
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIO MOLINARO

Enzimi «amino-acidi attivanti» nelle uova di Ciona

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 34 (1963), n.5, p. 563–569.

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_34_5_563_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. — *Enzimi «amino-acidi attivanti» nelle uova di Ciona* (*). Nota di MARIO MOLINARO, presentata (**) dal Socio P. PASQUINI.

I. — INTRODUZIONE.

1° Le ricerche di Hoagland [1] e di altri [2, 3] hanno mostrato il ruolo che gli enzimi attivanti gli amino acidi svolgono nella biosintesi delle proteine. Questi enzimi sono stati trovati nei batteri [2], nel lievito [3], nelle cellule dei Mammiferi [1-4] e nelle piante [5]. Si ritiene che essi siano circa 20 e che ciascuno sia specifico per un singolo amino acido [6]: finora però ne sono stati isolati solo una decina.

Essi catalizzano due reazioni: con la prima l'amino acido specifico viene legato all'ATP formando un amino-acil adenilato con liberazione di pirofosfato; con la seconda l'amino-acil adenilato si unisce con il proprio S-RNA con liberazione di AMP [7].

2° Nello sviluppo embrionale, com'è ben noto, le sintesi proteiche sono molte attive sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo; e perciò l'embrione, nei suoi diversi stadi di sviluppo, costituisce un ottimo materiale per l'analisi dei meccanismi delle sintesi proteiche.

La ricerca degli enzimi attivanti sui sistemi embrionali è stata fatta sull'embrione di pollo [8], sull'embrione degli Anfibi [9] e sul girino [10] e sull'uovo vergine di riccio di mare [11]. Nell'uovo in sviluppo del riccio di mare si è potuto determinare che la incorporazione di amino acidi a livello dei microsomi si compie intensamente, a partire dalla fecondazione [12, 13, 14].

3° Mi sono proposto di accertare se il meccanismo della sintesi proteica sopra descritto è valido anche in altro materiale embriologico: a tale fine ho condotto una ricerca sull'uovo di *Ascidie*. In una ricerca preliminare [15] fu preso in considerazione il problema concernente la presenza in questo uovo dell'S-RNA e le sue caratteristiche. A seguito di tale ricerca si è, in questo lavoro, presa in considerazione la presenza degli enzimi attivanti e la diversa quantità di alcuni amino acidi attivati in diverse fasi dello sviluppo. La ricerca è stata condotta sulle uova ovariche, nell'uovo vergine e nell'uovo in periodi successivi alla fecondazione.

(*) Lavoro eseguito presso l'Istituto di Zoologia dell'Università di Palermo, sotto la direzione del Prof. G. Reverberi.

(**) Nella seduta dell'11 maggio 1963.

II. - MATERIALE E METODO.

A) *Prelievo del materiale.*

a) Gli ovari prelevati rapidamente dall'animale vivo, furono lavati a freddo più volte con acqua di mare artificiale [16]. Successivamente furono omogeneizzati nel seguente mezzo: 0,025 M Tris-HCl buffer (pH 7,5), 0,025 M KCl, 0,001 M $MgCl_2$. L'omogeneizzazione fu fatta con omogenizzatore vetro-téflon tipo Potter azionato a motore, per 4 min.

Tutte le operazioni sono state svolte a 0-4°C. La rottura completa degli ovociti fu ogni volta controllata al microscopio.

b) Per quanto concerne le uova vergini e le uova fecondate anch'esse furono lavate ripetutamente in acqua di mare artificiale, furono fatte sedimentare mediante centrifugazione con centrifuga a mano, e infine omogenate come in (a). Una aliquota di uova fecondate fu fatta sviluppare fino a larva per controllare la normalità dello sviluppo.

B) *Preparazione della frazione enzimatica.*

Fu seguito il procedimento suggerito da Cormier [17] con lievi modifiche.

L'omogenato fu centrifugato 30 min. a $20.000 \times g$. Al sovranatante decantato fu aggiunto 0,1 vol. di 2 % protamina solfato (per 10 min.); si ottenne un precipitato di acidi nucleici che fu rimosso mediante centrifugazione a 15.000 g 5 min. La protamina fu aggiunta fino a che l'estinzione a 260 m μ non scese del 75 % rispetto al livello iniziale. Dopo la rimozione degli acidi nucleici il sovranatante fu portato al 15 % di saturazione di solfato di ammonio, agitato per 1/2 h e centrifugato 10 min. a 10.000 g; il sedimento ottenuto, trovato inattivo, fu scartato e il sovranatante fu portato al 90 % di saturazione di solfato di ammonio, agitato e centrifugato come sopra. Questo sedimento che contiene la frazione enzimatica attiva fu risospeso nel buffer Tris-KCl- $MgCl_2$ a pH 7,5 (0,5 vol. dell'originale sovranatante) e fu ripetuta la precipitazione a 90 % di saturazione con ammonio solfato. Il precipitato attivo fu infine sospeso in egual volume di 0,2 M Tris buffer (pH 7,5) e dializzato per 6 h a freddo contro diversi cambi dello stesso buffer entro tubi Visking 8/32, previamente lavati diverse volte con acqua bidistillata calda e 10^{-4} M EDTA.

C) *Incubazione enzimatica.*

La determinazione degli amino acidi attivati fu eseguita secondo il metodo di Hoagland et alii [5]. Aliquote di 0,5 ml della sospensione enzimatica (contenenti circa 5 mg di proteine) furono aggiunte alla miscela di incubazione

contenente in 1 ml: Tris buffer pH 7,5 μ M 200 (di cui 100 μ M contenute nella sospensione enzimatica); $MgCl_2$ μ M 10; ATP (neutralizzato con KOH) μ M 5; NH_2OH 1 mM (preparata dalla forma cloridrata secondo Beinert [18]); L-Amino acido 10 μ M. In prove preliminari si dimostrò non necessaria la presenza di pirofosfatasi. La idrossilamina, come è noto, si combina con i gruppi carbossilici attivati degli amino-acidi, formando amino-acil-idrossamati, che sono dosati colorimetricamente con cloruro ferrico. L'incubazione fu eseguita a 37°C per 1/2 h. La reazione enzimatica fu arrestata con l'aggiunta di 1,5 ml di soluzione di 0,37 M $FeCl_3$, 0,3 M TCA, e 0,65 M HCl.

Il precipitato costituito dalle proteine enzimatiche fu rimosso mediante centrifugazione e l'assorbimento del sovranatante fu letto a 540/m μ in uno spettrofotometro Beckman DU, contro un bianco in cui furono omessi gli amino-acidi. I valori di estinzione furono riportati a curve standard ottenute con i rispettivi amino-acil-idrossamati sintetici del commercio.

Idrossamato di leucina venne sintetizzato a partire dal metil estere secondo Chunnigham e al. [19].

Il dosaggio delle proteine fu eseguito secondo Lowry e al. [20], usando uno standard di albumina cristallizzata.

Reagenti.

ATP sale disodico; L-glicina idrossamato; L-istidina idrossamato; furono ottenuti dalla Sigma Chemical Co. Gli L-amino-acidi usati furono ottenuti dalla Eastman Organic Chemicals.

Idrossilamina HCl fu ottenuta dalla Merck Darmstad. Il reagente di Folin-Ciocalteu usato per la determinazione delle proteine, Amberlite CG 50, 200 mesh, protamina solfato, furono ottenuti dalla British Drug Houses LTD.

RISULTATI.

a) Come mostrato in Tabella I, il sovrinatante ottenuto dall'omogenato centrifugato a 20.000 g si dimostra notevolmente attivo nella formazione di idrossamati. Questa reazione è indipendente dall'aggiunta di amino-acidi o di ATP nel mezzo di incubazione.

Nel sovrinatante dializzato, invece, la formazione di idrossamati dipende dall'aggiunta di ATP nel mezzo di incubazione, ma risente solo scarsamente dell'aggiunta di amino-acidi.

Sottoponendo il sovrinatante ai procedimenti tecnici sopra descritti si riscontra una drastica diminuzione degli idrossamati formati in assenza di amino-acidi. Prolungando l'incubazione si ha un notevole aumento dell'at-

tivazione di *back ground*. Gli idrossamati formati in queste condizioni di incubazione, sono in alta percentuale di natura non basica, cioè non sono trattenuti su resina a scambio cationico (Amberlite CG 50 in forma H⁺) [21]. Come è noto ad eccezione degli acidi aspartico e glutammico gli amino-acidi attivati formano invece idrossamati basici.

TABELLA I.

Formazione di idrossamati in gonadi di Ciona.
 $\mu\text{Moli idrossamato/mg proteine.}$

	I	2	3
Sovranatante crudo	0,0260	0,0255	0,023
Sovranatante dializzato.	0,0245	0,0205	0,010
Preparazione enzimatica	0,031	0,008	0,0035
	0,033 (*)	0,018	0,005

I quantitativi di idrossamati riportati in colonna 1 furono ottenuti mediante incubazione enzimatica come descritta in Materiale e metodo. In colonna 2 e 3 sono riportati i risultati ottenuti mediante incubazione fatta in assenza di amino-acidi e di ATP rispettivamente.

(*) Valori ottenuti incubando 1 h a 37°C.

b) Nell'*uovo ovarico* si riscontra un quantitativo assai alto di amino-acidi attivati. Sorprendente è la quantità di istidina attivata. Questo risultato è forse in rapporto con l'estrema abbondanza dell'istidina nel pool degli amino acidi liberi negli ovari di *Ciona intestinalis* [22]. Anche la glicina attivata è in notevole quantità. La leucina attivata si trova in quantità inferiore rispetto all'istidina e alla glicina attivata; ancora più bassa è la quantità di arginina attivata (Tabella II). A questo proposito va ricordato che anche nei batteri e nelle cellule dei Mammiferi il dosaggio sia mediante l'idrossilamina, sia mediante lo scambio PP-ATP rivela scarse attività di arginina attivata [23].

c) Nell'*uovo vergine* il quantitativo di questi amino-acidi attivati è notevolmente inferiore. I rapporti fra i singoli amino-acidi sono però pressoché invariati, tranne che per l'istidina, per la quale si riscontra una lieve diminuzione.

d) Nell'*uovo fecondato* il quantitativo di questi amino-acidi attivati è nettamente superiore a quello riscontrato sia nelle uova vergini, sia nelle uova ovariche. La glicina presenta i dati più alti, segue l'istidina; a livelli più bassi vi è la leucina (Tabella II).

TABELLA II.

Amino-acil-idrossamati - $\mu\text{Moli/mg}$ proteine.

Prova n°	Glic.	Istid.	Leuc.	Argin.	Tiros.	Alan.
a) <i>Ovari.</i>						
1 . . .		0,032	0,015		0,031	
2 . . .		0,0235				
3 . . .		0,030	0,018			0,025
4 . . .		0,027				
5 . . .	0,020	0,031				
6 . . .	0,025	0,034	0,020			
7 . . .	0,024	0,033	0,020			
8 . . .	0,022	0,025	0,018	0,014		
9 . . .	0,025			0,013		
10 . . .	0,017		0,016			
11 . . .	0,0208	0,024	0,018	0,0135		
12 . . .	0,023	0,0245	0,0185	0,015		
$\bar{x} =$	0,0234	0,0284	0,018	0,0139		
b) <i>Uova vergini.</i>						
1 . . .	0,018					
2 . . .	0,015	0,018	0,009			
3 . . .	0,017	0,0175	0,01			
4 . . .	0,016	0,019				
5 . . .	0,0165	0,018	0,0101			
$\bar{x} =$	0,0165	0,0181	0,0097			
c) <i>Uova fecondate 30 minuti.</i>						
1 . . .	0,0285	0,027	0,023			
2 . . .	0,032					
3 . . .	0,030	0,028	0,022			
4 . . .	0,029	0,0285	0,0225			
5 . . .	0,031	0,0275	0,021			
$\bar{x} =$	0,0302	0,0278	0,0221			
Le condizioni di sviluppo della reazione sono quelle descritte in Materiale e metodo.						

DISCUSSIONE.

a) Da quanto esposto si può innanzitutto concludere che nell'uovo di *Ciona*, come poteva prevedersi a seguito della già dimostrata presenza dell'S-RNA [15], sono presenti diversi enzimi attivanti.

Questo reperto mostra che l'uovo di *Ciona* segue le tappe classiche della biosintesi proteica.

b) Un secondo dato che scaturisce dalla presente ricerca è che durante la oogenesi vi è un'alta percentuale di amino-acidi attivati. Ciò sembra ovvio dato che il periodo dell'oogenesi è un periodo di intensa sintesi proteica. Va tuttavia fatto rilevare che gli ovari, sui quali fu compiuta la determinazione, sono costituiti da una popolazione eterogenea, in quanto costituiti da oociti in diversi stadi di sviluppo e quindi con diversi livelli di attività proteica. Gli oociti a termine hanno sintesi proteiche molto più scarse degli oociti ai primi stadi. Ciò è in accordo con quanto è stato osservato nelle gonadi di riccio di mare, nelle quali è stata vista [13] una diminuzione di incorporazione di amino-acidi col procedere delle maturazione. I valori di attivazione da me ottenuti sono perciò una media tra questi diversi metabolismi.

Per quanto riguarda gli amino-acidi di cui è stata eseguita la determinazione è risultato che la glicina e la istidina sono gli amino-acidi attivati in maggiore quantità. Essi accanto alla taurina sono anche gli amino-acidi più abbondanti nel pool degli amino-acidi liberi degli ovari di *Ciona* [22]. Il significato di questa alta quantità di istidina attivata non è noto.

c) Per quanto riguarda l'uovo vergine i dati qui ottenuti mostrano una caduta del quantitativo di amino-acidi attivati.

Questo dato conferma l'inerzia metabolica dell'uovo vergine di *Ciona*, già documentata dal basso livello del consumo di O_2 [24, 25, 26] e dalla scarsa o assente incorporazione degli amino-acidi marcati [27]. Gli amino-acidi attivati presenti, probabilmente hanno solo significato di *turnover*.

d) Nell'uovo fecondato il quantitativo di amino-acidi attivati è molto maggiore di quello riscontrato nell'uovo vergine. La glicina è l'amino-acido attivato che è presente in maggiore quantità fra quelli provati. Segue l'istidina. La leucina e la glicina sono a livello doppio che nell'uovo vergine e superano anche il valore dell'uovo ovarico. Questo fatto probabilmente è da riferirsi all'intensità di sintesi proteiche al momento della fecondazione; esso sembrerebbe non accordarsi con la comparsa di nuovi antigeni solo in stadi più avanzati di sviluppo [28]. D'altra parte anche nell'uovo di riccio di mare, in cui, appunto, nuovi antigeni compaiono solo in stadi avanzati di sviluppo, [29, 30] si è trovato un notevole aumento dell'incorporazione di amino-acidi già nei primi periodi successivi alla fecondazione [12, 13, 14], ed è stata evidenziata la precoce sintesi d'una proteina contenente metionina, necessaria per la formazione del mesenchima [31].

In *Ciona* alla fecondazione segue un notevole aumento del consumo di O_2 [24, 25, 26] e una maggiore incorporazione di amino-acidi marcati, evidenziabili all'autoradiografia [27]. Questo fatto è probabilmente legato alla sintesi di proteine necessarie per la formazione del fuso e di nuove superfici cellulari e nucleari.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] M. B. HOAGLAND, « Bioch. Bioph. Acta », 16, 288 (1955).
- [2] J. A. DE MOSS & G. D. NOVELLI, « Bioch. Bioph. Acta », 22, 49 (1956).
- [3] P. BERG, « J. Biol. Chem. », 222, 1025 (1956).
- [4] M. B. HOAGLAND, E. B. KELLER, P. C. ZAMECNIK, « J. Biol. Chem. », 221, 45 (1956).
- [5] J. M. CLARK, « J. Biol. Chem. », 233, 421 (1958).
- [6] F. H. BERGMANN, P. BERG & M. DIECKMANN, « J. Biol. Chem. », 236, 1735 (1961).
- [7] P. BERG, F. H. BERGMANN, E. J. OFENGAND & M. DIECKMANN, « J. Biol. Chem. », 236, 1726 (1961).
- [8] E. M. DEUCHAR, « Nature (London) », 191, 1006 (1961).
- [9] E. M. DEUCHAR, « Exptl. Cell Res. », 25, 364 (1961).
- [10] M. DE GROOT & P. P. COHEN, « Bioch. Bioph. Acta », 59, 595 (1962).
- [11] E. SCARANO & R. MAGGIO, « Exptl. Cell Res. », 12, 403 (1957).
- [12] T. HULTIN & A. BERGSTRAND, « Devel. Biol. », 2, 61 (1960).
- [13] T. HULTIN, « Exptl. Cell Res. », 25, 405 (1961).
- [14] A. MONROY, « Exper. », 16, 114 (1960).
- [15] M. MOLINARO, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », 5, 172 (1962).
- [16] S. HÖRSTADIUS, « Pubbl. Staz. Zool. Napoli », 14, 251 (1935).
- [17] M. J. CORMIER & G. D. NOVELLI, « Bioch. Bioph. Acta », 30, 135 (1958).
- [18] H. BEINERT, D. E. GREEN, P. HELE, H. HIFT, R. V. VAN KORFF & C. V. RAMAKRISHNAN, « J. Biol. Chem. », 203, 35 (1953).
- [19] K. C. CUNNINGHAM, G. T. NEWBOLD, F. S. SPRING & J. STARK, « J. Chem. Soc. », p. 2091 (1949).
- [20] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, « J. Biol. Chem. », 193, 265 (1951).
- [21] W. H. ELLIOT & G. COLEMAN, « Bioch. Bioph. Acta », 57, 236 (1962).
- [22] J. S. KITTREDGE, D. G. SIMONSEN, E. ROBERTS & B. JELINEK, *Amino Acid Pools. Proc. Conference on Free Aminoacids*, p. 176, London 1962.
- [23] G. D. NOVELLI, « Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. », 44, 85 (1958).
- [24] J. RUNNSTRÖM, « Protoplasma », 10, 106 (1930).
- [25] A. TYLER & W. D. HUMASON, « Biol. Bull. », 73, 261 (1937).
- [26] R. LENTINI, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », 4, 209 (1961).
- [27] C. MANSUETO, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », 5, 135 (1962).
- [28] W. E. BERG & P. C. BAKER, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », 5, 274 (1962).
- [29] P. PERLMANN & T. GUSTAFSON, « Exper. », 4, 481 (1948).
- [30] P. PERLMANN, « Exptl. Cell Res. », 5, 394 (1953).
- [31] M. BOSCO & A. MONROY, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », 3, 53 (1960).