

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

MARIO DE VINCENTIIS, PETER PERLMANN, TORE  
HULTIN

## Incorporazione di aminoacidi marcati nelle proteine organo-specifiche del cristallino embrionale di pollo

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 32 (1962), n.4, p.  
524-528.*

Accademia Nazionale dei Lincei

[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1962\\_8\\_32\\_4\\_524\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_32_4_524_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

**Embriologia chimica.** — *Incorporazione di aminoacidi marcati nelle proteine organo-specifiche del cristallino embrionale di pollo* (\*). Nota di MARIO DE VINCENTIIS, PETER PERLMANN e TORE HULTIN, presentata (\*\*) dal Socio G. COTRONEI.

È noto che le proteine lenticolari sono dotate di un elevato grado di specificità di organo [1]. Tale loro caratteristica proprietà le rende di particolare interesse nello studio di alcuni problemi di induzione e di differenziamento embrionale [2, 3]. Adulti antigeni lenticolari solubili furono messi precocemente in evidenza nella vescicola cristallina di embrioni di pollo [4, 5, 6]. Successive ricerche poterono precisare alcune modalità concernenti la presenza di tali antigeni nella frazione microsomiale [7]; si poté infatti dimostrare che gli antigeni lenticolari sono legati a tale frazione negli stadi embrionali (46-48 h di sviluppo) in un grado più elevato che nella lente adulta e pertanto si pensava che essi costituiscono i reali precursori degli antigeni solubili che si rinvenivano unicamente quando prende posto il differenziamento del cristallino. Venne così emessa l'ipotesi che, durante la formazione della lente, le sostanze induttorie possono portare alla solubilizzazione di proteine lenticolari già pronte nei microsomi o attivare i *template* ribosomiali a sintetizzare una maggiore quantità di tali proteine. Pertanto una particolare composizione o disposizione spaziale della popolazione microsomiale potrebbe essere la causa della capacità di alcune regioni embrionali a indurre la formazione del cristallino come anche la competenza particolare di una regione a trasformarsi in lente.

Uno dei metodi per poter portare al vaglio sperimentale tale ipotesi potrebbe essere quello di studiare le modalità di incorporazione di aminoacidi marcati negli antigeni lenticolari ottenuti da diverse regioni embrionali e da differenti frazioni subcellulari. Naturalmente per condurre un'indagine del genere è necessario studiare le modalità di incorporazione degli aminoacidi nelle proteine organo-specifiche lenticolari. Una precedente ricerca [8] adoperando il sistema acellulare di cristallino di embrioni di pollo di 11 giorni e di pulcino, aveva mostrato, specie nelle proteine lenticolari embrionali una discreta incorporazione di  $^{14}\text{C}$ -L-leucina e di  $^{14}\text{C}$ -L-valina. L'incorporazione era possibile solo in presenza di ATP e del sistema rigenerante l'ATP ed era inibita dalla ribonucleasi. Inoltre gli omogenati di cristallini di embrioni di pollo presentavano una apprezzabile radioattività incorporata nella frazione

(\*) Istituto « Wenner-Grens » di Biologia Sperimentale dell'Università di Stoccolma e Istituto di Biologia Generale e Genetica della Università di Napoli. Lavoro effettuato con una borsa di studio del Consiglio Nazionale delle Ricerche ed un grant della Swedish Cancer Society.

(\*\*) Nella seduta del 14 aprile 1962.

a pH 5,1. L'insieme di tali risultati era favorevole ad una incorporazione di aminoacidi marcati nelle proteine specifiche lenticolari, anche adoperando sistemi acellulari di embrioni di pollo. Tali osservazioni in linea di massima collimano con quelle di Devi, Lerman e Sarkar [9] che osservano incorporazioni di aminoacidi marcati (leucina  $^{14}\text{C}$ , valina  $^{14}\text{C}$  e istidina  $^{14}\text{C}$ ) in cristallini di ratti di 6 settimane sia in *in vivo* sia in *in vitro* in omogenati. Questi Autori segnalano un effetto attivante esercitato dai cobaltoioni ( $\text{Co}^{++}$ ) sulla capacità di incorporazione nel complesso «proteine-RNA» lenticolare.

Allo scopo di meglio dimostrare tale aspetto del problema è sembrato utile procedere all'isolamento della proteina organo-specifica di cristallini di pollo mediante antisieri lenticolari omologhi ed eterologhi.

#### PARTE SPERIMENTALE.

Gli antisieri adoperati furono: siero anticristallino di bue, siero anticristallino di pollo, siero antiuova di *Arbacia lixula*. L'esperienza consisteva nel prelevare dei cristallini di embrioni di pollo di 11 giorni, di dividerli in due metà e porli in vaschette di vetro che contenevano 5 ml di liquido di Krebs-Henseleit [10] nel quale erano aggiunti 0,1 ml di glucosio 0,25 M e 0,16  $\mu\text{mole}$  dei seguenti  $^{14}\text{C}$  aminoacidi di attività specifica 6 mC/mmole: L-leucina, L-iso-leucina, L-valina.

Le vaschette venivano saturate con una miscela di 95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  e messe in agitazione in un bagno termostatico a 35°C per 3 h. Alla fine dell'incubazione si aggiungevano 0,05 ml di ogni soluzione satura dei tre aminoacidi non marcati e i cristallini venivano quindi omogenati nel liquido di cultura suddetto e l'omogenato era centrifugato per 1 h a 40.000 RPM (centrifuga Spinco). Il supernatante veniva diviso in 4 parti ad una delle quali veniva aggiunto subito TCA 10% mentre alle altre 3 parti si aggiungevano i tre antisieri suddescritti (ved. schema fig. 1). Sui precipitati essiccati (purificati mediante 3 ebollizioni di un quarto d'ora in TCA 5% e delipidati con alcool a 95° ed etere) si effettuavano al Geiger (Tracerlab) le misure di radioattività. In alcune prove, allo scopo di ottenere una maggiore quantità di precipitato veniva aggiunto al precipitato un sistema *carrier* rappresentato dal supernatante di un omogenato di cristallini di pollo in soluzione fisiologica che era stato centrifugato per 1 h a 40.000 RPM (12 mg di proteine del *carrier* per ogni campione).

Altri esperimenti sono stati effettuati allestendo con frazioni di supernatanti, ottenuti dopo la centrifugazione a 40.000 RPM, delle prove immuno-elettroforetiche secondo Grabar e Williams [11] adoperando siero anticristallino di bue e sulle stesse preparazioni si procedeva quindi ad allestire delle autoradiografie secondo la tecnica proposta da Perlmann e Hultin [12]. Queste ultime prove sono state effettuate su cristallini di pulcino di 4 giorni ed incubati per 15 h (in condizioni di sterilità) con i suddescritti aminoacidi marcati.

Le proteine erano determinate secondo la tecnica di Lowry e coll. [13].

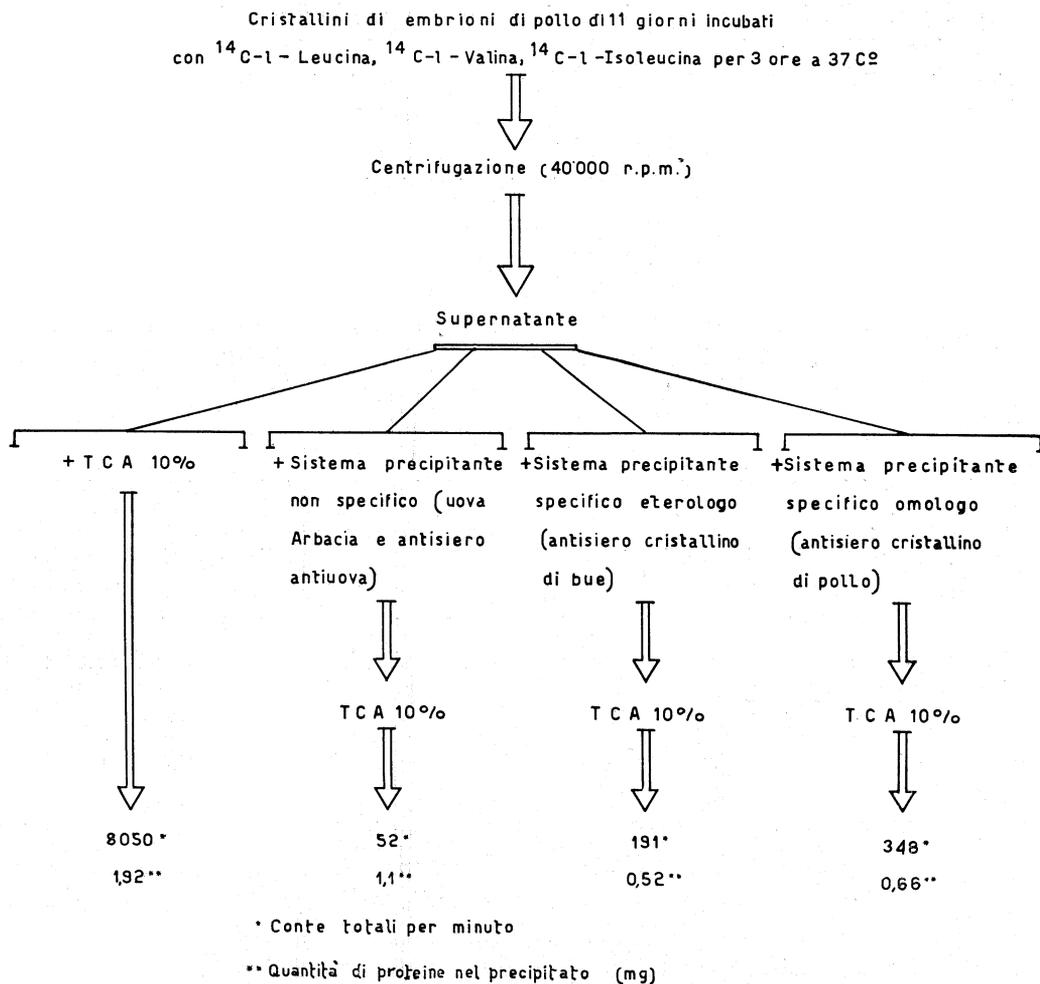


Fig. 1. - Schema delle frazioni precipitate con antigeni non specifici ed antisieri specifici di supernatante di omogenati di cristallini di embrioni di pollo di 11 giorni incubati per 3 h con  $^{14}\text{C}$ -L-leucina,  $^{14}\text{C}$ -L-isoleucina,  $^{14}\text{C}$ -L-valina.

Nello schema viene riportato anche il risultato di un esperimento. Al precipitato primario si aggiungono 12 mg del carrier.

### RISULTATI, DISCUSSIONE E CONCLUSIONE.

Adoperando siero non specifico e sieri specifici omologhi ed eterologhi si è potuto dimostrare una chiara incorporazione degli aminoacidi marcati nelle proteine specifiche lenticolari. Dato che è confermato dall'assenza di incorporazione adoperando il sistema precipitante non specifico (fig. 1).

Nella proteina lenticolare isolata in modo specifico mediante l'antisiero eterologo si riscontra una buona incorporazione degli aminoacidi marcati suddescritti. Essa è probabilmente  $\alpha$ -cristallina. Tale dato che già si ricava dalle prove di precipitazione adoperando i sistemi non specifici e specifici

rappresentati dai suddescritti antisieri verrebbe anche dimostrato dalle prove immuno-elettroforetiche ed autoradiografiche, nelle quali, procedendo con antisieri omologhi ed eterologhi all'isolamento delle proteine lenticolari, si osserva una evidente radioattività in alcune delle linee di precipitazione e nel residuo della proteina migrata (fig. 2).

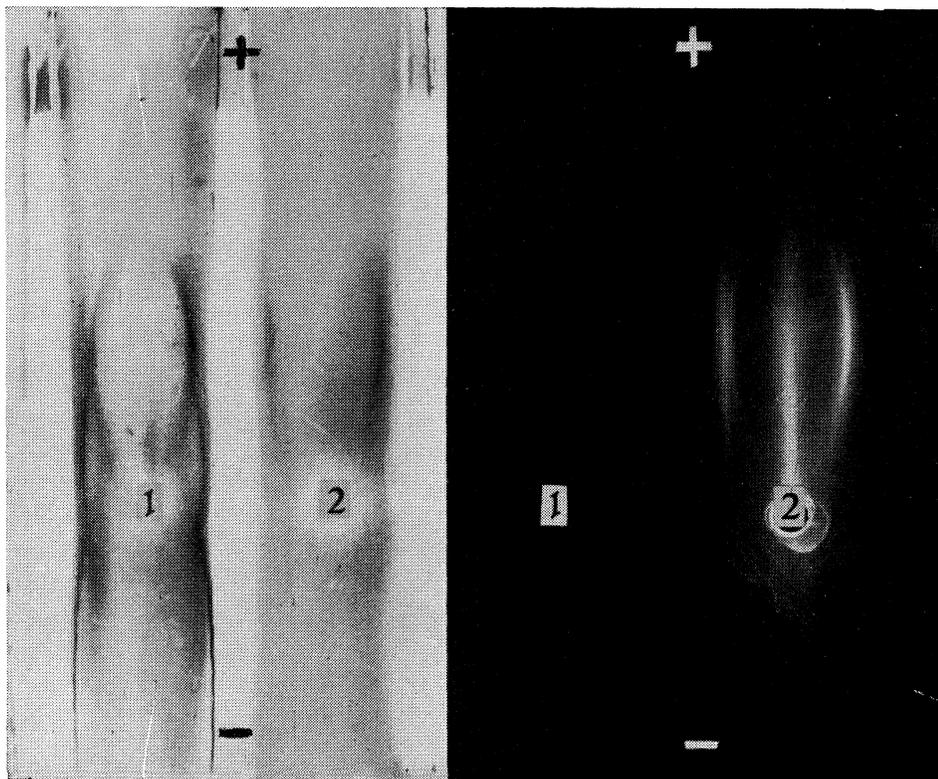


Fig. 2.

A) = Immuno-elettroforesi di una soluzione di proteine lenticolari di bue (n. 1) e di supernatante di omogenato di cristallini di pulcini di 4 giorni (n. 2) incubati per 15 h, in condizioni di sterilità, con  $^{14}\text{C}$ -L-isoleucina,  $^{14}\text{C}$ -L-leucina,  $^{14}\text{C}$ -L-valina. B) = autoradiografia della medesima preparazione (durata di esposizione: mesi 5). Siero = anti-cristallino di bue.

L'insieme dei risultati ottenuti verrebbero a dimostrare due fatti di un certo interesse e cioè la possibilità di isolare con antisieri delle proteine specifiche di organo e di studiare, con tale metodica, l'incorporazione in esse di aminoacidi marcati. Inoltre viene dimostrato la capacità di incorporazione *in vitro* di aminoacidi marcati nelle proteine organo-specifiche lenticolari isolate con tale metodica. Tale ultimo risultato allarga ed estende i risultati precedentemente ottenuti adoperando i sistemi acellulari [8].

Tutto ciò lascia ben sperare che uno studio condotto sull'incorporazione di aminoacidi marcati nella proteina organo-specifica lenticolare estratta, con la suddescritta metodica, da differenti popolazioni microsomiali embrio-

nali possa dare qualche frutto per indagare sulle prime modalità di sintesi delle proteine del cristallino e loro funzione nei meccanismi della induzione e della competenza.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] S. P. HALBERT and P. L. FITZGERALD, « Am. J. Ophth. », 46, 187 (1958).
- [2] J. D. EBERT, in *The Cell*, vol. 1, J. Brachet and A. E. Mirsky eds. Academic Press, New York 1959.
- [3] G. TEN CATE, *Biochemistry of Morphogenesis*, p. 120. W. J. Nickerson ed. Pergamon Press, London 1959.
- [4] R. H. BELOFF, « J. Exp. Zool. », 140, 493 (1959).
- [5] J. LANGMAN, « J. Exptl. Morphol. », 7, 264 (1959).
- [6] G. TEN CATE e W. J. VAN DOORENMAALEN, « Proc. Koninkl. Med. Akad. Wetenschap. », 53 (6), 894 (1950).
- [7] P. PERLMANN e M. DE VINCENTIIS, « Exptl. Cell. Res. », 23, 612 (1961).
- [8] M. DE VINCENTIIS e T. HULTIN, Comunicazione al X Congresso del Gruppo Embriologico Italiano, Bologna ottobre 1961 (« Acta Embryologiae et Morphologiae experimentalis », 1962, vol. 5).
- [9] A. DEVI, S. LERMAN e N. K. SARKAR, « Nature », 190, 1193 (1961).
- [10] H. A. KREBS e K. HENSELEIT, « Z. physiol. Chem. », 210, 33 (1932).
- [11] P. GRABAR e C. A. WILLIAMS jr., « Biochim. et Biophys. Acta », 17, 67 (1955).
- [12] P. PERLMANN e T. HULTIN, « Nature », 182, 1530 (1958).
- [13] O. H. LOWRY, M. A. SCHALEKOMP, M. P. KUYZEN and R. VEEN, « Biol. Chem. », 103, 265 (1951).