Atti Accademia Nazionale dei Lincei

Classe Scienze Fisiche Matematiche Naturali

Rendiconti

Caterina Mansueto

Incorporazione di amino acidi marcati nei frammenti nucleati e anucleati dell'uovo vergine di Ascidie

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. **38** (1965), n.6, p. 911–915.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_6_911_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/

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Accademia Nazionale dei Lincei, 1965.

Embriologia. — *Incorporazione di amino acidi marcati nei frammenti nucleati e anucleati dell'uovo vergine di Ascidie* (*). Nota di CATERINA MANSUETO, presentata (**) dal Corrisp. P. PASQUINI.

1. Il valore del nucleo nella sintesi delle proteine citoplasmatiche è stato investigato da numerosi Autori. Il metodo seguito per questa ricerca è stato quello di dividere la cellula in una porzione nucleata e in una anucleata; successivamente di esporre i due frammenti a precursori marcati; finalmente di contare le tracce radioattive nei due frammenti.

In *Amoeba* il citoplasma in presenza del nucleo incorpora amino acidi nelle proteine molto attivamente: in assenza del nucleo però una certa incorporazione è stata notata [1,2]. In *Acetabularia* [3,4], nell'uovo di riccio di mare [5] e nell'uovo di Anfibi [6], invece, la sintesi delle proteine si ha anche in assenza del nucleo. D'altra parte in *Mytilus* il lobo polare, notoriamente anucleato, separato dal resto dell'uovo, incorpora amino acidi marcati (metionina e glicina) molto meno che i blastomeri AB e CD [7].

Nei reticolociti l'incorporazione di amino acidi marcati avviene anche in assenza del nucleo [8–11].

2. Per quanto concerne le *Ascidie* [12] i frammenti « scuri » dell'uovo vergine di *Ciona intestinalis*, ottenuti a seguito della centrifugazione incorporano (metionina marcata) attivamente e sempre: quelli « chiari » invece incorporano solo in alcuni casi. Questo comportamento fu spiegato ammettendo che il nucleo dell'uovo (in condizione metafasica I meiotica) passa, a seguito della centrifugazione, *a caso*, o nel frammento scuro o nel frammento chiaro, più spesso però nel frammento scuro, che è più grande. Secondo questa interpretazione il nucleo dell'uovo eserciterebbe una influenza nella incorporazione degli amino acidi nelle proteine citoplasmatiche. Fu, però, anche prospettata l'ipotesi che la incorporazione possa essere dovuta alla presenza o meno, nei frammenti, dei mitocondri: di fatto i frammenti scuri posseggono quasi tutti i mitocondri dell'uovo, quelli chiari, invece, ne sono privi, o ne posseggono solo eccezionalmente.

Allo scopo di portare più luce in questo problema, gli esperimenti sono stati ripresi facendo uso di un altro precursore marcato (istidina) e utilizzando oltre le uova di Ciona anche uova di altre specie di Ascidie.

(*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Zoologia della Università di Palermo, sotto la direzione del prof. G. Reverberi.

(**) Nella seduta del 17 giugno 1965.

Materiale e metodi.

Uova vergini di *Phallusia mamillata*, *Ascidia malaca* e *Ciona intestinalis*, liberate dalle membrane con aghi di ferro sottili, furono sottoposte a centrifugazione per 10' a 13000 g, secondo il metodo di Harvey [13]. Le uova furono in questo modo spezzate in due sorta di frammenti: chiari e scuri.

Un'altra serie di esperimenti condotti su uova di *Ascidia malaca* fu eseguita tagliando l'uovo a mano con aghi di vetro: poiché la presenza del nucleo nell'uovo di *A. malaca* è facile a determinarsi, si può con certezza dire quali sono i frammenti nucleati e quali gli anucleati. I frammenti, separatamente, furono incubati in soluzioni di metionina–S^{35} (att. spec. 7 μC/ml; conc. 0,68 mM) e di istidina–C^{14} (att. spec. 10 μC/ml; conc. $4{,}5 \times 10^{-4}$M) per 3 ore: quindi furono lavati nelle soluzioni degli amino acidi non marcati e sottoposti alle usuali tecniche istologiche. Dopo sparaffinamento le sezioni di 5 μ di spessore furono ricoperte con film Kodak AR 10. L'esposizione in camera scura fu di 20–30 giorni. Il colorante usato fu il verde di metil–pironina.

Risultati.

a) *Frammenti dell'uovo di* Ciona intestinalis.

A seguito della centrifugazione si ebbero due tipi di frammenti: « chiari » di 40–70 μ di diametro, fatti di plasma ialino e con una goccia di lipidi ad un polo; e « scuri » di 90–140 μ di diametro, contenenti granuli di tuorlo, pigmenti e mitocondri.

L'assenza, rispettivamente la presenza, nei frammenti ialini o scuri, dei mitocondri fu stabilito con la reazione Nadi [14,15].

I frammenti ialini e scuri messi ad incubare in istidina–C^{14} si sono comportati nel seguente modo: i frammenti chiari non presentano alcuna radioattività; i frammenti scuri sono *tutti* radioattivi.

b) *Frammenti di uovo di* Phallusia mamillata.

Il frammento chiaro è un po' meno della metà dell'uovo ed è costituito da un citoplasma ialino, omogeneo, interrotto nella porzione equatoriale da una fascia granulare, costituita da mitocondri [14,16]. Il pezzo scuro è leggermente più grande della metà dell'uovo intero, e ha una struttura granulare: i suoi componenti sono dati principalmente da granuli di tuorlo e di pigmenti.

Il nucleo dell'uovo, in metafase I meiotica, in seguito alla centrifugazione può essere dislocato indifferentemente nel pezzo ialino o in quello scuro.

Entrambi i frammenti furono incubati in metionina–S^{35} per 3 ore. Lo studio delle sezioni al microscopio ha mostrato che i frammenti chiari (Tav. I, fig. 1) e quelli scuri incorporano: questi ultimi però meno dei pezzi chiari (Tav. I, fig. 2).

c) *Frammenti di uovo di* Ascidia malaca.

Il frammento chiaro è circa 80–90 μ di diametro; possiede ad un polo granuli gialli, grossolani e, equatorialmente, una masserella di granuli più piccoli. L'altro frammento, quello scuro, è grande circa 100 μ: possiede una piccola calotta di plasma ialino, e, per il resto, granuli di tuorlo e pigmento distribuiti uniformemente su tutta la sua superficie. Urbani e Urbani–Mistruzzi [14], con metodi istochimici, hanno mostrato che entrambi i frammenti presentano reazione positiva per la indofenol ossidasi (che probabilmente si identifica con la citocromo ossidasi) e che quindi posseggono mitocondri.

I frammenti furono incubati separatamente in metionina–S^{35} o in istidina–C^{14}.

Il risultato fu che i frammenti chiari (Tav. I, fig. 3) e scuri (Tav. I, fig. 4), presentano radioattività.

Nel caso in cui, invece che per centrifugazione i frammenti furono ottenuti con taglio a mano e si potè stabilire in quale frammento si trova il nucleo, fu potuto stabilire quanto segue: le metà nucleate (Tav. I, fig. 5) e quelle anucleate (Tav. I, fig. 6) sono radioattive.

DISCUSSIONE.

1° La condizione del nucleo nell'uovo vergine appena deposto delle *Ascidie* è la seguente: la vescicola germinale è già sfasciata ed è presente la figura metafasica in preparazione all'emissione del 1° globulo polare. È probabile che in queste condizioni il nucleo non abbia alcuna funzione metabolica per riguardo alla costruzione delle proteine. L'uovo vergine, d'altra parte, possiede un metabolismo, anche se non elevato; infatti esso respira [17, 18] e, come gli esperimenti precedentemente fatti con l'uso di metionina marcata mostrano, [12] incorpora.

2° I risultati sopra riportati mostrano che l'incorporazione in *Phallusia* è abbastanza attiva in ambedue le sorta di frammenti.

I risultati ottenuti con *Ascidia malaca* precisano che l'incorporazione è uguale sia nelle parti nucleate che nelle anucleate.

Per quanto riguarda *Ciona intestinalis* i nuovi risultati assicurano che solo i frammenti scuri incorporano.

Da questi risultati appare evidente che il nucleo, nelle condizioni sopra descritte, non è implicato nell'incorporazione dei precursori delle proteine. Queste ricerche non sono in contraddizione con quanto già visto da altri sulle uova di Echinodermi e di Anfibi [5, 6].

3° Esclusa l'azione del nucleo nell'incorporazione degli amino acidi da parte dell'uovo vergine, va considerata se la incorporazione può essere determinata dalla presenza nei frammenti dei mitocondri.

Come esposto precedentemente i frammenti ialini dell'uovo di *Ciona intestinalis* non incorporano: ora tali frammenti non posseggono mitocondri [14,15], è anche noto che tali frammenti non sono capaci di svilupparsi [19, 15].

Nell'uovo centrifugato di *Ascidia malaca* i mitocondri si rinvengono in ambedue i tipi di frammenti [14]: in questo caso i pezzi chiari sono capaci di svilupparsi e di dare origine a larve complete [20, 21]. In concordanza con questi dati ambedue i pezzi incorporano gli amino acidi marcati.

Per quanto riguarda i frammenti di *Phallusia mamillata* nei quali è stata notata una incorporazione più vistosa nei frammenti ialini, questi appunto posseggono la maggior parte dei mitocondri rispetto ai pezzi scuri; essi sono anche capaci di dare larve complete [16].

Da queste ricerche, dunque, emerge, che, indipendentemente dal ruolo del nucleo nell'incorporazione degli amino acidi – ruolo che verrà ulteriormente indagato – i mitocondri sono necessari perché tale incorporazione avvenga. La incorporazione degli amino acidi nelle proteine evidentemente richiede energia: ed è ben conosciuto che le particelle deputate alla costituzione delle molecole di ATP, le molecole energetiche, sono appunto i mitocondri.

Bibliografia.

[1] D. Mazia, D.M. Prescott, « Biochem. Biophys. Acta », *17*, 23 (1955).
[2] J. Brachet, A. Ficq, « Arch. de Biol. », *67*, 431 (1956).
[3] J. Brachet, H. Chantrenne, « Nature, London », *168*, 950 (1941).
[4] M. J. Olszewska, J. Brachet, « Exptl. Cell Res. », *22*, 370 (1961).
[5] H.M. Malkin, « J. Cell Comp. Physiol. », *44*, 105 (1954).
[6] H. Tiedemann, H. Tiedemann, « Naturwiss. », *41*, 535 (1954).
[7] A. Abd-el-Wahab, E.M. Pantelouris, « Exptl. Cell Res. », *13*, 78 (1957).
[8] H. Borsook, C. L. Deasy, A. J. Haagen-Smit, O Keighley, P. H. Lowy, « J. Biol. Chem. » *196*, 669 (1952).
[9] B. W. Holloway, S. H. Ripley, « J. Biol. Chem. », *196*, 695 (1952).
[10] S. B. Koritz, H. Chantrenne, « Biochem. Biophys. Acta », *13*, 209 (1954).
[11] F. Gavosto, R. Rechenmann, « Biochim. Biophys. Acta », *13*, 583 (1954).
[12] C. Mansueto, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », *6*, 131 (1963).
[13] E. B. Harvey, « Biol. Bull. », *64*, 125 (1933).
[14] E. Urbani, L. Urbani-Mistruzzi, « Pubbl. Staz. Zool. Napoli », *21*, 69 (1947).
[15] R. La Spina, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », *3*, 1 (1960).
[16] R. La Spina, « Pubbl. Staz. Zool. Napoli », *33*, 163 (1963).
[17] A. Minganti, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », *1*, 150 (1957).
[18] R. Lentini, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », *4*, 209 (1961).
[19] G. Reverberi, « Pubbl. Staz. Zool. Napoli », *18*, 129 (1940).
[20] F. Almagià, « Pubbl. Staz. Zool. Napoli », *20*, 179 (1946).
[21] R. La Spina, « Act Embryol. Morphol. Exper. », *4*, 320 (1961).

Sommario. — Nella presente ricerca è stata studiata l'incorporazione di metionina-S^{35} e di istidina-C^{14} nei frammenti dell'uovo vergine di *Ciona intestinalis*, *Phallusia mamillata* e *Ascidia malaca*, ottenuti per centrifugazione. I risultati mostrano che in *Ciona* la incorporazione avviene esclusivamente nel pezzo scuro; che in *Phallusia* è più abbondante nel pezzo chiaro; e che in *Ascidia malaca* è presente in entrambi i frammenti.

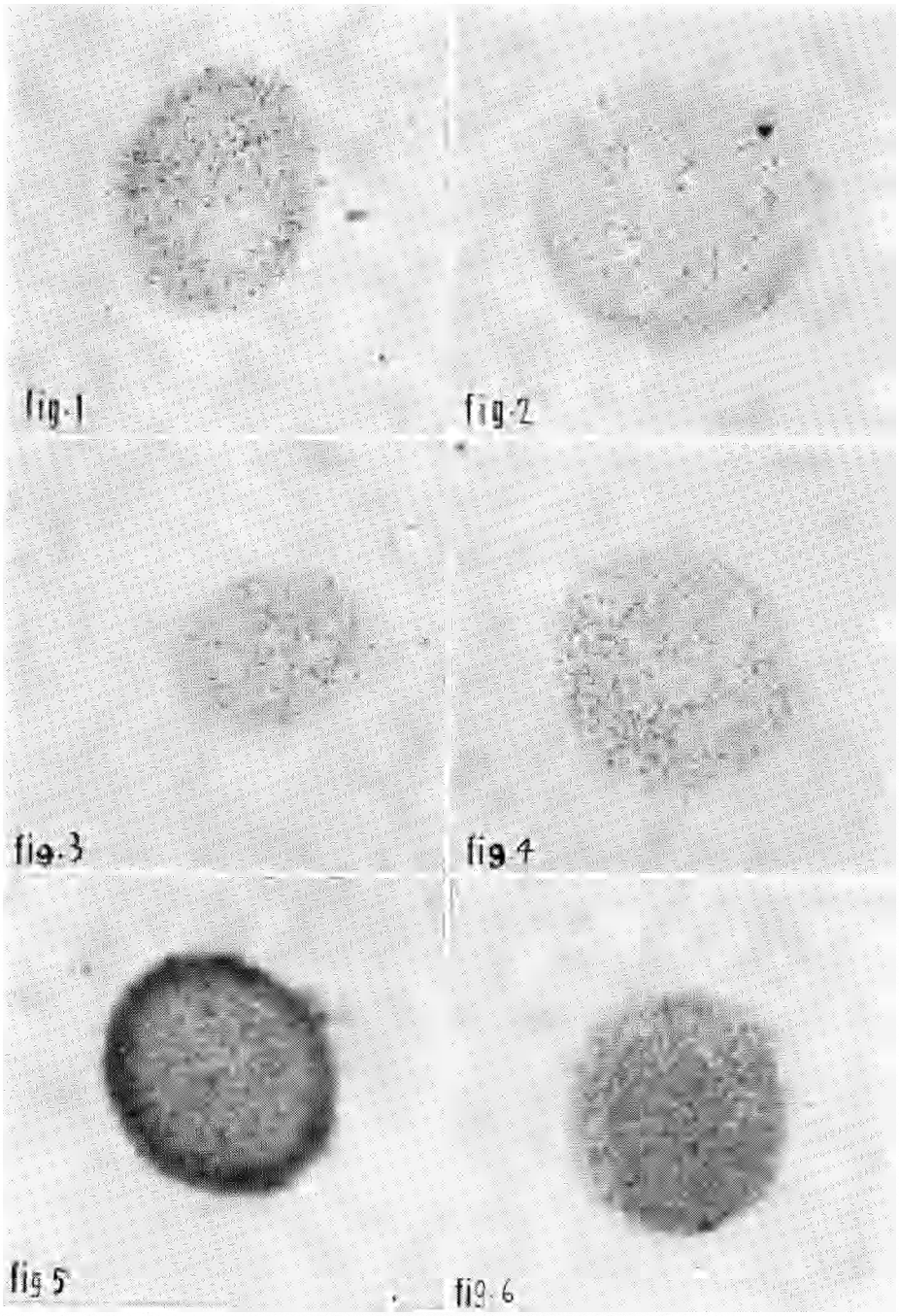
fig. 1
fig. 2
fig. 3
fig. 4
fig. 5
fig. 6

I risultati suggeriscono che il nucleo, *in condizione meiotica metafasica,* non è responsabile dell'incorporazione, ma la presenza dei mitocondri nei frammenti.

Ricerche precedenti hanno mostrato che il frammento ialino di *Ciona* è completamente sprovvisto di mitocondri, mentre ambedue i frammenti – chiaro e scuro – dell'uovo di *Phallusia* e di *Ascialia malaca,* ne posseggono in grande quantità: nel caso dei frammenti scuri dell'uovo di *Phallusia* la incorporazione è più debole che nei frammenti chiari: in correlazione essi posseggono meno mitocondri che i frammenti chiari.

Questi risultati non escludono l'influenza del nucleo nella sintesi delle proteine citoplasmatiche: dicono solo che una condizione necessaria per tale sintesi è *la presenza dei mitocontri.* Questi probabilmente ne forniscono l'energia necessaria.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

Fig. 1. – Frammento chiaro di *Phallusia mamillata* trattato con metionina–S^{35}.

Fig. 2. – Frammento scuro di *Phallusia mamillata* trattato con metionina–S^{35}.

Fig. 3. – Frammento chiaro di *Ascidia malaca,* dopo trattamento con istidina–C^{14}.

Fig. 4. – Pezzo scuro di *Ascidia malaca* trattato con istidina–C^{14}.

Fig. 5. – Frammento nucleato dell'uovo vergine di *Ascidia malaca* trattato con metionina–S^{35}.

Fig. 6. – Frammento anucleato dell'uovo di *Ascidia Malaca* dopo trattamento con metionina–S^{35}.