare ad altri filamenti (Foto 4).

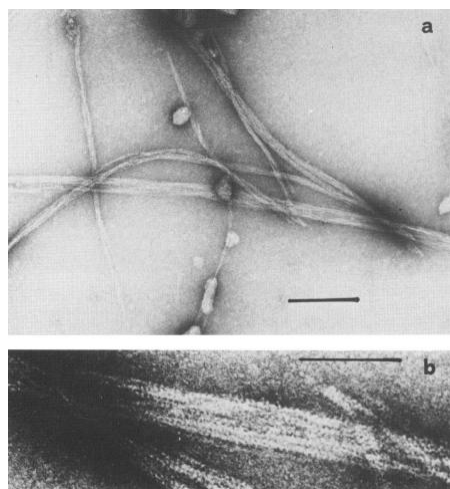


Foto 4. Micrografia elettronica di complessi 1:1 di actina G 1 μM e protamina 1 μM . Campioni incubati 3 min a 22°C. bar = 200 nm (a) e 100 nm (b)

La polimerizzazione dell'actina

La polimerizzazione dell'actina è un meccanismo complesso, che comprende le fasi di nucleazione, allungamento, redistribuzione, associazione tra filamenti di actina (Arisaka et al., 1975) e frammentazione (Wegner e Savko, 1982).

Questo processo può essere descritto assumendo che: a.) l'actina G è l'unico reagente di partenza; b.) la concentrazione di piccoli oligomeri è sempre trascurabile in confronto alla concentrazione polimerica totale (Wegner e Engel, 1975; Cooper et al., 1983); c.) l'allungamento ha luogo solamente mediante addizione di monomeri; d.) la velocità della fase di allungamento è indipendente dalla lunghezza del polimero per quanto riguarda gli oligomeri maggiori del dimero (Wegner e Engel, 1975), del trimero (Arisaka et al., 1975) e dell'esamero (Frieden e Goddette, 1983). Oligomeri di actina sono presenti al di sotto della concentrazione critica (Oosawa, 1970), messi in evidenza mediante tritazione con $^{54}\text{Mn}^{2+}$, in soluzioni di ATP-actina G. Assumendo che ogni oligomero legni un Mn^{2+} (Grazi, 1984), la concentrazione degli oligomeri è stimata essere 0.4 μM , in una soluzione di ATP-actina G con una concentrazione di 23 μM .

Questi risultati dimostrano che l'actina monomerică non è l'unico reagente di partenza, come detto precedentemente. Inoltre, gli oligomeri, in rapido equilibrio con i monomeri, possono comportarsi come nuclei, influenzando, in qualche modo, il processo di polimerizzazione. In effetti, concentrazioni relativamente elevate di oligomeri sono presenti sia in soluzioni di actina monomerică (Grazi, 1984), sia in soluzioni di actina in corso di polimerizzazione (Grazi e Magri, 1987).

Molto spesso, le preparazioni di actina F, quando vengono osservate al microscopio elettronico, rivelano la presenza di significative quantità di filamenti molto corti, così come di aggregati amorfi (Hanson e Lowy, 1964; Depue e Rice, 1965; Nachmias et al., 1970; Mabuchi, 1976; Bryan e Kane, 1978; Cooke, 1982; Strzelecka-Golaszewska et al., 1985).

Questi aggregati possono dare origine a due popolazioni polimeriche, morfologicamente e cineticamente differenti tra loro (Grazi e Magri, 1987). La prima, costituita da aggregati amorfi, è in grado di legare rapidamente l'ATP libero. La seconda, composta principalmente da lunghi filamenti di actina, è coinvolta solo indirettamente, a causa della condensazione con gli aggregati amorfi. Questi risultati danno un'ulteriore conferma agli studi eseguiti qualche anno prima (Grazi et al., 1983, 1984; Grazi, 1984), dove si afferma che l'allungamento del filamento ha luogo, non solo dalla reazione con i monomeri, ma anche in seguito alla condensazione dei filamenti con gli aggregati amorfi.

La popolazione polimerica di actina, in KCl 50 mM, si presenta eterogenea: accanto a lunghi filamenti vengono trovati numerosi piccoli aggregati, di larghezza tra gli 8 e i 12 nm e lunghi dai 10 ai 40 nm (Foto 5 a e c).

Gli aggregati possono essere facilmente separati dai filamenti lunghi mediante centrifugazione per 3 minuti a 366.000g. Il sopranatante che ne deriva contiene solamente piccoli aggregati (Foto 5 b e d).

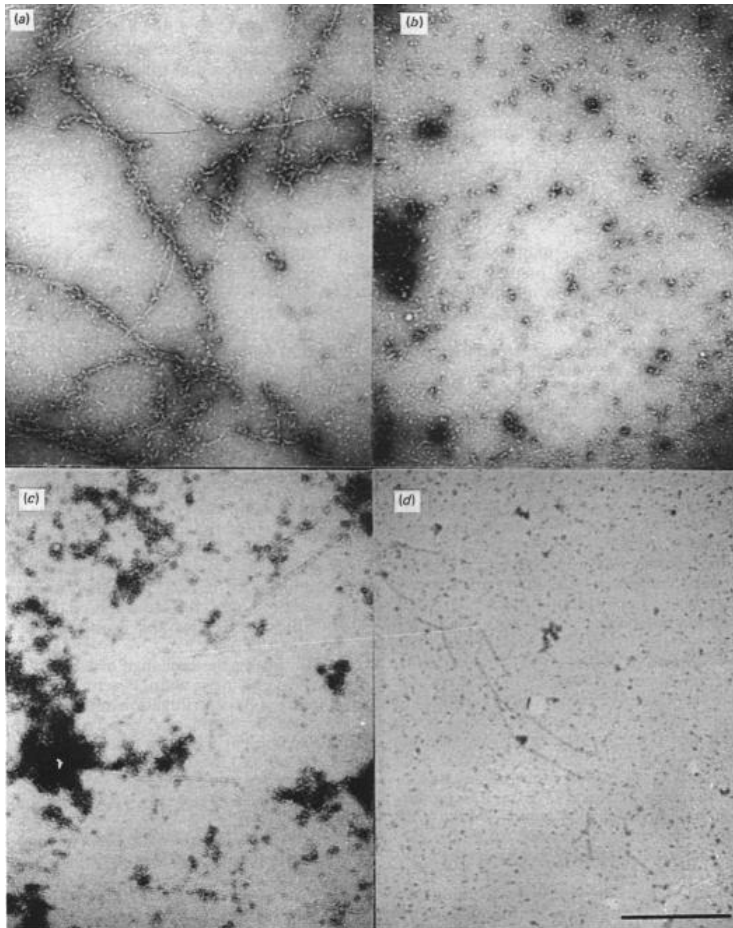


Foto 5. Micrografia elettronica di actina F polimerizzata in KCl.
a) e c) actina F polimerizzata in KCl 50 mM
b) e d) sopranatante ottenuto dalla centrifugazione per 3 min a 366.000g
 bar = 500 nm

In un lavoro del 1981, Maruyama ha sottolineato l'importanza della presenza di concentrazioni submicromolari di Mg^{2+} per la nucleazione dell'actina. Tale processo avviene anche in assenza del catione, se si mantiene la soluzione di actina sotto agitazione meccanica.

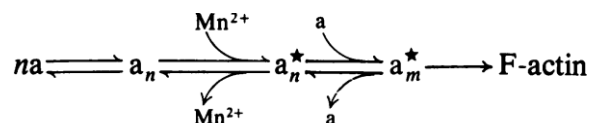
Dal momento che la costante di associazione del Mg^{2+} per il singolo "sito ad alta affinità" dell'actina è approssimativamente $0.6 \cdot 10^5 M^{-1}$ (Barany et al., 1964; Strzelecka-Golaszewska, 1973), per spiegare l'effetto del Mg^{2+} submicromolare nella reazione di nucleazione, bisogna supporre che: a) il Mg^{2+} sia legato al sito ad alta affinità di una piccola parte delle molecole di actina G che vanno incontro a nucleazione; b.) il Mg^{2+} sia legato ad un sito a più elevata affinità della maggioranza delle molecole di actina G;

oppure, c) il Mg^{2+} stabilizzi nuclei preformati di actina, come è stato proposto da Maruyama (1981).

Dal momento che lo ione Mn^{2+} può rimpiazzare il Mg^{2+} , nel promuovere la nucleazione dell'actina, è possibile seguire la formazione dei complessi $^{54}Mn^{2+}$ -actina e mettere in relazione questo processo di legame alla polimerizzazione dell'actina. Come risultato di questi studi, Grazi (1984) ha dimostrato che il $^{54}Mn^{2+}$ si lega agli oligomeri (ma non ai monomeri) presenti nelle soluzioni di actina G. Durante la polimerizzazione, inoltre, Mn^{2+} è legato a piccole specie oligomeriche (trimeri-pentameri) e a specie più estese (15-24 monomeri).

Per determinare la quantità di $^{54}Mn^{2+}$ legato all'actina, dopo 120 minuti di incubazione in presenza del catione, la proteina viene isolata mediante filtrazione in colonne di Sephadex G-50, equilibrate con Tris/HCl buffer. In media, circa il 24% del $^{54}Mn^{2+}$ compare nel filtrato, che rappresenta la frazione libera in equilibrio con i complessi Mn^{2+} -actina. Il restante $^{54}Mn^{2+}$ si trova legato alla proteina ed è distribuito tra le piccole specie oligomeriche (non trattenute dal filtro Millipore) e le grandi specie oligomeriche e polimeriche (trattenute dal filtro).

La quantità di Mn^{2+} legato all'actina, non trattenuto dal filtro, aumenta nel corso della polimerizzazione e raggiunge un valore medio di uno ione Mn^{2+} legato ogni quattro monomeri di actina. Sembra quindi che la principale funzione del catione, a concentrazioni submicromolari, sia quella di stabilizzare i nuclei di actina e di modulare la concentrazione del monomero allo stato stazionario. I nuclei, poi, crescono fino a diventare oligomeri più grandi, che, almeno in certe condizioni, si condensano in actina F. Quest'ultimo è il fattore limitante dell'intero processo:



dove le specie indicate con la stella (\star) sono i complessi actina- Mn^{2+} ;

$$3 < n < 5$$

$$14 < m < 25.$$

Alcuni polimeri di actina, come le strutture tubulari che si formano in presenza di lantanidi (Curmi et al., 1982) e i complessi paracristallini che si creano in presenza di protamina (Grazi et al., 1982), contengono ATP. Aggregati di ATP-actina sono stati descritti come intermediari nella formazione dell'actina F (Ferri e Grazi, 1982; Grazi et al., 1984) e si suppone che l'actina F in sé possa contenere filamenti di parecchie centinaia di subunità actiniche che sono in prevalenza legate all'ATP (Pollard e Weeds, 1984).

Partendo dal fatto che, in presenza di 2 mM $MgCl_2$, l'ADP-actina G polimerizza a temperatura ambiente e depolimerizza a 3°C (Grant, 1965), si è stati in grado di dimostrare che, alle basse temperature, l'ATP è favorito rispetto all'ADP, nel legame con l'actina F.

In presenza di ATP, l'actina F è stabile, sia a 26°C, che a 3°C; una volta che il nucleotide viene rimosso, l'actina depolimerizza rapidamente, a bassa temperatura. L'aggiunta di 0.1 mM ATP permette la totale ripolimerizzazione (Grazi et al., 1984).

La polimerizzazione dell'actina è un fenomeno alquanto complesso.

Per cercare di comprenderlo nella sua interezza, da decenni si continuano a condurre innumerevoli studi, riguardanti una molteplicità di parametri ad esso correlati.

Uno di questi è sicuramente la temperatura e l'effetto che essa provoca nell'actina F, come appena visto.

Quando la temperatura viene abbassata da 20 a 4°C, la viscosità specifica dell'actina polimerizzata in presenza di $CaCl_2$ 4 mM, o di $MgCl_2$ 2 mM, diminuisce del 50%, in assenza di ATP libero. L'aggiunta di ATP ripristina il valore della viscosità dell'actina polimerizzata da Mg^{2+} , ma non quello dell'actina polimerizzata dal Ca^{2+} . L'effetto della temperatura su quest'ultimo tipo di actina è dovuto a:

- a) la conversione polimero-monomero
- b) l'aggregazione latero-laterale dei filamenti
- c) la frammentazione dei filamenti

L'osservazione al microscopio elettronico della Ca-actina F, a 20°C, dimostra che essa è caratterizzata dalla presenza di lunghi filamenti e di fasci formati dall'aggregazione latero-laterale dei singoli filamenti (Foto 6a). A 4°C le strutture fascicolate prevalgono sui singoli filamenti (Foto 6b).

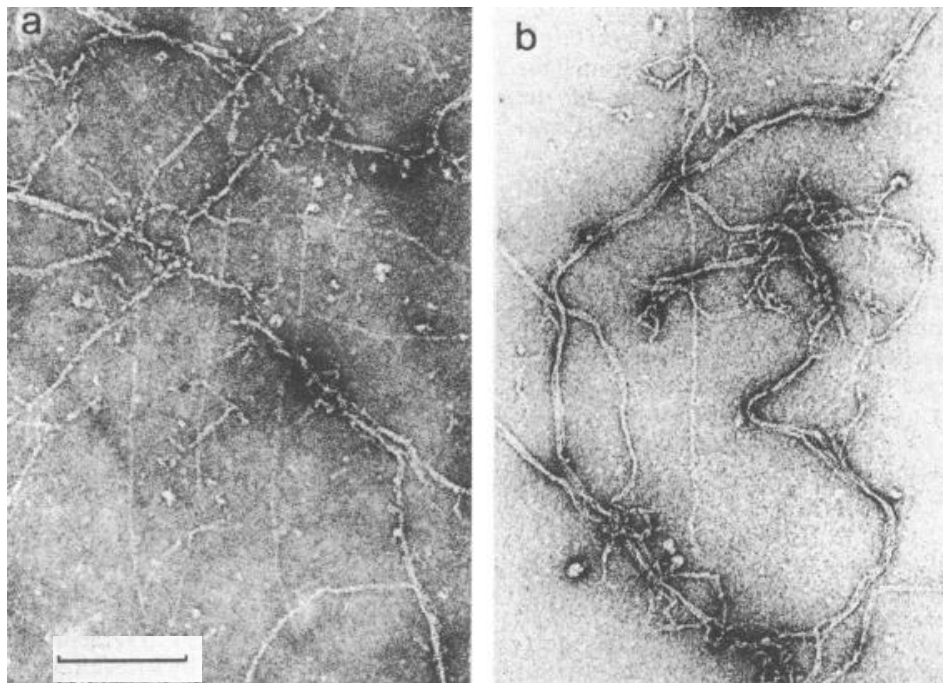


Foto 6. Micrografia elettronica della Ca-actina F, a 20°C (a) e a 4°C (b).
bar = 368 nm (a), 276 nm (b)

L'incremento dell'aggregazione latero-laterale tra i filamenti certamente contribuisce a diminuire la viscosità del sistema. Questo fenomeno fu notato anche durante la formazione degli eteropolimeri actina-protamina (Grazi et al., 1982), già descritti precedentemente.

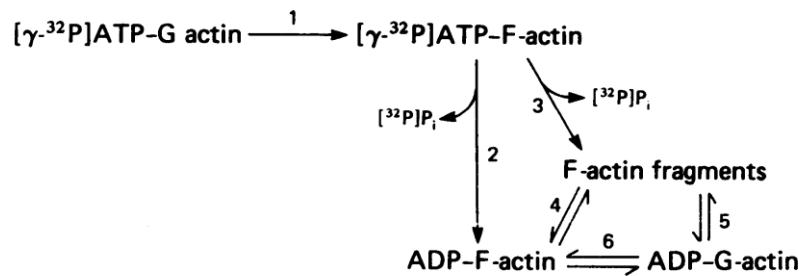
Come abbiamo visto, in assenza di ATP libero, sia la Mg-actina F, che la Ca-actina F depolimerizzano reversibilmente, quando la temperatura si abbassa da 20 a 4°C. L'aggiunta di ATP, a 4°C, promuove la polimerizzazione della Mg-actina F, ma non della Ca-actina F. Questo è dovuto allo scambio molto lento del nucleotide legato all'actina, a concentrazioni elevate di Ca^{2+} (Kuehl e Gergely, 1969).

L'effetto della temperatura sulla Ca-actina F è spiegato solo in parte dalla conversione dei polimeri in monomeri. Altri due fattori sono determinanti: l'aggregazione latero-laterale dei filamenti e la frammentazione. Inoltre, il confronto tra il comportamento della Mg-actina F e della Ca-actina F in presenza di ATP libero ha sottolineato l'importanza che l'entità dello scambio del nucleotide legato all'actina ha nella regolazione del processo di frammentazione, almeno alle basse temperature.

L'analisi eseguita da Wegner (1982) e Wegner e Engel (1975), che tratta la frammentazione come un processo irreversibile, fu criticata da Frieden e Goddette, nel 1983. Essi sostennero

che non solo la frammentazione deve essere un processo reversibile a causa della redistribuzione, ma anche che, in certe condizioni, questa redistribuzione potrebbe essere abbastanza rapida da non rendere apparente la frammentazione.

Lo stesso fenomeno avviene anche a temperature più alte, come dimostrato in un lavoro di Grazi e Trombetta del 1986, dove si è studiata la distribuzione del nucleotide legato all'actina tra le specie oligomeriche e polimeriche, formate polimerizzando la $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -actina G in CaCl_2 4 mM. In questo sistema, lo scambio del nucleotide legato all'actina, con il nucleotide nel mezzo, è particolarmente lento (Kuehl e Gergely, 1969). Di conseguenza, il nucleotide diventa un eccellente “adesivo” per l'actina e offre un segnale addizionale per rappresentare gli stadi intermedi della polimerizzazione. La $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -actina G polimerizza rapidamente in lunghe fasce di $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -actina F (reazione 1, Schema 2), che vanno poi incontro a frammentazione in cordoni più corti di ADP-actina F (reazione 3, Schema 2).



Schema 2. Stadi intermediari della polimerizzazione della $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -actina G.

La concentrazione macromolecolare

L'effetto della concentrazione macromolecolare nelle associazioni delle strutture del citoscheletro è dovuto principalmente ad interazioni preferenziali; argomento, questo, trattato teoricamente da molti autori (Ogston, 1962; Arakawa e Timasheff, 1985; Minton, 1981; Lee et al., 1979).

La presenza di macromolecole sposta l'equilibrio monomero-tetramero della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi in favore della formazione del tetramero (Minton e Wilf, 1981); regola inoltre il flusso ionico attraverso le membrane cellulari (Minton et al., 1992). Nel campo specifico del citoscheletro, queste interazioni preferenziali influenzano il legame degli enzimi glicolitici alle strutture citoscheletriche e alle miofibrille (Shearwin et al., 1989); accelerano ed intensificano la polimerizzazione dell'actina (Tellam et al., 1983), l'allungamento dei filamenti (Drenckhahn e Pollard, 1986) e favoriscono la formazione di fasci (Suzuki et al., 1989). Quest'ultimo contributo è stato ampiamente preso in esame, presentato e discusso da Grazi in un lavoro del 1994, in cui si afferma che le funzioni citoscheletriche sono ampiamente influenzate, sia quantitativamente che qualitativamente, da grandi concentrazioni di soluti macromolecolari, con l'interconversione reversibile dei filamenti in fasci, l'intensificazione dell'attività dell' α -actinina e la diminuzione dell'attività della gelsolina.

Variazioni osmotiche del volume cellulare vengono indotte da promotori tumorali e da agenti mitotici, ad opera del co-trasporto di K-Cl o dello scambio Na-H, sono accompagnate dal flusso osmotico dell'acqua e, di conseguenza, dalla variazione della concentrazione delle macromolecole (Grinstein e Foskett, 1990). Essendo prodotte da flussi di acqua, queste variazioni si propagano abbastanza rapidamente in ogni spazio cellulare, inclusa la matrice nucleare, dove possono agire come segnale per la trascrizione genica.

Piccole variazioni del volume cellulare, che generano lievi cambiamenti nella concentrazione delle macromolecole nel mezzo, possono modificare lo stato di aggregazione di quelle specie actiniche che si trovano nello stato di transizione tra filamenti e fasci. Per contro, variazioni nello stato di aggregazione dell'actina possono influenzare il volume.

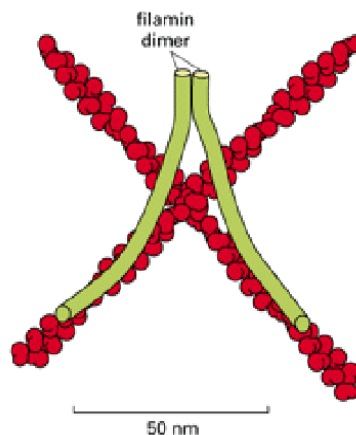
Molte specie cellulari animali rispondono al rigonfiamento o al raggrinzimento, attivando dei trasportatori di membrana: il co-trasporto di K-Cl, indotto dal rigonfiamento, lo scambio Na-H, indotto dal raggrinzimento. Le lievi variazioni del volume cellulare sono percepite come piccole modificazioni della concentrazione macromolecolare citoplasmatica.

Le proteine citoscheletriche ausiliarie modulano la concentrazione macromolecolare necessaria a promuovere la transizione dei filamenti in fasci di actina. Ad esempio, nelle condizioni sperimentali descritte nel suddetto lavoro di Grazi (1994), la formazione di fasci avviene in presenza di polietilenglicole, PEG, con una concentrazione del 3%, per l'actina associata a caldesmone, del 4-5% nel caso di actina associata a filamina, del 5-7% per l'actina legata a caldesmone-tropomiosina, del 6-7% per l'actina F e del 9-10% per l'actina legata a tropomiosina (Grazi et al., 1990; Cuneo et al., 1992).

Una più fine regolazione viene ottenuta cambiando il rapporto tra proteine ausiliarie e actina. In soluzioni di actina e filamina, la formazione di fasci ha luogo anche in assenza di PEG, quando il rapporto molare filamina:actina è portato a 1:8 (Wang e Singer, 1977).

La concentrazione di PEG, richiesta per indurre la transizione dei filamenti di actina F in fasci, diminuisce con l'aumentare del rapporto molare caldesmone:actina, ma, anche quando è 1:3, il PEG è necessario per la formazione di fasci (Cuneo et al., 1992).

La distribuzione intracellulare delle proteine ausiliarie citoscheletriche può determinare lo stato di aggregazione dell'actina. La filamina, ad esempio, favorisce la formazione di fasci di actina ed è presente nel bordo esterno delle membrane (Wang e Singer, 1977; Small et al., 1982).



La tropomiosina, che al contrario impedisce la formazione di fasci, si trova confinata nella parte più interna delle cellule (Lazarides, 1976).

In alcuni casi, la correlazione tra concentrazione macromolecolare, stato di aggregazione dell'actina e distribuzione delle proteine ausiliarie citoscheletriche non è alquanto chiara.

Il caldesmone si lega preferibilmente all'actina F associata a tropomiosina, piuttosto che alla sola actina F (Moody et al., 1985); di conseguenza, un sistema composto da actina F-tropomiosina e da caldesmone-actina F evolve verso un sistema composto da actina F e da actina F-caldesmone-tropomiosina. Questo ha un enorme effetto sullo stato di aggregazione dell'actina. In soluzioni di PEG 3%, la progressione del sistema dal primo al secondo stato aumenta la proporzione dei filamenti rispetto ai fasci. In soluzioni più concentrate di PEG (6-7%), la stessa progressione aumenta la proporzione dei fasci rispetto ai filamenti (Cuneo et al., 1992).

Numerosi studiosi, abituati a lavorare con soluzioni a bassa pressione osmotica macromolecolare, sono portati a considerare la forma filamentosa come lo stato iniziale dell'aggregazione dell'actina nella cellula. Suzuki e collaboratori (1989) hanno dimostrato, invece, che i fasci di actina rappresentano questo stato iniziale, quando l'osmolarità delle macromolecole del mezzo è simile a quella del liquido cellulare. La questione che si pone, quindi, è in che modo, nella cellula, i fasci di actina possono essere portati a dissociarsi in filamenti.

Numerose proteine sono coinvolte nel processo di regolazione della formazione e dissociazione di fasci actinici: la proteina eritrocitaria umana 4.9 mostra la capacità di disporre l'actina in fasci, che viene bloccata quando la proteina, nei fasci di actina preformati, è fosforilata dalla subunità catalitica della protein chinasi AMP ciclico-dipendente (Husain-Chishti et al., 1988); la lipocortina 85 ha la proprietà di indurre la formazione di fasci di actina, Ca^{2+} -dipendente (Ikebuchi e Waisman, 1990); quest'ultima proprietà è tipica anche della sinapsina I, che viene inattivata dalla fosforilazione da parte della protein chinasi II Ca^{2+} -calmodulina-dipendente (Bähler e Greengard, 1987); il complesso Ca^{2+} -calmodulina-caldesmone dissocia a basse concentrazioni di Ca^{2+} ; il caldesmone rilasciato separa la filamina dai fasci di actina-filamina, che dissociano quindi in filamenti (Sobue et al., 1981).

In nessun caso, tuttavia, si riesce a capire se i fasci preformati di actina possano dissociare quando la concentrazione delle macromolecole è simile a quella presente nel citosol. Ad esempio, nel PEG 3%, la Ca^{2+} -calmodulina previene il legame del caldesmone all'actina F, ma non riesce a dissociare i fasci di caldesmone-actina F, che si formano a questa concentrazione di polietilenglicole.

Quando la dissociazione dei fasci actinici avviene ad opera di una proteina, il principale inconveniente è l'ingombro sterico, dovuto al fitto avvolgimento dei filamenti di actina.

In soluzioni a riposo, la tropomiosina non dissocia i fasci di actina F, in PEG 7%, anche se l'actina F-tropomiosina forma fasci solo con PEG a concentrazioni intorno a 9-10% (Grazi et al., 1990; Cuneo et al., 1992). Per ottenere la dissociazione dei fasci, la soluzione deve essere costantemente tenuta in agitazione (Grazi et al., 1992). Al contrario, anche in soluzioni a riposo, la tropomiosina promuove la dissociazione dei fasci di actina F-caldesmone in PEG 3%. Probabilmente, in questo caso, i fasci sono condensati in minor entità (Cuneo et al., 1992), a causa del minore stress osmotico, dato dalla bassa concentrazione di PEG.

È improbabile che il flusso citoplasmatico possa superare le restrizioni steriche imposte dai fasci di filamenti actinici strettamente avvolti: sembra quindi che la dissociazione dei fasci sia meglio promossa da molecole piccole. Un potenziale candidato per questo ruolo è il Mg^{2+} . In vitro, in un sistema actina F-tropomiosina, l'aumento della concentrazione del Mg^{2+} libero favorisce la formazione di fasci, mentre il suo decremento ne facilita la dissociazione in filamenti. La sola actina F non è soggetta a questo meccanismo di regolazione (Grazi et al., 1992).

A 37°C, pH 7.14, in PEG 7,2%, la transizione tra filamenti e fasci avviene a 1.7-2.0 mM di Mg^{2+} libero. Queste concentrazioni sono leggermente superiori allo 0.6 mM, valore stimato per la concentrazione del Mg^{2+} libero nei tessuti dei mammiferi (Romani e Scarpa, 1992). Tuttavia, a causa della molteplicità dei fattori che regolano la transizione e della impossibilità pratica di valutare le condizioni cellulari, la concentrazione del Mg^{2+} libero non può essere esclusa come potenziale candidato per la regolazione. Nelle condizioni sperimentali prese in esame, un cambiamento nella concentrazione di Mg^{2+} libero da 1.7 a 2 mM, che produce un sostanziale incremento nella quantità di fasci di actina-tropomiosina

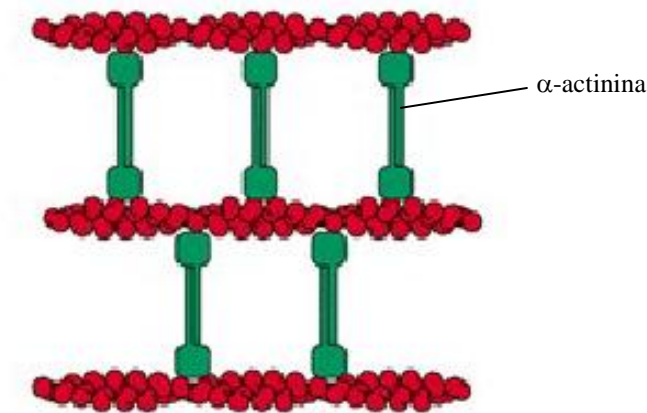
rispetto ai filamenti, è causata da una diminuzione della concentrazione di ATP pari a 0.5 mM. Lo stimolo da parte dell'ADP delle piastrine umane induce un simile decremento nella concentrazione "metabolica" di ATP (Murphy, 1989). Queste variazioni nella concentrazione di ATP sono accompagnate dalla formazione di fasci di actina durante la reazione di aggregazione (Holmsen et al., 1972; Pribluda et al., 1981).

Le alfa actinine sarcomeriche sono le maggiori componenti della linea Z e svolgono una fondamentale funzione organizzatrice e regolatrice nella contrazione muscolare.

È nozione comune che la loro proprietà di formare gel di actina diventi quasi irrilevante a 37°C (Jockusch e Isenberg, 1981; Bennett et al., 1984). Questo comportamento fa sorgere apparentemente dubbi sull'attività di queste proteine in vivo (Bennett et al., 1984). A dir la verità, l' α -actinina estratta da stomaco di pollo, a concentrazioni nanomolari, aumenta significativamente la consistenza del gel di actina, anche a 37°C, in presenza di basse concentrazioni di actina (2-3 μ M) (Grazi et al., 1990; Grazi et al., 1991). Questa scoperta porta alla considerazione che, solamente a basse concentrazioni, i filamenti di actina possono diffondere liberamente e formare legami crociati, grazie all'azione dell' α -actinina. Dal momento che la rete di fasci è ampiamente anastomizzata, la rigidità del sistema aumenta, anche a 37°C.

Ad eccezione di due casi (Meyer e Aebi, 1990), il legame dell' α -actinina all'actina F è stato studiato solamente ad un'unica concentrazione di actina F (Bennett et al., 1984, Duhaiman e Bamburg, 1984). Lo studio di questa interazione, in funzione della concentrazione, ha evidenziato che la costante di dissociazione aumenta di circa 40 volte, quando la concentrazione di actina viene incrementata da 1.2 a 48 μ M. Per spiegare questo fenomeno, Grazi e collaboratori (1990, 1991) hanno proposto che il legame tra α -actinina e actina F è una funzione sia della concentrazione, sia della struttura del gel. Con l'incremento della concentrazione, si assiste a due fenomeni: l'improvvisa diminuzione della diffusione dei filamenti di actina e l'incremento del numero di legami crociati, dovuto all'avvolgimento dei filamenti. L' α -actinina diffonde liberamente attraverso la rete actinica (Fujime e Ishiwata, 1971, Tait e Frieden, 1982). Di conseguenza, essa stabilisce un'interazione monodentata con i monomeri dei filamenti actinici. Ciò non succede invece nell'interazione bidentata. A concentrazioni molto basse, i filamenti di actina diffondono

liberamente e si dispongono adiacenti l'uno all'altro, abbastanza vicini da essere legati in modo crociato ad opera dell' α -actinina.



Con l'aumentare della concentrazione di actina, questa diffusione diminuisce improvvisamente ed una grande quantità di monomeri dei filamenti diviene inutilizzabile per il cross-linking da parte dell' α -actinina. L'aumento della concentrazione, tuttavia, è accompagnato da un incremento nell'avvolgimento dei filamenti, con un conseguente aumento del numero di legami crociati tra i filamenti e, quindi, del numero di siti disponibili per il legame bidentato dell' α -actinina all'actina (Grazi et al., 1993).

La gelsolina è un'altra proteina coinvolta nell'organizzazione del sistema contrattile. Essa ostacola la polimerizzazione, tagliando il filamento e legandosi all'estremità "più" appena formata.

Il rapporto molare gelsolina:actina è approssimativamente 1:100 nella cellula (Pollard e Cooper, 1986), un valore adeguato, in vitro, a supporto della nucleazione, accrescimento e frammentazione dei filamenti di actina. Dal momento che queste funzioni sono regolate dal Ca^{2+} e dal fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (Janmey e Stossel, 1987), la gelsolina assume il ruolo di potenziale candidato nel promuovere la transizione gel-sol in vivo. In vitro, le sue funzioni vengono solitamente testate sull'actina filamentosa; nella cellula, comunque, a causa della grande concentrazione delle macromolecole, l'actina è spesso presente sottoforma di fasci di filamenti. In queste strutture, le forti interazioni latero-laterali tra filamenti possono neutralizzare la loro frammentazione ad opera della gelsolina (Grazi et

al., 1991). Una protezione alla sua azione si ottiene anche aggiungendo tropomiosina 1.5 μM al sistema in poli(etilenglicole), una condizione in cui i fasci di actina non sono ancora formati. Forse, anche in questo caso, l'entità dell'associazione latero-laterale dei filamenti è sostanziale. L'azione di questa proteina può anche essere ostacolata rafforzando le interazioni monomero-monomero, che avvengono in presenza di elevate concentrazioni macromolecolari (Tellam et al., 1983).

Acqua e contrazione muscolare

Nel 1954, due gruppi di studiosi, A.F. Huxley con R. Niedergerke e H.E. Huxley con J.Hanson, giungono contemporaneamente ed indipendentemente alla conclusione che: a.) tutte le variazioni nella lunghezza del sarcomero avvengono a carico della banda I; b.) la lunghezza della banda A rimane costante, ma varia la sua densità; c.) durante la contrazione isometrica, la lunghezza di entrambe le bande rimane invariata.

La contrazione muscolare non è dovuta ad una variazione della lunghezza dei miofilamenti spessi e sottili, ma ad uno scorrimento degli uni sugli altri. Durante il processo, i miofilamenti sottili penetrano tra quelli spessi (variazione della lunghezza della banda I e variazione della densità della banda A) e in questo modo il sarcomero si accorcia. Successivi studi di microscopia elettronica e di diffrazione ai raggi X hanno portato alla formulazione di un modello della contrazione su base molecolare (Huxley, 1969). Secondo questo modello, la contrazione si realizza mediante un'interazione ciclica delle teste di miosina con il filamento di actina. Le teste di miosina subiscono una modifica conformazionale associata in qualche modo all'idrolisi dell'ATP.

Dopo più di mezzo secolo, la definizione dei due gruppi di studiosi rimane convincente, in quanto basa la contrazione muscolare sulle proprietà intrinseche alle proteine contrattili ed, in particolare, sulle modificazioni conformazionali che caratterizzano la formazione del ponte actomiosinico. Ma tali cambiamenti conformazionali rimangono per così dire "ipotetici" e le vie di trasduzione chimico-meccanica sono ben lungi dall'essere chiarite.

La dettagliata descrizione del ciclo ATPasico della miosina e della actomiosina, lo studio della meccanica della fibra muscolare, la risoluzione della struttura del complesso actina-

DNAsi I, del complesso profilina:actina, del frammento S1 della miosina, hanno portato alla definizione di numerosi dettagli della contrazione muscolare, ma non abbiamo ancora una visione unitaria di questo affascinante fenomeno.

Nel lavoro “Acqua e contrazione muscolare”, di qualche anno fa, Grazi, a tal proposito, afferma che “si clona l’uomo e si dimentica il vecchio adagio: *corpora non agunt nisi soluta*”.

In effetti, il sistema contrattile si può considerare una “soluzione” altamente non ideale, nella quale le proteine sono in forte competizione per l’acqua. Spesso questa realtà non è tenuta in sufficiente considerazione dagli scienziati che studiano il muscolo.

Lo strumento principe per analizzare le proprietà delle proteine contrattili, per soluzioni non ideali, è la pressione osmotica. Misurando questo parametro è possibile determinare il potenziale chimico di un soluto nella soluzione.

Date due soluzioni separate da una membrana permeabile al solvente, ma non al soluto, il solvente fluisce dalla soluzione meno concentrata (potenziale chimico dell’acqua più elevato, μ_1^I) alla soluzione più concentrata (potenziale chimico dell’acqua meno elevato, μ_1^{II}). Il flusso può essere arrestato applicando una opportuna pressione idrostatica sulla soluzione più concentrata. Tale pressione idrostatica misura la pressione osmotica, π , generata dal sistema:

$$\mu_1^I = \mu_1^{II} + \pi V$$

dove V è il volume di una grammo mole di acqua (18 cm^3).

Da questa equazione, si evince che il prodotto πV misura la differenza del potenziale chimico dell’acqua fra i due compartimenti. Nota la variazione del potenziale chimico dell’acqua, è possibile calcolare la variazione del potenziale chimico del soluto.

Lo studio delle proprietà osmotiche delle proteine del sistema contrattile può essere condotto per dialisi (vedi Figura 4) ad equilibrio, utilizzando membrane permeabili all’acqua e ai piccoli soluti, ma impermeabili alle proteine.

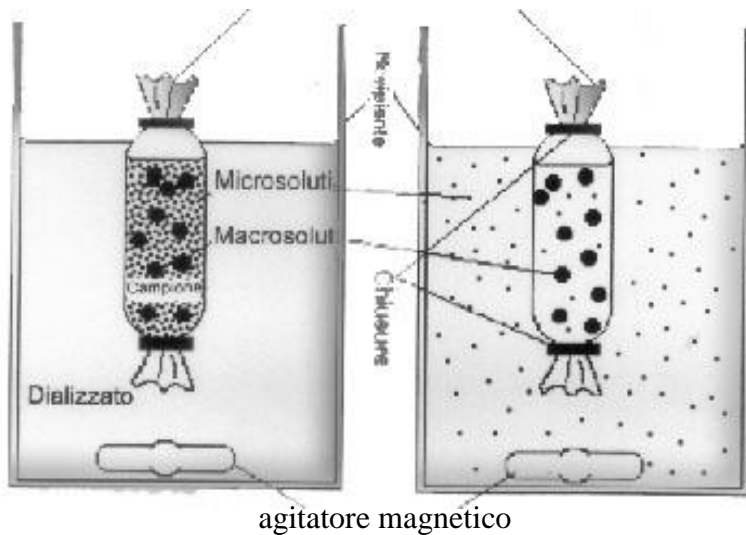
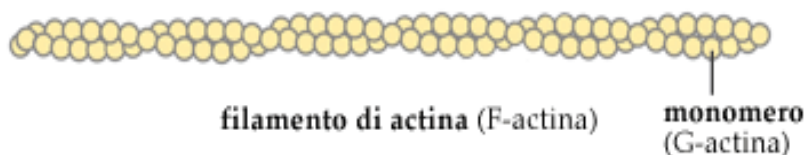


Figura 4. Rappresentazione schematica dell'apparato dializzatore.

In tal modo, si valuta la quota di pressione osmotica dovuta al contributo delle macromolecole. Si equilibrano le soluzioni proteiche contro soluzioni di macromolecole a pressione macromolecolare nota. Quando l'equilibrio viene raggiunto, la pressione osmotica della soluzione proteica è identica a quella della soluzione della macromolecola di riferimento. Si determinano gravimetricamente le masse dell'acqua e della proteina e si calcola la molalità della proteina, che è espressa dalla concentrazione totale dei monomeri (monomeri liberi + monomeri nei filamenti) e non dalla concentrazione dei filamenti, come sarebbe più corretto. Miosina e actina formano soluzioni polidisperse di filamenti e, per rappresentare i dati in funzione della concentrazione dei filamenti, dovremmo fare ipotesi sulla polidispersione delle soluzioni stesse. Ciò annullerebbe il valore principale del metodo: la misura diretta della variazione del potenziale chimico di una proteina.

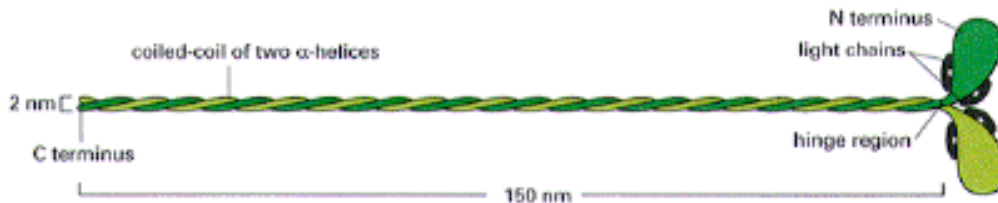
Una delle caratteristiche più rilevanti dell'actina e della miosina è la loro capacità di polimerizzare spontaneamente. A questa proprietà è legata essenzialmente la formazione del sarcomero nel muscolo scheletrico.

Il polimero di actina è costituito da un'elica levogira, formata da 2.16 monomeri per giro.



In vivo, meccanismi intrinseci regolano la lunghezza di questo filamento sottile intorno al micrometro. In vitro, questa lunghezza è varia e può raggiungere anche i 40 μm .

Il polimero di miosina (filamento grosso) è costituito da 300 molecole ed è lungo circa 1.5 μm . Esso si forma per interazione delle code delle molecole di miosina ed è pertanto bipolare. La sua porzione centrale è liscia (formata solo dalle code), mentre le due estremità presentano proiezioni laterali (teste della miosina), disposte in modo elicoidale.



Le sospensioni di filamenti di miosina e quelle di filamenti di actina hanno comportamento non ideale.

La variazione della pressione osmotica proteica ha effetti relativamente modesti sull'energia libera dell'actina, ma influenza significativamente l'energia libera della miosina, che, per l'incremento da 1.7 a 18 kPa della pressione osmotica proteica, aumenta di 11 RT/mole. Questi valori (1.7 e 18) non sono stati scelti a caso: 1.7 kPa è il valore massimo della pressione osmotica proteica associabile alle soluzioni diluite di actina e miosina, riscontrabili in letteratura; 18 kPa è il valore della pressione osmotica proteica del muscolo di rana, in condizioni fisiologiche. L'incremento di energia libera descritto, ~ 11 RT/mole, è dello stesso ordine di grandezza di quello conferito al ponte actomiosinico, in seguito ad una dislocazione di ~ 10 nm rispetto alla posizione di minima energia, cioè rispetto al punto nel quale non vi sarebbe sollecitazione elastica. In realtà, anche in questa posizione (dislocazione 0 nm) vi è un certo grado di sollecitazione elastica. Questa è generata proprio dalla pressione osmotica proteica:

$$dG = n f dl - PdV_w$$

dove n è il numero totale delle molecole proteiche sollecitate; f è la sollecitazione elastica, dl è la dislocazione, P è la variazione del potenziale chimico dell'acqua espresso in unità pressorie e V_w è il volume dell'acqua spostata.

L'entità del minimo di energia del ponte actomiosinico è pertanto funzione della pressione osmotica proteica del sistema e non solo della costante di formazione del complesso actomiosinico.

Due fenomeni caratterizzano l'interazione dei filamenti bipolari di miosina con l'adenosina difosfato (sale di magnesio) alla pressione osmotica proteica di 18 kPa:

- a.) il variare della concentrazione della miosina in funzione della concentrazione del nucleotide
- b.) l'anomalia del legame.

All'equilibrio, la concentrazione della miosina aumenta da 0.766 mM a 0.92 mM con l'aumentare del MgADP da 0 a 0.8 mM e diminuisce da 0.92 a 0.8 mM per l'ulteriore aumento del MgADP da 0.8 a 2.0 mM. L'incremento della concentrazione del MgADP da 0 a 0.8 mM è accompagnato dalla espulsione di ~187 litri di acqua per mole di miosina, vale a dire dall'incremento dell'energia libera della componente proteica. L'ulteriore incremento del MgADP da 0.8 a 2 mM è accompagnato dalla riassunzione di 118 litri di acqua per mole di miosina, vale a dire dal decremento dell'energia libera della componente proteica.

Questi fenomeni indicano che la ripartizione della miosina, fra miosina libera, complesso miosina-ADP e complesso miosina-(ADP)₂, influenza l'equilibrio osmotico della soluzione.

La variazione dell'energia libera è generalmente riferita al procedere della reazione nel suo complesso, cioè alla somma delle energie libere dei prodotti meno la somma delle energie libere dei reagenti. Se si rappresentano graficamente le variazioni delle energie libere degli stati di equilibrio dei singoli componenti del sistema, cioè la miosina libera, la miosina-ADP e la miosina-(ADP)₂, in funzione della concentrazione del nucleotide, le tre curve che ne derivano convergono tutte sul valore zero dell'ascissa. In realtà, la loro posizione relativa si ottiene solo sommando a ciascuna di esse la corrispondente energia libera

standard. Cosa che abitualmente non si fa, si apprezza la variazione dell'energia libera della reazione, ignorando le variazioni delle energie libere dei singoli componenti.

L'interazione tra actina e miosina è stata studiata in presenza di una pressione osmotica costante, pari a 18 kPa, in soluzioni contenenti le due proteine in rapporto molare 2.6:1, ovvero il rapporto stechiometrico nella banda A del muscolo scheletrico.

Nel sistema actomiosinico ricostruito su queste basi, la distanza media fra i filamenti di miosina è di 34.2 nm, equivalente alla distanza che si riscontra nella fibra intatta del muscolo in rigor per lunghezze del sarcomero di 3.38 μm . A questa lunghezza, il muscolo sviluppa circa il 20% della tensione massima (Gordon et al., 1976).

Il sistema actomiosinico è molto più complesso di quelli costituiti da soli filamenti di actina o miosina. Per questo le variazioni dell'energia libera del sistema devono essere correlate alla concentrazione totale di miosina, invece che ripartite tra miosina libera e complessi actomiosinici.

Le interazioni della miosina con l'actina F e con la tropomiosina-actina F sono caratterizzate da decrementi dell'energia libera del sistema di 2.17 e 2.29 RT/mole di miosina, rispettivamente; una quota modesta, ~11%, se riferita all'energia libera di idrolisi dell'ATP (Hill, 1977). L'introduzione della troponina rende il sistema sensibile alle variazioni della concentrazione dello ione calcio. La conversione del complesso troponina-tropomiosina-actina F (EGTA) \rightarrow troponina-tropomiosina-actina F (CaCl_2) è endoergonica per 0.28 RT/mole di actina. La conversione del complesso troponina-tropomiosina-actina F-miosina (EGTA) \rightarrow troponina-tropomiosina-actina F-miosina (CaCl_2) è endoergonica per 0.6 RT/mole di miosina.

Per quanto chiaramente evidenziabile, questa differenza di energia libera non è tale da spiegare su sole basi termodinamiche, lo stato refrattario del muscolo alle basse concentrazioni di Ca^{2+} .

Nello studio della trasduzione chimico-meccanica, cioè della connessione fra il ciclo actomiosinico (idrolisi dell'ATP) e lo sviluppo della forza contrattile, il contributo della pressione osmotica proteica non viene preso in considerazione. Si ammette che una trazione esercitata sul sarcomero in rigor aumenti l'energia libera dei ponti actomiosinici associati, ma non si riconosce che la trazione aumenti l'energia libera dei ponti dissociati. Questo

atteggiamento sembra derivare dal convenzionalismo introdotto da Hill nel 1977, secondo il quale:

- a.) gli stati del ponte actomiosinico sono caratterizzati da vari livelli di energia libera
- b.) l'energia libera di un ponte actomiosinico associato è data dall'energia libera in assenza di deformazione più l'energia libera dovuta alla deformazione elastica.

Secondo questa definizione, l'energia libera dei ponti dissociati non cambia con la trazione. Questo formalismo è incompleto, in quanto ignora il contributo dell'acqua.

Se si considera un volume della banda A del sarcomero, contenente n_{AT} moli di ponti actomiosinici associati, n_{DI} moli di ponti actomiosinici dissociati, n_A moli di monomeri di actina non impegnati nel legame con la miosina e n_W moli di acqua, a temperatura e pressione costanti, lo stato del sistema è definito da:

$$(\delta G/\delta f) df = n_{AT} d\mu_{AT} + n_{DI} d\mu_{DI} + n_A d\mu_A + n_W d\mu_W$$

dove, G, f, n e μ indicano, rispettivamente, l'energia libera, la forza applicata, il numero delle moli e il potenziale chimico. Si suppone anche che, durante l'applicazione della forza, i ponti actomiosinici associati non si possano scindere, cosicché il numero di moli dei componenti non varia.

Se si ipotizza che, a causa della trazione, possa variare solo l'energia libera dei ponti actomiosinici associati, $d\mu_W = d\mu_{DI} = d\mu_A = 0$, l'equazione appena vista si riduce a:

$$(\delta G/\delta f) df = n_{AT} d\mu_{AT}$$

che descrive l'effetto della trazione sui ponti actomiosinici associati.

In soluzioni proteiche concentrate, tuttavia, gli equilibri dell'acqua vengono turbati da molti fattori, come lo rivela l'insorgere di fenomeni osmotici:

- a.) A 18 kPa, la pressione osmotica proteica fisiologica del muscolo scheletrico (Maughan e Godt, 2001), CaCl_2 0.2 mM induce il rilascio di 38.7 litri di acqua per mole (come monomero di actina) di filamento di actina calcio-regolato (Schwienbacher et al., 1995).

- b.) Nelle stesse condizioni, MgADP 1 mM induce il rilascio di 187 litri di acqua per mole (come miosina) da una soluzione di filamenti di miosina, mentre l'ulteriore incremento a 2 mM del MgADP induce la riassunzione di 118 litri di acqua per mole di miosina.
- c.) La formazione di actomiosina è accompagnata da una ingente assunzione di acqua.

Questi effetti indicano che la formazione del ponte actomiosinico e la successiva sollecitazione meccanica non possono non essere accompagnati da significative perturbazioni degli equilibri dell'acqua di solvatazione dell'actina e della miosina e, quindi, da variazioni del potenziale chimico dell'acqua. E' perciò necessario introdurre il termine "acqua" nella suddetta equazione, che diventa:

$$(\delta G/\delta f) df = n_{AS} d\mu_{AS} + n_W d\mu_W$$

La differenza tra le due equazioni è fondamentale. Per la prima, "il formalismo di Hill", la sollecitazione meccanica è completamente assorbita dai ponti actomiosinici associati. Per l'ultima equazione, parte della sollecitazione meccanica accresce l'energia delle molecole d'acqua di solvatazione dei ponti actomiosinici associati, promuovendone così il disassorbimento e l'aumento del potenziale chimico. E' chiaro che, se la sollecitazione meccanica influenza il potenziale chimico dell'acqua, la stessa sollecitazione influenza, sia pure indirettamente, il potenziale chimico dei ponti actomiosinici dissociati e dei monomeri del filamento sottile non impegnati in legami con la miosina. Entrambi i componenti sono stabilizzati dall'interazione con le molecole di acqua di nuovo rilascio, con relativa diminuzione della propria energia libera. Il sistema è quindi descritto correttamente dall'equazione

$$\frac{\delta G}{\delta f} df = n_{AT} d\mu_{AT} + n_{DI} d\mu_{DI} + n_A d\mu_A + n_W d\mu_W$$

in cui la sollecitazione meccanica influenza il potenziale chimico di tutti e quattro i componenti del sistema.

L'effetto della sollecitazione meccanica sul potenziale chimico dell'acqua è trascurabile in soluzioni proteiche diluite, mentre è estremamente rilevante nel muscolo, una soluzione altamente non ideale, nella quale la concentrazione delle proteine è nell'ambito mmolare e, tra di esse, vi è una forte competizione per l'acqua.

La sollecitazione meccanica provoca il rilascio di molecole di acqua dai ponti actomiosinici associati. Queste molecole sono immediatamente captate dai ponti dissociati e dai monomeri di actina non impegnati in legami con la miosina. Esiste, quindi, una stretta connessione tra la sollecitazione meccanica e quella osmotica. In questo modo, se un sistema è sollecitato osmoticamente, la componente proteica è sollecitata elasticamente, mentre se la proteina è sollecitata elasticamente, il microambiente circostante viene sollecitato osmoticamente:

$$dG = n f dl - PdV_w$$

Naturalmente, gli effetti delle sollecitazioni osmotica e meccanica non coincidono completamente: la prima agisce direttamente su tutte le proteine della soluzione; la seconda, meccanica, agisce direttamente soltanto su un componente, il ponte actomiosinico associato, e influenza indirettamente (tramite l'acqua) i ponti actomiosinici dissociati e i monomeri di actina che non sono impegnati nel legame con la miosina nel filamento sottile. La sollecitazione osmotica, inoltre, aumenta il potenziale chimico di tutti i componenti, ad esclusione dell'acqua. La sollecitazione meccanica, al contrario, aumenta il potenziale chimico dei ponti actomiosinici associati e transitoriamente anche quello dell'acqua. Quest'ultima, a sua volta, influenza, diminuendoli, i potenziali chimici dei ponti actomiosinici dissociati e i monomeri liberi di actina.

Il filamento di actina non è solo un componente del sarcomero, ma esplica innumerevoli altre funzioni nel citoscheletro. Forse per questo è stato sempre vivo il desiderio di costruirne dei modelli. I primi sono stati generati da immagini ottenute per diffrazione ottica di paracrystalli di actina (Spudich e Watt, 1971). In tali modelli vengono delineati i contorni delle masse dei monomeri e viene risolto il contributo della tropomiosina. Il diametro del filamento di actina è stimato tra i 7 nm (Spudich e Watt, 1971) e gli 8 nm (Moore et al., 1970).

Successivamente, vengono utilizzate immagini ottenute per diffrazione ai raggi X:

- di gel orientati di actina F: il modello di Heidelberg (Holmes et al., 1990);
- di fibre di profilina-actina: il modello "elica-nastro" (Schutt et al., 1989, 1993);

- di sartorio rilassato in vivo: il modello di Egelman-Padron (1984).

Nel modello di Heidelberg, si definiscono la posizione e la natura di numerosi contatti fra monomero e monomero e si assegna al filamento un diametro di 9.5 nm. Il filamento di Heidelberg è generato integrando la diffrazione a raggi X di un gel orientato di actina (Popp et al., 1987) con la diffrazione a raggi X del monomero di actina nel complesso actina-DNAse I (Kabsch et al., 1990). Il modello, dapprima costruito ipotizzando l'indipendenza dei quattro domini del monomero di actina (Holmes et al., 1990), è successivamente ridefinito con l'uso di vari algoritmi (Lorenz et al., 1993; Tirion et al., 1995).

Il modello "elica-nastro" si fonda sull'analisi della struttura del complesso cristallino profilina-actina. Tale modello differisce completamente da quello di Heidelberg, in quanto postula la possibilità di una conversione reversibile filamento-nastro. In questo senso, il modello non è rigido.

Il modello di Egelman-Padron (1984) è creato integrando la diffrazione ai raggi X del sartorio rilassato di rana in vivo e le fasi, determinate in microscopia elettronica, di singoli filamenti di actina. Il diametro assegnato al filamento in questo modello è di 10 nm.

In opposizione ai modelli precedentemente descritti, il "filamento ad ala battente" è idrato, non rigido, con diametro e contatti monomero-monomero variabili (Grazi, 1997).

L'idea di proporre questo modello deriva dalla grande variabilità di valori del diametro del filamento di actina che vengono riportati in letteratura.

L'osservazione diretta di sezioni sottili di muscolo mostra diametri anche molto inferiori rispetto a quelli dei modelli finora citati. Da qui l'interrogativo se il diametro del filamento di actina non sia variabile e, di conseguenza, se la struttura del filamento non sia affatto rigida.

Il diametro del filamento di actina idrato diminuisce significativamente con l'aumentare della pressione osmotica proteica. Si giunge a questa conclusione attraverso semplici studi di pressione osmotica, tenendo conto della transizione dei filamenti in fasci, indotta dall'aumento della pressione osmotica proteica (Suzuki et al., 1989). La transizione introduce un vincolo geometrico, che consente di correlare la distanza media interfilamento

(d), ovvero il diametro medio del filamento idrato, alla concentrazione di actina m , secondo l'equazione

$$d = \left\{ \frac{[(0.718 \times M_r \times m) + 1000 + 5 \times 4]}{m \times N \times 2.73 \times 10^{-7} \times 2\sqrt{3}} \right\}^{1/2} \text{ cm}$$

dove M_r è la massa molecolare del monomero di actina; N è il numero di Avogadro; 0.718 mL/g è il volume parziale specifico dell'actina F ; 1000+5 è il volume dell'acqua + il volume dei sali in cm^3 ; 2.73×10^{-7} cm è il valore della ripetizione assiale del monomero di actina lungo l'elice genetica (Hanson e Lowy, 1963).

Equilibrando soluzioni di actina a pressioni osmotiche proteiche crescenti, ma inferiori al livello che induce il cambiamento di fase, si rimuove prevalentemente l'acqua "extrafilamento". A cambiamento di fase avvenuto, l'ulteriore aumento della pressione rimuove buona parte dell'acqua "intrafilamento", cioè strutturale, diminuisce la distanza media interfilamento, ne altera l'architettura e quindi i rapporti spaziali fra i monomeri e i contatti intramonomero (Grazi, 1994; Schwienbacher et al., 1995).

Nel modello ad ala battente, questi eventi sono spiegati con la diminuzione dell'angolo α , formato tra l'asse lungo del monomero e l'estremità puntuta dell'asse longitudinale del filamento. A bassa pressione osmotica proteica, <1.7 kPa, si assume che il diametro del filamento di actina sia 9.5 nm (Holmes et al., 1990) e l'angolo $\alpha = 90^\circ$. Con l'aumento della pressione osmotica proteica, ad esempio a 18 kPa, l'angolo α diminuisce e il diametro del filamento di actina idrato diminuisce da 9.5 a 8 nm.

In seguito all'aumento della pressione osmotica, la diminuzione del volume della soluzione potrebbe essere spiegata anche dall'interpenetrazione dei filamenti, che si comporterebbero come corpi perfettamente rigidi. In questo caso, non varierebbe il diametro del filamento.

Il modulo elastico di trazione della fibra muscolare ha valori finiti. Poiché, a parte il verso, la flessione del monomero rispetto al filamento e la trazione sulla fibra sono operazioni identiche, si deve concludere che, se il monomero può essere deformato elasticamente da una sollecitazione meccanica, esso deve essere deformato elasticamente anche da una sollecitazione osmotica (Grazi et al., 1993; Schwienbacher et al., 1995). La concezione che

il filamento di actina sia un corpo perfettamente rigido e non sia deformabile elasticamente è quindi fisicamente insostenibile.

La proteolisi controllata consente di scindere la miosina nei due domini globulari (S1) e nella “coda”. I frammenti S1, le cosiddette “teste” della miosina, ospitano il sito attivo per l’attività ATPasica e le superfici per l’interazione con il monomero dell’actina F (vedi Figura 5).

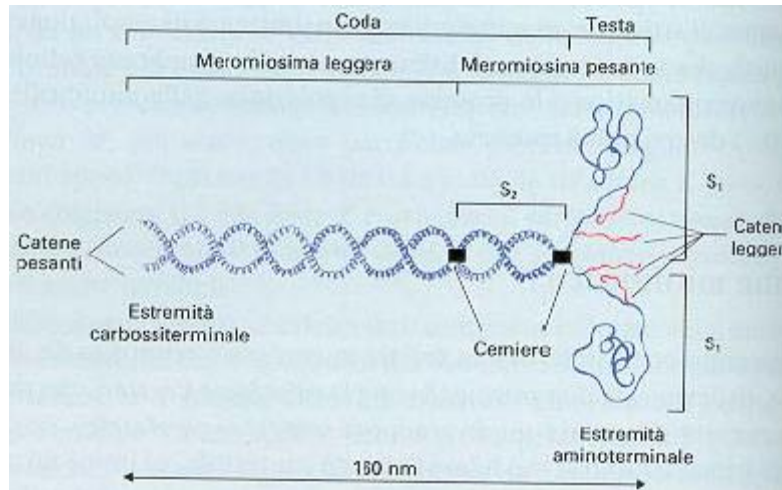
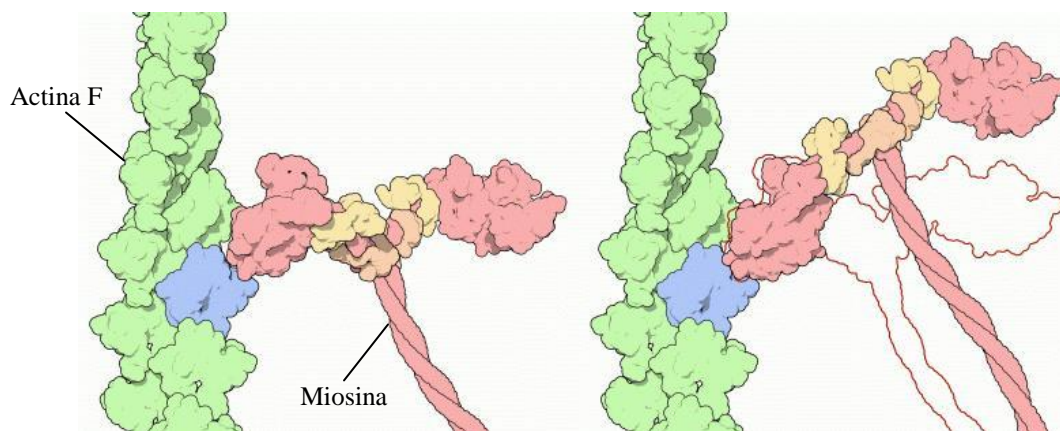


Figura 5. Struttura della miosina.

Miscelando il frammento S1 con il monomero del filamento di actina, nel rapporto molare 1:1, si ottiene il complesso rigor actina F-S1:



In uno studio di chimica fisica, è utile conoscere la frazione del volume totale occupata da ciascun componente. A tale scopo, è opportuno attribuire una forma cilindrica ad ogni

particella, la cui lunghezza è data dal diametro del filamento a bassa pressione osmotica proteica. Il volume della particella idrata è determinato dal volume parziale specifico e dalla massa equivalente. Se si conoscono il volume e la lunghezza, si può calcolare il raggio del cilindro. Il monomero di actina è quindi rappresentato da un cilindro di lunghezza pari a 4.75 nm (Holmes et al., 1990) e di raggio di 1.83 nm. Il monomero di actina decorato con S1 è rappresentato da un cilindro di 11.15 nm di lunghezza e di raggio pari a 2.318 nm.

Come l'actina F, anche il complesso rigor actina F-S1 soggiace ad un preciso vincolo geometrico, che impone una ben precisa relazione fra la molalità dell'actina (come monomero) e la lunghezza complessiva dei filamenti in soluzione.

Secondo il nostro modello, la pressione osmotica proteica deforma il filamento di actina decorato. La deformazione è prodotta dalla forza, f , parallela all'asse longitudinale del filamento ed è bilanciata dalla reazione elastica della struttura. A 18 kPa, l'angolo α è di 61.5° per il monomero di actina e di 84° per il monomero di actina-S1. Al momento dell'associazione, l'angolo del monomero di actina è 61.5° , quindi uguale a quello del monomero actina-S1. Poiché questa non è la posizione di equilibrio imposta dalla pressione osmotica proteica di 18 kPa, si sviluppa una forza contrattile, definita da:

forza contrattile = reazione elastica del complesso rigor a $61.5^\circ - f$ a 61.5°

La reazione elastica del complesso rigor a 61.5° è data dalla somma di f per $\alpha = 84^\circ$ più l'incremento che si verifica per la diminuzione di α da 84° a 61.5° .

La forza è diretta verso l'estremità barbata del filamento di actina e promuove lo spostamento del filamento stesso verso il centro del sarcomero.

Il modello ad ala battente, in conclusione, descrive il sistema contrattile come una soluzione proteica altamente non ideale. Questa rappresentazione stilizzata, che ignora il dettaglio strutturale del sarcomero, è certamente più adeguata delle rappresentazioni più rispettose della morfologia, che impongono però l'idealità del sistema.

In realtà, l'associazione spontanea delle proteine del sistema contrattile a costituire il sarcomero è concomitante alla non idealità della soluzione. E' di fondamentale importanza,

quindi, determinare le attività di queste proteine, oltre a valutare le masse e le concentrazioni, per avere chiaro il processo di contrazione muscolare, prima ancora di studiarne la cinetica di reazione.

La distribuzione di lunghezza dei filamenti di actina: il modello di Biron

L'actina, nella forma filamentosa, è il principale componente strutturale del citoscheletro e riveste un ruolo attivo nel mantenimento della morfologia delle strutture contrattili. I filamenti sono complessi dinamici che polimerizzano e depolimerizzano continuamente; le loro proprietà fisiche (forza meccanica, risposta viscoelastica, ecc.) dipendono dalle caratteristiche dei filamenti che ne formano la struttura e, in particolare, dalla loro distribuzione in base alla lunghezza.

Esperimenti con actina F, in vitro, in condizioni fisiologiche, mostrano un'ampia distribuzione esponenziale di lunghezze (Xu et al., 1999; Littlefield e Fowler, 1998; Edelstein-Keshet e Ermentrout, 1998). Allo stesso tempo, le teorie sull'equilibrio dell'assemblaggio di polimeri e micelle prevedono una distribuzione esponenziale determinata dalla competizione tra l'energia all'estremità del filamento e l'entropia traslazionale (Bar-Ziv e Safran, 1994). In effetti, proteine come la gelsolina (Yin e Stull, 1999) modificano la lunghezza media dei filamenti, l , ma non il coefficiente della varianza della distribuzione:

$$r_{\sigma} \equiv \sigma_l / l$$

dove σ_l è la deviazione standard della distribuzione.

Recentemente, Biron e collaboratori (2006) hanno osservato che l'aggiunta di proteine "crosslinker" (cioè che partecipano alla formazione di legami crociati), ad una soluzione di actina F, favorisce la tendenza dei filamenti a sovrapporsi. Di conseguenza, la forma della distribuzione cambia e r_{σ} viene ridotto approssimativamente della metà (Biron e Moses, 2004). Un comportamento simile viene osservato anche in presenza di aggregati miosinici (Kawamura e Maruyama, 1970).

Secondo Biron, il restringimento della distribuzione di lunghezza è un effetto generale, che ha luogo in seguito all'attrazione a corto raggio tra i filamenti. Sia le attrazioni mediate da deplezione, in soluzioni contenenti polimeri inerti (PEG), sia le interazioni elettrostatiche indotte dai controioni multivalenti (spermina) danno luogo ad attrazioni che fanno

restringere significativamente la distribuzione. Queste forze aumentano la tendenza dei filamenti a disporsi parallelamente l'uno rispetto all'altro e simultaneamente ad accrescersi (Figura 6).

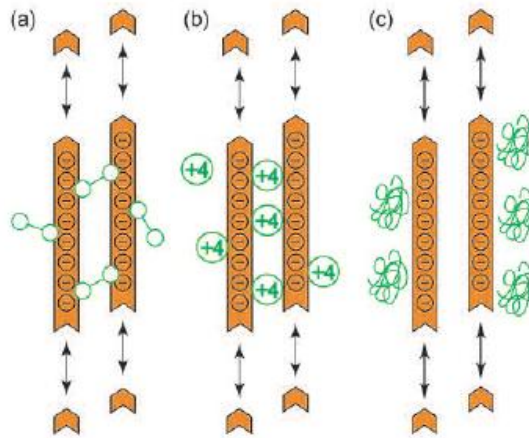


Figura 6. Quadro schematico dei tre tipi di attrazione e il loro effetto sulla polimerizzazione dell'actina:
a) proteine “crosslinker”, b) controioni polivalenti,
c) polimeri inerti che danno origine ad attrazioni mediate da deplezione.

Come risultato, l'andamento della distribuzione cambia drasticamente: da curva esponenziale a Gaussiana, con un picco ben definito alle lunghezze più grandi.

Genericamente parlando, le distribuzioni di tipo esponenziale, in cui l'ampiezza coincide con la media, sono tipiche dei sistemi dove l'entropia prevale rispetto le energie di interazione; le distribuzioni di tipo Gaussiano, in cui l'ampiezza è di molto inferiore alla media, sono caratteristiche dei sistemi dove prevalgono le energie di interazione.

Le cellule, inoltre, rappresentano un ambiente biochimico, dove la concentrazione di macromolecole è rilevante. Questo porta alla formazione delle attrazioni mediate da deplezione, che possono essere riprodotte, in vitro, aggiungendo polimeri inerti, come il polietilenglicole.

La polimerizzazione dell'actina è un processo dinamico e molte teorie che trattano le distribuzioni di lunghezza (Edelstein-Keshet e Ermentrout, 1998; Flory, 1956; Oosawa e Kasai, 1962) si basano su equazioni cinetiche che descrivono i vari processi coinvolti (ad esempio, l'associazione dei monomeri, la dissociazione, ecc.). D'altro canto, come notato

da Flory (1956), teorie cinetiche che trattano distribuzioni allo stato stazionario possono essere spesso sostituite da altre che riguardano l'equilibrio. In particolare, la presenza di proteine (come la gelsolina, la cofilina, ecc.) fa sì che la distribuzione dei filamenti segua la distribuzione tipica dello stato di equilibrio e che non dipenda dalle instabilità dinamiche.

In effetti, la distribuzione a carattere esponenziale che è tipica dell'actina F viene riscontrata anche nei sistemi dove le molecole surfattanti formano micelle lineari e l'equilibrio è mantenuto attraverso lo scambio di queste molecole con la soluzione (Bar-Ziv e Safran, 1994).

L'approccio all'aspetto che riguarda l'equilibrio ha il vantaggio di offrire una struttura naturale per studiare sistematicamente l'effetto delle interazioni inter-filamento.

Il punto di partenza teorico è la conseguente energia libera (per unità di volume) di una soluzione costituita da concentrazioni, ρ_l , di filamenti di lunghezza $l = 1, 2, 3, 4, \dots$:

$$f = \sum_l \rho_l [\ln(\rho_l v_0) - 1 + \alpha l + b] + \sum_{l < l'} w(l, l') \rho_l \rho_{l'} - \mu \sum_l l \rho_l \quad (1)$$

Il termine logaritmico rappresenta l'entropia traslazionale dei filamenti, dove v_0 è il volume del monomero. Tutte le energie vengono espresse in unità di energia termica $k_B T$. L'energia di un singolo filamento è costituita da un termine l -dipendente, dovuto all'interazione tra monomeri vicini, e un termine l -indipendente, che rappresenta sostanzialmente l'energia all'estremità del filamento, b . Il termine che segue rappresenta l'interazione tra due corpi, dove $w(l, l') = \int d\mathbf{r} d\mathbf{\Omega} [1 - \exp(-u_{l, l'}(\mathbf{r}, \mathbf{\Omega}))]$ è il secondo coefficiente viriale di un paio di filamenti con lunghezze l, l' che sono posti a una certa distanza tra loro, \mathbf{r} , con angolo $\mathbf{\Omega}$ (Onsager, 1949).

Infine, il moltiplicatore di Lagrange, μ , viene aggiunto all'energia libera per ottenere la concentrazione monomerica totale $\sum_l l \rho_l = \rho_m$.

La distribuzione di lunghezza, all'equilibrio, è ottenuta portando al minimo l'energia libera rispetto a ρ_l :

$$\rho_l = \rho_0 \exp \left(-\alpha l - \sum_{l'} w(l, l') \rho(l') \right) \quad (2)$$

dove $\rho_0 = \exp(-b)/v_0$ e $\alpha = \alpha - \mu$.

In assenza di interazioni interfilamento, la distribuzione ρ_l è esponenziale, con una lunghezza media del filamento $\langle l \rangle_0 = 1/a = (\rho_m/\rho_0)^{1/2}$ e $r_\sigma = 1$.

Quando vengono introdotte le attrazioni crociate interfilamento, il nuovo contributo porta a

$$W_{\text{att}}(l, l') = \pi/2 l l' \delta (1 - e^{-u_0}) + 2\pi d \delta \left\{ 2l_1 \left[1 + (e^{-z} - 1) / z \right] + (l_2 - l_1) [1 - e^{-z}] \right\} \quad (3)$$

dove u_0 è l'attrazione a corto raggio per monomero e δ è l'entità dell'attrazione.

Il primo termine rappresenta il contributo da parte delle configurazioni dove i filamenti si intersecano con ampi angoli, mentre il secondo è il contributo delle configurazioni parallele, con

$$z \equiv (l_1 / d) u_0, l_1 \equiv \min(l, l') \text{ e } l_2 \equiv \max(l, l')$$

Le equazioni (2) e (3) permettono di determinare la distribuzione di lunghezza $\{\rho_l\}$.

Quando l'attrazione diventa più forte, nella distribuzione si sviluppa un picco, in corrispondenza delle lunghezze più grandi. Dal momento che u_0 è definito come l'energia di interazione per monomero, è la grandezza di lu_0 che determina se le interazioni interfilamento sono abbastanza forti da modificare la distribuzione. L'effetto nel coefficiente di varianza r_σ è non-monotonico. In un primo tempo, la proporzione supera l'unità, ma raggiunge velocemente un massimo e scende al di sotto di uno. L'incremento iniziale che si verifica in r_σ è dovuto essenzialmente alla distribuzione bimodale di lunghezza a valori intermedi di u_0 e il conseguente decremento è dato dal prevalere dei filamenti più lunghi.

A causa della natura "inquietata" di questa approssimazione, ciò non può descrivere correttamente il comportamento in presenza di attrazioni a corto raggio. Con questo limite, di forti interazioni, il comportamento può essere studiato prendendo in considerazione la nuova forma che viene ad avere la distribuzione

$$\rho_l \approx \begin{cases} \rho_0 e^{-al + (gl^* \rho^*) l_2} & l \leq l^* \\ \rho_0 e^{-(a - gl^* \rho^*) l} & l \geq l^* \end{cases} \quad (4)$$

dove $g \sim \pi u_0^2$.

Mentre la distribuzione di lunghezza dei filamenti lunghi ($l \geq l^*$) rimane a carattere esponenziale, quella dei filamenti più corti ($l \leq l^*$) presenta due massimi, uno a $l = 0$ e l'altro a $l = l^*$. Inoltre, mentre per valori bassi di $|u_0|$ la distribuzione si riduce a quella esponenziale d'origine, per valori elevati presenta un picco ristretto a $l = l^*$.

In presenza di tre incognite a , l^* e ρ^* , la funzione della distribuzione, ρ_l , può essere calcolata risolvendo le equazioni che seguono:

- la condizione di conservazione del monomero $\int dl l \rho_l = \rho_m$
- la condizione di coerenza $\rho^* = \rho_0 \exp(-a + gl^*3 \rho^*)$
- la condizione che $\langle l \rangle = l^*$

Riassumendo, in presenza di attrazioni a corto raggio, il coefficiente di varianza della distribuzione di lunghezza dell'actina F risulta ridotto, a causa di un aumento nella tendenza dei filamenti a disporsi parallelamente l'uno rispetto all'altro, anche in assenza di legami chimici crociati. Questo fenomeno è alquanto generale e non dipende dal meccanismo di attrazione: le attrazioni possono essere indotte da controioni multivalenti, possono essere elettrostatiche; possono aver luogo in ambienti ad elevata concentrazione macromolecolare (cellula), come risultato di attrazioni mediate da deplezione, o possono essere indotte da proteine di legame, che legano i filamenti di actina tra loro, nel citoscheletro.

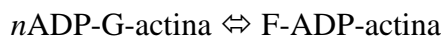
Allo stato stazionario, la distribuzione di lunghezza dei filamenti di actina è esponenziale (Kawamura e Maruyama, 1970) e presenta una media di 7 μm (2600 monomeri), indipendentemente dalla concentrazione iniziale del monomero, per soluzioni tra 5 e 100 μM (Sept et al., 1999). Questo tipo di distribuzione viene ampiamente alterato dalla presenza di cationi multivalenti (Strzelecka-Golaszewka, 1973; Grazi et al., 1982) o dall'incremento della pressione osmotica proteica (Suzuki et al., 1989; Schwienbacher et al., 1995). Questi fattori promuovono la conversione dei filamenti in fasci di filamenti. Una perturbazione, seppure di minore entità, della distribuzione esponenziale dell'actina F è

provocata anche dall' α -actinina, una proteina che, come abbiamo già visto, interagisce con l'actina per la formazione di legami crociati (Biron e Moses, 2004).

La pressione osmotica proteica modula la distribuzione di lunghezza dei filamenti di actina

In un lavoro pubblicato nel 2008 (Grazi e Pozzati), abbiamo correlato la pressione osmotica proteica alle variazioni di energia libera del monomero libero di actina e, utilizzando il modello di Biron e collaboratori (2006) discusso nelle pagine precedenti, abbiamo ulteriormente messo in relazione queste variazioni con i cambiamenti della distribuzione di lunghezza dei filamenti.

Questo è possibile a condizione che il sistema si trovi all'equilibrio:



Se l'equilibrio osmotico viene turbato dall'aggiunta di una macromolecola esterna, si crea una nuova distribuzione di lunghezza dei filamenti, dovuta all'instaurarsi di attrazioni a corto raggio. Un modello di questa nuova distribuzione può essere realizzato a condizione che si conosca il valore corrispondente alle attrazioni a corto raggio, che causa la variazione di energia libera del monomero libero, calcolata secondo Biron, pari a quella ottenuta dagli esperimenti osmotici.

Dialisi dell'actina F

Soluzioni di actina F, 120-168 μM come monomero, sono state dializzate per 24h a 2°C (prima dialisi) contro una soluzione tampone, contenente, per litro di acqua: KCl 0.1 M, trietanolamina 0.01 M, MgCl_2 , NaN_3 e 2-mercaptoetanololo 2 mM, ciascuno, ATP e CaCl_2 , 0.1 mM, ognuno. Il pH è stato mantenuto a 7.45 con HCl 6N (tampone A). La soluzione di actina dializzata è stata diluita con lo stesso tampone alla concentrazione proteica prescelta per l'esperimento, 12-48 μM . I 10-12 ml della soluzione finale sono stati sottoposti ad una seconda dialisi, di una notte, a 21°C contro 2 litri di tampone A. Il sacchetto di dialisi è stato lasciato aperto all'estremità superiore, facendo attenzione a mantenere allo stesso

livello, le soluzioni all'interno e all'esterno dello stesso. A fine dialisi, sono state determinate la concentrazione e la viscosità dell'actina. La viscosità specifica dell'actina F 19.2 μM è risultata 0.8, misurata con un viscosimetro di Ostwald, mantenuto a $21 \pm 0.1^\circ\text{C}$. La frazione non-polimerizzabile, saggiata con il metodo Blue Comassie (Bradford, 1976), non è mai stata maggiore di 0.11 μM su 19.2 μM . La frazione non-polimerizzabile corrisponde alla frazione proteica che non sedimenta per centrifugazione della soluzione proteica, a 393,000g per 10 minuti a 21°C in rotore TL100 della centrifuga Beckmann TL100. Per eseguire l'esperimento, aliquote da 1 ml della soluzione actinica sono state trasferite, con micropipetta Pedersen da 1 ml, in sacchetti di dialisi e quindi dializzate, a 21°C , contro 100 ml di tampone A, tenuto costantemente in agitazione, contenuto in bottigliette con tappo chiuso (nella cui sommità è stato creato un piccolo foro), immerse in bagnetto termostaticamente controllato entro $\pm 0.1^\circ\text{C}$. Anche in questo caso, il sacchetto di dialisi era aperto all'estremità superiore, con le soluzioni, all'interno e all'esterno, poste allo stesso livello. La dialisi è stata prolungata fino a 12 giorni, controllando il volume della soluzione proteica di tanto in tanto. Alla fine dell'esperimento, sono stati misurati il volume, con micropipette Pedersen, e la viscosità. Solitamente, il millilitro di soluzione proteica è stato recuperato totalmente. Una possibile causa può essere la durata degli esperimenti. Abbiamo riscontrato che l'actina F è stabile, a condizione che alle soluzioni venga aggiunto 2-mercaptoetanololo 2 mM. Per controllare la stabilità dell'actina F è stata misurata la viscosità, che, alla fine dell'esperimento, è stata riscontrata essere pari all'80-100% di quella iniziale. Inizialmente, la viscosità specifica, η_{sp} , dell'actina F 19.2 μM era 0.8. Alla fine, i campioni sono stati riuniti, depolimerizzati contro un tampone contenente trietanolammina-HCl 5 mM, 2-mercaptoetanololo 2 mM, ATP 0.1 mM e CaCl_2 0.1 mM, diluiti a 10 ml e ripolimerizzati con l'aggiunta di MgCl_2 2 mM. L'actina F era 17 μM , η_{sp} era 0.66, il decremento dovuto essenzialmente a perdite di natura meccanica.

Dialisi dell'actina F contro polietilenglicole 40,000

Per valutare la pressione osmotica, l'actina F è stata sottoposta a dialisi contro polietilenglicole (PEG) 40,000, nello stesso modo appena descritto, con la differenza che la terza dialisi è stata condotta aggiungendo 0.03-1.6g di PEG 40,000 alle aliquote di tampone

A da 100 ml ciascuna. Alla fine dell'esperimento, condotto per 9 giorni a 21°C, il volume di ogni campione è stato misurato con micropipetta Pedersen. Anche in questo caso, la viscosità è stata conservata per l'80-100%. L'aggiunta di PEG (la cui densità è 1.21g/ml) diminuisce la concentrazione dei piccoli elettroliti fino all'1.32%.

E' alquanto improbabile, tuttavia, che queste variazioni possano influenzare significativamente i risultati ottenuti.

Pressione osmotica macromolecolare indotta dal polietilenglicole

La pressione osmotica associata alle soluzioni contenenti PEG (fino a 5g per 100g di acqua) è stata misurata per mezzo di osmometri equipaggiati con membrane UH 100125 Schleicher e Schuell, M_r , cutoff 25,000. La pressione osmotica macromolecolare generata dal PEG è correlata alla concentrazione della macromolecola dall'equazione:

$$\text{pressione osmotica macromolecolare} = 980 (9c + c^{2.71}) \text{ dyne/cm}^2$$

dove c è la concentrazione del polietilenglicole (peso per 100 ml di soluzione).

Pressione osmotica proteica associata a soluzioni di actina F

Quando abbiamo sottoposto le soluzioni di 1 ml a dialisi contro tampone A, ci si aspettava che l'actina F, una specie non diffusibile, con il diminuire del potenziale chimico dell'acqua, avrebbe generato un flusso d'acqua verso l'interno, con un concomitante incremento del volume del compartimento che ospita la proteina. Nonostante la durata della dialisi sia stata prolungata, fino a 288h a 21°C, non è avvenuta alcuna variazione nel volume delle soluzioni (1 ± 0.005 ml). La modificazione del potenziale chimico dell'acqua indotta dall'actina F, in questo caso, è stata irrilevante.

Soluzioni di actina F equilibrate contro soluzioni di polietilenglicole 40,000

Soluzioni di actina F sono state sottoposte a dialisi contro un tampone contenente concentrazioni crescenti di PEG; in questo caso, il volume della soluzione proteica è diminuito significativamente, in funzione dell'incremento di concentrazione del PEG. La concentrazione finale di actina è stata calcolata utilizzando la formula:

$$\text{concentrazione finale} = \frac{\text{volume iniziale} \cdot \text{concentrazione iniziale}}{\text{volume finale}}$$

I risultati di questi esperimenti sono illustrati in Figura 7, dove la pressione osmotica macromolecolare (P) all'equilibrio è messa a confronto con la concentrazione actinica.

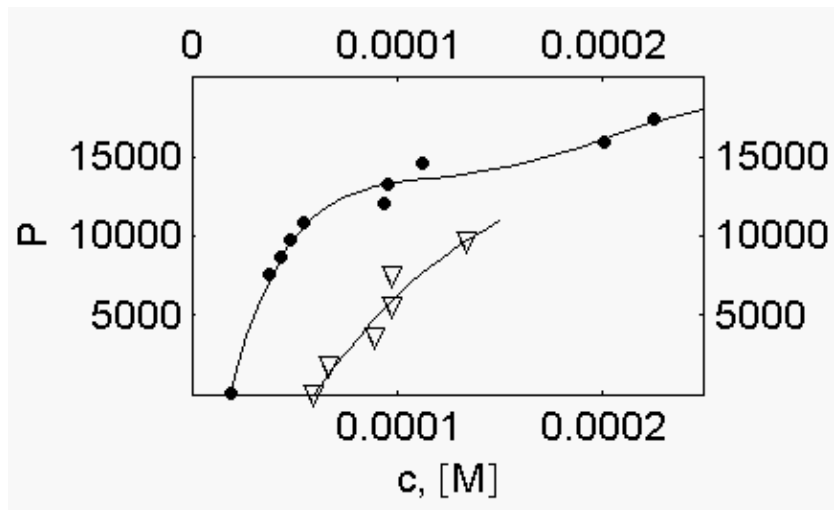


Figura 7. Pressione osmotica macromolecolare (dyne/cm²) in funzione della concentrazione di actina totale – Cerchi: concentrazione iniziale di actina, 19.18 µM; triangoli: concentrazione iniziale di actina, 60 µM.

Nella prima serie di esperimenti (cerchietti neri), la concentrazione iniziale dell'actina è 19.2 µM, come monomero. Inizialmente, questo campione è stato equilibrato contro tampone A, in assenza di polietilenglicole. Dopo 168h, a 21°C, il volume della soluzione, e quindi la sua concentrazione, è risultato invariato (1 ± 0.005 ml). Il resto dei campioni è stato equilibrato per lo stesso periodo di tempo, in presenza di concentrazioni crescenti di PEG. Alla fine dell'esperimento, il volume è stato misurato ed è stata calcolata la concentrazione di actina. La relazione tra la concentrazione totale di actina, c , e la pressione osmotica macromolecolare è data da

$$\text{pressione osmotica macromolecolare} = -17506.66 + 1.876 \cdot 10^9 c - 2.7338 \cdot 10^{11} c^{1.5} + 1.2539 \cdot 10^{13} c^2 - 8.7418 \cdot 10^{15} c^3 \text{ dynes/cm}^2 \quad (5)$$

Nella seconda serie di esperimenti (triangoli bianchi), la concentrazione iniziale dell'actina F è 60 µM, come monomero. Questo campione è stato equilibrato contro tampone A, senza

PEG. Dopo 173h a 21°C, non si sono riscontrate variazioni di volume (1 ± 0.005 ml). I restanti campioni sono stati equilibrati contro concentrazioni crescenti di PEG.

Alla fine dell'esperimento, la pressione osmotica macromolecolare è risultata

$$- 13761 + 2.8393 \cdot 10^8 c - 9.3939 \cdot 10^{11} c^2 + 9.544c^3 + 7.8378 \cdot 10^{11} c^4 \text{ dynes/cm}^2 \quad (6)$$

I risultati appena descritti dimostrano le diverse proprietà delle soluzioni di actina F a riposo e cimentate contro polietilenglicole. Una soluzione a riposo di actina 60 μM non sviluppa una pressione osmotica rilevante e il potenziale chimico dell'acqua nella soluzione è essenzialmente lo stesso del tampone A. Al contrario, la soluzione di actina F concentrata da 19.18 a 54.86 μM sviluppa una pressione osmotica macromolecolare di 10,852 dynes/cm^2 , con una variazione del potenziale chimico dell'acqua pari a

$\Delta\mu_w = - PV_M = - 10852 \cdot 18 = - 195336 \text{ erg/mole di acqua}$, oppure $- 7.877 \cdot 10^{-6} \text{ RT/mole di acqua}$

$\Delta\mu_w$ è la variazione del potenziale chimico dell'acqua e V_M il volume molare parziale dell'acqua, 18 cm^3 .

Il potenziale chimico dell'acqua della soluzione di actina F risulta essere più basso di $7.877 \cdot 10^{-6} \text{ RT/mole di acqua}$, rispetto al potenziale chimico dell'acqua del tampone A.

In questo modo, due soluzioni di actina F di identica concentrazione mostrano differenti comportamenti fisico-chimici. Questo fenomeno può essere facilmente spiegato, a condizione che la distribuzione di lunghezza dei filamenti, nei due casi, sia differente.

Pressione osmotica macromolecolare ed energia libera del monomero di actina

In effetti, ciò è intuibile dal momento che l'energia libera del monomero di actina varia in funzione della pressione osmotica macromolecolare associata alla soluzione actinica. La variazione di energia libera può essere calcolata integrando l'equazione

$$d\mu_1 = (w / m) V_M (dP / d m) d m$$

dove $\Delta \mu_1$ è la variazione del potenziale chimico del monomero libero di actina, P è la pressione osmotica proteica, w è il numero di moli di acqua, m è il numero di moli del monomero di actina e V_M il volume molare parziale dell'acqua.

Dopo sostituzione del termine P, sia con l'equazione (5) che con l'equazione (6), che correlano la pressione osmotica macromolecolare alla concentrazione totale di actina, ciò che ne risulta è rappresentato in Figura 8, che descrive l'incremento di energia libera per mole di monomero libero di actina, come funzione della concentrazione totale di actina.

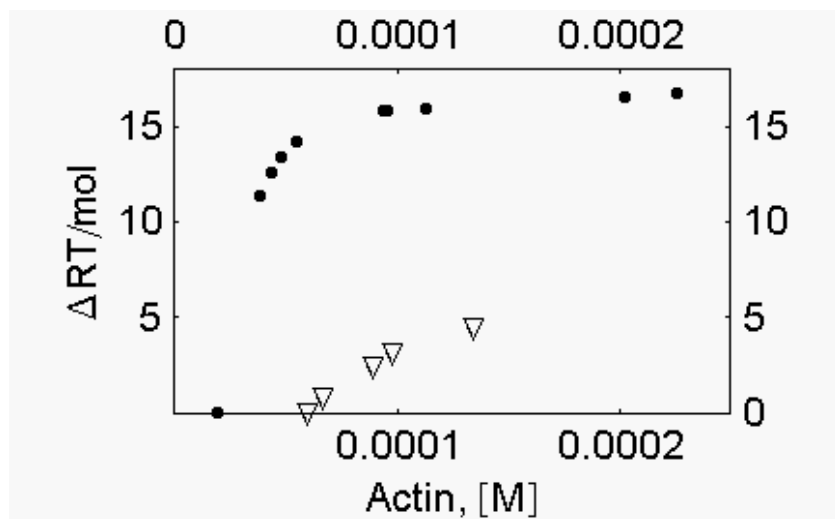


Figura 8. Variazione di energia libera del monomero libero di actina in funzione della concentrazione actinica totale.
 Cerchi: concentrazione iniziale di actina, 19.18 μM
 Triangoli: concentrazione iniziale di actina, 60 μM.

Nel primo esperimento (cerchi), l'aumento di concentrazione da 19.18 a 48 μM e a 226 μM incrementa l'energia libera del monomero libero di actina di 13.36 e di 16.77 RT/mole di monomero libero, rispettivamente. Nel secondo esperimento (triangoli), l'aumento della concentrazione totale da 60 a 98.18 μM e a 135 μM determina un incremento dell'energia libera del monomero libero di actina di 3.13 e 4.5 RT/mole di monomero libero, rispettivamente.

Calcolo della distribuzione di lunghezza dei filamenti allo stato stazionario

Secondo Sept e collaboratori (1999), la distribuzione di lunghezza dei filamenti di actina ha una media di ~ 7μm ed è indipendente dalla quantità totale di actina, tra 0 e 100 μM, come monomero.

Il modello di Biron offre l'opportunità di riprodurre la distribuzione osservata da Sept, utilizzando l'equazione (5). L'operazione viene eseguita assegnando il valore di 2560 (= $7000 \text{ nm}/2.73 \text{ nm}$) alla lunghezza numerica media, l^* , dove 2.73 nm è l'incremento di lunghezza per subunità actinica (Hanson e Lowy, 1963), fissando la lunghezza massima numerica dei filamenti a 25,600 (69888 nm) e l'attrazione a corto raggio per monomero, u_0 , a un valore molto basso, $-10^{-15}k_B T$, così da minimizzare le attrazioni a corto raggio e ottenere una curva esponenziale.

In Figura 9, la distribuzione di Sept è riprodotta per due concentrazioni di actina F, 19.18 e 110 μM , come monomero. Le due distribuzioni presentano la stessa lunghezza media dei filamenti, 7 μm . Tuttavia, la concentrazione del monomero libero differisce nei due casi, essendo 2.923 pM a 19.18 e 16.744 pM a 110 μM .

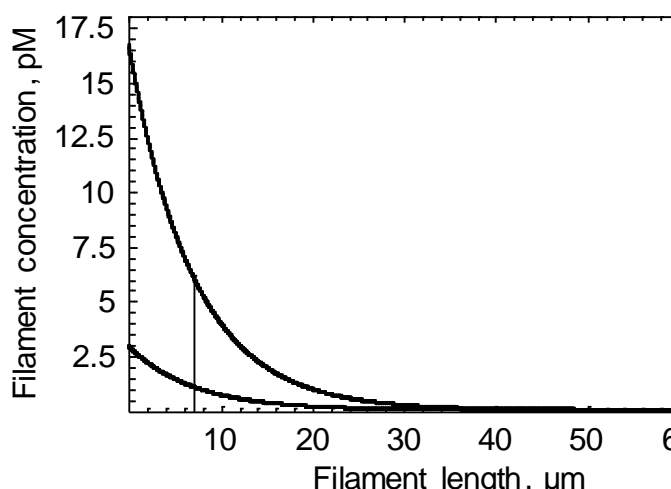


Figura 9. Distribuzione dei filamenti di actina in soluzioni di actina F. Curva superiore: concentrazione monomerica totale, 110 μM ; concentrazione del monomero libero, $1.6744 \cdot 10^{-11} \text{ M}$; curva inferiore: concentrazione monomerica totale, 19.18 μM ; concentrazione del monomero libero, $2.923 \cdot 10^{-12} \text{ M}$; la linea verticale indica la lunghezza media dei filamenti, 7 μm .

Distribuzione dei filamenti associata al loro minimo di energia libera

L'energia libera totale dei filamenti, che presentano la distribuzione illustrata in Figura 9, viene calcolata mediante l'equazione (1), tenendo conto della condizione di coerenza

$$\rho^* = \rho_0 \exp(-a + gl^*3 \rho^*).$$

A 19.18 μM , l'energia libera totale dei filamenti è $7.495 \cdot 10^{-9}$ RT per litro di soluzione; a 110 μM , essa è pari a $4.29 \cdot 10^{-8}$ RT per litro di soluzione. Questi valori, tuttavia, non rappresentano il livello minimo di energia libera dei filamenti. Un ulteriore decremento, infatti, si verifica con l'aumentare della lunghezza media. I limiti minimi vengono registrati ad una lunghezza media di 34,944 nm (12800 monomeri) e corrispondono a $1.5 \cdot 10^{-9}$ RT per litro di soluzione, a 19.18 μM di actina totale, e a $8.594 \cdot 10^{-9}$ RT per litro di soluzione, a 110 μM .

Al minimo di energia libera, tutti i filamenti di actina, inclusi i monomeri, presentano la stessa concentrazione, 0.0586 e 0.3357 pM a 19.18 e a 110 μM (Figura 10).

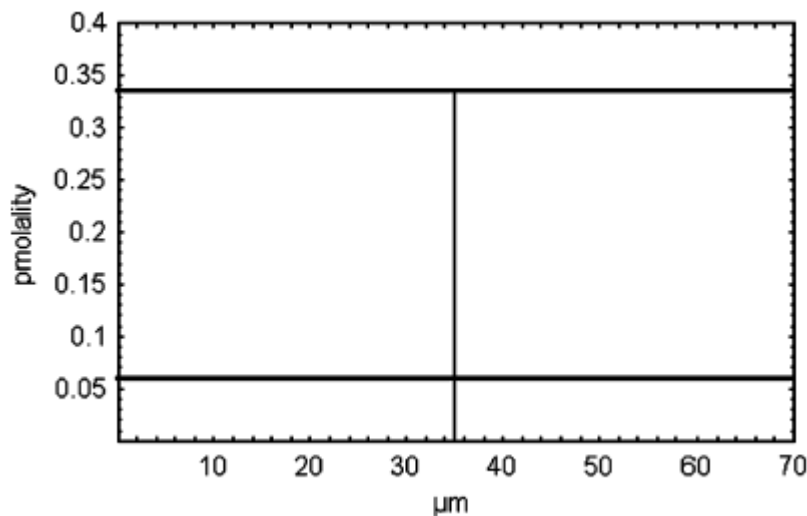
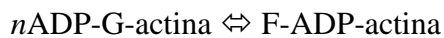


Figura 10. Distribuzione dei filamenti di actina in soluzioni di actina F all'equilibrio. Linea superiore: concentrazione monomerica totale, 110 μM ; concentrazione del monomero libero, $3.357 \cdot 10^{-13}$ M; linea inferiore: concentrazione monomerica totale, 19.18 μM ; concentrazione del monomero libero, $5.8638 \cdot 10^{-14}$ M; la linea verticale indica la lunghezza media dei filamenti, 34.94 μm .

Nella distribuzione di lunghezza descritta da Sept e collaboratori (1999), i filamenti non si trovano al minimo di energia libera; questo perchè la polimerizzazione dell'actina è associata all'idrolisi dell'ATP. Il sistema, quindi, non è all'equilibrio. Quando tutto l'ATP

della soluzione è stato idrolizzato, la polimerizzazione è descritta semplicemente dalla reazione



i filamenti sono in grado di raggiungere il proprio minimo di energia libera e la loro distribuzione è caratterizzata dall'uguaglianza di tutte le concentrazioni.

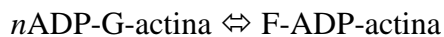
Effetto della dialisi contro polietilenglicole sulla distribuzione di lunghezza dei filamenti

Abbiamo dimostrato che soluzioni a riposo mostrano un comportamento osmotico differente da quello di soluzioni con simile concentrazione, ma sottoposte a dialisi contro polietilenglicole.

Spieghiamo questa caratteristica con un riarrangiamento della distribuzione dei filamenti di actina. Ad esempio, la distribuzione dei filamenti di una soluzione di actina 60 μM , a riposo, è differente da quella di una soluzione 60 μM , ottenuta dopo aver concentrato una soluzione originariamente di 19.18 μM .

Per dimostrare l'effetto perturbante della dialisi contro polietilenglicole, prendiamo come punto di partenza la distribuzione all'equilibrio dei filamenti, riportata in Figura 10.

Nei nostri esperimenti, dati i lunghi tempi di dialisi e l'associata idrolisi di ATP, è presumibile che, in assenza del polietilenglicole, il sistema evolva verso la condizione



quindi verso l'equilibrio.

Al contrario, in presenza di PEG, il sistema si sposta verso una nuova distribuzione di lunghezza dei filamenti, proprio all'instaurarsi delle attrazioni a corto raggio. Queste attrazioni si possono riprodurre abbassando il valore di u_0 (l'attrazione a corto raggio per monomero) fino a quando la variazione di energia libera del monomero libero, calcolata secondo Biron e collaboratori (2006), uguaglia quella ottenuta negli esperimenti osmotici.

I risultati di questi calcoli sono presentati in Tabella I, dove le proprietà delle soluzioni di actina a riposo sono messe a confronto con le proprietà delle soluzioni actiniche, aventi la medesima concentrazione, ottenute da dialisi contro PEG, partendo da soluzioni a concentrazione più bassa.

	Total actin monomers μM	Free actin monomers μM	C_σ	u_0	$k_B T / \text{mon.}$
At the equilibrium	38.4	0.113774	0.577328	-10^{-15}	$2.80 \cdot 10^{-8}$
	54.86	0.162581	0.577328	-10^{-15}	$2.70 \cdot 10^{-8}$
	93.66	0.277516	0.577328	-10^{-15}	$3.56 \cdot 10^{-8}$
Concentrated with PEG	38.4	0.11371	0.577302	$-5.10 \cdot 10^{-7}$	11.378
	54.86	0.16258	0.577287	$-5.33 \cdot 10^{-7}$	14.215
	93.66	0.277452	0.577278	$-4.51 \cdot 10^{-7}$	15.778
	213.44	0.669419	0.577271	$-3.10 \cdot 10^{-7}$	16.77

Tabella I. Concentrazione iniziale delle soluzioni di actina F, concentrate mediante dialisi contro PEG, 19.18 μM . Le concentrazioni riportate in Tabella sono raggiunte dopo equilibrio con soluzioni di PEG che generano una pressione osmotica macromolecolare di 7535, 10852, 13281, 17305 dyne/cm², rispettivamente.

Come illustrato in Tabella I, la concentrazione del monomero libero della soluzione perturbata di actina F e C_σ risultano leggermente diminuiti, confrontati ai valori delle soluzioni a riposo. La proporzione energia libera/monomero libero di actina aumenta da $\sim 10^{-8} k_B T$ (soluzioni a riposo) a $14.215 k_B T$ (soluzioni perturbate). Contemporaneamente, u_0 (l'attrazione a corto raggio per monomero) decresce da $-10^{-15} k_B T$ (soluzioni a riposo) a $-5.33 \cdot 10^{-7} k_B T$ (soluzioni perturbate). Sorprendentemente, u_0 , in soluzioni in agitazione, raggiunge il valore piú basso, $-5.33 \cdot 10^{-7} k_B T$, a 54.86 μM , mentre aumenta a concentrazioni piú elevate, essendo $-3 \cdot 10^{-7} k_B T$, a 213.44 μM .

Gli effetti della variazione di u_0 nella distribuzione dei filamenti vengono illustrati in Figura 11, che rappresenta il comportamento di una soluzione 19.18 μM , concentrata mediante dialisi contro differenti concentrazioni di PEG, a 38.4 μM (grafico in alto), a 54.84 μM (grafico in mezzo) e 93.66 μM (grafico in basso).

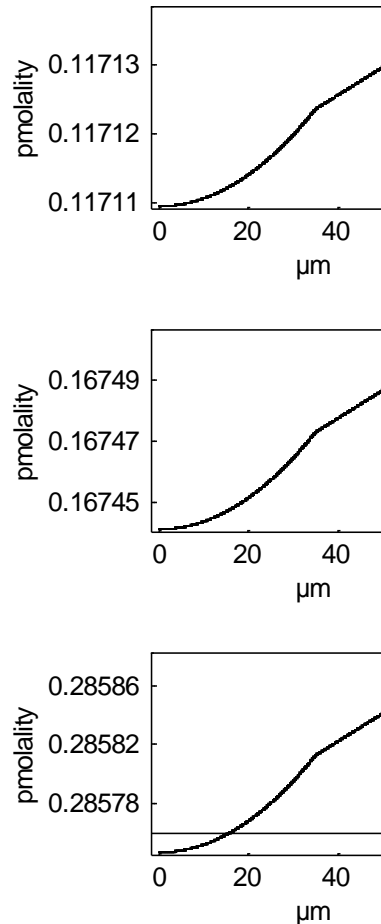


Figura 11. Distribuzione di lunghezza dei filamenti in soluzioni di actina F concentrate contro PEG. Ascissa, lunghezza dei filamenti, μM ; Ordinata, concentrazione dei filamenti, pM. Concentrazione iniziale, $19.18 \mu\text{M}$, come monomero. Concentrazione finale: $38.4 \mu\text{M}$ (grafico in alto); $54.86 \mu\text{M}$ (grafico al centro); $93.66 \mu\text{M}$ (grafico in basso). L'interruzione nella curva coincide con la lunghezza media dei filamenti, $34.94 \mu\text{m}$. La lunghezza massima è stata riscontrata a $69.89 \mu\text{m}$.

Come si può notare in questa Figura, la concentrazione dei filamenti aumenta con la loro lunghezza, mentre, all'equilibrio (Figura 10), la concentrazione è indipendente dalla lunghezza. Tutte le curve presentano, inoltre, un'interruzione in corrispondenza della lunghezza media.

Le nostre conclusioni

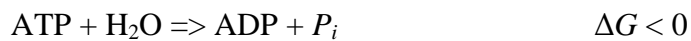
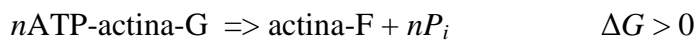
Combinando il modello di Biron e collaboratori (2006), che, come abbiamo visto, correla l'energia libera dei filamenti di actina alla loro distribuzione di lunghezza, con i nostri studi, che mettono in relazione l'energia libera del monomero libero di actina al potenziale chimico dell'acqua, definiamo tre condizioni per le soluzioni di actina F:

a.) lo stato stazionario, in cui la concentrazione dei filamenti di actina è esponenzialmente rapportata alla loro lunghezza (Figura 9)

b.) l'equilibrio, condizione in cui la concentrazione dei filamenti di actina è indipendente dalla loro lunghezza (Figura 10)

c.) l'equilibrio turbato da un macromolecola esterna, condizione in cui la concentrazione dei filamenti di actina aumenta leggermente, in funzione della loro lunghezza, presentando un'interruzione in corrispondenza della lunghezza media.

In questo modo, oltre al contributo delle proteine, abbiamo proposto che la distribuzione di lunghezza dei filamenti di actina sia regolata dalla correlazione tra la reazione di polimerizzazione e quella di idrolisi di ATP,



e dallo stress osmotico generato dalle macromolecole circostanti.

Per quanto riguarda il primo punto, mentre l'energia libera di idrolisi dell'ATP si avvicina allo zero, l'energia libera totale dei filamenti di actina decresce e la loro lunghezza media aumenta, così che, all'equilibrio, l'energia libera totale dei filamenti raggiunge un minimo e la concentrazione dei filamenti diviene indipendente dalla loro lunghezza. Sept e collaboratori (1999) hanno dimostrato che la lunghezza media dei filamenti è $\sim 7 \mu\text{m}$, mentre per Kaufmann e collaboratori (1982), così come per Käs e colleghi (1996), essa è pari a $22 \mu\text{m}$.

Secondo la nostra ipotesi, i due valori di lunghezza media appena riportati dovrebbero essere associati a differenti energie libere della reazione di idrolisi di ATP, dato che lo stato stazionario nell'esperimento di Sept è lontano dalla condizione di equilibrio. Inoltre, l'energia libera del monomero libero e la distribuzione di lunghezza dei filamenti di actina sono dettate dallo stress osmotico macromolecolare, non solo per un sistema all'equilibrio, come abbiamo descritto per semplicità nel nostro esempio, ma anche a qualsiasi stato stazionario. L'incremento dello stress osmotico macromolecolare porta ad un aumento dell'energia libera del monomero libero di actina e introduce un'interruzione nella curva che descrive la concentrazione dei filamenti, come funzione della loro lunghezza.

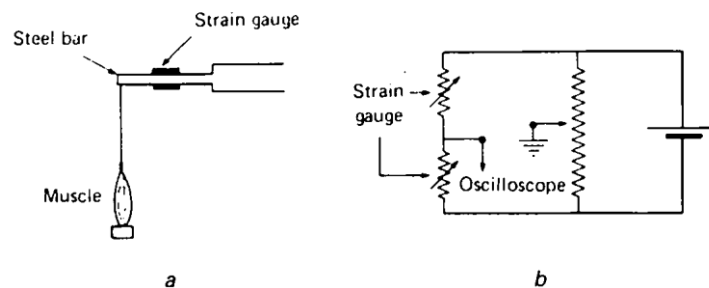
Contrazione isometrica e contrazione isotonica

Durante la contrazione di un muscolo, si possono misurare due diverse variabili: la sua lunghezza e la sua tensione. Nella maggior parte dei casi, una di queste due variabili è mantenuta costante durante la contrazione.

Nella contrazione isometrica, al muscolo non è consentito l'accorciamento (la sua lunghezza è mantenuta costante); viene misurata, quindi, la tensione prodotta.

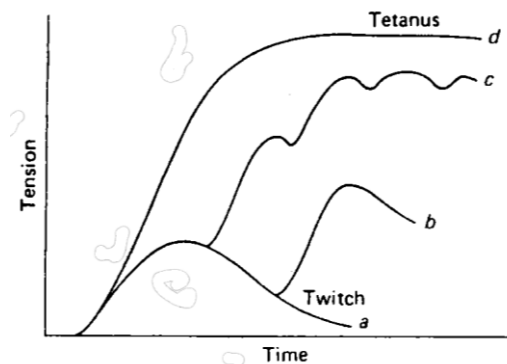
Nella contrazione isotonica, il carico sul muscolo (che è uguale alla tensione prodotta) è mantenuto costante; si misura l'accorciamento.

Nella contrazione isometrica, entrambe le estremità del muscolo sono bloccate, impedendone così l'accorciamento; la contrazione viene misurata come sviluppo di tensione. Per poter fare ciò, una estremità del muscolo deve essere collegata ad un opportuno strumento per la misura della tensione, ad esempio uno "strain gauge", elemento semiconduttore la cui resistenza è proporzionale alla forza che si esercita su di esso.



La tensione prodotta da un muscolo è una forza/superficie e pertanto si misura in grammi peso/superficie. Il grafico sottostante schematizza il decorso temporale dello sviluppo della tensione nel corso di una contrazione isometrica. Un singolo stimolo produce un rapido aumento della tensione, che poi decade (scossa singola, o "twitch"). La durata di una scossa singola varia da muscolo a muscolo e decresce con l'aumentare della temperatura. Per il muscolo sartorio di rana, a 0°C, il tempo che solitamente intercorre tra l'inizio della contrazione e il suo picco è di circa 200 ms, mentre la tensione decade a zero entro 800 ms (traccia *a*). Se un secondo stimolo è applicato prima che la tensione della prima contrazione sia decaduta a zero, il picco della tensione del secondo stimolo è più alto di quello del primo (traccia *b*); questo effetto prende il nome di sommazione meccanica. Stimolazioni

ripetute a bassa frequenza producono quindi una traccia di tensione che presenta una serie di gibbosità (traccia *c*). Mano a mano che la frequenza di stimolazione viene aumentata, si raggiunge un punto in cui le ondulazioni si perdono e la tensione cresce in modo continuo fino a raggiungere uno stato stazionario (traccia *d*). Si dice quindi che il muscolo è in tetano.

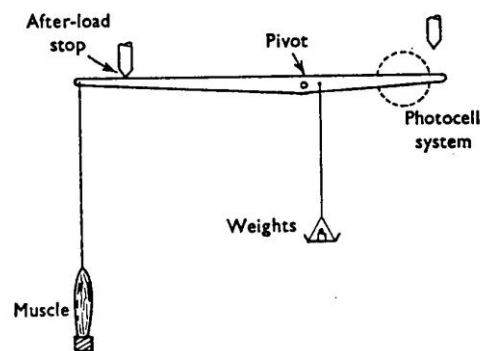


Il rapporto lunghezza-tensione, osservato nei muscoli scheletrici, si spiega con il meccanismo dello scorrimento dei filamenti nella contrazione muscolare. Quando la fibra muscolare si contrae isometricamente, la tensione che si sviluppa è proporzionale al numero di legami trasversali fra l'actina e la miosina. Quando il muscolo viene stirato, la sovrapposizione fra actina e miosina si riduce, e così diminuisce anche il numero dei legami trasversali. Inversamente, quando il muscolo è più corto della sua lunghezza a riposo, si ha la sovrapposizione dei filamenti di actina e anche questo riduce il numero di legami trasversali.

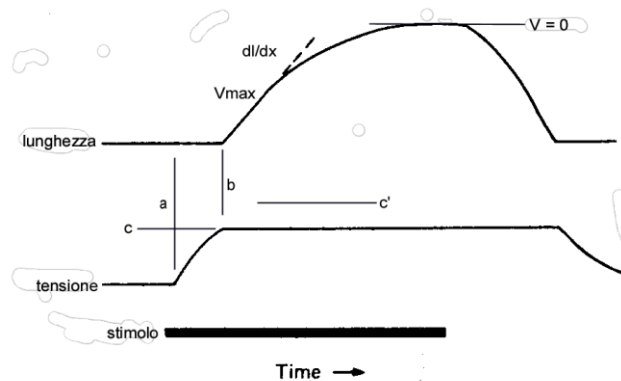
La velocità con la quale i muscoli si contraggono varia inversamente al carico. Per ogni dato carico, la velocità è massima alla lunghezza di riposo, mentre è minore per lunghezze superiori o inferiori a questa.

La contrazione isotonica rappresenta il modo di contrazione più frequente nei muscoli scheletrici. Nella misura della contrazione isotonica, la tensione esercitata dal muscolo è mantenuta costante (di solito permettendogli di sollevare un carico fisso), mentre vengono misurate le variazioni di lunghezza. L'apparato sperimentale tipicamente usato per studiare la contrazione isotonica è illustrato nello schema sottostante. Il muscolo è attaccato ad una

leggera leva in un modo tale da essere costretto a sollevare un carico quando si accorcia. Il movimento della leva può poi essere registrato su carta, mediante opportuni dispositivi. Quando il muscolo è rilasciato, la leva appoggia contro un punto di arresto (stop), così che il muscolo a riposo non deve sostenere il carico. Se non ci fosse l'arresto, il muscolo assumerebbe lunghezze iniziali progressivamente maggiori, mano a mano che il carico aumenta, e questo renderebbe più difficile l'interpretazione dei risultati al variare dei carichi.



La figura sottostante rappresenta ciò che accade quando un muscolo si trova a sollevare un carico moderato, mentre è sottoposto a stimolazione tetanica (la curva della lunghezza in alto in realtà andrebbe rovesciata, trattandosi di un accorciamento). La tensione nel muscolo comincia a salire (curva di mezzo) subito dopo il primo stimolo (linea *a*), ma occorre un certo tempo prima che essa raggiunga un valore sufficiente a sollevare il carico (linea *b*); inizialmente (tratto compreso tra le linee *a* e *b*), quindi, avviene una contrazione senza accorciamento: il muscolo, cioè, si contrae isometricamente. Ad un certo punto (linea *b*), la tensione, continuando ad aumentare, eguaglia il carico (linea *c*); quando questo avviene, il muscolo comincia ad accorciarsi, senza che ci siano ulteriori aumenti di tensione; in altri termini, la tensione rimane costante per tutta la fase che segue, durante la quale il muscolo si contrae isotonicamente.

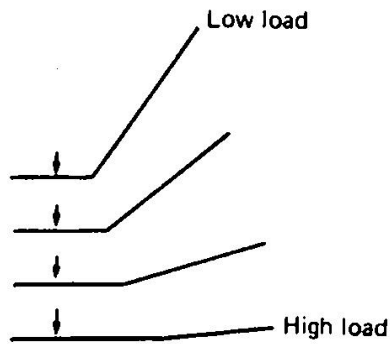


La derivata della curva della lunghezza rispetto al tempo ($\delta l / \delta t$, graficamente la pendenza della curva che descrive la lunghezza) esprime la velocità dell'accorciamento. Inizialmente, questa è massima (V_{max}) ed è costante (linea tratteggiata). Mano a mano che il muscolo si accorcia, tuttavia, la sua velocità di accorciamento diminuisce, fino a diventare uguale a zero, al termine della fase di accorciamento.

Quando il periodo di stimolazione termina, il muscolo torna a distendersi per effetto del carico e l'allungamento continua, fino a che la leva non incontra nuovamente l'arresto; a questo punto, il rilasciamento diventa isometrico (non avviene ulteriore variazione di lunghezza) e la tensione nel muscolo continua a scendere, fino a raggiungere i consueti livelli di riposo.

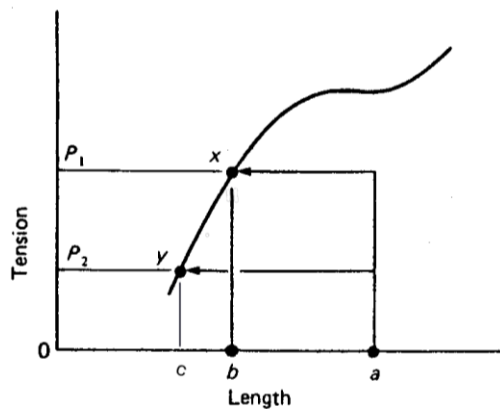
Se questa procedura viene ripetuta con carichi di diversa entità, le contrazioni vengono modificate sotto tre aspetti diversi:

- 1) Il ritardo tra lo stimolo e l'inizio dell'accorciamento ha una durata maggiore in caso di carichi più elevati. Questo fenomeno è illustrato nel grafico che segue, che mostra il tratto iniziale della curva della lunghezza per carichi diversi; il momento in cui viene inviato lo stimolo è indicato dalla freccia (corrispondente al punto *a* della figura precedente) mentre l'inizio dell'accorciamento (che corrisponde alla linea *b* della medesima figura) è indicato dal punto in cui la curva flette verso l'alto. L'aumento del ritardo è dovuto al fatto che la fase di contrazione isometrica, ovvero il tempo richiesto dal muscolo per sviluppare una tensione uguale al carico, aumenta con l'aumentare del carico.



2) L'accorciamento totale diminuisce aumentando il carico. Questo perché la tensione che un muscolo può sviluppare diminuisce con il diminuire della lunghezza e, quindi, il muscolo più caricato può accorciarsi di meno, prima che la tensione isometrica diventi uguale al carico. Per la spiegazione si faccia riferimento al grafico seguente. La curva rappresenta la relazione tensione-lunghezza totale. Si consideri un muscolo che ha una lunghezza iniziale pari ad a e che deve sollevare successivamente i carichi P_1 e P_2 ($P_1 > P_2$). Il muscolo inizia a contrarsi senza accorciamento (fase isometrica), sino a che non sviluppa una tensione uguale al carico P_1 . A questo punto, inizia l'accorciamento senza ulteriore aumento di tensione (fase isotonica), che continua fino a che viene raggiunto il punto x di equilibrio. L'accorciamento totale, quindi, sarà pari a $(a - b)$.

Se si considera ora il caso in cui lo stesso muscolo, partendo dalla stessa lunghezza iniziale a , venga confrontato con un carico P_2 , la fase di contrazione isometrica risulta più breve ($P_2 < P_1$) e al raggiungimento del nuovo punto di equilibrio y , il muscolo risulterà accorciato di $(a - c)$, maggiore di $(a - b)$.



3) Durante la fase a velocità costante della contrazione isotonica (fase iniziale), la velocità di accorciamento decresce con l'aumentare del carico (si osservi il grafico precedente). La velocità di accorciamento diventa zero quando il carico eguaglia la massima tensione che può essere raggiunta durante una contrazione isometrica del muscolo a quella lunghezza.

La manovra di Huxley-Simmons

La manovra di Huxley-Simmons consiste nell'applicare una lieve e rapida variazione alla lunghezza di una singola fibra muscolare, che si trova nello stato isometrico, e nel misurare il conseguente recupero della tensione ad una stabilita lunghezza sarcomerica (Huxley e Simmons, 1971). Huxley e Simmons scoprirono che il recupero della tensione risultava più veloce dell'accorciamento della fibra. Per spiegare tale comportamento, essi ipotizzarono che il ponte crociato dovesse essere costituito da due elementi strutturali, uno di tipo elastico, la cui lunghezza viene alterata contemporaneamente alla variazione di lunghezza, ed uno di tipo visco-elastico, in grado di ripristinare la tensione del sistema. Il primo processo è fortemente influenzato dal carico, mentre sembra che il secondo processo ne sia indipendente.

La definizione del sistema venne quindi migliorata introducendo un elemento elastico addizionale. L'elasticità e il rapido recupero della tensione vennero descritti dunque dalla combinazione di due componenti elastiche e di una viscosa (Ford et al., 1977). In questi studi, la variazione di lunghezza era completa in ~ 0.2 ms e la risposta tensiva venne suddivisa in quattro fasi: 1.) un iniziale cambiamento di tensione, concomitante alla variazione di lunghezza applicata; 2.) un rapido recupero parziale verso la tensione originale, della durata di 2-5 ms; 3.) un recupero lento, 10-50 ms; 4.) un ritorno ancora più lento, 10-50 ms, alla tensione originale.

La manovra di Huxley-Simmons incontrò subito molto favore, in quanto si riteneva che il rapido rilascio potesse sincronizzare i ponti crociati; il rapido recupero della tensione, inoltre, venne considerato come una manifestazione del colpo di forza, benché il recupero avvenga a lunghezza costante della fibra.

Tale manovra venne utilizzata per analizzare: la rapida rigenerazione del colpo di forza miosinico nel muscolo contrattile (Irving et al., 1992; Lombardi et al., 1992); la riflessione

a raggi X 14.5 nm (Lombardi et al., 1995); l'inclinazione elastica delle teste miosiniche durante la contrazione muscolare (Dobbie et al., 1998); il rapido rilascio e la frequenza dei colpi di forza (He et al., 1999, He et al., 2000). Nonostante questi esperimenti siano stati condotti servendosi delle tecniche più raffinate, riteniamo che alcuni risultati siano in qualche modo sopravvalutati.

E' opinione condivisa che il rapido rilascio di una fibra muscolare nello stato isometrico rappresenti un evento di tipo elastico. In effetti, la variazione iniziale della tensione avviene simultaneamente alla variazione di lunghezza che viene applicata; un fenomeno, questo, che dovrebbe denotare come la fibra posseda una determinata cedevolezza (Ford et al., 1977). Di un evento elastico possono essere calcolate le variazioni della lunghezza e della forza. Il calcolo è eseguito sulla base di un accorciamento di 6 nm per metà sarcomero. Come illustrato in Figura 12 (cerchietti neri), l'accorciamento è caratterizzato da un comportamento armonico. La velocità della contrazione aumenta da zero ad un livello massimo, quando la fibra raggiunge la lunghezza a riposo. La porzione negativa della parte discendente della curva descrive la compressione della fibra, sotto l'azione dell'energia cinetica accumulata durante l'accorciamento.

Tale Figura presenta, inoltre, la effettiva variazione di lunghezza di una fibra muscolare (cerchi vuoti) misurata durante lo stesso rilascio (Ford et al., 1977). E' evidente che il rilascio spontaneo è più rapido ($\sim 43 \mu\text{s}$), rispetto a quello sperimentale ($\sim 180 \mu\text{s}$).

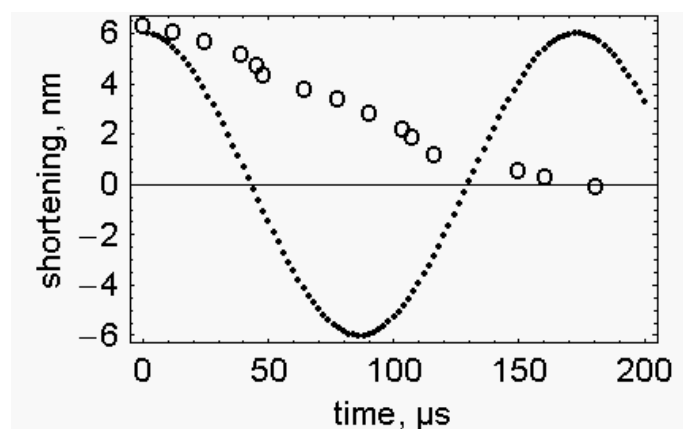


Figura 12. Time course del rilascio rapido – Variazione di lunghezza durante un rilascio di 6 nm/metà sarcomero (cerchi vuoti). Variazione di lunghezza spontanea calcolata durante lo stesso rilascio (cerchietti neri). Per i calcoli, sono state utilizzate le stesse condizioni di Ford e coll. (1977): $P_0 = 2.7 \cdot 10^6 \text{ dyne/cm}^2$; lunghezza della fibra, 0.534 cm; sezione della fibra, $1.89 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$; densità della fibra, 1.19 g/cm^3 ; lunghezza del sarcomero, $2 \cdot 10^{-4} \text{ cm}$; rigidità della fibra, 159270 dyne/cm.

Nonostante, ad una prima osservazione, l'entità della contrazione sperimentale possa essere considerata costante, un esame più dettagliato ed attento dimostra che l'accorciamento è lento all'inizio, più rapido nella parte centrale e nuovamente lento verso la fine. Le prime due componenti dell'accorciamento seguono un andamento armonico, ma il rallentato aspetto dell'ultima parte richiede il coinvolgimento di una forza aggiuntiva, che si opponga alla contrazione. Il sospetto che sorge, quindi, è che il rilassamento rapido sia un evento guidato. Ciò viene confermato dall'osservazione di diverse misure di accorciamento, registrate a differenti punti di rilascio (Figura 13).

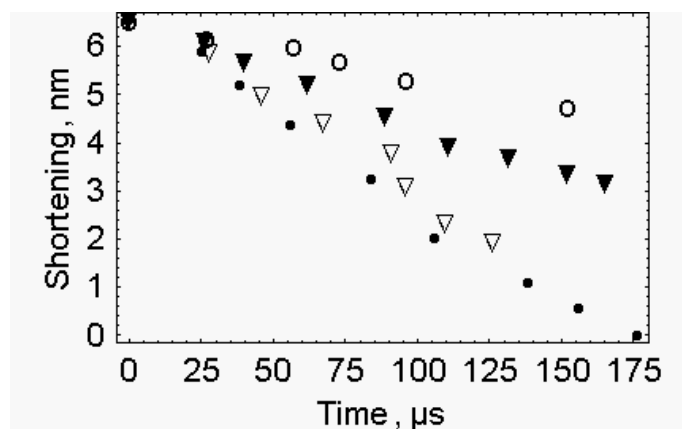


Figura 13. Variazioni di lunghezza misurate durante il rilascio rapido (dati estrapolati da Ford e coll., 1977). I rilasci sono rappresentati in nm per metà sarcomero: 1.5 nm (cerchi bianchi); 3.0 nm (triangoli neri); 4.5 nm (triangoli bianchi); 6.0 nm (cerchi neri).

Questo non può di certo avvenire in un rilassamento elastico spontaneo, dove le porzioni iniziali delle curve, generate dai rilasci rapidi di differenti lunghezze, dovrebbero sovrapporsi, dal momento che tutti i rilasci iniziano alla stessa forza isometrica.

Si è inoltre determinata la variazione di forza associata al rilascio spontaneo di 6 nm per metà sarcomero. Anche in questo caso è stato riscontrato un comportamento armonico (Figura 14, cerchietti neri). La forza (e la concomitante accelerazione) diventa nulla. Nella parte negativa della curva, la forza viene ripristinata a spese dell'energia cinetica accumulata nella parte positiva della curva.

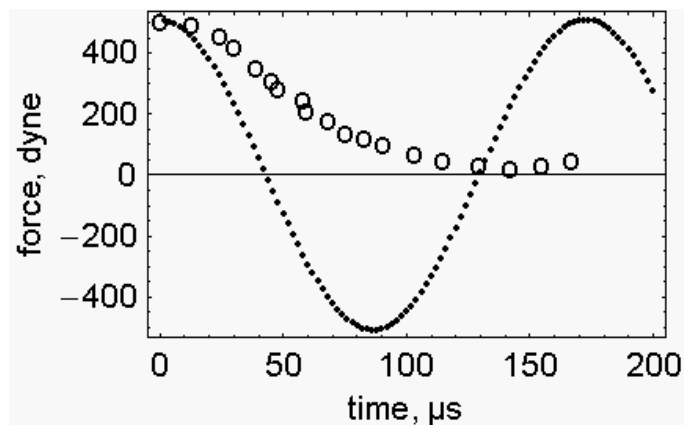


Figura 14. *Time course della forza durante il rilascio rapido* – Variazione per 6 nm/metà sarcomero (cerchi bianchi). Variazione calcolata durante lo stesso tipo di rilascio (cerchi neri). Anche in questo caso, i calcoli sono stati tratti da Ford e coll. (1977): $P_0 = 2.7 \cdot 10^6$ dyne/cm²; lunghezza della fibra, 0.534 cm; sezione della fibra, $1.89 \cdot 10^{-4}$ cm²; densità della fibra, 1.19 g/cm³; lunghezza del sarcomero, $2 \cdot 10^{-4}$ cm; rigidità della fibra, 159270 dyne/cm.

In effetti, se il rapido rilascio di una fibra muscolare nello stato isometrico è un evento elastico (Ford et al., 1977), non dovrebbe sorprendere il fatto che questo rilascio venga seguito da un rapido recupero; in un evento elastico, infatti, l'energia non viene dissipata. L'energia cinetica accumulata durante il rilascio dovrebbe comprimere la fibra (porzione negativa della parte discendente della curva di Figura 12). Nelle condizioni sperimentali di Ford et al. tutto questo non avviene: la fibra non può accorciarsi oltre la lunghezza a riposo, né tantomeno si può allungare nuovamente. Viene stabilita una nuova situazione isometrica.

Nel caso di un corpo elastico, la flessione determina il comportamento illustrato in Figura 15, dove l'accorciamento in seguito a rapido rilascio (Figura 15a) è seguito da una fase di allungamento (Figura 15b).

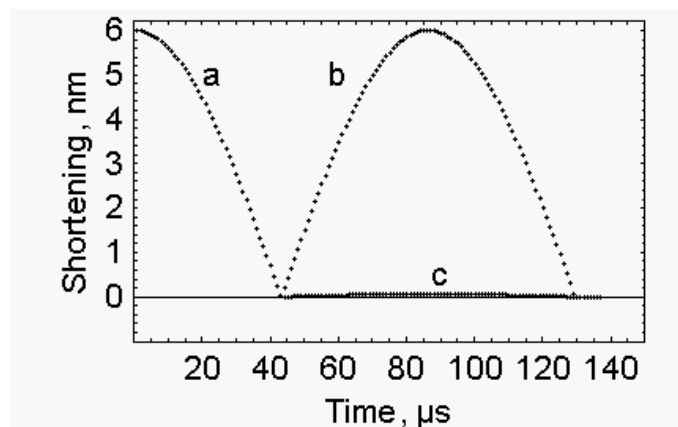


Figura 15. Rilascio rapido e conseguente allungamento dovuto a flessione di un corpo elastico a.) Rilascio rapido, stesse condizioni di Figura 11.

b.) Rapido recupero, energia cinetica iniziale, 0.815917 erg; rigidità della fibra, 159270 dyne/cm; massa della fibra, 0.00012 g.

c.) Recupero isometrico, energia cinetica iniziale, 0.815917 erg, rigidità iniziale, $1.2713 \cdot 10^9$ dyne/cm; massa della fibra, 0.9608 g.

Nel recupero sperimentale della fibra, una larga frazione della forza isometrica originale viene ripristinata, mentre ciò non avviene per quanto riguarda la lunghezza iniziale. Per caratterizzare questa dissociazione, la rigidità putativa della fibra deve essere incrementata, così che il ripristino della forza viene associato ad un lieve recupero della lunghezza della fibra. La massa putativa della fibra viene anch'essa aumentata.

Si deve inoltre stabilire un valore adeguato all'energia cinetica. Al termine del rilascio spontaneo (Figura 12, cerchietti neri) la massa della fibra è 0.00012 g; l'accorciamento è pari a 116.564 cm/s; l'energia cinetica, a forza zero, è 0.816 erg. Al termine del rilascio sperimentale di 6 nm per metà sarcomero, sono disponibili solamente 0.0097 erg. Questo dimostra che l'energia cinetica resa disponibile nel corso del rapido rilascio spontaneo (0.816 erg) viene enormemente dissipata nella procedura sperimentale. In queste condizioni, per riprodurre la prima parte del recupero sperimentale, la rigidità della fibra deve essere portata a $4.76 \cdot 10^6$ dyne/cm e la massa a 0.32427 g.

I risultati di questa simulazione sono presentati in Figura 16. Il rapido recupero raffigurato nella parte superiore, cerchi bianchi, rappresenta quello sperimentale.

L'energia cinetica acquisita nel corso del rilascio rapido non chiarisce completamente il ripristino della forza osservata sperimentalmente. Nella parte inferiore della Figura sono riportate le variazioni minori di lunghezza della fibra.

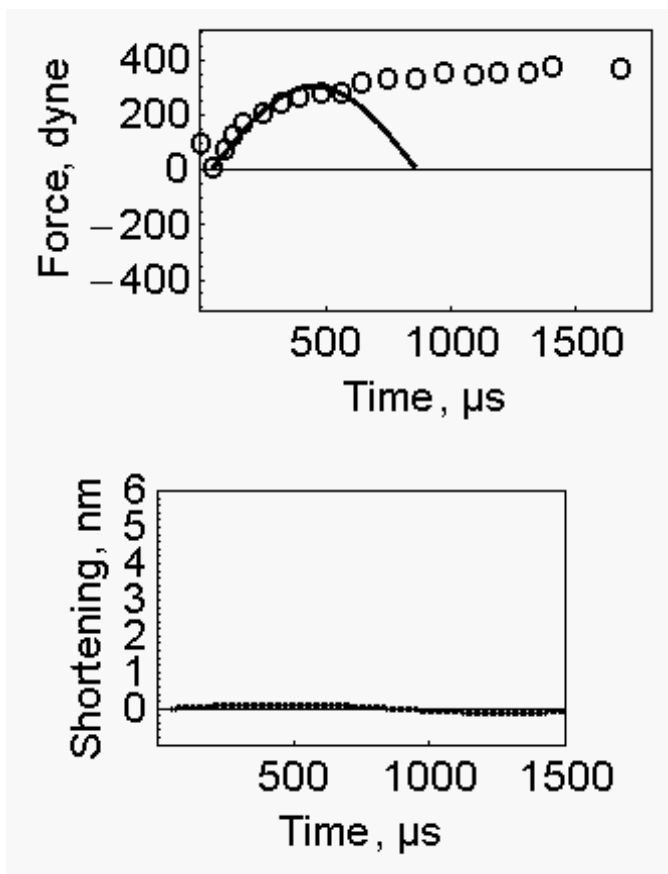


Figura 16. Simulazione del recupero rapido

Parte superiore della figura, cerchi bianchi: recupero sperimentale dopo rilascio rapido di 6 nm per metà sarcomero. Cerchi neri: curva ottenuta dalla riflessione del rilascio rapido spontaneo. Rigidità della fibra $1.27 \cdot 10^9$ dyne/cm, massa della fibra 0.9608 g, energia cinetica 0.0097 erg.

Parte inferiore della figura: il recupero della lunghezza della fibra è rappresentato da un' onda di minima ampiezza.

Ciò che ci si domanda è se il rilascio e il rapido recupero siano l'espressione dell'attività di un'unica o di più strutture fisiche.

Huxley, nel 1969, propose che la struttura del ponte crociato, capace di generare la forza, fosse attaccata al filamento miosinico, con un legame di 40 nm, presentando estremità flessibili su entrambe le terminazioni. La struttura che produce la forza poteva quindi legarsi al filamento di actina e subire le stesse modificazioni conformazionali, generando la medesima forza longitudinale. Seguendo questa ipotesi, Huxley e Simmons (1971) collegarono il rilascio rapido e il veloce recupero a due elementi strutturali in serie. Il rilascio venne associato ad un elemento elastico, la cui lunghezza variava simultaneamente

con la modificazione della lunghezza dell'intera fibra. Il recupero fu legato ad un ulteriore elemento, di natura visco-elastica, che aveva la capacità di ripristinare la propria lunghezza in pochi millisecondi.

Il rilascio rapido è una sequenza di eventi che coinvolge il filamento di actina, la struttura del ponte crociato e il legame di 40 nm. Dal momento che la struttura che produce la forza e il legame sono in serie, la forza che vi è associata deve attenuarsi in concomitanza al rapido rilascio. Inoltre, la variazione nella lunghezza deve essere suddivisa tra le due componenti del ponte crociato, in ragione delle loro rispettive rigidità. La rigidità che caratterizza il rilascio è quindi la rigidità media della struttura che genera la forza e quella del legame di 40 nm, che, presi individualmente, risultano ancora sconosciuti.

L'analisi della riflessione a raggi X 14.5 nm supporta ulteriormente l'ipotesi che l'elemento elastico e l'elemento che genera la forza convergano in un'unica struttura.

Huxley HE e collaboratori (Huxley et al., 1981; Piazzesi et al., 1994) dimostrarono che la manovra di Huxley-Simmons, nel muscolo sartorio di *Rana Esculenta*, è accompagnata da intense variazioni della riflessione a raggi X. Dal momento che si pensa che tale riflessione abbia luogo da un pattern ripetuto di ponti crociati miosinici lungo tutta la lunghezza del muscolo, questi cambiamenti sono stati considerati una diretta evidenza che lo scorrimento dei filamenti di actina su quelli di miosina, durante la contrazione, è prodotto dal movimento longitudinale dei ponti crociati.

Irving et al. (1992), ripetendo il medesimo esperimento su fibre muscolari isolate, con risoluzione maggiore, non trovarono una variazione rilevante nell'intensità della riflessione a raggi X 14.5 nm, concludendo, in seguito, che lo scorrimento dei filamenti, nel rilascio rapido, non è accompagnato dal movimento dei ponti crociati e che solamente i movimenti delle teste miosiniche, che mettono in evidenza la variazione di intensità, vengono associati alla produzione di forza.

Alcuni anni dopo, lo stesso gruppo di studiosi giunse a conclusioni sostanzialmente differenti. Esaminando il rapido stiramento delle fibre muscolari nello stato isometrico, Lombardi e collaboratori (1995) riscontrarono un notevole decremento dell'intensità della riflessione a raggi X 14.5 nm, che suggeriva come una significativa parte dell'elasticità istantanea del muscolo si trovasse all'interno della testa miosinica.

Ma dove finisce l'energia associata alla componente elastica della manovra di Huxley-Simmons?

E' generalmente approvato che la componente veloce di questa manovra manifesti un comportamento elastico. Una proprietà fondamentale dei sistemi elastici è la loro capacità di non dissipare l'energia sottoforma di calore. La questione che ci si pone è in che modo e dove venga distribuita l'energia elastica coinvolta nella contrazione rapida.

Per essere in grado di dare una risposta, abbiamo valutato l'energia elastica coinvolta in questo processo, ricostruendo un sistema elastico. Facendo questo, abbiamo riscontrato che una rilevante quantità di energia viene resa disponibile dal rilascio rapido a favore di altri eventi, come il recupero veloce. Questa osservazione cambia certamente l'economia totale della manovra di Huxley-Simmons.

In effetti, se parte del recupero è prodotta dall'energia cinetica accumulata nel corso del rilascio rapido, si dovrebbe trovare una relazione tra l'entità del rilascio rapido e quella del primo recupero. Sfortunatamente l'influenza che l'entità del primo ha sul secondo è completamente ignota.

Durante la contrazione, i ponti crociati sono funzionalmente asincroni (Huxley, 2000). Se, al termine del rilascio rapido, essi fossero realmente sincronizzati, potrebbero allo stesso tempo generare il successivo colpo di forza e la tensione sviluppata sarebbe di molto superiore a quella isometrica. Inoltre, la tensione oscillerebbe fino al nuovo raggiungimento della condizione di asimmetria.

Sembra ragionevole considerare il sarcomero come l'unità operativa della contrazione muscolare. Tutti i filamenti spessi in una metà del sarcomero si legano allo stesso disco Z, pertanto la forza sviluppata dai ponti crociati viene applicata al medesimo disco Z e contribuisce alla tensione della fibra. Se ciò veramente avviene, la frequenza di questi eventi contrattili è data da:

$$\text{frequenza dei colpi di forza} = N_F \cdot N_H \cdot k_{ATPase}$$

dove, $N_F = 2000 - 8000$ è il numero dei filamenti spessi per sarcomero; $N_H = 300$ è il numero delle teste di miosina per metà sarcomero; k_{ATPase} varia tra 7.42 s^{-1} (stato

isometrico) e 17.57 s^{-1} (He et al., 1999). In metà sarcomero, quindi, la frequenza dei colpi di forza copre da $4.65 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ a $42 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$.

La convinzione di Dobbie et al. (1998) che il colpo di forza non contribuisca alla risposta di forza durante il ciclo di $320 \mu\text{s}$, risulta, quindi, infondata, come lo è l'idea che il rilascio rapido non sia influenzato dal colpo di forza. A dir la verità, i colpi di forza modulano continuamente lo stato della fibra, in un modo talmente minuzioso che non riesce ad essere documentato con i mezzi attualmente disponibili. E' anche questa la ragione per cui il pronto recupero non dovrebbe essere considerato una misura del colpo di forza.

L'accelerazione del carico: un parametro negletto nella contrazione muscolare

Il concetto che i ponti crociati operino ciclicamente, attacco, impegno di forza e distacco dopo scorrimento dei filamenti, sufficiente a portare la forza vicino allo zero, fu formulato per la prima volta da Needham, nel 1950.

Inizialmente si pensava che la forza si generasse istantaneamente all'instaurarsi del ponte crociato (Huxley A. F., 1957); è tuttavia probabile che la prima fase di attacco non sia rigida abbastanza da trasmettere della forza (Huxley A.F., 1974). Questa supposizione è supportata da risultati ottenuti nel muscolo attivo, dove l' accorciamento è preceduto da una considerevole attività ATPasica, non attribuibile alla contrazione del sarcomero, ma che accompagna un periodo di rapido sviluppo di forza (He et al., 1999, 2000).

Apparentemente, il muscolo attivo si prepara alla contrazione, sviluppando forze adeguate al carico che dovrà sopportare. Ulteriore evidenza a questo aspetto è data dalle previsioni del nostro modello:

- per dare inizio alla contrazione i ponti crociati devono raggiungere un valore soglia nella forza
- il livello di questa soglia aumenta con il carico (Grazi e Di Bona, 2005, 2006)

Il modello

Inizialmente, quando il modello (descritto dettagliatamente in Appendice) fu presentato (Grazi e Di Bona, 2005, 2006), l'accelerazione di gravità venne scelta a rappresentare

l'accelerazione del carico e il carico veniva modificato cambiando la massa. Di conseguenza, lo stato pre-stazionario della contrazione risultava abbastanza rapido, di pochi μ s, rendendo impossibile la riuscita di un riscontro sperimentale.

Ciò che abbiamo osservato in seguito è che, a carico costante, la durata dello stato pre-stazionario aumenta significativamente con la diminuzione dell'accelerazione del carico. Questo periodo potrebbe raggiungere anche il millisecondo, permettendo quindi di testare sperimentalmente il modello. Negli studi che riguardano la contrazione delle miofibrille, vengono condotte dettagliate misurazioni della relazione forza-lunghezza, ma non si fa mai esplicita menzione al valore dell'accelerazione associata al carico; in realtà, questo parametro è di notevole importanza, dato che determina la durata dello stato pre-stazionario della contrazione.

La nostra indagine venne eseguita supponendo che la produzione di forza muscolare non varia in concomitanza dell'accelerazione associata al carico. Tuttavia, a causa della fine regolazione a cui va incontro la contrazione muscolare, non possiamo escludere che ciò possa avvenire. Ad esempio, la fase stazionaria potrebbe risultare inalterata, mentre potrebbero variare la produzione di forza e il rendimento, contemporaneamente ad una modificazione dell'accelerazione del carico. Questo aspetto potrebbe essere una sfida per futuri esperimenti.

Il modello consente di convertire l'energia erogata nel corso dell'idrolisi dell'ATP in energia cinetica associata allo scorrimento del filamento sottile su quello spesso. Tale scorrimento è descritto da un moto uniformemente accelerato. Poiché nella contrazione isotonica, il moto è uniforme, la conversione dal moto uniformemente accelerato al moto uniforme è ottenuta introducendo una componente viscosa.

Effetto dell'accelerazione del carico sulla forza iniziale

Come detto precedentemente, nel precedente lavoro avevamo considerato il carico come un peso ($aL = 980 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-2}$), dunque per variare il carico, modificavamo la sua massa.

Il carico, tuttavia, può essere cambiato andando ad agire sull'accelerazione, lasciando costante la massa.

Negli esperimenti eseguiti in seguito alla formulazione della suddetta ipotesi, è stata riprodotta la massa isometrica

$$m_{2iso} = 2 \text{ sS } P_0 / (980 \text{ cm s}^{-2})$$

e l'accelerazione a differenti carichi è risultata pari a

$$a_{LO} = F_2 / m_{2iso}$$

In questo modo, ad ogni singolo carico,

$$F_2 = g m_2 = a_{LO} m_{2iso}$$

dove, g, rappresenta l'accelerazione di gravità.

I dati riguardanti la curva forza-velocità sono stati ottenuti dal lavoro di He et al. (1999), con $P_0 = 190 \text{ kN/m}^2$.

Nella nuova condizione, la forza iniziale F_1 richiesta per dare inizio alla contrazione è minore rispetto a quella richiesta per soddisfare la condizione precedente.

Diminuisce con il carico anche il rapporto tra i due valori, essendo 0.992 a $P/P_0 = 0.94737$ e 0.0576 a $P/P_0 = 0.0526$ (Figura 17).

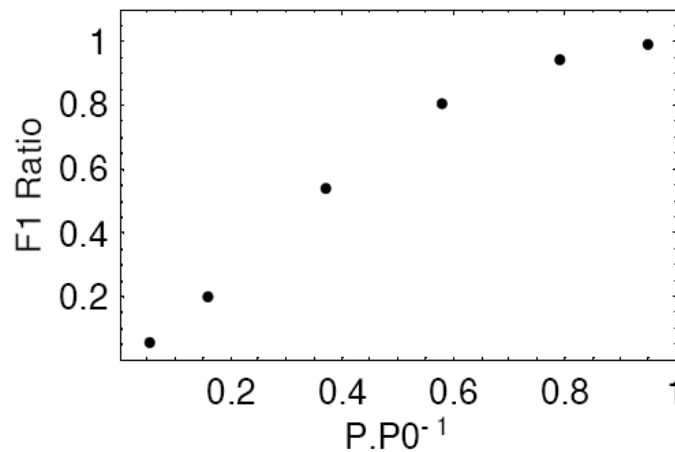


Figura 17. Relazione tra la forza iniziale F_1 , a variabile accelerazione del carico e massa costante (m_{2iso}), e quella a costante accelerazione del carico (980 cm s^{-2}) e massa variabile, come funzione di P/P_0 .

La differenza tra le due condizioni è raffigurata in dettaglio nella Figura 18, dove vengono presentate tre coppie di curve, ottenute a P/P_0 di 0.578947 (in alto), 0.368421 (al centro) e 0.157895 (in basso). Ogni curva è costituita da un tratto discendente (stiramento causato dal carico) e da un tratto ascendente (accorciamento).

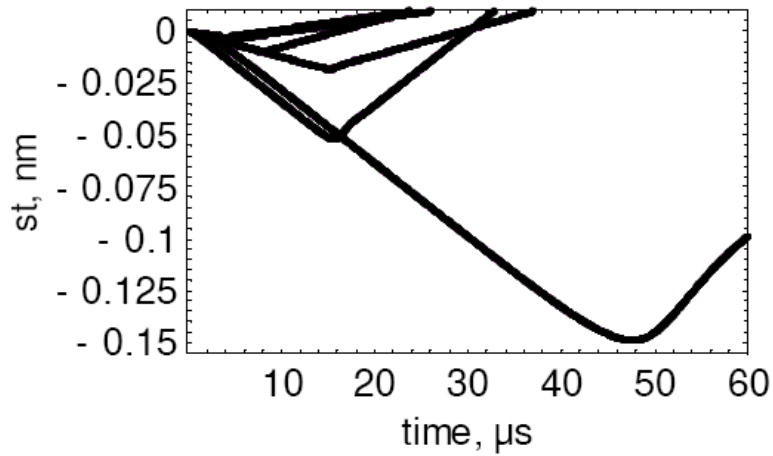


Figura 18. Rappresentazione dello stiramento e dell'accorciamento, in tre coppie di curve, a P/P0 di 0.578947 (in alto), 0.368421 (al centro) e 0.157895 (in basso).

Nella coppia in alto, l'accelerazione del carico, la F_1 iniziale e i minimi sono 980 cm.s^{-2} , $0.03660248253 \text{ dyne}$ e -0.0024467 nm (curva superiore); $567.368 \text{ cm.s}^{-2}$, $0.0295915665 \text{ dyne}$ e -0.003128 nm (curva inferiore). Nella coppia di mezzo, tali valori sono rispettivamente 980 cm.s^{-2} , $0.0158060124224 \text{ dyne}$ e -0.00968152 nm (curva superiore); $361.053 \text{ cm.s}^{-2}$, 0.00856316 dyne e -0.0178394 nm (curva inferiore).

Infine, per la coppia in basso, essi sono 980 cm.s^{-2} , $0.00311082992 \text{ dyne}$ e -0.0516705 nm (curva superiore); $154.737 \text{ cm.s}^{-2}$, 0.00062608 dyne e -0.148636 nm (curva inferiore).

Così, allo stesso P/P0, abbassando l'accelerazione del carico, sia la F_1 iniziale, che il minimo, si riducono. I due fenomeni sono molto più pronunciati a carichi bassi.

In Figura 19, sono rappresentati i risultati degli effetti della riduzione dell'accelerazione del carico da $154.737 \text{ cm.s}^{-2}$ (curva superiore) a 50 cm.s^{-2} (curva centrale) e a 20 cm.s^{-2} (curva inferiore) a $P/P0 = 0.157895$.

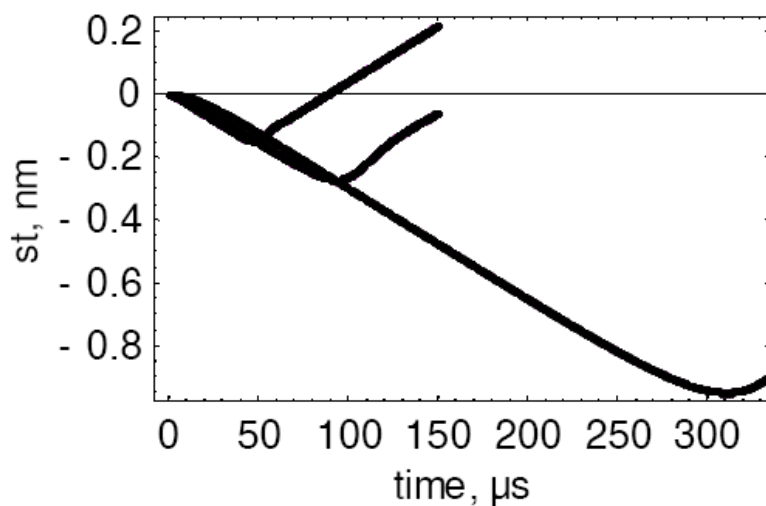


Figura 19. Effetti della riduzione dell'accelerazione del carico da 154.737 cm.s^{-2} (curva superiore) a 50 cm.s^{-2} (curva centrale) e a 20 cm.s^{-2} (curva inferiore).
 $P/P0 = 0.157895$.

La riduzione dell'accelerazione del carico è accompagnata dalla diminuzione della F_1 iniziale da 0.00062608, a 0.0002102 e a 0.00008491 dyne. I minimi delle curve decrescono da -0.149331 nm a -0.272377 nm e a -0.95088 nm. La loro posizione viene dislocata da ~50 μs a ~100 μs e a ~310 μs .

Effetti dell'accelerazione del carico sulla rigidità iniziale della miofibrilla

Per quanto riguarda la rigidità iniziale della miofibrilla, una stima di essa si può ottenere dividendo la differenza tra F_2 ed F_1 per $stvM$, ovvero la differenza tra la lunghezza della fibra nella sua massima estensione e nella condizione di riposo

$$(F_2 - F_1) / stvM$$

Come ci si aspettava, la rigidità aumenta con l'incremento di $P/P0$, ma si riduce con il decrescere dell'accelerazione del carico. Infatti, quando quest'ultima diminuisce da 980 a 100 cm.s^{-2} , la rigidità decresce a sua volta da 0.305 a 0.085 mN/nm a $P/P0 = 0.368$; da 1.42 a 0.41 mN/nm a $P/P0 = 0.579$; e da 3.24 a 1.43 mN/nm a $P/P0 = 0.789$ (Figura 20).

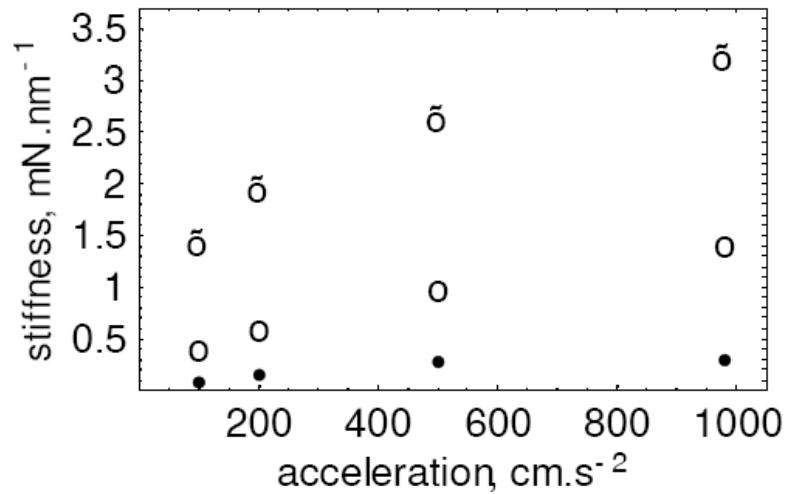


Figura 20. La rigidità in funzione dell'accelerazione del carico
 Cerchi neri, $P/P0 = 0.368$; cerchi bianchi, $P/P0 = 0.579$; \odot , $P/P0 = 0.789$.

Effetto dell'accelerazione del carico sulla viscosità

Secondo il nostro modello, la viscosità è rappresentata dal parametro k , utilizzato per adattare la velocità in assenza di attrito, alla velocità sperimentale allo stato stazionario.

Il confronto tra la situazione in assenza e in presenza di viscosità è illustrato in Figura 21, dove viene esaminato il comportamento della miofibrilla, ad accelerazioni del carico di 980 e 50 cm.s⁻², con $P/P0 = 0.947368$.

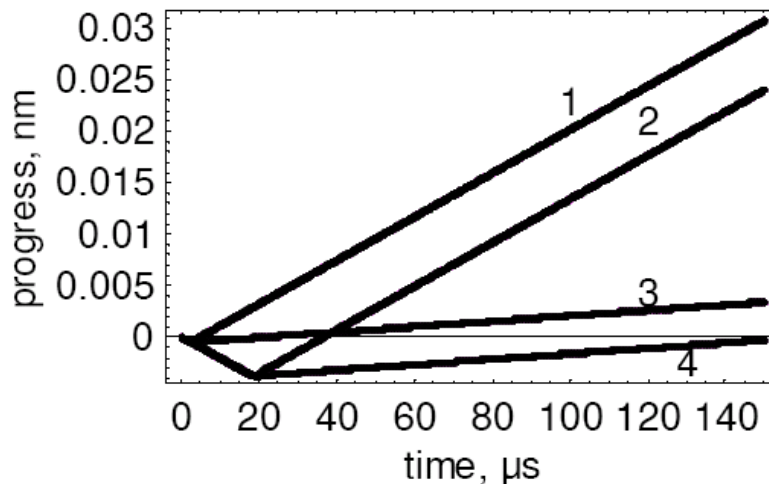


Figura 21. Progresso della contrazione, in assenza e in presenza di attrito, a due accelerazioni del carico - $P/P0 = 0.947368$. Accelerazione del carico, 980 cm.s⁻² (linee 1 e 3) e 50 cm.s⁻² (linee 2 e 4). Attrito, assente (linee 1 e 2), presente (linee 3 e 4).

Per dare inizio alla contrazione, ad un'accelerazione del carico di 980 cm.s^{-2} (linee 1 e 3), è necessaria una F_1 iniziale di 0.08853609356 dyne, mentre ad un'accelerazione del carico pari a 50 cm.s^{-2} (linee 2 e 4), la F_1 richiesta è 0.0334112648 dyne.

Sia in assenza, che in presenza, di viscosità, lo stato pre-stazionario presenta una durata maggiore, con bassa accelerazione ($\sim 35 \mu\text{s}$), rispetto a quando l'accelerazione è più alta ($\sim 5 \mu\text{s}$).

In assenza di attrito (linee 1 e 2), la velocità stazionaria è la medesima, sia con bassa che con elevata accelerazione.

Tuttavia, per misurare la velocità sperimentale (linee 3 e 4), si devono utilizzare due differenti valori per k .

$$k = 6.433 \cdot 10^{-6} \text{ s a } 980 \text{ cm.s}^{-2} \text{ (linea 3)}$$

$$k = 53.27 \cdot 10^{-6} \text{ s a } 50 \text{ cm.s}^{-2} \text{ (linea 4)}.$$

Il modello è quindi adeguato per fornire una risposta al nostro quesito, cioè se le variazioni dell'accelerazione del carico evocano risposte contrattili diverse.

Appendice

Il nostro modello consiste in due fasi. La prima considera gli effetti del colpo di forza in assenza di qualsiasi impedimento. Nella seconda fase, viene introdotta la componente viscosa per misurare sperimentalmente la velocità e il rendimento della contrazione.

Il sarcomero è costituito da $n = 2000$ unità elementari (Ernst, 1977); la sua sezione trasversale è

$$sS = n \cdot 3 \sqrt{3}/2 r^2$$

e la parte mobile della massa di metà sarcomero, m_1 , è

$$m_1 = n (\rho \cdot 3 \sqrt{3}/2 r^2 l_s/2 - 300 \text{ MWM}/(2 N))$$

dove, $\rho = 1.035 \text{ g/cm}^3$, è la densità del muscolo sartorio di rana (Truong, 1974); $r = 25 \text{ nm}$, è la distanza che intercorre tra i centri di due filamenti di actina adiacenti; $l_s = 2.7 \mu\text{m}$, è la lunghezza del sarcomero; 300 è il numero di molecole di miosina nel filamento spesso; MWM è la massa molecolare della miosina, 407 kD (Margossian e Lowey, 1982), N è il numero di Avogadro.

Prima fase

Il colpo di forza è potenziato dall'idrolisi di ATP, $7.44 \cdot 10^{-8}$ pJ per molecola, EATP, (Kushmerick, 1969). I colpi di forza avvengono casualmente e la sequenza di questi eventi produce la contrazione muscolare (Duke, 1999; Huxley, 2004).

L'energia e la forza sviluppate dal colpo di forza sono legate dall'equazione

$$EATP = F_1 l$$

dove, F_1 è la forza media sulla distanza l ad inizio contrazione ed l è lo scorrimento dei filamenti spessi e sottili.

In presenza di un carico, P , la forza che si oppone, F_2 , è

$$F_2 = 2 sS P$$

il fattore 2 sta ad indicare il fatto che solamente la metà della sezione trasversale totale della fibra è occupata dall'apparato contrattile (Merah e Morel, 1993).

La forza generata da un singolo colpo di forza è, generalmente, più bassa di F_2 ; è quindi necessario sommare l'energia totale sviluppata. Ciò è possibile se la frequenza dei colpi di forza oltrepassa un certo livello, così che non tutta l'energia sviluppata da un colpo di forza viene utilizzata prima dell'instaurarsi del successivo. La condizione viene soddisfatta se lo spazio percorso nel tempo tra due colpi di forza è minore di

$$l = EATP / F_1$$

in questo modo, la frazione che rimane dall'energia iniziale, $1 - |lA| / l$, va ad aggiungersi all'energia sviluppata dal colpo di forza successivo.

Seconda fase

Per convertire il moto uniformemente accelerato della prima parte, nel moto uniforme osservato sperimentalmente, abbiamo introdotto, come abbiamo già detto, la componente viscosa.

Per fare questo, si deve assegnare una forma iperbolica alla velocità, vV , delle masse, m_1 ed m_2 , che si muovono per effetto della forza F_1

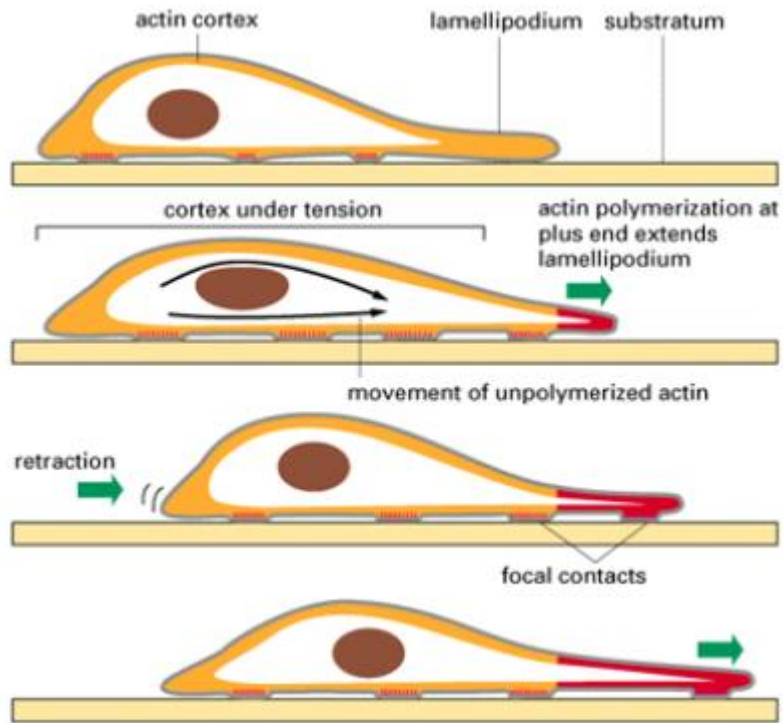
$$vV = k \text{ ad } t / (k + t)$$

Il programma è stato eseguito in due stadi:

- a. nella prima fase, e in presenza di un carico esterno, è stato determinato il livello minimo di $F1$ in grado di promuovere l'accorciamento, in assenza di impedimento viscoso.
- b. nella seconda parte, sono stati stabiliti i valori di k , in grado di uguagliare la velocità calcolata, vV , alla velocità osservata, vO . Il programma è stato fermato a $vV / vO < 1.001$.

Conclusioni

Il movimento cellulare avviene mediante protrusione della membrana anteriore, contatto con il substrato sottostante e retrazione del lembo posteriore, in sequenza ciclica, come raffigurato nella Figura che segue:



La regione più attiva è il lamellipodio anteriore (vedi Foto 7), un'area molto ricca di filamenti actinici, che si presentano sotto forma di reti dense e piccoli fasci.



Foto 7. Lamellipodi: estensioni dinamiche durante il movimento.

L'assemblaggio e il disassemblaggio del filamento di actina è un fenomeno molto complesso, regolato a diversi livelli.

Come abbiamo visto, al processo contribuiscono numerose proteine ausiliarie, con differenti funzioni.

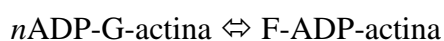
Meccanismi basici di regolazione, inoltre, sono la concentrazione macromolecolare e la concentrazione di ATP. La prima modula le proprietà delle proteine ausiliarie citoscheletriche e promuove la conversione dei filamenti di actina in fasci. Quest'ultimo aspetto viene favorito maggiormente dalla presenza di tropomiosina e inibito in presenza di caldesmone e filamina. La concentrazione macromolecolare orienta l'azione gelificante dell' α -actinina principalmente verso la formazione di fasci, ostacolando, in questo modo, l'azione della gelsolina.

Anche l'ATP è un potenziale strumento di regolazione. A causa della disomogenea distribuzione di sistemi che lo producono e di altri che lo consumano, si crea una disparità nella domanda-offerta di ATP; questo avviene, ad esempio, nelle cellule epatiche, dove le proteine situate alla periferia della cellula (quindi ad una maggiore distanza dai mitocondri) vanno incontro a più acute diminuzioni nella concentrazione di ATP, rispetto alle proteine situate in prossimità dell'apparato mitocondriale (Aw e Jones, 1985).

La deplezione dell'ATP causa la disorganizzazione delle fibre stressorie, in cellule di muscolo liscio vascolare, in coltura (Kwon et al., 2002).

Sembra dunque che la concentrazione di ATP possa influenzare il comportamento dell'actina nella cellula; tuttavia, a causa della molteplicità dei fattori di regolazione che vengono coinvolti, non si hanno certezze sui reali effetti che le variazioni di concentrazione del nucleotide possano avere in vivo.

Abbiamo dimostrato, infatti, come nella distribuzione di lunghezza descritta da Sept e collaboratori (1999), i filamenti non si trovino al minimo di energia libera, in quanto la polimerizzazione dell'actina è un fenomeno associato all'idrolisi dell'ATP. Quando l'ATP della soluzione viene idrolizzato totalmente, il processo di polimerizzazione è descritto dalla reazione



i filamenti possono così raggiungere il proprio minimo di energia libera e la loro distribuzione presenta concentrazioni identiche.

Siamo giunti alla conclusione che un riarrangiamento della distribuzione dei filamenti di actina sia il motivo per cui soluzioni a riposo presentano un comportamento osmotico discordante da quello di soluzioni con simile concentrazione, sottoposte a dialisi contro polietilenglicole.

Combinando il modello di Biron e collaboratori (2006) con i nostri studi, abbiamo definito tre condizioni per le soluzioni di actina F: lo stato stazionario, l'equilibrio e l'equilibrio turbato da un macromolecola esterna.

In questo modo, oltre al contributo delle proteine, abbiamo proposto che la distribuzione di lunghezza dei filamenti di actina sia regolata dalla correlazione tra la reazione di polimerizzazione e quella di idrolisi di ATP.

Nei nostri studi, abbiamo, inoltre, preso in esame la manovra di Huxley-Simmons, che consiste nel rilascio immediato del muscolo in contrazione isometrica e nel successivo recupero della tensione. Assumendo che questo rilascio sia un processo di natura elastica, tenendo conto della tensione isometrica e della rigidità del muscolo, siamo giunti ad affermare che il rilascio spontaneo della fibra richiede un periodo di $\sim 43 \mu\text{s}$ ed avviene più velocemente, rispetto a quello osservato sperimentalmente ($\sim 180 \mu\text{s}$). Abbiamo determinato l'energia elastica interessata in tale processo, ricostruendo un sistema elastico, riscontrando che una considerevole quantità di energia viene resa utilizzabile dal rilascio rapido a favore di altri eventi, come il recupero veloce.

Durante la contrazione, i ponti crociati sono asincroni. Se si potessero sincronizzare, al termine del rilascio rapido, potrebbero al contempo generare il successivo colpo di forza e la tensione sviluppata sarebbe superiore a quella isometrica. Abbiamo misurato la frequenza dei colpi di forza in metà sarcomero, riscontrandola a valori compresi tra $4 \cdot 10^6$ e $40 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$. Con tale frequenza, non vi è alcuna parte della manovra di Huxley-Simmons, che possa “sfuggire” al controllo del colpo di forza. Non vi è quindi alcuna ragione per considerare il conseguente recupero della tensione come un'indicazione della lunghezza del colpo di forza.

Un ultimo aspetto che abbiamo esaminato è il carico, da cui dipende la risposta contrattile di un muscolo attivo. L'accelerazione ad esso associata è un fattore di estrema rilevanza nel determinare il time course della contrazione. Ciò che abbiamo potuto osservare è che, a carico costante, la durata dello stato pre-stazionario aumenta significativamente, con la diminuzione dell'accelerazione del carico. Questo periodo potrebbe raggiungere anche il millisecondo, permettendo quindi di testare sperimentalmente il modello.

Dato che, come abbiamo visto, la contrazione muscolare è soggetta a fine regolazione, non si può escludere che una variazione di tale parametro possa avvenire realmente. Contemporaneamente a questa modificazione, potrebbero variare, ad esempio, la potenza e il rendimento della contrazione, suggerendo così ulteriori ed approfondite indagini, che potrebbero essere oggetto di sfide future.

Bibliografia

- * Arakawa T. e Timasheff S.N., 1985. Mechanism of poly(ethylene glycol) interaction with proteins. *Biochemistry* 24:6756-62.
- * Arisaka F., Noda H. e Maruyama K., 1975. Kinetic analysis of the polymerization process of actin. *Biochim. Biophys. Acta* 400:263-274.
- * Aw T.Y. e Jones D.P., 1985. ATP concentration gradients in cytosol of liver cells during hypoxia. *Am. J. Physiol.* 249:C385-C392.
- * Bähler M. e Greengard P., 1987. Synapsin I bundles F-actin in a phosphorylation-dependent manner. *Nature* 326(6114):704-7.
- * Barany M., Koshland D.E. Jr, Springhorn S.S., Finkelman F., Therattil Antony T., 1964. Adenosine Triphosphate Cleavage During The G-Actin To F-Actin Transformation And The Binding Of Adenosine Diphosphate To F-Actin. *J Biol Chem.* 239:1917-9.
- * Bar-Ziv R. e Safran S.A., 1994. Supercooling of surface-modified phases. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 49(5):4306-4321.
- * Bennett G., Carlet E., Wild G. e Parsons S., 1984. Influence of colchicine and vinblastine on the intracellular migration of secretory and membrane glycoproteins: III. Inhibition of intracellular migration of membrane glycoproteins in rat intestinal columnar cells and hepatocytes as visualized by light and electron-microscope radioautography after 3H-fucose injection. *Am J Anat.* 170(4):545-66.
- * Bershtitsky S.Y., Tsaturyan A.K., Bershtitskaya O.N., Mashanov G.I., Brown P., Burns R. e Ferenczi M.A., 1997. Muscle force is generated by myosin heads stereospecifically attached to actin. *Nature* 388(6638):186-90.

- * Biron D. e Moses E., 2004. The effect of alpha-actinin on the length distribution of F-actin. *Biophys. J.* 86:3284-3290.
- * Biron D., Moses E., Borukhov I. e Safran S.A., 2006. Inter-filament attractions narrow the length distribution of actin filaments. *Europhys. Lett.* 73:464-470.
- * Bradford M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- * Bryan J. e Kane R.E., 1978. Separation and interaction of the major components of sea urchin actin gel. *J. Mol. Biol.* 125:207-224.
- * Burlacu S., Janmey P.A. e Borejdo J., 1992. Distribution of actin filament lengths measured by fluorescence microscopy. *Am. J. Physiol.* 262:C569-C577.
- * Collins J.H. e Elzinga M., 1975. The primary structure of actin from rabbit skeletal muscle. Completion and analysis of the amino acid sequence. *J Biol Chem.* 250:5915-20.
- * Cooke P., 1982. Preparation of isolated thick and thin filaments. *Methods Enzymol.* 85:277-284.
- * Cooper J.A., Buhle E.L., Walker S.B. Jr., Tsong T.Y. e Pollard T.D., 1983. Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization. *Biochemistry* 22:2193-2202.
- * Crowther R.A., Padrón R., Craig R., 1985. Arrangement of the heads of myosin in relaxed thick filaments from tarantula muscle. *J Mol Biol.* 184(3):429-39.

- * Cuneo P., Magri E., Verzola A. e Grazi E., 1992. 'Macromolecular crowding' is a primary factor in the organization of the cytoskeleton. *Biochem. J.* 281:507-512.
- * Curmi P.M., Barden J.A., dos Remedios C.G., 1982. Conformational studies of G-actin containing bound lanthanide. *Eur J Biochem.* 122(2):239-44.
- * Depue R.H. Jr. e Rice R.V., 1965. F-Actin is a right-handed helix. *J. Mol. Biol.* 12:302-303.
- * Dobbie I., Linari M, Piazzesi G, Reconditi M, Koubassova N, Ferenczi M, Lombardi V e Irving M., 1998. Elastic bending and active tilting of myosin heads during muscle contraction. *Nature* 396(6709):317-8.
- * Drenckhahn D. e Pollard T.D., 1986. Elongation of actin filaments is a diffusion-limited reaction at the barbed end and is accelerated by inert macromolecules. *J Biol Chem.* 261(27):12754-8.
- * Duhaiman A.S. e Bamberg J.R., 1984. Isolation of brain alpha-actinin. Its characterization and a comparison of its properties with those of muscle alpha-actinins. *Biochemistry* 23(8):1600-8.
- * Duke T.A.J., 1999. Molecular model of muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2770-2775.
- * Edelstein-Keshet L. e Ermentrout G.B. e., 1998. Models for the length distributions of actin filaments: I. Simple polymerization and fragmentation. *Bulletin of Mathematical Biology* 60: 449-475.
- * Egelman E.H., 1985. The structure of F-actin. *J Muscle Res Cell Motil.* 6(2):129-51.

- * Ermentrout B.G. e Edelstein-Keshet L., 1998. Models for the length distributions of actin filaments: II. Polymerization and fragmentation by gelsolin acting together. *Bulletin of Mathematical Biology* 60: 477-503.
- * Ernst E., 1977. Sliding friction contra sliding hypothesis. *Acta Biochim. Et Biophys. Acad. Sci. Hung.* 12:83-85.
- * Ferri A. e Grazi E., 1982. Mechano-chemical energy transduction in biological systems. The effect of mechanical stimulation on the polymerization of actin: a kinetic study. *Biochem. J.* 205:281-284.
- * Ferri A., Magri E. e Grazi E., 1979. The rate-limiting step of the protamine-induced adenosine triphosphatase activity of adenosine triphosphate-G-actin. *Biochem J* 183(2):475-6.
- * Flory P.J., 1956. Role of Crystallization in Polymers and Proteins. *Science* 124(3211):53-60.
- * Ford L.E., Huxley A.F. e Simmons R.M., 1977. Tension transients during the rise of tetanic tension in frog muscle fibres. *J. Physiol.* 269:441-515.
- * Frieden C. e Goddette D.W., 1983. Polymerization of actin and actin-like systems: evaluation of the time course of polymerization in relation to the mechanism. *Biochemistry* 22:5836-5843.
- * Fujime S. e Ishiwata S., 1971. Dynamic study of F-actin by quasielastic scattering of laser light. *J Mol Biol.* 62(1):251-65.
- * Fujiwara S., Takahashi H., Tadakuma T., Funatsu S., Ishiwata S., 2002. Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nature Cell Biol* 4:666-673.

- * Goldmann Y.E. e Simmons R.M., 1977. Active and rigor muscle stiffness [proceedings]. *J. Physiol. (London)* 269:55-57P.
- * Gordon D.J., Yang Y.Z. e Korn E.D., 1976. Polymerization of Acanthamoeba actin. Kinetics, thermodynamics, and co-polymerization with muscle actin. *J Biol Chem.* 251:7474-9.
- * Grant R.J., 1965. Doctoral Thesis, Columbia University, New York.
- * Grazi E. e Trombetta G., 1986. [γ - 32 P]ATP as a tracer of the fragmentation of Ca-F-actin. *Biochem. J.* 239:801-803.
- * Grazi E., 1984. $^{54}\text{Mn}^{2+}$ as a tracer of the polymerization of actin. Intermediate oligomers condense to give F-actin. *Biochem. J.* 223:571-576.
- * Grazi E., 1994. Cytoskeleton, motile structures and macromolecular crowding. Actin: Biophysics, Biochemistry, and Cell Biology. Edited by J.E. Estes and P.J. Higgins, Plenum Press, New York.
- * Grazi E., 1997. What is the diameter of the actin filament? *FEBS Lett.* 405:249-52.
- * Grazi E., 2000. A highly non-ideal solution: the contractile system of skeletal muscle. *Eur. Biophys. J.* 29:535-41.
- * Grazi E., Aleotti A. e Ferri A., 1984. Characterization of the ATP-G-actin aggregates formed at low potassium chloride concentration. *Biochem J.* 219(1):273-6.
- * Grazi E., Aleotti A. e Ferri A., 1984. Characterization of the ATP-G-actin aggregates formed at low potassium chloride concentration *Biochem. J.* 219:273-276.
- * Grazi E., Cuneo P., Magri E. e Schwienbacher C., 1992. Preferential binding of alpha-actinin to actin bundles. *FEBS Lett.* 314:348-350.

- * Grazi E., Cuneo P., Magri E., Schwienbacher C. e Trombetta G., 1993. Diffusion hindrance and geometry of filament crossings account for the complex interactions of F-actin with alpha-actinin from chicken gizzard. *Biochemistry* 32:8896-8901.
- * Grazi E., Ferri A. e Cino S., 1983. The polymerization of actin. A study of the nucleation reaction. *Biochem J.* 213(3):727-32.
- * Grazi E., Ferri A., Lanzara V., Magri E. e Zaccarini M., 1980. G-actin modified by plasma membrane interaction polymerizes only in the presence of filamentous myosin. *FEBS Lett.* 112(1):67-9.
- * Grazi E., Magri E. e Pasquali-Ronchetti I., 1982. Multiple supramolecular structures formed by interaction of actin with protamine. *Biochem. J.* 205:31-37.
- * Grazi E., Magri E., Cuneo P. e Cataldi A., 1991. The control of cellular motility and the role of gelsolin. *FEBS Lett.* 295:163-166.
- * Grazi E., Schwienbacher C. e Magri E., 1993. Osmotic stress is the main determinant of the diameter of the actin filament. *Biochem Biophys Res Commun.* 197:1377-81.
- * Grazi E., Trombetta G. e Guidoboni M., 1990. Divergent effects of filamin and tropomyosin on actin filaments bundling. *Biochem Biophys Res Commun.* 167(3):1109-14.
- * Grazi E., Trombetta G. e Guidoboni M., 1990. Microfilament gel rigidity cooperates negatively with the binding of actin gelling proteins. *Biochem Int.* 21(4):633-640.
- * Grazi E., Trombetta G., Magri E. e Cuneo P., 1990. The actin gelling activity of chicken gizzard alpha-actinin at physiological temperature is triggered by water sequestration. *FEBS Lett.* 272(1-2):149-51.

- * Grazi E. e Di Bona C., 2005. Cooperative behaviour of the elementary sarcomere units and the cross-bridge step size. *Biophys Chem.* 118:113-117.
- * Grazi E. e Di Bona C., 2006. Viscosity as an inseparable partner of muscle contraction. *J. Theoret. Biol.* 242:853-861.
- * Grazi E. e Di Bona C., 2006. Protein osmotic pressure and cross-bridge attachment determine the stiffness of thin filaments in muscle ex vivo. *J Biochem.* 140(1):39-42.
- * Grazi E. e Pozzati S., 2008. Protein osmotic pressure modulates actin filament length distribution. *J Theor Biol.* 251(3):411-20.
- * Grazi E. e Pozzati S., 2009. Force And Length Do Not Rigorously Define Muscle Contraction. In stampa.
- * Grazi E. e Pozzati S., 2009. The Contribution of the Elastic Reaction is severely underestimated in the Studies on Myofibrils Contraction. In stampa.
- * Grazi E. e Trombetta G., 1985. Effects of temperature on actin polymerized by Ca^{2+} . Direct evidence of fragmentation. *Biochem. J.* 232:297-300.
- * Grazi E. e Magri E., 1987. Kinetic heterogeneity of F-actin polymers. *Biochem. J.* 248:721-725.
- * Grinstein S. e Foskett J.K., 1990. Ionic mechanisms of cell volume regulation in leukocytes. *Annu Rev Physiol.* 52:399-414
- * Hanson J. e Lowy J., 1964. The structure of actin filaments and the origin of the axial periodicity in the I-substance of vertebrate striated muscle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 160:449-60.

- * He Z.H., Bottinelli R., Pellegrino M.A., Ferenczi M.A. e Reggiani C., 2000. ATP consumption and efficiency of human single muscle fibers with different myosin isoform composition. *Biophys. J.* 79:945-961.
- * He Z.H., Chillingworth R.K., Brune M., Corrie J.E.T., Webb M.R. e Ferenczi M.A., 1999. The efficiency of contraction in rabbit skeletal muscle fibres, determined from the rate of release of inorganic phosphate. *J. Physiol. (London)* 517.3:839-854.
- * Hill A.V., 1977. A-band length, striation spacing and tension change on stretch of active muscle. *J Physiol.* 266(3):677-85.
- * Holmes K.C., Popp D., Gebhard W. e Kabsch W., 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347:44-49.
- * Holmes K.C., Popp D., Gebhard W. e Kabsch W., 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature.* 347(6288):44-9.
- * Holmsen H., Storm E. e Day H.J., 1972. Determination of ATP and ADP in blood platelets: a modification of the firefly luciferase assay for plasma. *Anal Biochem.* 46(2):489-501.
- * Husain-Chishti A., Levin A. e Branton D., 1988. Abolition of actin-bundling by phosphorylation of human erythrocyte protein 4.9. *Nature* 334(6184):718-21.
- * Huxley A.F. e Simmons R.M., 1971. Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature* 233:533-538.
- * Huxley A.F., 1957. Muscle structure and theories of contraction. *Prog. Biophys. Biophys. Chem.* 7:255-318.
- * Huxley A.F., 1974. Muscular contraction. *J. Physiol.* 243:1-43.
- * Huxley H.E., 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164:1356-1366.

- * Huxley H.E., 2000. Past, present and future experiments on muscle. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355:539-543.
- * Huxley H.E., 2004. Fifty years of muscle and the sliding filament hypothesis. *Eur. J. Biochem.* 271:1403-1415.
- * Huxley H.E., Simmons R.M., Faruqi A.R., Kress M., Bordas J. e Koch M.H.J., 1981. Millisecond time-resolved changes in x-ray reflections from contracting muscle during rapid mechanical transients, recorded using synchrotron radiation. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.* 78:2297-2301.
- * Ikebuchi N.W. e Waisman D.M., 1990. Calcium-dependent regulation of actin filament bundling by lipocortin-85. *J Biol Chem.* 265(6):3392-400.
- * Irving M., Lombardi V., Piazzesi G. e Ferenczi M., 1992. Myosin head movements are synchronous with the elementary force-generating process in muscle. *Nature* 357:156-158.
- * Janmey P.A. e Stossel T.P., 1987. Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature* 325(6102):362-4.
- * Jockusch B.M. e Isenberg G., 1981. Interaction of alpha-actinin and vinculin with actin: opposite effects on filament network formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(5):3005-9.
- * Kabsch W., Mannherz H.G., Suck D., Pai E.F. e Holmes K.C., 1990. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347(6288):37-44.
- * Käs J., Strey H., Tang J.X., Finger D., Ezzell R., Sackmann E. e Janmey P.A., 1996. F-actin, a model polymer for semiflexible chains in dilute, semidilute, and liquid crystalline solutions. *Biophys. J.* 70:609-625.

- * Kasai M., Kawashima H. e Oosawa F., 1960. Dephosphorylation of adenosine triphosphate in actin solutions at low concentrations of magnesium. *J. Polymer Sci.* 44:51-69.
- * Kasai M., Asakura S. e Oosawa F., 1962. The G-F equilibrium in actin solutions under various conditions. *Biochim Biophys Acta.* 57:13-21.
- * Kaufmann S., Käs J., Goldmann W.H., Sackmann E. e Isenberg G., 1992. Talin anchors and nucleates actin filaments at lipid membranes. A direct demonstration. *FEBS Lett.* 314:203-205.
- * Kawamura M. e Maruyama K., 1970. Polymorphism of F-actin. I. Three forms of paracrystals. *J Biochem.* 68(6):885-99.
- * Kawamura M. e Maruyama K., 1970. Electron microscopic particle length of F-actin polymerized in vitro. *J Biochem* 67(3):437-57.
- * Kawamura M e Maruyama K., 1972. A further study of electron microscopic particle length of F-actin polymerized in vitro. *J Biochem.* 72(1):179-88.
- * Kawamura M. e Maruyama K., 1972. Length distribution of F-actin transformed from Mg-polymer. *Biochim Biophys Acta.* 267(2):422-34.
- * Kuehl W.M. e Gergely J., 1969. The kinetics of exchange of adenosine triphosphate and calcium with G-actin. *J. Biol. Chem.* 244:4720-4729.
- * Kushmerick M.K. e Davies R.E., 1969. The chemical energetics of muscle contraction. II. The chemistry, efficiency and power of maximally working sartorius muscles. Appendix. Free energy and enthalpy of atp hydrolysis in the sarcoplasm. *Proc. R. Soc. B* 174:315-353.

- * Kushmerick M.K., 1969. The chemical energetics of muscle contraction. I. Activation heat, heat of shortening and ATP utilization for activation-relaxation processes. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 174:290-314.
- * Kwon O., Phillips C.L. e Molitoris B.A., 2002. Ischemia induces alterations in actin filaments in renal vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282:F1012-F1019.
- * Lazarides E., 1976. Actin, alpha-actinin, and tropomyosin interaction in the structural organization of actin filaments in nonmuscle cells. *J Cell Biol.* 68(2):202-19.
- * Lee R.M., Garfield R.E., Forrest J.B. e Daniel E.E., 1979. The effects of fixation, dehydration and critical point drying on the size of cultured smooth muscle cells. *Scan Electron Microsc.* 3:439-48.
- * Linari M., Dobbie I., Reconditi M., Koubassova N., Irving M., Piazzesi G. e Lombardi V., 1998. The stiffness of skeletal muscle in isometric contraction and rigor: the fraction of myosin heads bound to actin. *Biophys. J.* 74:2459-2473.
- * Littlefield R. e Fowler V.M., 1998. Defining actin filament length in striated muscle: rulers and caps or dynamic stability? *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14:487-525.
- * Lombardi V., Piazzesi G., Ferenczi M.A., Thirlwell H., Dobbie I. e Irving M., 1995. Elastic distortion of myosin heads and repriming of the working stroke in muscle. *Nature.* 374(6522):553-5.
- * Lombardi V., Piazzesi G. e Linari M., 1992. Rapid regeneration of the actin-myosin power stroke in contracting muscle. *Nature* 355:638-641.
- * Lorenz M., Popp D. e Holmes K.C., 1993. Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J Mol Biol.* 234(3):826-36.

- * Mabuchi I., 1976. Isolation of myosin from starfish sperm heads. *J. Mol. Biol.* 100:569-582.
- * Magri E., Zaccarini M. e Grazi E., 1978a. The interaction of histone and protamine with actin. Possible involvement in the formation of the mitotic spindle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82:1207-1210.
- * Magri E., Zaccarini M. e Grazi E., 1978b. Does protamine dictate the direction of growth of the actin filaments? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85:35-41.
- * Margossian S.A. e Lowey S., 1982. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.* 85:55-71.
- * Maruyama K., 1981. Sonic vibration induces the nucleation of actin in the absence of magnesium ions and cytochalasins inhibit the elongation of the nuclei. *J. Biol. Chem.* 256:1060-1062.
- * Maughan D.W. e Godt R.E., 2001. Protein osmotic pressure and the state of water in frog myoplasm. *Biophysical Journal* 80:435-442.
- * Merah Z. e Morel J.E., 1993. Isometric tension exerted by a myofibril of the frog at 0 degree C: geometrical considerations. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 14:552-553.
- * Meyer R.K. e Aebi U., 1990. Bundling of actin filaments by alpha-actinin depends on its molecular length. *J Cell Biol.* 110(6):2013-24.
- * Minton A.P. e Wilf J., 1981. Effect of macromolecular crowding upon the structure and function of an enzyme: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 20(17):4821-6.
- * Minton A.P., 1981. The bivalent ligand hypothesis. A quantitative model for hormone action. *Mol Pharmacol.* 19(1):1-14.

- * Minton A.P., Colclasure G.C. e Parker J.C., 1992. Model for the role of macromolecular crowding in regulation of cellular volume. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21):10504-6.
- * Moody C.J., Marston S.B. e Smith C.W., 1985. Bundling of actin filaments by aorta caldesmon is not related to its regulatory function. *FEBS Lett.* 191(1):107-12.
- * Murphy R.A., 1989. Contraction in smooth muscle cells. *Annu Rev Physiol.* 51:275-83.
- * Nachmias V.T., Huxley H.E. e Kessler D., 1970. Electron microscope observations on actomyosin and actin preparations from *Physarum polycephalum*, and on their interaction with heavy meromyosin subfragment I from muscle myosin. *J. Mol. Biol.* 50:83-90.
- * Needham D.M., 1950. Myosin and adenosinetriphosphate in relation to muscle contraction. *Biochim. Biophys. Acta.* 4:42-49.
- * Noritake J., Fukata M., Sato K., Nakagawa M., Watanabe T., Izumi N., Wang S., Fukata Y. e Kaibuchi K., 2004. Positive role of IQGAP1, an effector of Rac1, in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact. *Mol. Biol. Cell* 15:1065-1076.
- * Oda T., Makino K., Yamashita I., Namba K. e Maéda Y., 1998. Distinct structural changes detected by X-ray fiber diffraction in stabilization of F-actin by lowering pH and increasing ionic strength. *Biophys. J.* 95:2672-2681.
- * Ogston A.G., 1962. Molecular weight of enzymes. *Nature* 196:171-2.
- * Onsager, 1949. Apparatus for isotope separation by thermal diffusion. *Rev Sci Instrum.* 20(12):924-7
- * Oosawa F. e Kasai M., 1962. A theory of linear and helical aggregations of macromolecules. *J Mol Biol.* 4:10-21.

- * Oosawa F., 1970. Size distribution of protein polymers. *J Theor Biol.* 27(1):69-86.
- * Oosawa F., 1972. Dynamic properties of F-actin and the thin filament. *Nippon Seirigaku Zasshi.* 34(2):96-7.
- * Orlova A., Yu X. e Egelman E.H., 1994. Three-dimensional reconstruction of a co-complex of F-actin with antibody Fab fragments to actin's NH2 terminus. *Biophys J.* 66(2 Pt 1):276-85.
- * Otterbein L.R., Graceffa P. e Dominguez R., 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* 293:708-711.
- * Piazzesi G. e Lombardi V., 1995. A cross-bridge model that is able to explain mechanical and energetic properties of shortening muscle. *Biophys. J.* 68(5):1966-79.
- * Piazzesi G., Linari M. e Lombardi V., 1994. The effect of hypertonicity on force generation in tetanized single fibres from frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 476:531-546.
- * Piazzesi G., Lucii L. e Lombardi V., 2002. The size and the speed of the working stroke of muscle myosin and its dependence on the force. *J. Physiol. (London)* 545.1:145-151.
- * Pollard T.D. e Weeds A.G., 1984. The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin. *FEBS Lett.* 170:94-98.
- * Pollard T.D. e Cooper J.A., 1986. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem.* 55:987-1035.
- * Popp D., Lednev V.V. e Jahn W., 1987. Methods of preparing well-orientated sols of f-actin containing filaments suitable for X-ray diffraction. *J Mol Biol.* 197(4):679-84.

- * Pribluda V., Laub F. e Rotman A., 1981. The state of actin in activated human platelets. *Eur J Biochem.* 116(2):293-6.
- * Raghavan M., Smith C.K. e Schutt C.E., 1989. Analytical determination of methylated histidine in proteins: actin methylation. *Anal Biochem.* 178(1):194-7.
- * Romani A. e Scarpa A., 1992. Regulation of cell magnesium. *Arch Biochem Biophys.* 298(1):1-12.
- * Schutt C.E., Lindberg U., Myslik J. e Strauss N., 1989. Molecular packing in profilin:actin crystals and its implications. *J Mol Biol.* 209(4):735-46.
- * Schutt C.E., Myslik J.C., Rozycki M.D., Goonesekere N.C. e Lindberg U., 1993. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* 365(6449):810-6.
- * Schutt C.E. e Lindberg U., 1993. A new perspective on muscle contraction. *FEBS Lett.* 325(1-2):59-62.
- * Schwienbacher C., Magri E., Trombetta G. e Grazi E., 1995. Osmotic properties of the calcium-regulated actin filament. *Biochemistry* 34:1090-5.
- * Sept D., Xu J., Pollard T.D. e McCammon J.A., 1999. Annealing accounts for the length of actin filaments formed by spontaneous polymerization. *Biophys. J.* 77:2911-2919.
- * Shearwin K., Nanhua C. e Masters C., 1989. The influence of molecular crowding on the binding of glycolytic enzymes to cytoskeletal structure. *Biochem Int.* 19(4):723-9.

- * Small J.V., Rinnerthaler G. e Hinssen H., 1982. Organization of actin meshworks in cultured cells: the leading edge. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 46 Pt 2:599-611.
- * Sobue K., Muramoto Y., Fujita M. e Kakiuchi S., 1981. Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(9):5652-5.
- * Sobue K., Fujita M., Muramoto Y. e Kakiuchi S., 1981. The calmodulin-binding protein in microtubules is tau factor. *FEBS Lett.* 132(1):137-40.
- * Somlyo A.V., Khromov A.S., Webb M.R., Ferenczi M.A., Trentham D.R., He Z.H., Sheng S., Shao Z. e Somlyo A.P., 2004. Smooth muscle myosin: regulation and properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359(1452):1921-30.
- * Spudich J.A. e Watt S.J., 1971. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem.* 246:4866-71.
- * Srolovitz D.J., Safran S.A. e Tenne R., 1994. Elastic equilibrium of curved thin films. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 49(6):5260-5270.
- * Strzelecka-Golaszewska H., 1973. Effect of tightly bound divalent cation on the equilibria between G-actin-bound and free ATP. *Biochim. Biophys. Acta* 310:60-69.
- * Strzelecka-Golaszewska H., Zmorzynski S. e Mossakowska M., 1985. Effects of various amino acid replacements on the conformational stability of G-actin. *Biochim. Biophys. Acta* 828:13-21.
- * Strzelecka-Golaszewska H., Hinssen H. e Sobieszek A., 1984. Influence of an actin-modulating protein from smooth muscle on actin-myosin interaction. *FEBS Lett.* 177(2):209-16.

- * Suzuki A., Yamazaki M. e Ito T., 1989. Osmoelastic coupling in biological structures: formation of parallel bundles of actin filaments in a crystalline-like structure caused by osmotic stress. *Biochemistry* 28(15):6513-8.
- * Suzuki N., Tamura Y. e Mihashi K., 1996. Compressibility and specific volume of actin decrease upon G to F transformation. *Biochim Biophys Acta* 1292(2):265-72.
- * Tait J.F. e Frieden C., 1982. Polymerization and gelation of actin studied by fluorescence photobleaching recovery. *Biochemistry* 21(15):3666-74.
- * Tait J.F. e Frieden C., 1982. Chemical modification of actin. Acceleration of polymerization and reduction of network formation by reaction with N-ethylmaleimide, (iodoacetamido) tetramethylrhodamine, or 7-chloro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *Biochemistry* 21(24):6046-53.
- * Tellam R.L., Sculley M.J., Nichol L.W. e Wills P.R., 1983 The influence of poly(ethylene glycol) 6000 on the properties of skeletal-muscle actin. *Biochem J.* 213(3):651-9.
- * Tirion M.M., ben-Avraham D., Lorenz M. e Holmes K.C., 1995. Normal modes as refinement parameters for the F-actin model. *Biophys J.* 68(1):5-12.
- * Trombetta G., Di Bona C. e Grazi E., 2005. The transition of polymers into a network of polymers alters per se the water activity. *Int J Biol Macromol.* 35(1-2):15-8.
- * Truong X.T., 1974. Viscoelastic wave propagation and rheologic properties of skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 226:256-265.
- * Wang K. e Singer S.J., 1977. Interaction of filamin with f-actin in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(5):2021-5.
- * Webb M.A. e Ferenczi M., 1997. *J. Physiol.* 501:125-148.

- * Wegner A. e Engel J., 1975. Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments. *Biophys. Chem.* 3:215-225.
- * Wegner A. e Savko P., 1982. Fragmentation of actin filaments. *Biochemistry* 21:1909-1913.
- * Wegner A., 1982. Spontaneous fragmentation of actin filaments in physiological conditions. *Nature (London)* 296:266-277.
- * Wegner A., 1982. Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments. *J Mol Biol.* 161(4):607-15.
- * Wittmann T., Gary M., Bokoch G.M. e Waterman-Storer C.M., 2003. Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *J. Cell Biol.* 161:845-851.
- * Woodhead J.L., Zhao F.Q., Craig R., Egelman E.H., Alamo L., Padrón R., 2005. Atomic model of a myosin filament in the relaxed state. *Nature* 436(7054):1195-9.
- * Xu J., Casella J.F. e Pollard T.D., 1999. Effect of capping protein, CapZ, on the length of actin filaments and mechanical properties of actin filament networks. *Cell Motil. Cytoskeleton* 42:73-81.
- * Xu J., Zutter M.M., Santoro S.A. e Clark R.A., 1998. A three-dimensional collagen lattice activates NF-kappaB in human fibroblasts: role in integrin alpha2 gene expression and tissue remodeling. *J Cell Biol.* 140(3):709-19.
- * Yin H.L. e Stull J.T., 1999. Proteins that regulate dynamic actin remodeling in response to membrane signaling minireview series. *J Biol Chem.* 274(46):32529-30.