
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ALBERTO MONROY, RACHELE MAGGIO, ANNA MARIA
RINALDI

Attivazione in vitro dei rihosorni delle uova vergini di riccio di mare

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.6, p. 962–967.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_6_962_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/>

Biologia. — *Attivazione in vitro dei ribosomi delle uova vergini di riccio di mare*^(*). Nota di ALBERTO MONROY, RACHELE MAGGIO e ANNA MARIA RINALDI, presentata ^(**) dal Corrisp. S. RANZI.

Una caratteristica della maturazione dell'uovo è la progressiva inibizione delle capacità di compiere sintesi proteica. La fecondazione o la attivazione partenogenetica sono seguite dalla immediata o rapida attivazione della sintesi proteica (Hultin, 1950; Nakano e Monroy, 1958; Monroy e Vittorelli, 1962; Monroy e Tolis, 1964). È un problema molto importante, dunque, quello di conoscere il processo che nel corso della maturazione determina il blocco della sintesi proteica ed il meccanismo attraverso il quale l'inibizione viene rimossa alla fecondazione.

È chiaro che l'inibizione può essere localizzata a livello di uno qualsiasi degli anelli della catena di reazioni che operano nella sintesi proteica.

Per quel che riguarda l'attivazione degli aminoacidi, si è dimostrato che nell'uovo vergine di riccio di mare (Scarano e Maggio, 1957; Maggio e Catalano, 1963) gli enzimi attivanti sono presenti ed attivi, seppure a livello relativamente basso. L'attività non cambia fino alla blastula avanzata. Vi sono dati recenti (Nemer e Bard, 1963; Glisin e Glisin 1964) che fanno pensare che lo sRNA nell'uovo vergine possa essere un fattore limitante della sintesi proteica o perché presente in quantità estremamente piccola o perché scarsamente funzionante. Questo, dunque, potrebbe essere uno dei fattori limitanti della sintesi proteica nell'uovo vergine. I dati sono però ancora poco chiari.

Per quel che riguarda il sistema RNA messaggero (mRNA)-ribosomi, si hanno prove abbastanza convincenti che nell'uovo vergine esso è bloccato.

Ribosomi preparati da uova vergini non sono capaci di incorporare *in vitro* aminoacidi nelle proteine; questa capacità è invece presente nei ribosomi preparati da uova fecondate (Hultin, 1961). L'ipotesi che ciò che manca all'uovo vergine è lo mRNA è contraddetta dalle tre seguenti osservazioni:

(1) Uova fecondate e lasciate sviluppare in presenza di actinomicina D si sviluppano in modo normale fino allo stadio di blastula; durante tale periodo la velocità di incorporazione degli aminoacidi nelle proteine è identica a quella dei controlli nonostante la forte inibizione della sintesi dello RNA (Gross e Cousineau, 1963). Allo stadio di blastula lo sviluppo si arresta. Sembra dunque che lo mRNA necessario a dirigere la sintesi proteica fino allo stadio di blastula sia già presente nell'uovo vergine.

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia Comparata della Università di Palermo e Gruppo di Embriologia Molecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche. Questa ricerca è stata anche in parte sovvenzionata dai National Institutes of Health, U.S. Public Health Service (GM 06211) e dalla Fondazione Rockefeller.

(**) Nella seduta del 17 giugno 1965.

(2) Frammenti anucleati di uova vergini attivati partenogeneticamente sono capaci di compiere sintesi proteica come i controlli nucleati e fecondati (Denny e Tyler, 1964). Questo esperimento esclude che la attivazione della sintesi proteica sia dovuta a produzione di mRNA da parte del nucleo, immediatamente dopo la fecondazione.

(3) RNA preparato da uova vergini di riccio di mare stimola la incorporazione di aminoacidi in proteine da parte di ribosomi di embrioni di riccio o di fegato di ratto *ma è del tutto senza effetto* su ribosomi preparati da uova vergini. I ribosomi delle uova vergini non sono nemmeno stimolati da RNA preparato da embrioni o da nuclei di fegato di ratto (Maggio et al., 1964). Questo esperimento dimostra che nell'uovo vergine vi è uno RNA le cui proprietà lo fanno considerare come un messaggero ma che d'altra parte i ribosomi delle stesse uova vergini non sono capaci di interagire con esso. È stato tuttavia osservato (Nemer, 1962; Wilt e Hultin, 1962) che i ribosomi di uova vergini sono stimolabili da poly-U (acido poliuridilico). Questa osservazione può essere spiegata ricordando che questo polinucleotide ha una capacità di legarsi ai ribosomi che è molto più elevata di quella dei polinucleotidi naturali (Okamoto e Takanami, 1963).

Si pone quindi il problema della condizione che inibisce ai ribosomi delle uova vergini di interagire con lo mRNA. Si potevano prospettare due possibilità: (1) i ribosomi delle uova vergini hanno una configurazione strutturale che non consente l'attacco dello mRNA; (2) la superficie dei ribosomi è coperta da un rivestimento che impedisce l'interazione con lo mRNA.

I risultati che saranno esposti indicano invece che nelle uova vergini di riccio lo mRNA è già legato ai ribosomi ma il complesso è reso inattivo dalla presenza di un involucro proteico.

MATERIALE E METODI.

Si sono usati uova ed embrioni di riccio di mare, *Paracentrotus lividus*. Negli esperimenti su uova vergini, dopo ripetuti lavaggi con acqua di mare, si rimuoveva la capsula gelatinosa con trattamento con acqua di mare acida (pH circa 5,0). Le uova fecondate si sono lasciate sviluppare in grandi recipienti mantenendo la sospensione in agitazione a mezzo di un'elica rotante lentamente.

La preparazione dei ribosomi era fatta a partire dal supernatante post-mitochondriale di omogenati in mezzo A di Robinson e Novelli (1962) con aggiunta di mercaptoetanolo 5×10^{-3} M. Il sedimento ottenuto per centrifugazione a 105.000 g era risospeso in tampone Tris 0,05 M, pH 7,6 contenente 5×10^{-2} M KCl e acetato di Mg 4×10^{-3} M e usato come tale. Per una discussione critica sul grado di purezza di queste preparazioni come anche per maggiori dettagli tecnici si rimanda al lavoro più esteso (Monroy et al., 1965).

I dettagli sul procedimento di incubazione per le prove di incorporazione sono descritti nelle Tabelle. Alla fine della incubazione i precipitati in acido

trichloracetico (TCA), lavati ed estratti, erano disciolti in ammoniacca ed essiccati in strato sottile sul fondo delle vaschette del contatore a scintillazione liquida, EKCO. Come liquido di scintillazione si è usata una miscela di PPO 0,3% e POPOP 0,03% in toluene.

Da ogni campione della preparazione ribosomiale si prelevava un'aliquota per la determinazione dello RNA (orcinolo) e delle proteine (Lowry et al., 1951) da servire come riferimento.

L'incubazione per il trattamento con tripsina era fatta con 50-100 $\mu\text{g/ml}$ a 30°C per 30 minuti. I ribosomi erano poi lavati per centrifugazione attraverso circa 10 ml di saccarosio 0,15 M a 105.000 g per 60 minuti. Lo stesso sistema di lavaggio dei ribosomi si è usato quando questi erano sottoposti a preincubazione. Per la preincubazione si è sempre usato il supernatante postribosomiale della stessa preparazione dalla quale provenivano i ribosomi. La preincubazione era fatta nella stessa miscela di incubazione usata per la incorporazione ad esclusione degli aminoacidi radioattivi e dello RNA o polinucleotidi esogeni.

Il supernatante di fegato di ratto era preparato da omogenati di fegato di ratto in mezzo A con la tecnica descritta da Maggio et al. (1963) centrifugati a 15.000 g per 15 minuti ed il supernatante centrifugato a 105.000 g per un'ora. Del supernatante di quest'ultima centrifugazione si usava la parte limpida intermedia dopo avere scartato il terzo superiore. Il supernatante veniva conservato in fiale da 4 ml a -20°C e veniva scongelato ed usato quando necessario. Lo RNA è stato preparato e purificato come descritto da Maggio et al. (1964).

Gli aminoacidi radioattivi sono stati acquistati dal Radiochemical Center, Amersham, Inghilterra; ATP e GTP dalla Sigma; PEP e PEP-chinasi dalla Boehringer; il poly-U dalla Miles Chemical Company, tripsina e ribonucleasi cristalline dalla Worthington; chimotripsina cristallina dalla Armour.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

I dati riportati nella Tabella I dimostrano che ribosomi di uova vergini, trattati con tripsina, acquistano la capacità di incorporare aminoacidi e di essere stimolati da RNA al quale prima non rispondevano. Anche la stimolazione da poly-U diviene considerevolmente più forte. Il fatto più interessante che emerge da questi esperimenti è che i ribosomi così trattati sono divenuti capaci di incorporare aminoacidi anche in assenza di RNA o polinucleotidi esogeni. La chimotripsina, fatta agire nelle stesse condizioni, è senza effetto. La ribonucleasi, alla concentrazione di 0,25 $\mu\text{g/ml}$, abolisce la capacità dei ribosomi delle uova vergini di rispondere alla stimolazione da poly-U.

Nei nostri precedenti esperimenti (Maggio et al., 1964) avevamo tentato di localizzare nell'uovo vergine lo RNA attivo nella stimolazione dei ribosomi per la incorporazione *in vitro*. Avevamo trovato che la frazione attiva sedimenta con i ribosomi. Questa osservazione, assieme a quelle presentate adesso, sugge-

risce l'ipotesi che nell'uovo vergine siano presenti ribosomi che portano mRNA attaccato ma che il complesso è reso inattivo da un rivestimento proteico. La rimozione proteolitica di questo rivestimento mette in libertà lo mRNA e rende attivo il complesso. Il fatto che alla fecondazione si ha, nell'uovo di riccio, una transitoria attivazione di enzimi proteolitici (Lundblad, 1949; 1950) può esser preso come indiretta indicazione che un meccanismo simile possa agire anche *in vivo*.

TABELLA I.

Effetto del trattamento con tripsina sulla capacità di ribosomi di uova vergini di incorporare aminoacidi in proteine.

Esper. N.	Aminoacidi	Aggiunta	CPM/mg di RNA ribosomiale	
			Controllo	Trattato
1	Fenilalanina	—	0	122
	Fenilalanina	Poly-U	270	340
2	Fenilalanina	—	0	72
	Fenilalanina	Poly-U	360	2200
	AH	—	25	260
	AH	RNA blastula	0	475
	AA	—	18	448
3	AA	RNA vergine	9	644

La miscela di incubazione conteneva in 1,0 ml 25 μ M di tampone Tris 0,05 M pH 7,6; 4 μ M di Mg acetato; 50 μ M KCl; 20 μ M mercaptoetanolo; 4 μ M ATP; 0,5 μ M GTP; 10 μ M PEP; 10 μ g PEP-chinasi; circa 4 mg (come proteina) di supernatante di fegato di ratto. *Aggiunte*: Poly-U: 1 mg; RNA totale da blastule (RNA blastula): 1,3 mg; RNA totale da uova vergini (RNA vergine): 1,23 mg. Fenilalanina- C^{14} (att. sp. 7,8 μ C/ μ M): 1 μ C; idrolizzato di proteine di alghe C^{14} (AH): 1 μ C; miscela di C^{14} -fenilalanina, lisina, valina, glicina e acido glutamico (AA): 1 μ C totale. Quantità di ribosomi: esper. 1: mg 0,193; esper. 2: mg 0,483; esper. 3: mg 0,327. Dopo 30 minuti di incubazione a 30°C, la reazione era interrotta con l'aggiunta di 100 μ M di aminoacidi C^{14} usati per la reazione e 0,4 ml di TCA 50%. Il precipitato era quindi estratto con TCA 5% freddo e poi a 90°C, alcool-etero 3:1 a caldo ed etere; veniva quindi sciolto in amoniaca ed essiccato in strato sottile sul fondo delle vaschette dello scintillatore. Il trattamento con tripsina è stato fatto per 30 minuti con 100 μ g/ml. Da ogni campione un'aliquota si precipitava con TCA 5% e si usava per l'analisi dello RNA e delle proteine totali, per riferimento.

Abbiamo inoltre trovato che se dopo il trattamento con tripsina i ribosomi di uova vergini vengono incubati nel loro stesso supernatante postribosomiale (preincubazione) e quindi lavati e saggati per la incorporazione *in vitro*, la loro capacità incorporativa endogena è molto aumentata. Essi inoltre non sono più stimolabili da poly-U (Tabella II). La preincubazione è soltanto efficace se applicata *dopo* il trattamento con tripsina. Questa osservazione indica che la preincubazione ha del tutto rimosso (per un processo proteolitico o altro) il rivestimento proteico inibitore, ha cioè attivato in modo completo

tutti i complessi mRNA-ribosomi. La perdita di stimolabilità da RNA o poly-U per effetto di questo secondo trattamento indica che i ribosomi sono stati completamente attivati e cioè le molecole di mRNA ad essi attaccate sono state tutte esposte. I ribosomi quindi non offrono più siti disponibili per l'attacco di RNA o polinucleotidi esogeni.

TABELLA II.

Trattamento di ribosomi di uova vergini con tripsina seguito da preincubazione: effetto sulla capacità endogena e stimolata da poly-U di incorporare fenilalanina-¹⁴C nelle proteine.

Trattamento con tripsina	Preincubazione	Esperimento 1		Esperimento 2	
		senza Poly-U	con Poly-U	senza Poly-U	con Poly-U
—	—			0	240
—	+			0	217
+	—	149	520		
+	+	645	585	451	485

Sistema di incubazione come indicato nella Tabella I. Trattamento con tripsina con 200 µg/ml per 30 minuti a 30° C. Preincubazione per 30 minuti. Quantità di ribosomi: nell'esper. 1: 0,444 mg; nell'esper. 2: 0,394 mg. Attività in CPM/mg di RNA ribosomiali.

Il trattamento con tripsina eseguito su ribosomi di embrioni ne abolisce, o riduce, la attività incorporante. Esperimenti sono in corso per chiarire la natura della differenza tra ribosomi di uova vergini e fecondate.

La interpretazione di questi risultati che noi proponiamo è la seguente. Lo mRNA sintetizzato nel corso della ovogenesi, e dal quale dipende il controllo della sintesi proteica dell'embrione fino allo stadio di blastula, si attacca ai ribosomi. Nel corso della maturazione questi complessi mRNA-ribosomi sono resi inattivi da un rivestimento proteico. La rimozione di tale rivestimento causa la attivazione del complesso e la nostra ipotesi è che questo processo è operato dalle proteasi che si attivano alla fecondazione.

Un'attraente possibilità è che anche nel corso della embriogenesi si abbiano complessi mRNA-ribosomi mantenuti in stato di inattività da un rivestimento proteico e che vengono attivati dall'intervento di proteasi al momento richiesto. Questa ipotesi è confermata dalle recenti osservazioni di Humphreys et al. (1964) che nel tegumento dell'embrione di pollo sono presenti aggregati ribosomiali inattivi che divengono attivi al momento in cui inizia la cheratinizzazione. Esperimenti sono in corso per verificare la validità della nostra ipotesi.

BIBLIOGRAFIA.

- DENNY P. C. & TYLER A., « Bioch. Bioph. Res. Comm. », *14*, 245 (1964).
GLISIN V. R. & GLISIN M. V., « Proc. Natl. Acad. Sci., U.S. », *52*, 1548 (1964).
GROSS P. R. & Cousineau G. H., « Bioch. Bioph. Res. Comm. », *10*, 321 (1963).
HULTIN T., « Exptl. Cell Res. », *1*, 599 (1950).
HULTIN T., « Exptl. Cell Res. », *25*, 405 (1951).
HUMPHREYS T., PENMAN S. & BELL E., « Bioch. Bioph. Res. Comm. », *17*, 618 (1964).
LOWRY O. H., ROSENBOROUGH N. J., FARR L. A. & RANDALL R. J., « J. Biol. Chem. », *193*, 265 (1951).
LUNDBLAD G., « Nature », *163*, 1949 (1949).
LUNDBLAD G., « Exptl. Cell Res. », *1*, 264 (1950).
MAGGIO R. & CATALANO C., « Arch. Bioch. Bioph. », *103*, 164 (1963).
MAGGIO R., SIEKEVITZ P. & PALADE G. E., « J. Cell. Biol. », *18*, 267 (1963).
MAGGIO R., VITTORELLI M. L., RINALDI A. M. & MONROY A., « Bioch. Bioph. Res. Comm. », *15*, 436 (1964).
MONROY A. & VITTORELLI M. L., « J. Cell Comp. Physiol. », *60*, 285 (1962).
MONROY A. & TOLIS H., « Biol. Bull. », *126*, 456 (1964).
MONROY A., MAGGIO R. & RINALDI A. M., « Proc. Natl. Acad. Sci., U.S. », (1965),
(in corso di stampa).
NAKANO E. & MONROY A., « Exptl. Cell Res. », *14*, 236 (1958).
NEMER M., « Bioch. Bioph. Res. Comm. », *8*, 511 (1962).
NEMER M. & BARD S. G., « Science », *140*, 664 (1963).
OKAMOTO T. & TAKANAMI M., « Biochim. Biophys. Acta », *76*, 266 (1963).
ROBINSON C. L. & NOVELLI G. D., « Arch. Bioch. Bioph. », *96*, 452 (1962).
SCARANO E. & MAGGIO R., « Exptl. Cell Res. », *12*, 403 (1957).
WILT F. H. & HULTIN T., « Bioch. Bioph. Res. Comm. », *9*, 313 (1962).

SUMMARY. — It has been shown (Maggio et al., 1964) that RNA extracted from unfertilized sea urchin eggs stimulates incorporation of amino acids by ribosomes from rat liver or from sea urchin embryo. Ribosomes of unfertilized eggs are not stimulated.

Following treatment with trypsin, ribosomes of unfertilized eggs (1) are stimulated by RNA; (2) acquire the ability to incorporate amino acids in the absence of any exogenous RNA or polynucleotide. When trypsin treatment is followed by incubation of the ribosomes in their own postribosomal supernatant, the endogenous incorporation is greatly increased. It is suggested that in the unfertilized eggs ribosomes carrying attached molecules of messenger RNA are present which, however, are rendered inactive by a protein coat. Activation of protein synthesis, upon fertilization would result from the removal of this protein coat due to the action of proteases that (as shown by Lundblad, 1949) become active immediately following fertilization.