

Regolazione della contrazione nel muscolo striato

- E. D'Angelo, A. Peres. *Fisiologia. Molecole, cellule e sistemi*. Tomo 1. Edi-Ermes.
- D. J. Aidley. *The physiology of excitable cells*. Cambridge University Press.
- D. Randall, W. Burggren, K. French. *Fisiologia animale. Meccanismi e adattamenti*. Zanichelli.
- M. Linari, E. Brunello, M. Reconditi, L. Fusi, M. Caremani, T. Narayanan, G. Piazzesi, V. Lombardi, M. Irving. Force generation by skeletal muscle is controlled by mechanosensing in myosin filaments. *Nature* 528: 276-279, 2015

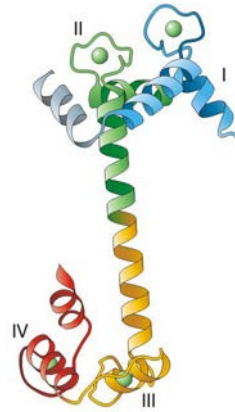
Regolazione del filamento sottile

Proteine regolatrici del filamento sottile



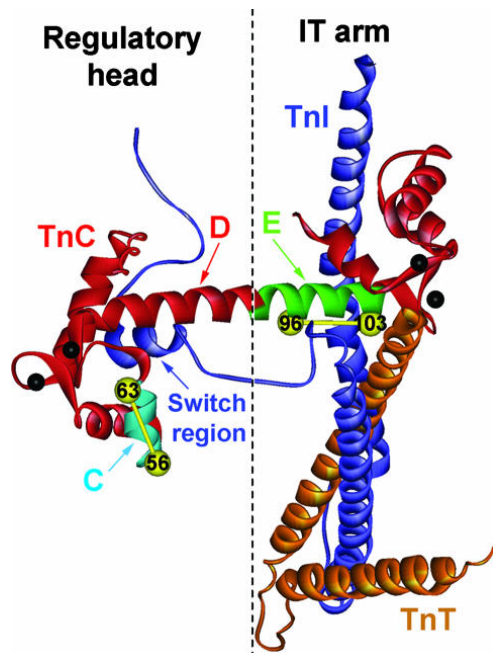
Tropomiosina

Troponina C

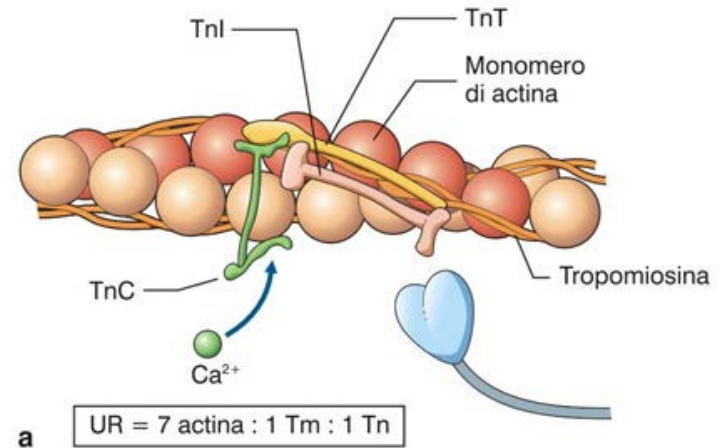


Tropomiosina (Tm): dimero lungo 40 nm formato da due catene ad α -elica avvolte tra loro. Ogni molecola di Tm si lega a quella successiva sovrapponendosi per alcuni residui aa. In ciascun dimero sette sequenze aminoacidiche formano i siti di legame per altrettanti monomeri di actina sul filamento sottile.

Troponina (Tn): è un complesso proteico formato da tre subunità: la **TnC**, composta da due domini globulari uniti da un'elica centrale, presenta i siti di legame per il Ca^{2+} ; la **TnI** inibisce l'interazione actina-miosina e l'ATPasi actomiosinica e la **TnT** lega TnC e TnI alla Tm nella regione di sovrapposizione tra due molecole di Tm.

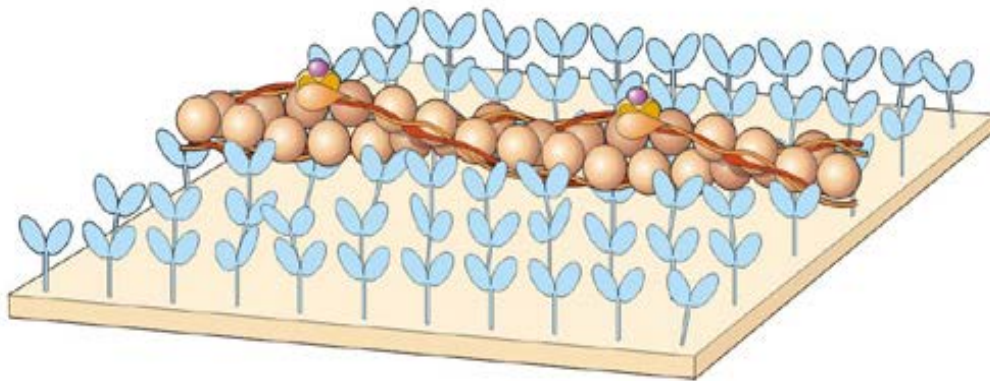


Struttura della porzione centrale del complesso troponinico di muscolo scheletrico nella forma legata al Ca^{2+} (troponina C, TnC, rosso, turchese, verde; troponina I, TnI, blu; troponina T, TnT, marrone).

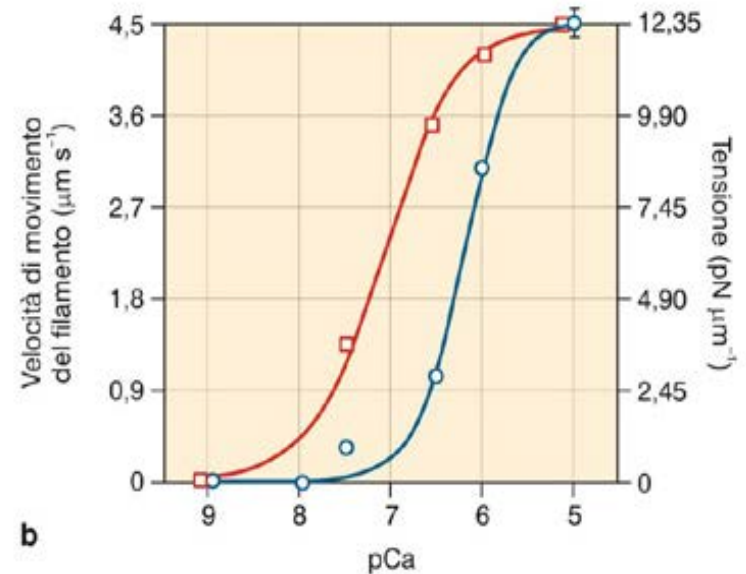


Schema dell'unità regolatrice costituita da 7 monomeri di actina, 1 molecola di tropomiosina e un complesso troponinico

Proteine regolatrici del filamento sottile



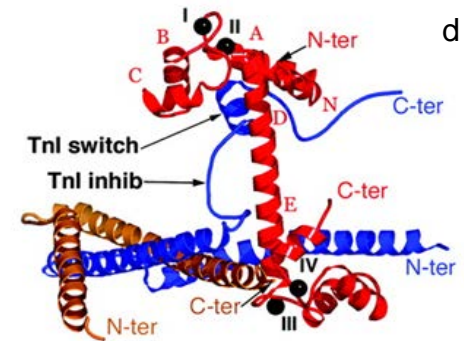
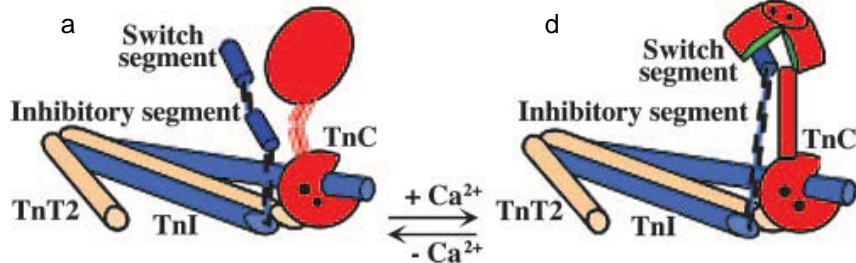
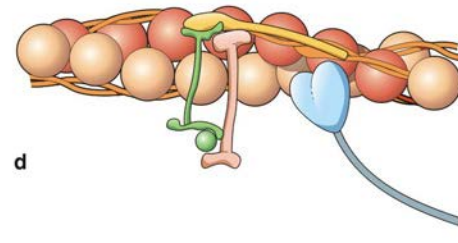
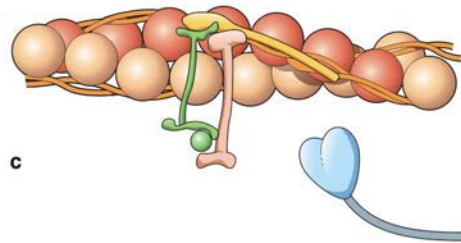
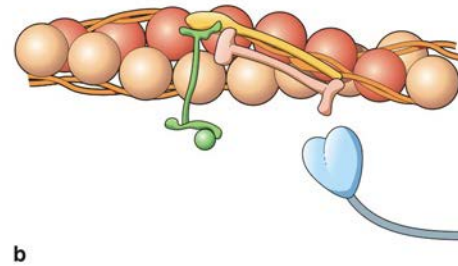
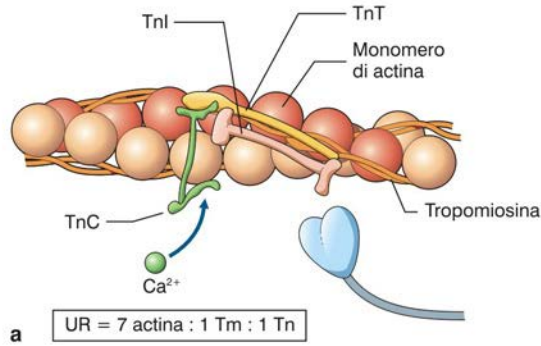
a



b

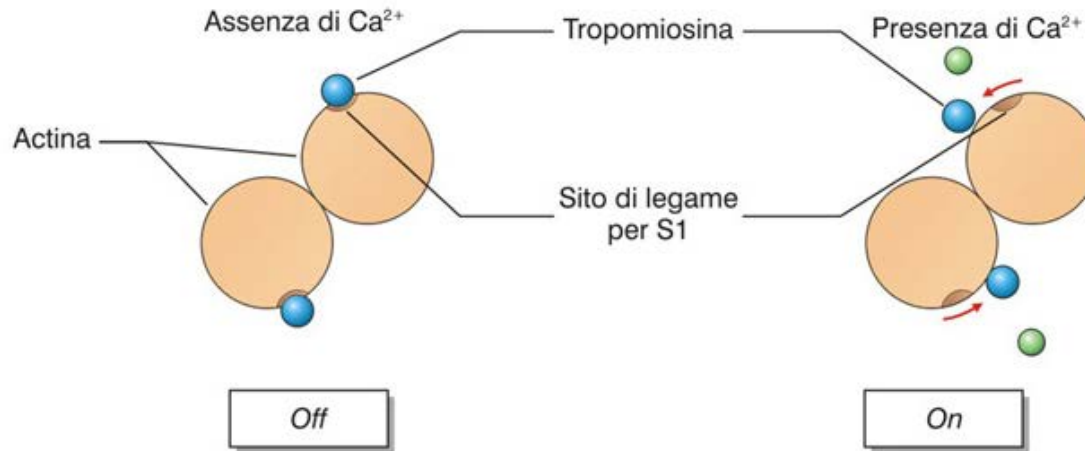
Esperimenti di motilità in vitro hanno mostrato che filamenti di actina ricostituiti senza il complesso Tm-Tn si muovono sul letto di miosine indipendentemente dalla presenza del Ca^{2+} , purchè sia presente ATP. Se i filamenti sono ricostituiti con l'intero complesso di proteine regolatrici, il movimento si osserva solo in presenza di Ca^{2+} e ATP. Tm e TnT da sole non inibiscono la motilità, mentre l'aggiunta di TnI provoca un blocco che non è rimosso dal Ca^{2+} . Quindi la TnI ha un ruolo fondamentale nel blocco dell'interazione actomiosinica e questo blocco è modulato dal Ca^{2+} attraverso la TnC che è il sensore del Ca^{2+} sul filamento sottile

Schema delle modifiche indotte dal Ca^{2+} durante l'attivazione del filamento sottile



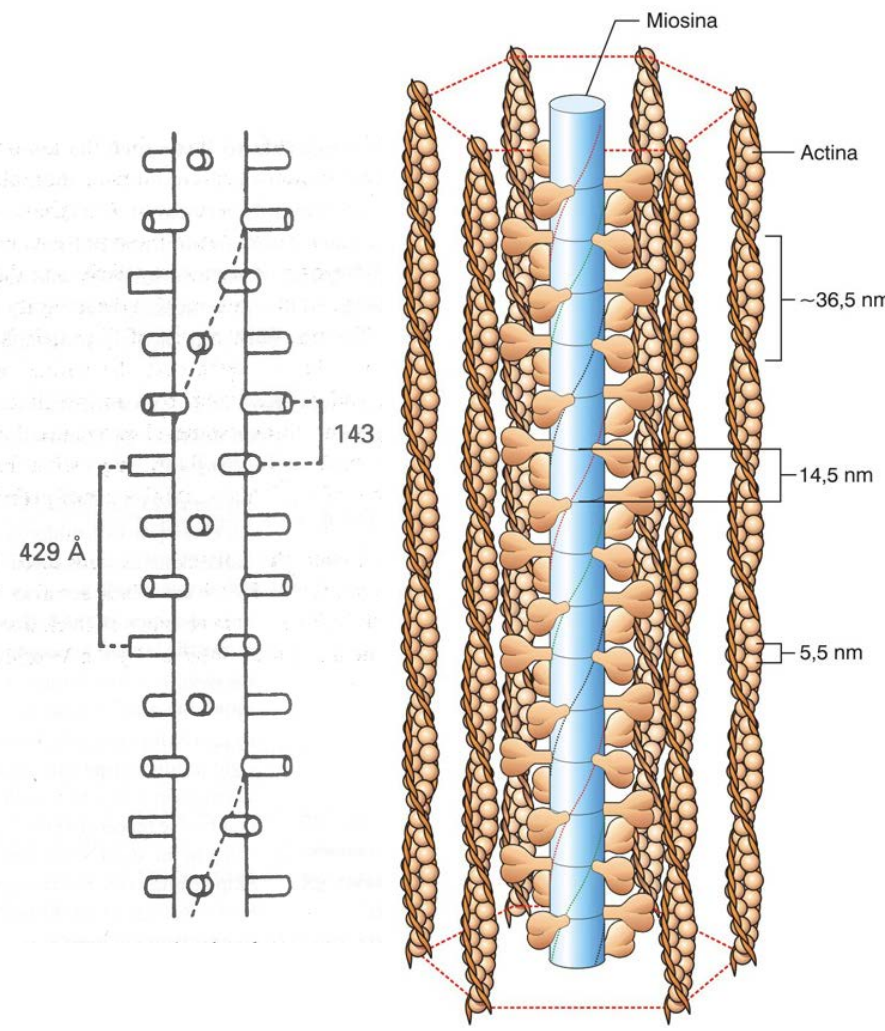
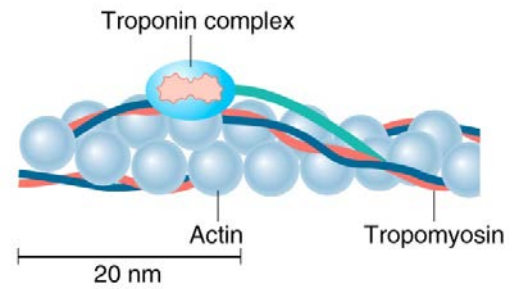
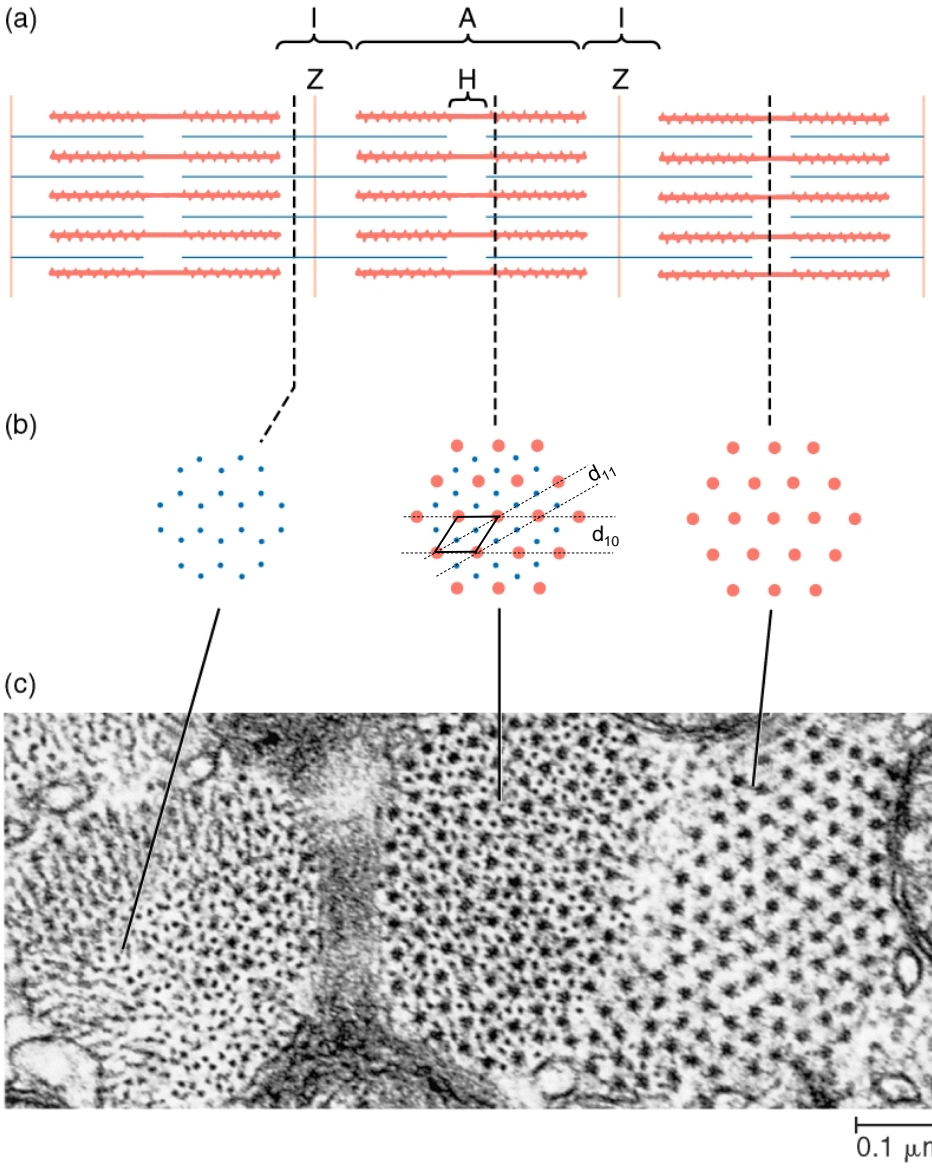
In presenza di Ca^{2+} la TnC subisce una modifica strutturale (b) che scopre siti per l'interazione con la TnI; in seguito all'interazione con la TnC, la TnI si stacca dall'actina (c) rimuovendo l'effetto inibitorio che questa esercita sull'interazione acto-miosinica; **le modifiche strutturali della TnI cambiano anche i rapporti tra TnT e Tm, promuovendo lo spostamento di quest'ultima nel filamento sottile in modo da aumentare la probabilità di attacco delle teste di miosina all'actina (d).**

Ipotesi del blocco sterico

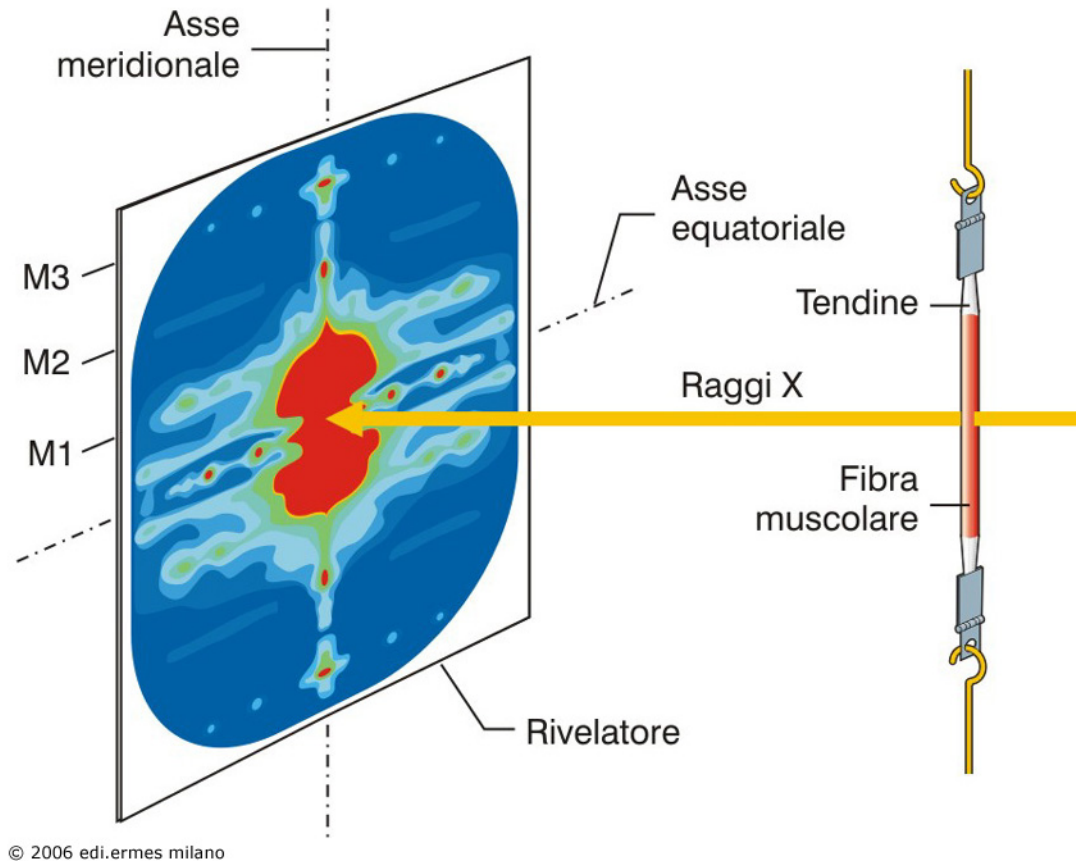


La Tm impedisce l'interazione actomiosinica bloccando stericamente i siti di legame sul filamento sottile. Tale blocco è rimosso in presenza di Ca^{2+} grazie allo spostamento della Tm verso il solco tra i monomeri di actina. Il movimento della Tm è stato messo in evidenza con esperimenti di diffrazione di raggi X e con la microscopia elettronica.

Struttura del sarcomero e dei miofilamenti

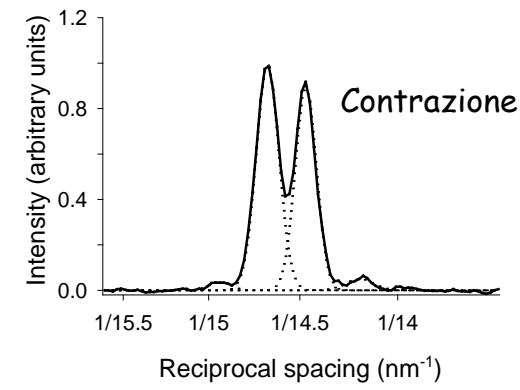
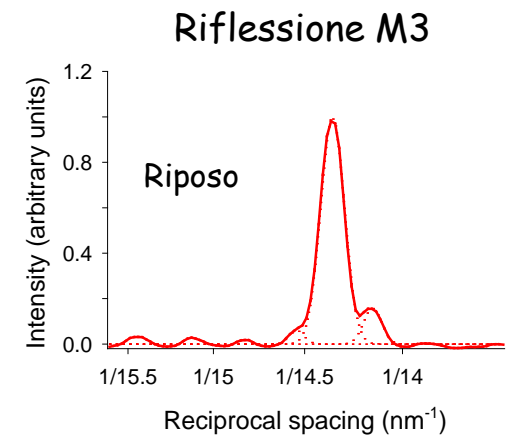
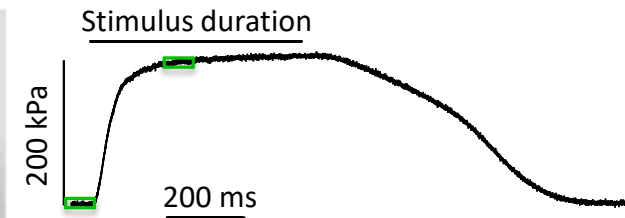
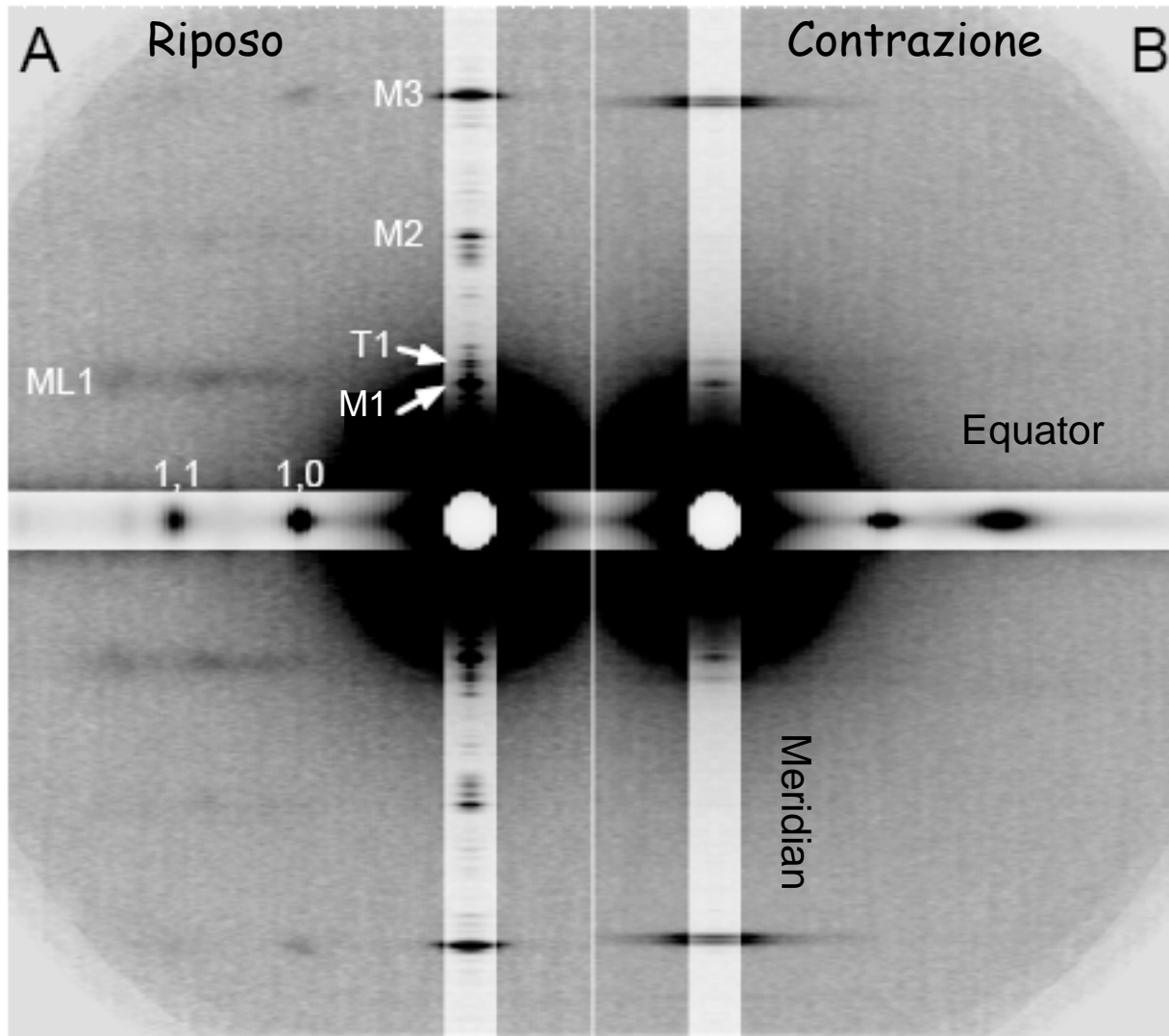


Diffrazione di raggi X da singola fibra muscolare scheletrica

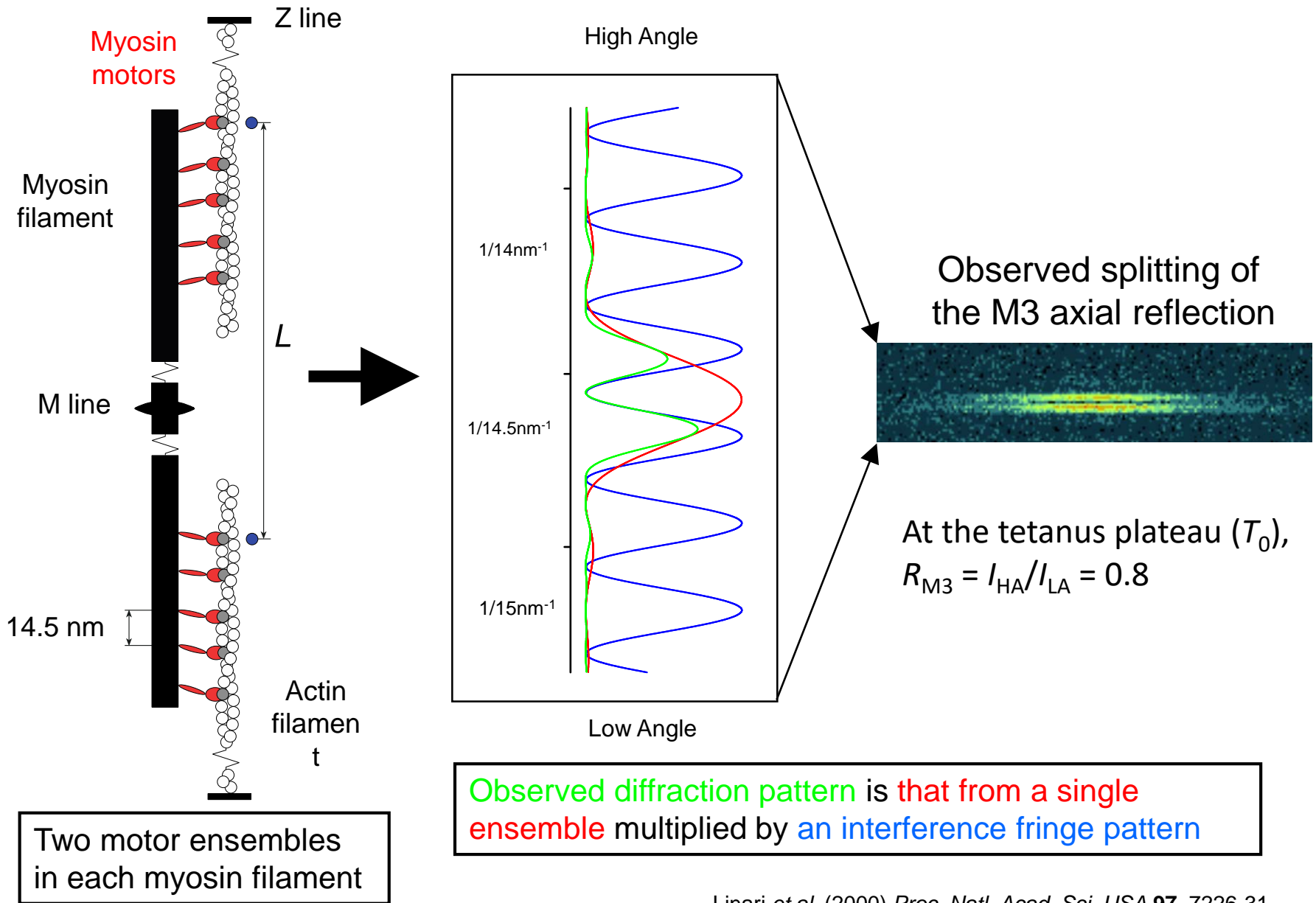


Le riflessioni lungo l'asse meridionale (l'asse parallelo all'asse della fibra, passante per il centro del diagramma) sono dovute alle strutture che si ripetono lungo l'asse della fibra e prendono il nome di **riflessioni meridionali**. Le riflessioni lungo l'asse equatoriale (perpendicolare a quello della fibra), **riflessioni equatoriali**, sono generate dalle periodicità dei filamenti spessi e sottili nel doppio reticolo esagonale. Le riflessioni parallele all'asse equatoriale dette **linee di strato** sono dovute alla disposizione elicoidale delle proteine nei filamenti. La distanza di una riflessione dal centro del pattern è inversamente proporzionale al periodo delle strutture (proteine o filamenti) responsabili di quella riflessione.

Diffrazione di raggi X da singola fibra muscolare scheletrica



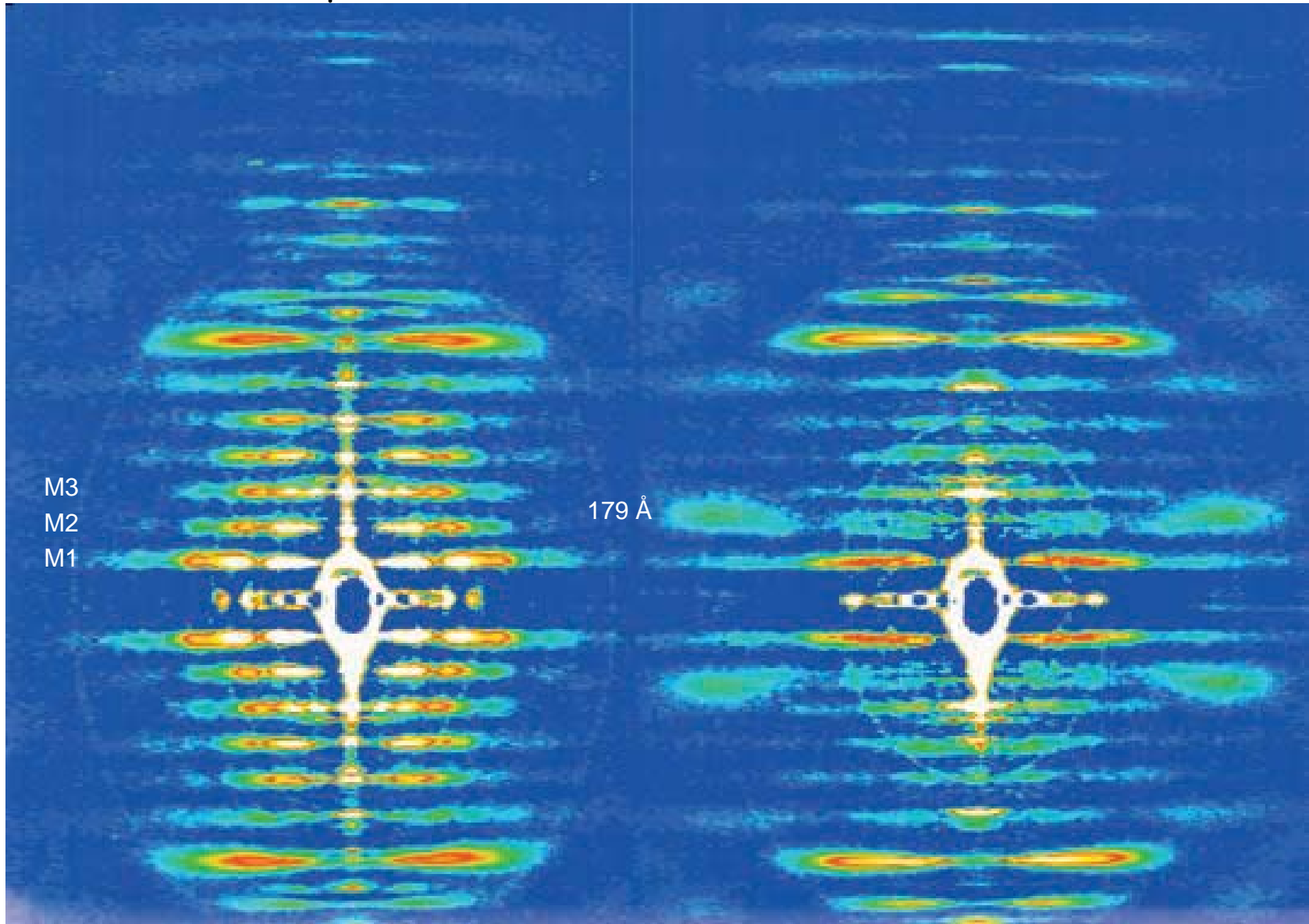
X-ray interference directly measures the axial motion of myosin motors





Riposo

Contrazione



Diagrammi di diffrazione bidimensionali da un **muscolo** in condizioni di riposo e durante una contrazione isometrica. La riflessione a 179 Å è associata ai movimenti della tropomiosina sul filamento sottile

Esperimenti di diffrazione di raggi X

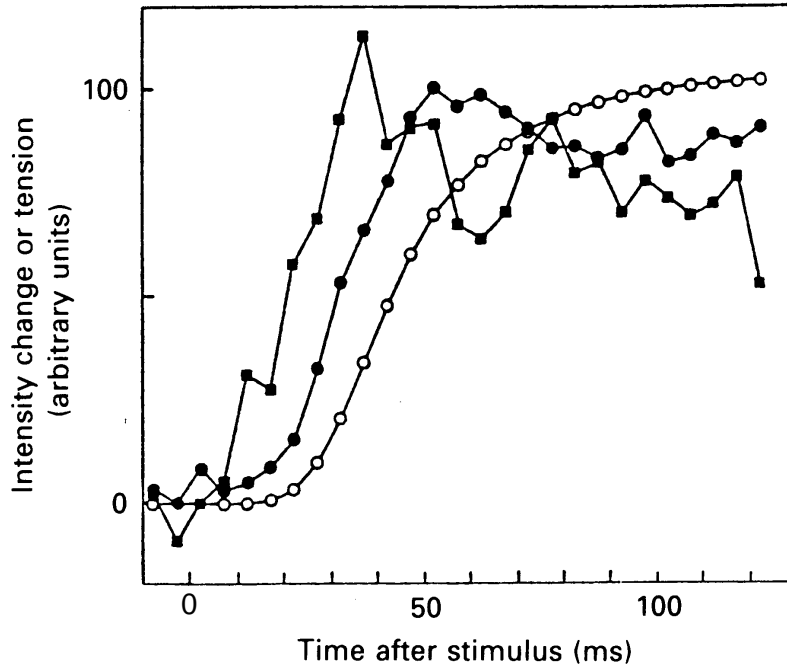
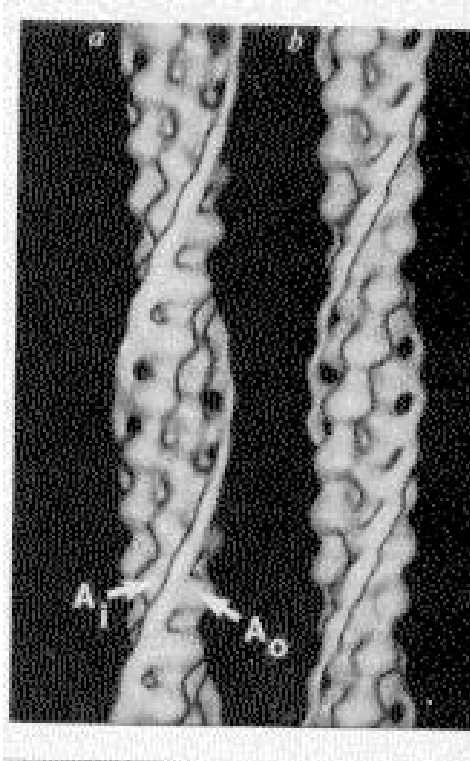


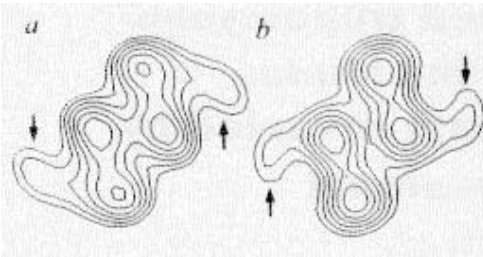
Figure 20.14. Time-resolved X-ray diffraction measurements on activation, from a frog twitch muscle at 5 °C. The curves show the intensity increases of the second actin layer line at 179 Å (squares) and of the equatorial (1,1) reflection (black circles), following an electrical stimulus. These curves indicate the movements of tropomyosin and of the myosin heads, respectively. White circles show the development of isometric tension. (From Kress *et al.*, 1986.)

Durante l'attivazione, l'intensità della linea di strato a 179 Å, sensibile ai movimenti della Tm, aumenta. Questo aumento precede sia quello dell'intensità della riflessione equatoriale 1,1, sensibile ai movimenti delle teste della miosina verso l'actina, sia lo sviluppo di forza. L'andamento temporale della 179 rimane invariato alla lunghezza del sarcomero di 3.65 μm, a cui la sovrapposizione tra i filamenti è assente. Questi risultati indicano che **il movimento della Tm precede la formazione dei legami acto-miosinici.**

Esperimenti di microscopia elettronica

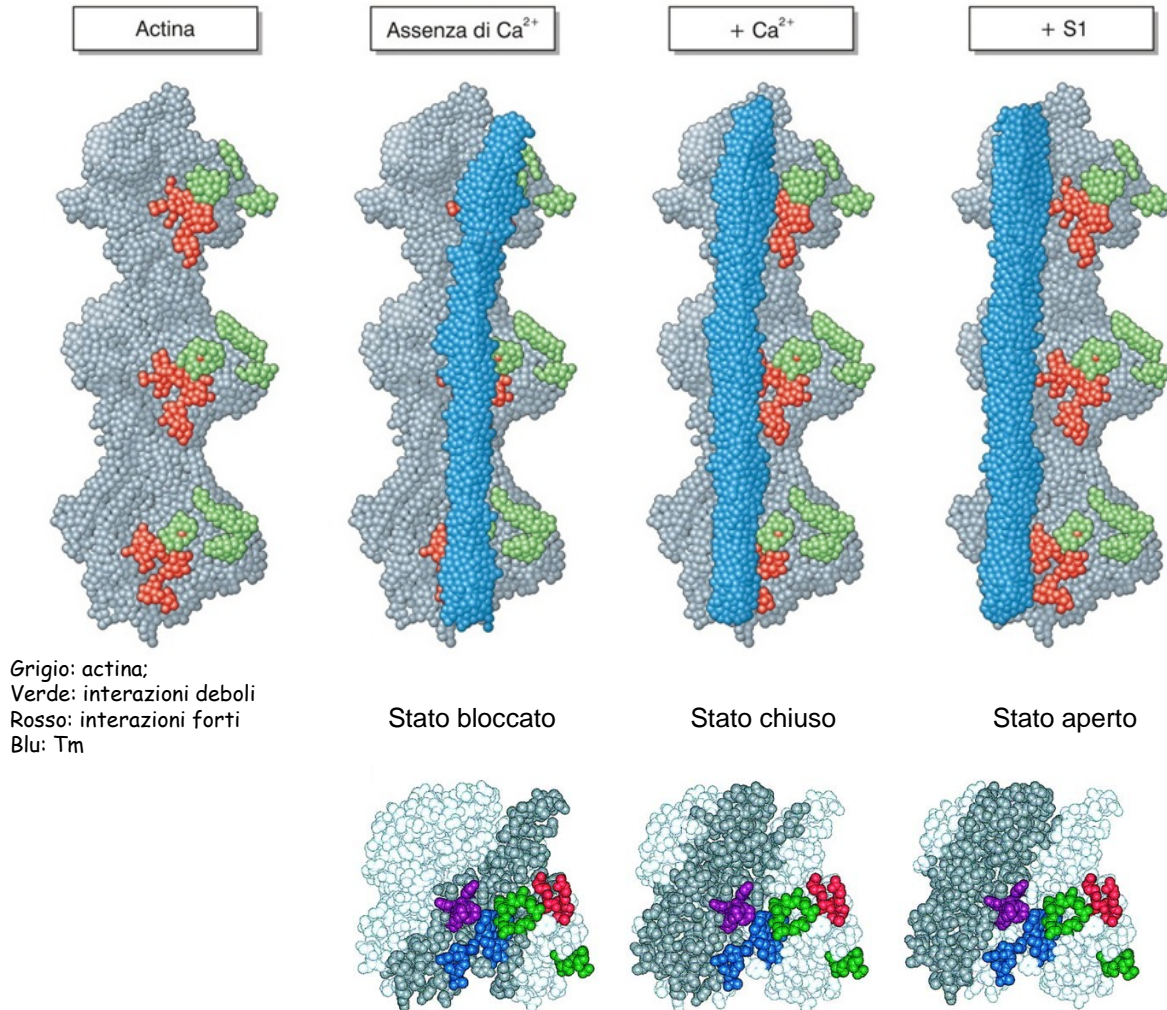


La ricostruzione tridimensionale dei filamenti sottili dalle microfotografie elettroniche rivela lo spostamento del filamento di Tm provocato dal Ca²⁺ (sinistra in assenza di Ca²⁺, destra in presenza di Ca²⁺). I monomeri di actina non subiscono variazioni di rilievo mentre il filamento di Tm è localizzato in una differente posizione sul filamento sottile.



La proiezione della densità di massa dei filamenti su un piano perpendicolare all'asse del filamento sottile mette ancor meglio in evidenza lo spostamento della Tm

Meccanismo di regolazione: modello a tre stati



Grigio: actina;
Verde: interazioni deboli
Rosso: interazioni forti
Blu: Tm

Stato bloccato

Stato chiuso

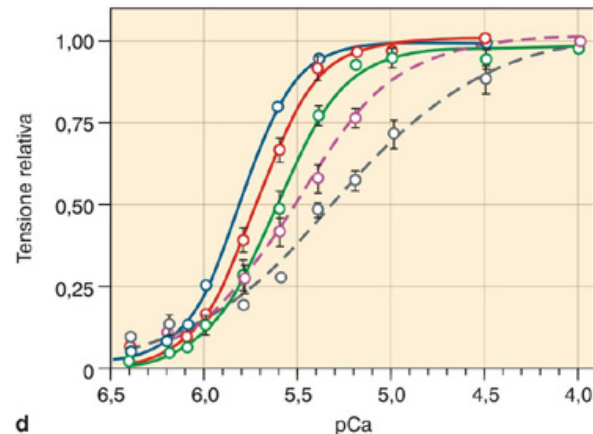
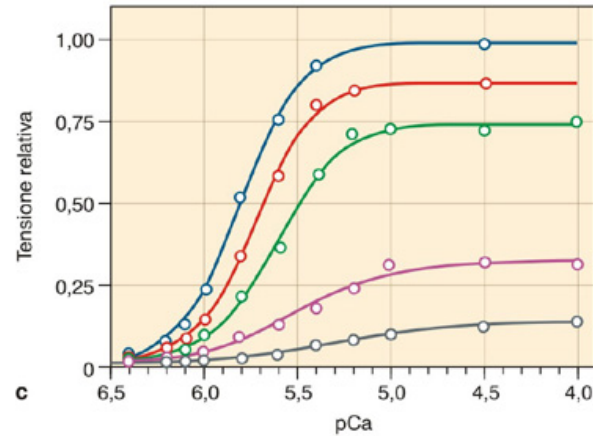
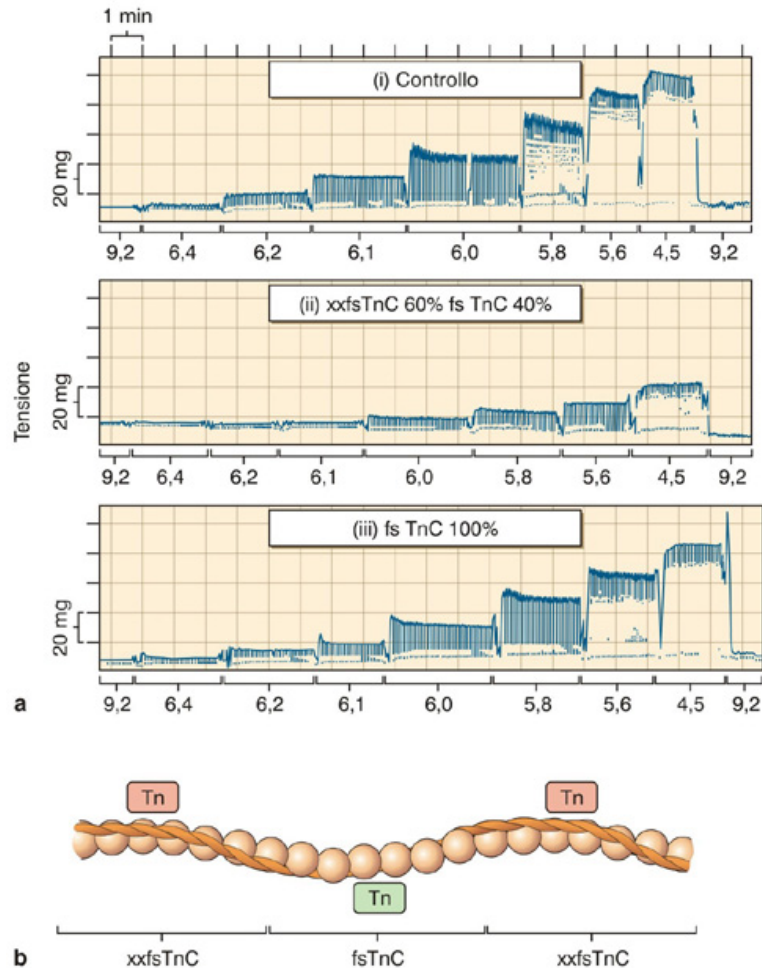
Stato aperto

Struttura di un monomero di actina G (grigio) su cui sono indicati i siti potenziali di attacco delle teste di miosina: verde e rosso legami deboli, blu e porpora legami forti. Il grigio più scuro indica la posizione della tropomiosina.

L'unità regolatrice del muscolo è formata dal sistema 1 Tn, 1 Tm, 7 actine che si ripete lungo il filamento sottile. Le unità regolatrici possono esistere in tre configurazioni strutturali e funzionali diverse che dipendono dalla presenza di Ca^{2+} e di interazioni forti tra actina e miosina. In assenza di Ca^{2+} , la Tm copre i siti per la formazione di legami forti impedendo interazioni meccanicamente efficaci (**stato bloccato**). In presenza di Ca^{2+} , in seguito alle modifiche conformazionali della Tn, la Tm si sposta rimuovendo parzialmente il blocco alla formazione di interazioni acto-miosiniche forti (**stato chiuso**). La formazione di legami forti modifica ulteriormente la struttura delle unità regolatrici, causando la completa attivazione del filamento sottile e favorendo l'ulteriore formazione di legami forti (**stato aperto**).

Cooperatività nella regolazione

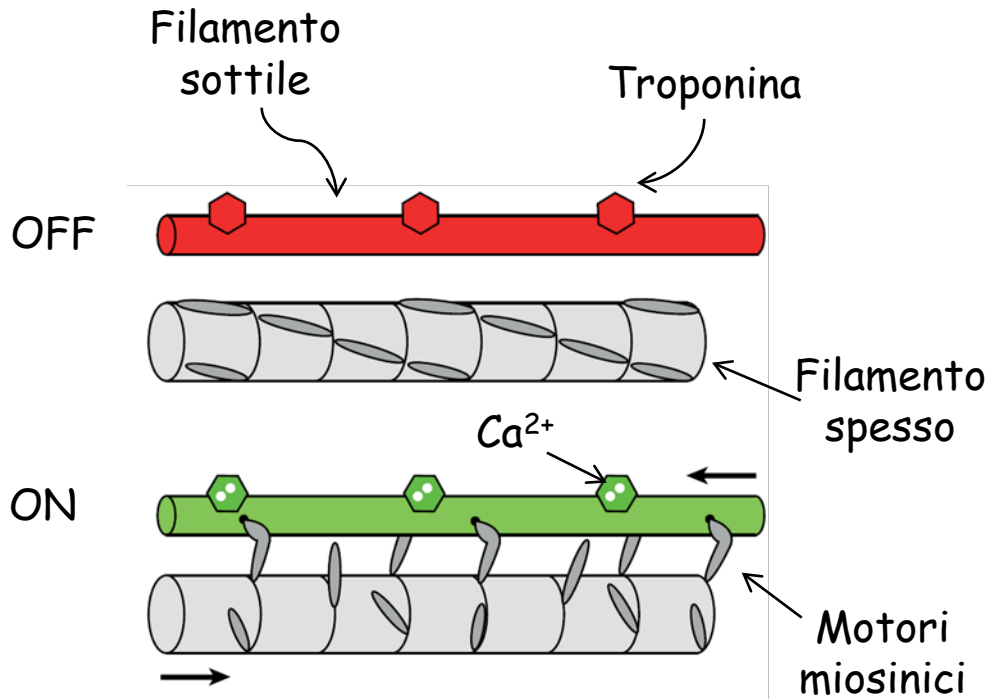
Il modello a tre stati dell'attivazione implica un meccanismo cooperativo di regolazione della contrazione: la formazione di legami forti promuove l'ulteriore attivazione del filamento sottile oltre a quella promossa dal Ca^{2+} legato alla Tn. Un'altra fonte di cooperatività è rappresentata dall'**accoppiamento tra unità regolatrici adiacenti** attraverso l'interazione testa-coda tra molecole di Tm. In questo caso il Ca^{2+} che si lega alla TnC di un'unità regolatrice o la presenza di interazioni forti in un'unità regolatrice potrebbe aumentare, attraverso un meccanismo di **feedback positivo**, l'affinità per il Ca^{2+} della TnC di una o più unità regolatrici vicine.



Quando la TnC endogena viene sostituita parzialmente con TnC mutata, incapace di legare il Ca^{2+} , unità regolatrici non funzionali sono alternate a unità regolatrici funzionali. La produzione di forza si riduce per la parziale attivazione del filamento sottile. Usando diversi gradi di sostituzione, si osserva che la **relazione forza-pCa è spostata a destra e la sua pendenza è diminuita**. Questi risultati indicano una **riduzione della sensibilità al Ca^{2+}** e la **rimozione dell'effetto cooperativo** responsabile dell'elevata pendenza della relazione in condizioni fisiologiche.

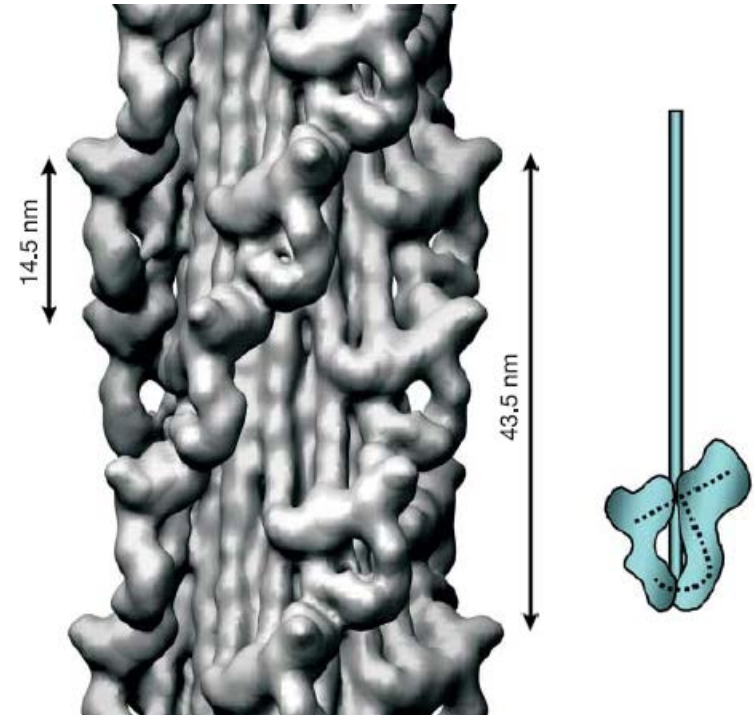
Regolazione del filamento spesso

Regolazione basata sul filamento sottile



Nel modello classico della regolazione il blocco sterico esercitato dalla Tm nel muscolo a riposo è rimosso dal legame del Ca^{2+} con la Tn. La transizione del filamento sottile dallo stato OFF allo stato ON è accompagnata dalla formazione dei legami actomiosinici.

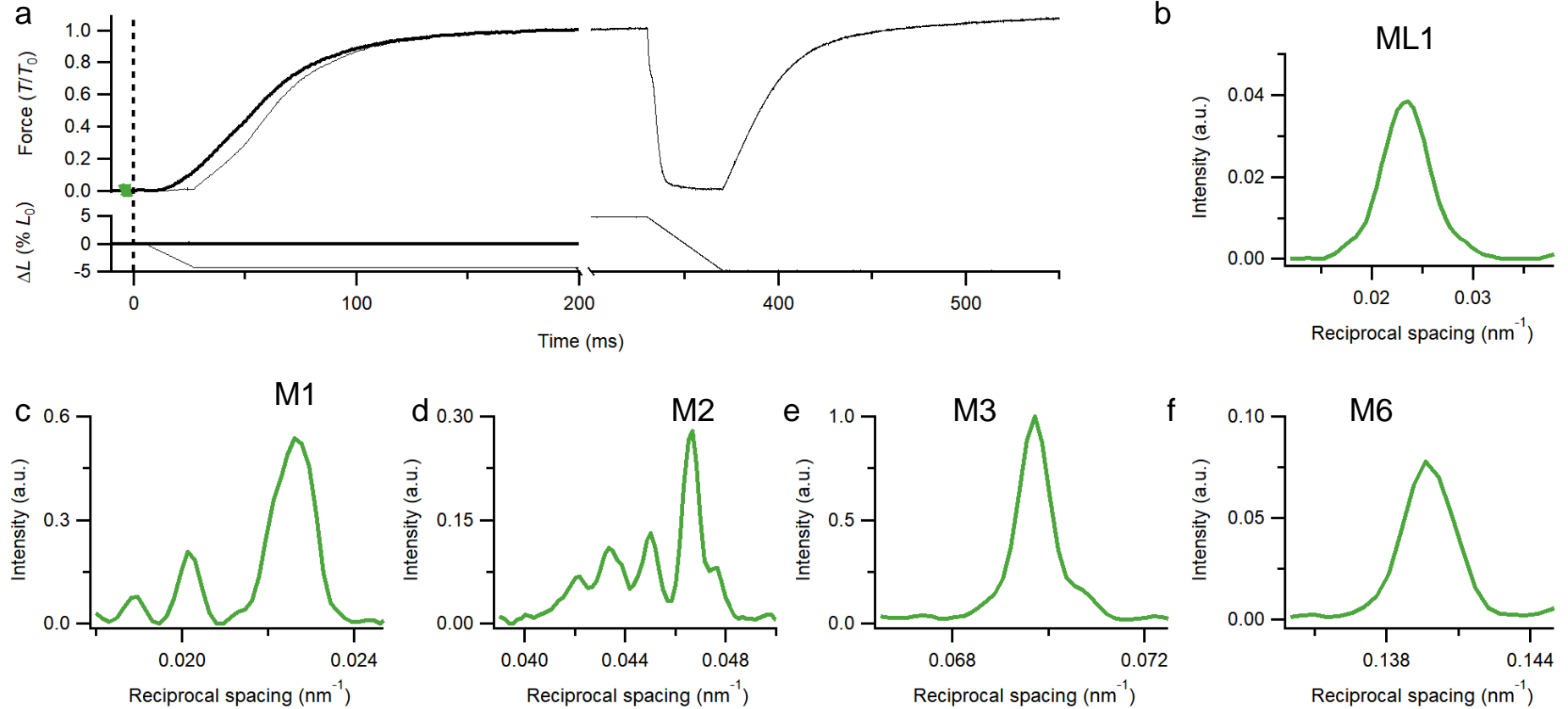
↑ Centro del sarcomero



Woodhead et al. (2005) *Nature* **436**:1195-1199

A riposo il filamento spesso è nello stato OFF: le teste di miosina giacciono sulla superficie del filamento, incapaci di legarsi all'actina e idrolizzare ATP per la presenza di legami intra e intermolecolari

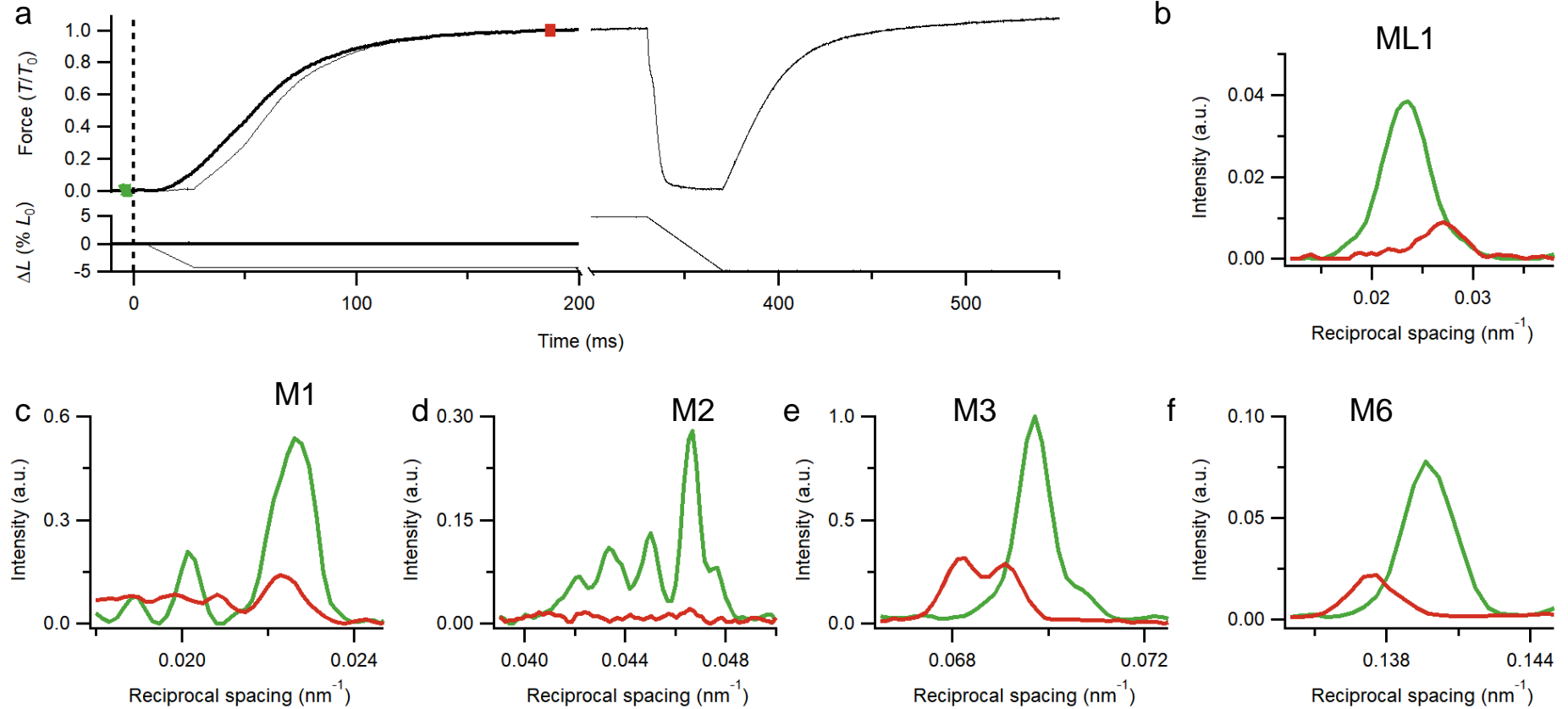
Ruolo del filamento spesso nella regolazione del muscolo scheletrico



Linari *et al.* (2015) *Nature* **528**:276

A riposo la linea di strato miosinica ML1 e le riflessioni miosiniche meridionali M1, M2, M3 e M6 sono intense, la M3 presenta un picco centrale e due piccoli satelliti ai due lati, la spaziatura della M3 e quella della M6 sono rispettivamente 14.34 nm e 7.17 nm. Questa struttura del filamento spesso e delle teste di miosina è tipica dello stato OFF.

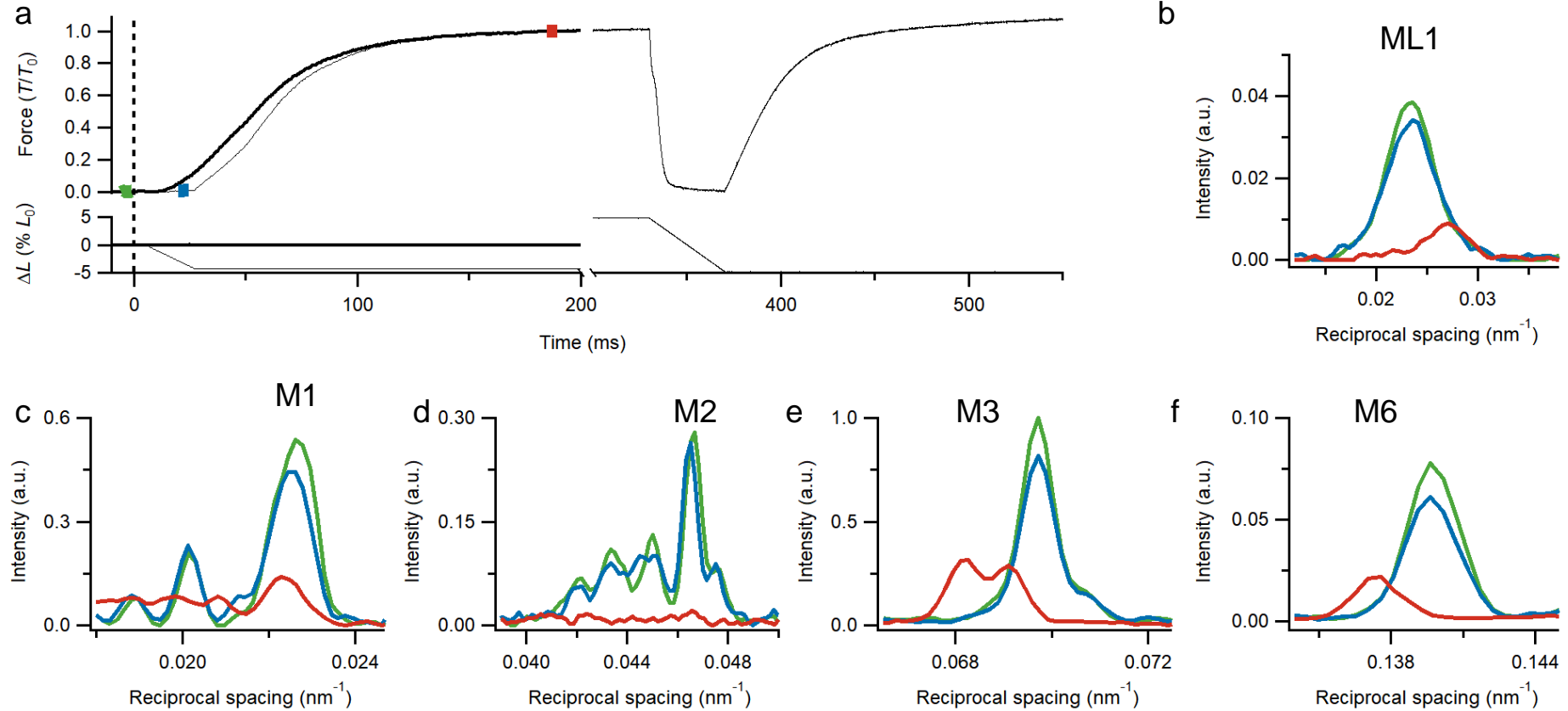
Ruolo del filamento spesso nella regolazione del muscolo scheletrico



Linari *et al.* (2015) *Nature* **528**:276

Al plateau del tetano (simbolo e linee rossi) filamento spesso e teste di miosina assumono la configurazione tipica dello stato ON: nella ML1 rimane una piccola componente attribuibile alla linea di strato actinica, le riflessioni meridionali miosiniche sono ridotte di ampiezza; la M3 presenta la struttura fine caratteristica delle teste di miosina generanti forza; la spaziatura della M3 e della M6 (14.57 nm e 7.29 nm rispettivamente) indicano il cambiamento di struttura del filamento spesso.

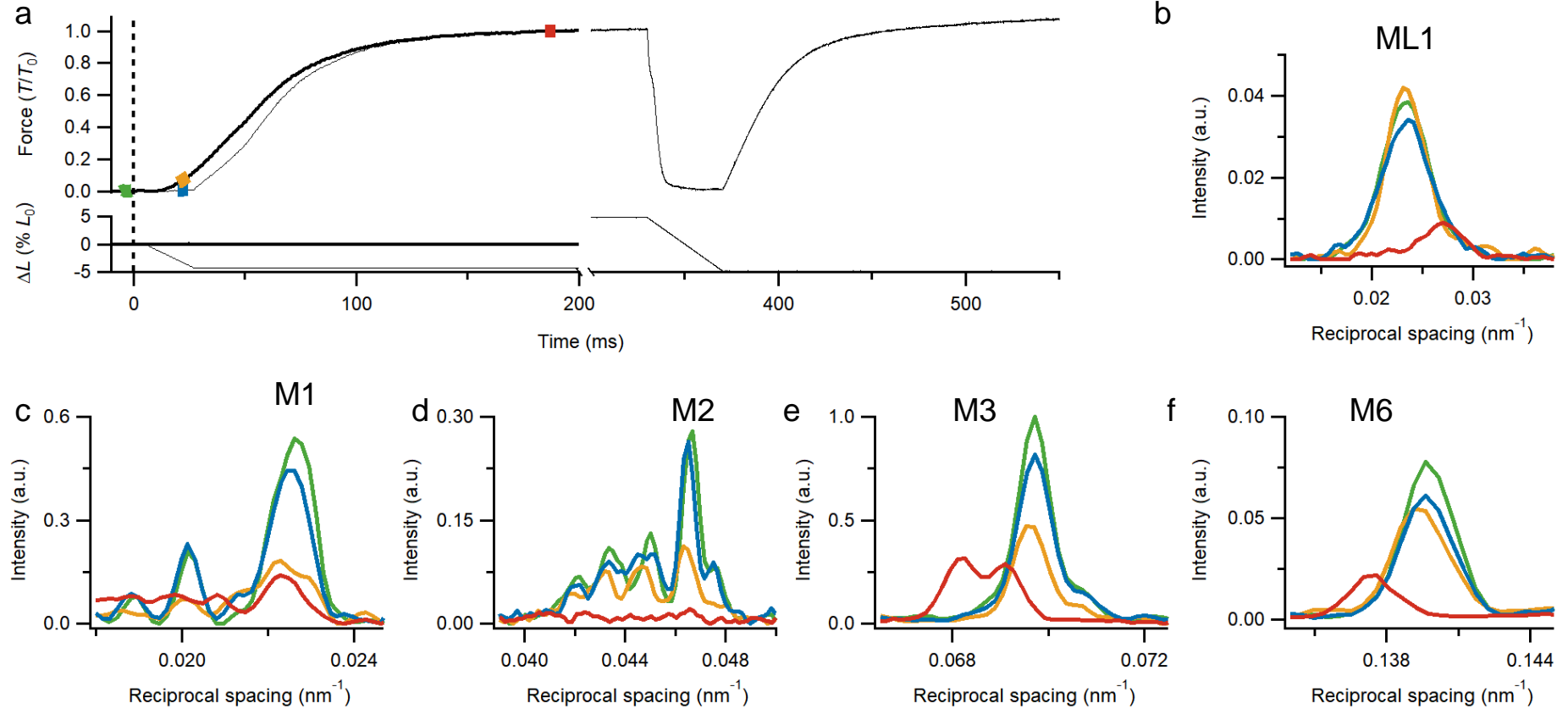
Ruolo del filamento spesso nella regolazione del muscolo scheletrico



Linari *et al.* (2015) *Nature* **528**:276

Quando la produzione di forza dopo la stimolazione viene prevenuta imponendo un accorciamento contro un carico uguale a zero (linea sottile, parte sinistra in **a**, velocità di accorciamento = V_{\max}) il filamento spesso e le teste della miosina mantengono la struttura OFF tipica della condizione di riposo (**b-f**, confronto linee verdi e azzurre). In queste condizioni il filamento sottile è completamente attivato e lo scorrimento a V_{\max} tra i filamenti è attribuibile alla presenza di alcune teste costituzionalmente attive presenti nel filamento spesso nello stato OFF.

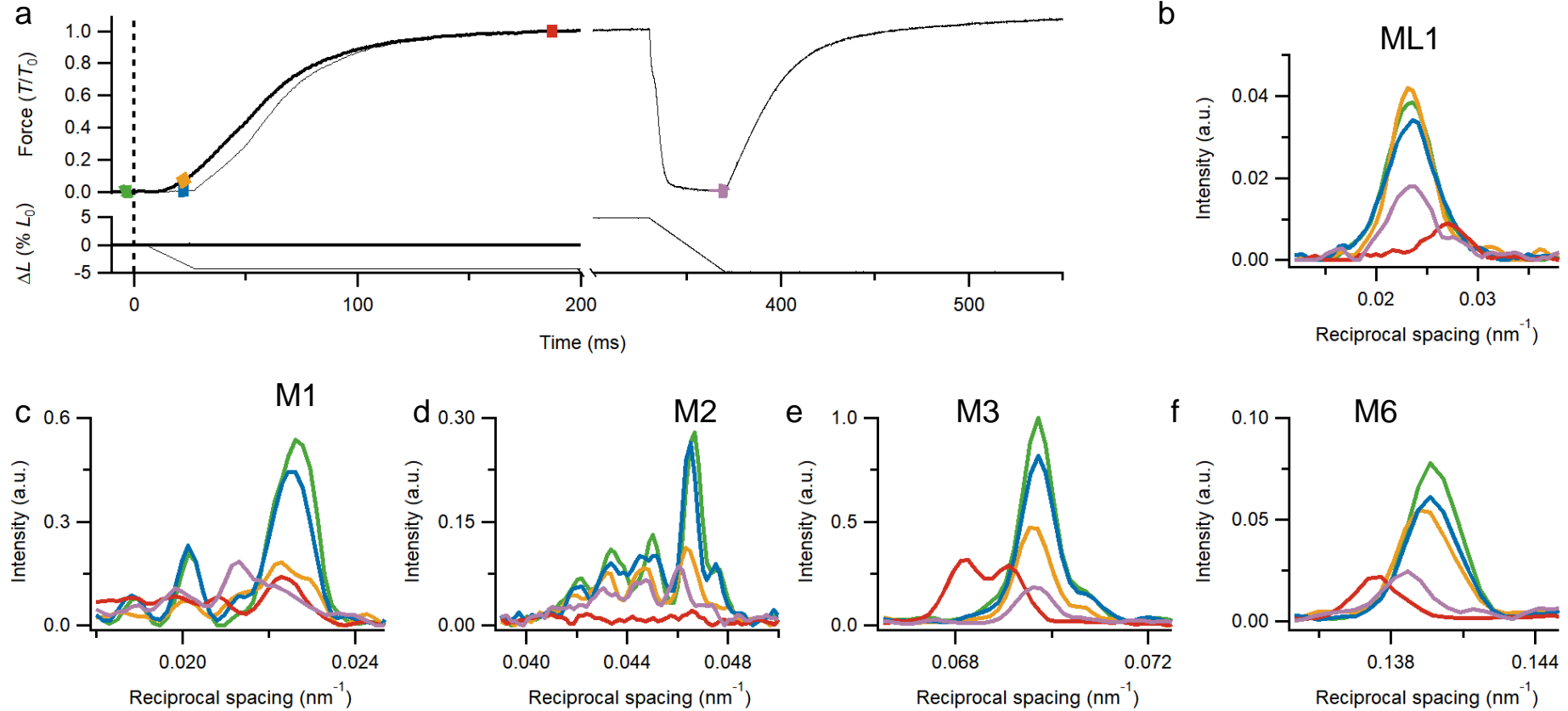
Ruolo del filamento spesso nella regolazione del muscolo scheletrico



Linari *et al.* (2015) *Nature* **528**:276

Ad un tempo molto precoce durante lo sviluppo di forza in una contrazione tetanica isometrica (linea spessa in a, simbolo e linee arancioni (a-f)), quando la forza è circa il 10 % di quella massima, le riflessioni mostrano che sia filamento spesso che teste di miosina stanno transitando verso lo stato ON. Nel filamento spesso è presente un meccanosensore in grado di rilevare la tensione presente sul filamento e promuoverne l'attivazione.

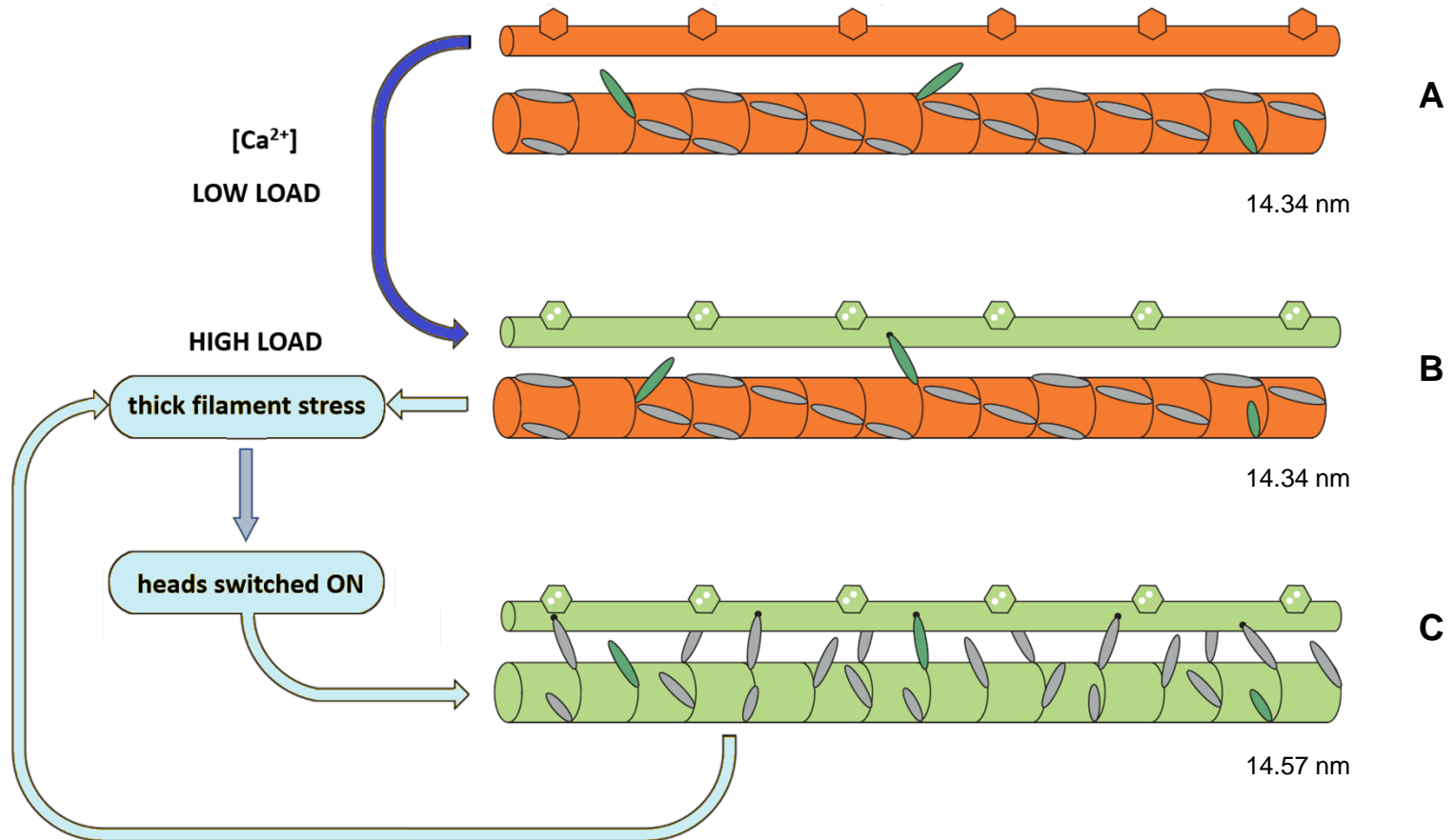
Ruolo del filamento spesso nella regolazione del muscolo scheletrico



Linari *et al.* (2015) *Nature* **528**:276

Alla fine di un accorciamento contro carico zero (velocità = V_{\max}) imposto al plateau della contrazione isometrica (linea sottile nella parte destra in **a**) filamento spesso e teste di miosina tendono a riassumere la configurazione OFF (linee viola in **b-f**): la rimozione della tensione sul filamento spesso promuove la transizione allo stato OFF confermando che nel filamento spesso è presente una struttura che agisce come meccanosensore.

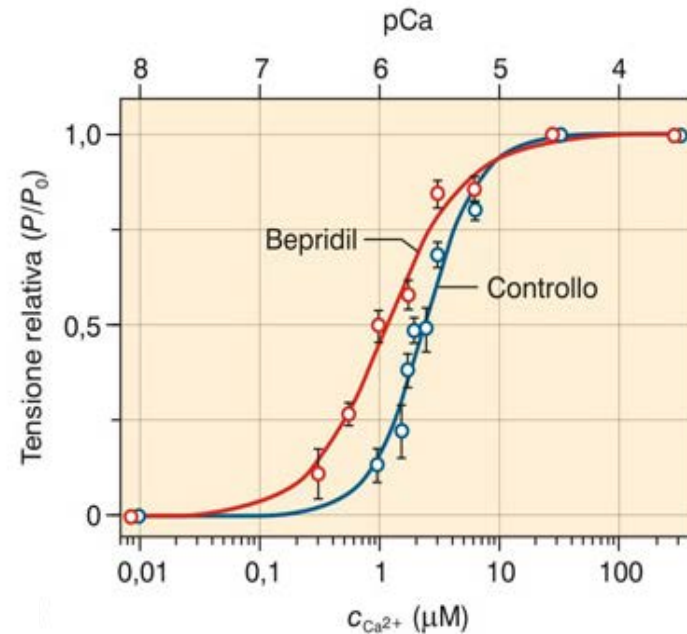
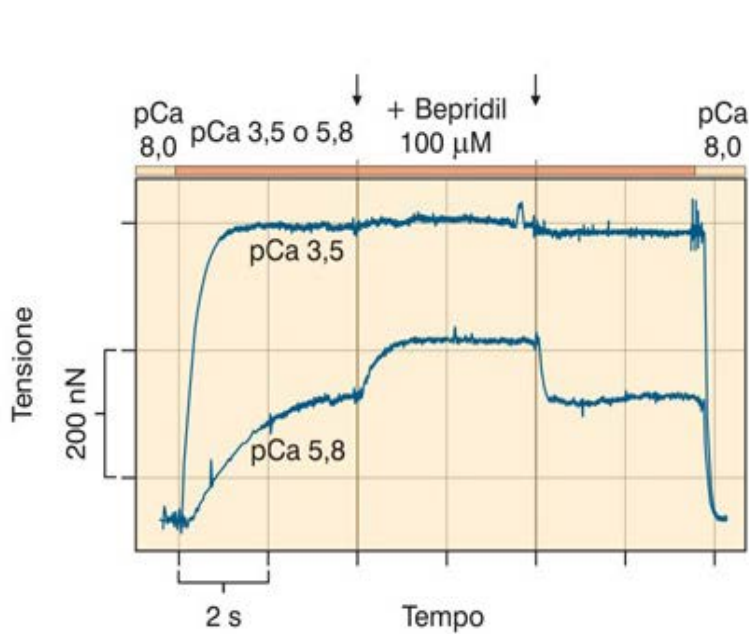
Duplicata regolazione del muscolo striato



A. A riposo, in assenza di Ca^{2+} , filamento sottile e filamento spesso sono nello stato OFF. Le teste di miosina giacciono ordinate lungo il filamento spesso, incapaci di legare l'actina e idrolizzare ATP. Alcune teste sono costituzionalmente ON (verde scuro). **B.** Quando il filamento sottile è attivato dal Ca^{2+} le poche teste ON sono responsabili dell'accorciamento a basso carico anche se il filamento spesso è OFF. **C.** A carichi più alti la forza generata dalle teste costituzionalmente ON promuove l'attivazione del filamento spesso che passa alla struttura ON (la spaziatura cambia da 14.34 nm a 14.57 nm) rendendo tutte le teste capaci di interagire con l'actina.

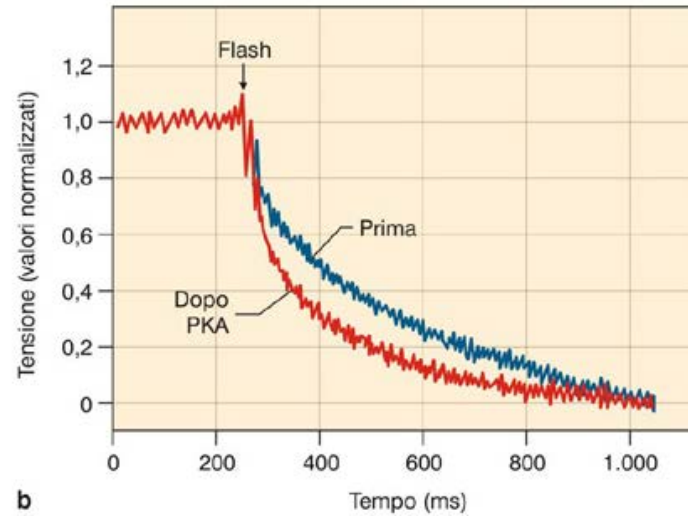
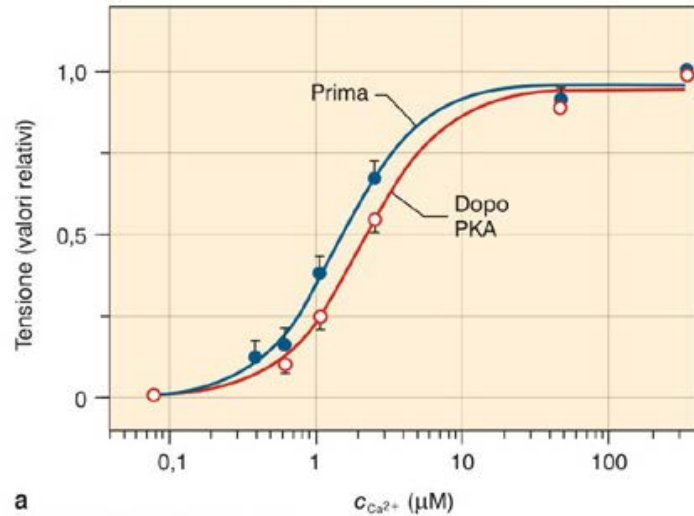
Modulazione dei meccanismi di regolazione

1. Modulazione farmacologica del legame TnC-Ca²⁺



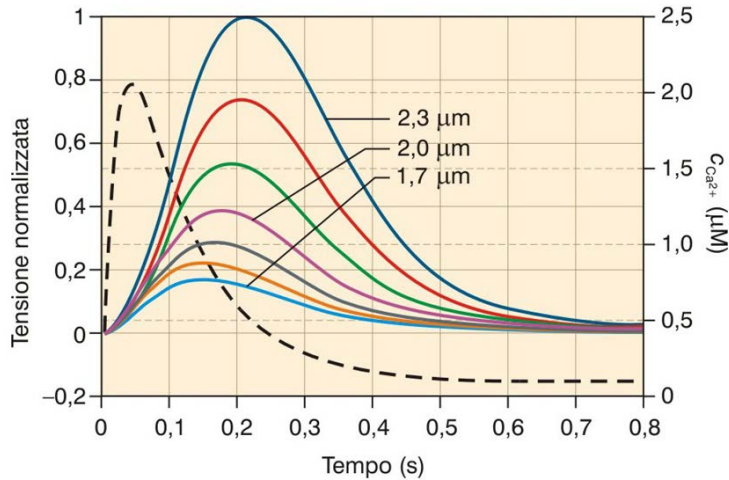
La sensibilità al Ca²⁺ può essere modificata con farmaci Ca-sensibilizzanti che aumentano l'affinità della TnC al Ca²⁺. Il Bepridil, per esempio, legandosi al lobo N terminale della TnC riduce la velocità di dissociazione del Ca²⁺ dai siti di legame con conseguente aumento della quantità di Ca²⁺ legato alla TnC. Questa azione si manifesta con l'aumento della forza di contrazione ad ogni [Ca²⁺] sottomassimale e con l'aumento di pK (= -log della concentrazione di Ca²⁺ alla quale la forza è il 50% del valore massimo).

2. Modificazioni trascrizionali delle proteine regolatrici

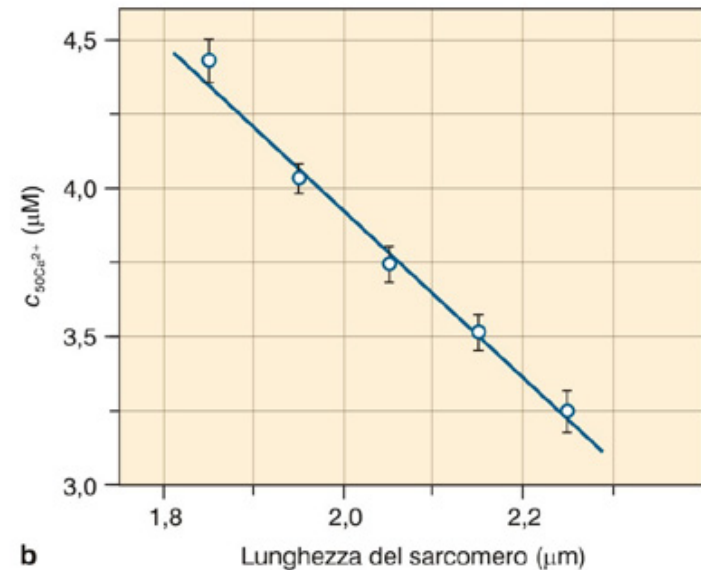
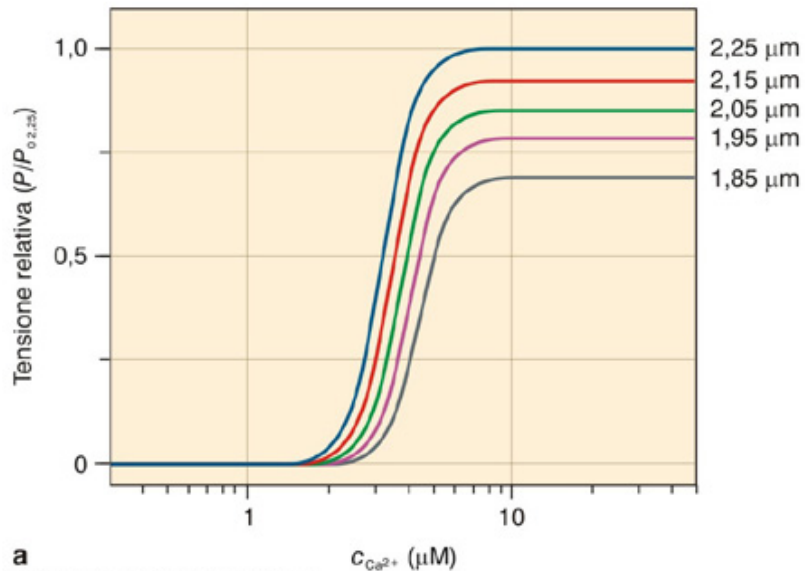


Muscolo scheletrico e cardiaco esprimono isoforme diverse delle proteine regolatrici. Solo nelle isoforme cardiache di TnI e TnT sono presenti siti che se fosforilati determinano una variazione nella sensibilità dei filamenti al Ca^{2+} . Il trattamento di trabecole demembranate con PKA sposta la relazione forza- $[Ca^{2+}]$ a destra, indicando una riduzione della sensibilità al Ca^{2+} che spiega l'effetto lusitropo positivo della stimolazione β -adrenergica: la fosforilazione della TnI accelera la dissociazione del Ca^{2+} dalla TnC. L'aumentata velocità di rilascio è in accordo con i risultati di esperimenti di fotolisi in cui chelanti del Ca^{2+} vengono istantaneamente attivati durante la contrazione di miociti cardiaci demembranati: dopo trattamento con PKA il rilascio indotto dal chelante è molto più rapido che nel controllo.

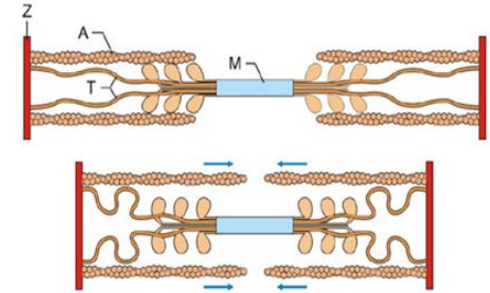
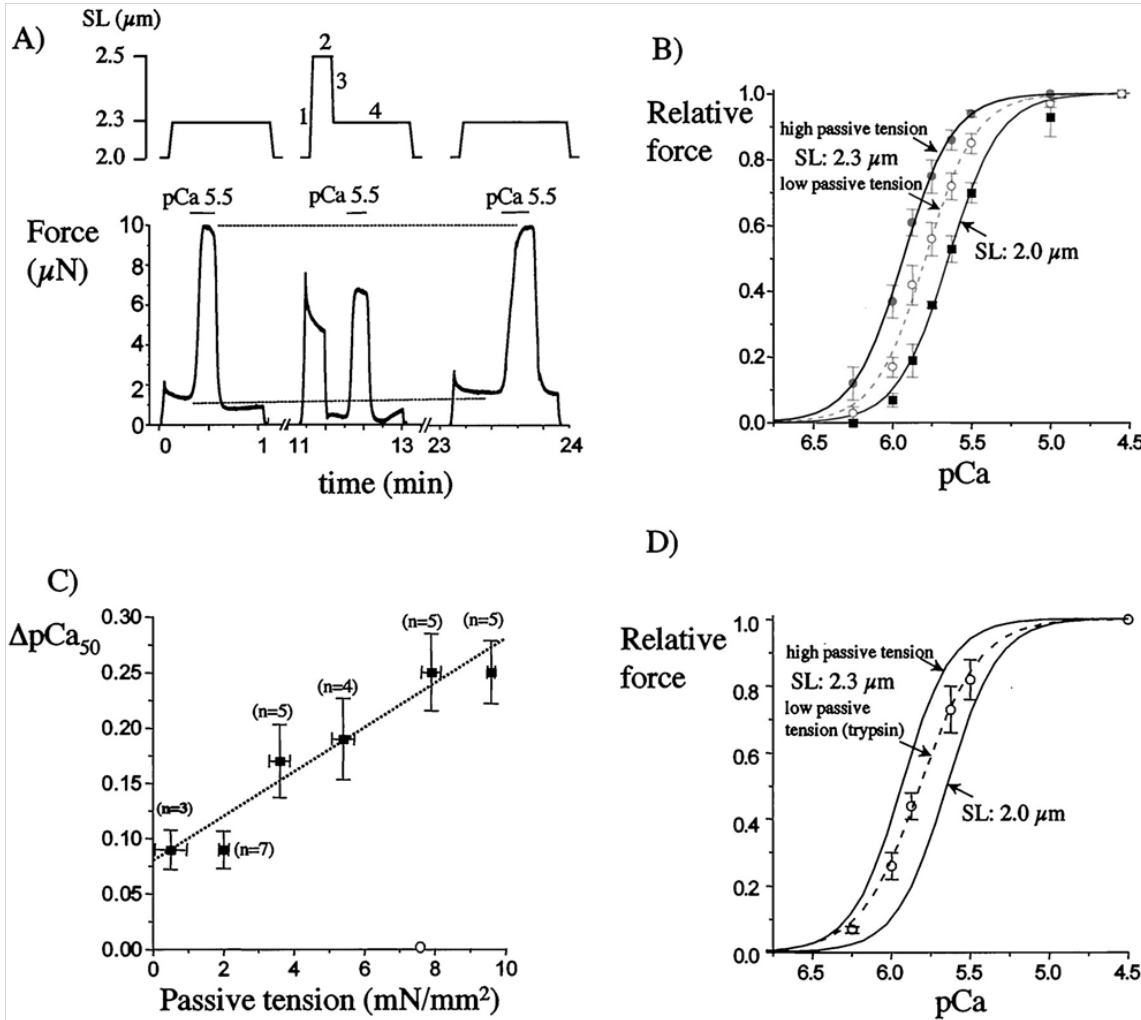
3. Dipendenza dalla lunghezza del sarcomero (legge di Frank-Starling)



La forza di contrazione dei miociti cardiaci aumenta fino a cinque volte con l'aumentare della lunghezza del sarcomero da 1.7 a 2.3 μm , l'intervallo fisiologico di lavoro del cuore. Questo aumento non è giustificato dalla variazione del grado di sovrapposizione di filamenti spessi e sottili e non è accompagnato da variazioni di ampiezza del transiente di Ca^{2+} . Il fenomeno è attribuibile all'esistenza di una relazione lineare tra sensibilità dei miofilamenti al Ca^{2+} e lunghezza del sarcomero: la $[Ca^{2+}]_{50}$ diminuisce proporzionalmente all'aumento della lunghezza del sarcomero.



3. Dipendenza dalla lunghezza del sarcomero (legge di Frank-Starling)



Un ruolo importante nel controllo della sensibilità al calcio potrebbe essere svolto dalla titina, una proteina citoscheletrica che stabilisce contatti sia con la miosina che con l'actina. La variazione della lunghezza del sarcomero modifica i rapporti tra titina e miofilamenti a causa della deformazione prodotta sulla titina, che determina la produzione di tensione passiva. L'attivazione lunghezza-dipendente dei miofilamenti è influenzata dalla tensione passiva prodotta dallo stiramento della titina. Quando la titina viene parzialmente digerita con tripsina, la diminuzione della forza passiva determina la riduzione della pCa_{50} indicando un possibile coinvolgimento di questa molecola nella modulazione della sensibilità dei miofilamenti al calcio.