
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

SALVATORE METAFORA, TOMMASO D'ANNA

Adenosintrifosfatasi in ovario di *Ciona intestinalis*

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.3, p. 403–408.
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_3_403_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. — *Adenosintrifosfatasi in ovario di Ciona intestinalis* (*). Nota di SALVATORE METAFORA e TOMMASO D'ANNA, presentata (**) dal Corrisp. P. PASQUINI.

INTRODUZIONE.

È noto che l'ATP-asi è un enzima presente nei mitocondri, nella frazione microsomiale e nei nuclei delle cellule. Un'attività ATP-asi, legata alla molecola della miosina, si riscontra inoltre nelle fibre muscolari.

Questi enzimi, pur agendo sullo stesso substrato, presentano caratteristiche cinetiche tali che permettono di differenziarli.

Intraprendere uno studio di questi enzimi nell'uovo di *Ciona intestinalis* ci è sembrato utile per la interpretazione di alcuni processi metabolici dello sviluppo embrionale. Allo scopo di caratterizzare cineticamente questi enzimi, alcune ricerche preliminari sono state condotte sull'ovario maturo.

Nella presente Nota sono riportati alcuni dati relativi alla ATP-asi mitocondriale, a quella della frazione microsomiale e alla ATP-asi actomiosina-simile.

MATERIALE E METODI.

Gli ovarii di *Ciona intestinalis* sono stati adoperati per la preparazione degli enzimi; dopo rimozione dagli animali vivi, gli ovarii furono accuratamente lavati con acqua di mare filtrata e con acqua distillata fredda e quindi omogenizzati e sottoposti alle tecniche di preparazione degli enzimi da saggiare.

A) Preparazione degli enzimi.

1° *Preparazione della frazione mitocondriale.* — 1 gr. in peso fresco di ovario fu omogenizzato in 5 ml di saccarosio 0,44 M in tampone citrato 0,1 M a pH 6,2 contenente Versene alla concentrazione finale di 5×10^{-4} M. L'omogenato fu poi centrifugato in una centrifuga refrigerata International a 700 g per 10 min.; il residuo fu risospeso in un egual volume di mezzo di omogenizzazione e quindi ricentrifugato allo stesso modo. I due supernatanti combinati, furono quindi centrifugati a 18000 g \times 30 min. Per eliminare la contaminazione da pigmento dal sedimento di mitocondri così ottenuto, tale sedi-

(*) Lavoro eseguito presso l'Istituto di Zoologia dell'Università di Palermo, sotto la direzione del prof. G. Reverberi. Il dr. S. Metafora è Ricercatore presso il Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R. per lo studio del differenziamento.

(**) Nella seduta del 13 febbraio 1965.

mento fu sospeso in un volume di saccarosio 1 M uguale al supernatante e centrifugato a 18000 g per 30 min. In tal modo il pigmento rimaneva a fluttare nel supernatante mentre i mitocondri si raccoglievano al fondo del tubo [1].

Tale residuo ultimo veniva poi sospeso in: saccarosio-barbital (0,25 M e 0,01 M c.f. a pH 8,6) per il dosaggio dell'ATP-asi, e in saccarosio-fosfato-versene (0,25 M; 0,04 M; e 10^{-3} M c.f. a pH 7,4) per il dosaggio della citocromossidasi.

2° *Preparazione del supernatante di 18000 g.* - 1 gr. di ovario fu omogenizzato in 5 ml di saccarosio 0,25 M in tampone barbital 0,01 M a pH 8,6 e centrifugato a 18000 g per 30 min.; il supernatante fu quindi messo a dializzare contro il mezzo di omogenizzazione a freddo per 5 ore e poi adoperato per il dosaggio della attività enzimatica.

3° *Preparazione dell'ATP-asi Actomiosina-simile.* - 1 gr. di ovario fu omogenizzato in 3 ml di KCl 0,5 M in KHCO_3 0,03 M a pH 8,3 e l'enzima fu lasciato estrarre per 15 min. L'omogenato è stato quindi centrifugato a 18000 g per 30 min. e il supernatante diluito con 20 volumi di acqua distillata fredda; l'enzima fu così lasciato precipitare a freddo per 5 ore e quindi la sospensione fu centrifugata a 18000 g per 30 min. Il sedimento, di aspetto gelatinoso, fu sospeso in KCl 0,5 M per essere così saggiato. Tutte le operazioni di preparazione furono condotte a 4° C.

B) *Saggi dell'attività enzimatica.*

1° *Citocromossidasi.* - L'attività di quest'enzima nei mitocondri è stata determinata con metodo gasometrico nei respirometri di Warburg; la miscela di reazione consisteva di 0,5 ml di substrato (citocromo *c* + parafenilendiamina, $2,5 \times 10^{-4}$ M e 0,03 M c.f.) posto nel braccio laterale e 0,5 ml di sospensione mitocondriale dentro la vaschetta; 100 μl di KOH 15 % furono messi nel pozzetto centrale. Dopo un periodo di 5 min. per equilibrare la temperatura, l'enzima e il substrato furono mescolati e la reazione fu seguita per 1 ora prendendo letture ogni 5 minuti; nel maggior numero dei casi il consumo di ossigeno era lineare per la prima mezz'ora.

L'attività della citocromossidasi nei mitocondri, isolati col metodo descritto, è stata determinata allo scopo di saggiare il loro grado di purezza. I risultati ottenuti ci mostrano un'attività specifica relativamente alta e costante pari a 76,75 μl di $\text{O}_2/\text{hr}/\text{mg}$ di Prot. La scelta del tampone fosfato nel saggio enzimatico è stata fatta per ovviare all'azione inibente del barbital.

2° *Adenosintrifosfatasi.* - L'attività dell'ATP-asi nei mitocondri, nel supernatante di 18000 g e nell'estratto actomiosinico fu determinata mediante micrometodo. Fu seguito in parte il metodo di KIELLEY [2] e di MONROY [1]: a 150 μl di substrato (ATP sale disodico + MgCl_2 o CaCl_2 in tampone barbital 0,01 M c.f. a pH 8,6 o 9,2) furono aggiunti 150 μl di sospensione enzimatica; la miscela di reazione fu quindi incubata a 30° C in bagno termostatico per 30 min., indi la reazione fu bloccata mediante aggiunta di 100 μl di TCA 40 %. Il precipitato fu eliminato centrifugando a 18000 g e a freddo in micro-

centrifuga OLE DICH con gli stessi tubi di incubazione. Il contenuto in fosforo liberato dall'azione dell'enzima, fu determinato col micrometodo descritto da Glick [3]. A 300 μ l di supernatante furono aggiunti 300 μ l di reagente (molibdato di ammonio + solfato ferroso) e, lasciato sviluppare il colore per 10 min., l'assorbimento fu letto a 720 m μ in uno spettrofotometro Beckman DU mediante l'uso di microcuvette.

L'attività enzimatica è stata calcolata sulla base del contenuto proteico dei campioni analizzati ed espressa come μ g di P liberato per mg di proteine in un'ora (attività specifica). Per la citocromossidasi l'attività specifica è stata espressa come μ l di ossigeno per mg di proteine in un'ora. Il contenuto proteico nei campioni analizzati fu determinato col metodo di Lowry & al. [4] usando come standard albumina di siero.

I principali fattori che influenzano la velocità iniziale di una reazione enzimatica e cioè: la concentrazione dell'enzima, la concentrazione del substrato, il pH, la temperatura e l'azione di alcuni ioni metallici, sono stati presi in esame uno ad uno.

RISULTATI.

a) *ATP-asi mitocondriale.*

Lo studio della cinetica enzimatica ci ha permesso di stabilire entro quali limiti di linearità mantenere la concentrazione dell'enzima. Il calcolo della costante di Michaelis ci ha fornito un valore di 2,86 μ M. Per quanto riguarda la concentrazione ottimale del substrato è stato scelto il valore di 5×10^{-4} M.

Il pH e la temperatura ottimali trovati sono rispettivamente di 8,6 e di 30°C. L'azione del cloruro di calcio e del cloruro di magnesio sulla attività enzimatica ha dato i risultati espressi nella Tabella I. Le concentrazioni finali degli ioni adoperati corrispondono a quelle di massimo effetto sull'attività enzimatica (10^{-3} M per il CaCl_2 e $2,5 \times 10^{-4}$ M per il MgCl_2).

b) *ATP-asi della frazione microsomiale (supernatante 18000g).*

Anche in questo caso la concentrazione enzimatica è stata mantenuta nei limiti di linearità; per la concentrazione del substrato è stato scelto il valore di 5×10^{-4} M c.f. Il pH optimum è di 8,6; la temperatura ottimale è di 30°C. L'effetto degli ioni calcio e degli ioni magnesio è espresso nella Tabella II. Le concentrazioni finali usate corrispondono a quelle di maggiore efficacia sull'attività dell'enzima (10^{-2} M per l' MgCl_2 e 10^{-2} M per il CaCl_2).

c) *ATP-asi actomiosina-simile.*

Per quanto concerne questo enzima i dati cinetici mostrano che vi è proporzionalità fra concentrazione enzimatica e velocità di reazione, che il pH ottimale è di 9,2 e che la temperatura ottimale è di 30°C. La concentrazione del substrato adoperata è stata di 5×10^{-4} M. Per quanto riguarda

l'azione del cloruro di calcio sull'attività dell'enzima si è visto che, alla concentrazione finale di 10^{-3} M, attiva del 27,1 %. La Tabella III riassume i dati relativi alle esperienze eseguite con il CaCl_2 .

TABELLA I.

Azione dell' MgCl_2 e del CaCl_2 sull'ATP-asi in mitocondri isolati da ovario di Ciona.

Attività specifica espressa in μg di P liberato per ora da 1 mg di proteina di mitocondri. Saggio enzimatico in saccarosio-barbital (0,25 e 0,01 M c.f.) a pH 8,6; substrato ATP c.f. 5×10^{-4} M; incubazione a 30° C per 30'.

Esper. n°	Sub. senza attivatore	Sub. + MgCl_2 ($2,5 \times 10^{-4}$ M c.f.)	Sub. + CaCl_2 (10^{-3} M c.f.)	Sub. + MgCl_2 + CaCl_2 ($2,5 \times 10^{-4}$ e 10^{-3} M c.f.)
1	38,4	49,4	—	—
2	42,3	55,1	45,2	45
3	36,92	47	—	—
4	42,5	55,2	41,7	44,8
5	39,55	51,1	43,85	43,85
Media	39,93	51,56	43,55	44,53
σ	$\pm 1,06$	$\pm 1,6$	$\pm 0,3$	$\pm 0,13$
% Attivazione		29,2		

DISCUSSIONE.

1) *ATP-asi mitocondriale e della frazione microsomiale.*

I dati da noi ottenuti sull'attività ATP-asi mitocondriale (vedi Tabella I) mostrano come l' MgCl_2 a concentrazione molto bassa ($2,5 \times 10^{-4}$ M c.f.) attiva l'enzima del 29,2 %, mentre il CaCl_2 provoca solo una leggera attivazione; i due composti associati infine competono nella loro azione. L'attivazione da magnesio-ioni di quest'enzima è in accordo con i dati ottenuti da altri Autori su materiale diverso [2, 5, 1, 6, 7].

L'ATP-asi della frazione microsomiale viene anche attivata dal MgCl_2 ma ad una concentrazione molto più alta di quella mitocondriale e per un valore solo del 16,7 %; a sua volta il CaCl_2 la inibisce del 9,2 %, mentre i due composti associati competono. La diversa concentrazione di magnesio-ioni necessaria per attivare i due enzimi, molto probabilmente dipende dalla presenza di magnesio « endogeno » nei mitocondri [8, 1, 9].

TABELLA II.

Azione dell'MgCl₂ e del CaCl₂ sull'ATP-asi microsomiale (Supernatante a 18.000 g).

Attività specifica espressa in μg di P per mg di proteine liberato in un'ora. Saggio enzimatico in saccarosio-barbital (0,25 e 0,01 M c.f.) a pH 8,6; substrato: ATP c.f. $5 \times 10^{-4}\text{M}$; incubazione a 30° C per 30'.

Esper. n°	Sub. senza attivatore	Sub. + MgCl ₂ (c.f. 10^{-2}M)	Sub. + CaCl ₂ (c.f. 10^{-2}M)	Sub. + MgCl ₂ + CaCl ₂ (10^{-2} e 10^{-2}M c.f.)
1	7	7,25	6,15	—
2	7,6	8,8	8,2	8
3	6,95	7,92	6,58	7,2
4	7,7	9,85	6	8,5
5	6,6	8,5	5,41	7,15
6	5,95	6,38	5,48	6,75
Media	6,94	8,1	6,3	7,5
σ	$\pm 0,26$	$\pm 0,49$	$\pm 0,43$	$\pm 0,31$
% Attivazione		16,7		
% Inibizione			9,2	

TABELLA III.

Azione del CaCl₂ sull'ATP-asi actomiosina-simile da ovario di Ciona.

Attività specifica espressa in μg di P per mg di proteine e per 1 h. Saggio enzimatico in KCl-barbital (0,5 M e 0,01 M c.f.) a pH 9,2; substrato: ATP sale disodico (c.f. $5 \times 10^{-4}\text{M}$); incubazione a 30° C per 30'.

Esperimento	Enzima senza attivatore	Enzima + CaCl ₂ (10^{-3}M c.f.)	Enzima + CaCl ₂ (10^{-1}M c.f.)
1	41,35	51,2	17,75
2	38,50	49,4	15,44
3	36,97	48,0	14,80
Media	38,95	49,5	16
% Attivazione	—	27,1	—
% Inibizione	—	—	59

Le nostre ricerche in corso per stabilire il « pattern » di attività di questi enzimi nel corso dello sviluppo embrionale acquistano particolare interesse alla luce di alcune ipotesi sul ruolo dell'ATP-asi mitocondriale nella fosforilazione ossidativa [10, 11].

Per quanto riguarda poi l'ATP-asi del supernatante a 18000 g l'attività di quest'enzima sarebbe legata ai microsomi [12, 13, 14] e probabilmente connessa con i processi di sintesi delle proteine.

2) *ATP-asi actomiosina-simile.*

I dati cinetici e il metodo di estrazione relativi a questo enzima ci indicano chiaramente la presenza nell'ovario di una sostanza actomiosina-simile. Come dimostra la Tabella III l'attivazione da calcio-ioni è abbastanza alta. Ad elevata concentrazione (0,1 M c.f.) il cloruro di calcio inibisce del 59 %. La ricerca di quest'enzima negli ovociti e nelle uova mature ha dato risultati negativi; inoltre, com'è noto, lo studio istologico dell'ovario non rivela presenza di fibre muscolari striate. In base a tali considerazioni c'è da supporre che quest'enzima, legato allo stroma ovarico, sia associato alle cellule dell'epitelio ciliato o ad eventuali fibre muscolari lisce.

È nostro intendimento vedere nel corso dello sviluppo embrionale il momento in cui si ha la comparsa di quest'enzima data la presenza di una muscolatura cospicua nella coda della larva natante.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. MONROY, « J. Cell Comp. Physiol. », 50, 73 (1957).
- [2] W. W. KIELLEY e J. KIELLEY, « J. Biol. Chem. », 200, 213 (1953).
- [3] D. GLICK, *Quantitative chemical technique of histo- and cytochemistry*, vol. II, p. 93, Wiley & Sons, Inc., New York (1963).
- [4] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR e R. J. RANDALL, « J. Biol. Chem. », 193, 265 (1951).
- [5] J. R. BRONCK e W. W. KIELLEY, « Biochim. Biophys. Acta », 24, 440 (1957).
- [6] M. E. PULLMAN, H. S. PENEFSKY, A. DATTA e E. RACKER, « J. Biol. Chem. », 235, 3322 (1960).
- [7] R. WEBER e E. J. BOELL, « Devel. Biol. », 4, 452 (1962).
- [8] P. SIEKEVITZ e V. R. POTTER, « J. Biol. Chem. », 215, 221 (1955).
- [9] S. LØVTRUP, « Biochim. Biophys. Acta », 89, 156 (1964).
- [10] W. C. SCHNEIDER, « Advances in Enzymology », 21, 1 (1959).
- [11] E. RACKER, « Advances in Enzymology », 23, 323 (1961).
- [12] L. ERNSTER, P. SIEKEVITZ e G. E. PALADE, « J. Cell Biol. », 15, 541 (1962).
- [13] P. F. BAKER, « Biochim. Biophys. Acta », 75, 287 (1963).
- [14] M. DIXON e E. C. WEBB, *Enzymes*, p. 627, Longmans ed., London (1964).