
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIO BUONGIORNO-NARDELLI

Attività proteasiche nelle uova vergini, fecondate ed attivate di *Arbacia lixula*

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 39 (1965), n.1-2, p. 129-131.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_39_1-2_129_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. — *Attività proteasiche nelle uova vergini, fecondate ed attivate di Arbacia lixula.* Nota (*) di MARIO BUONGIORNO-NARDELLI (**) presentata (***) dal Corrisp. P. PASQUINI.

Lundblad (1949, 1950, 1954) ha dimostrato che alcune proteasi presenti nelle uova di varie specie di Echinodermi (*Paracentrotus lividus*, *Arbacia lixula*, ecc.) subiscono, nei primi momenti seguenti la fecondazione, un notevole incremento di attività; la frazione E II (pH optimum intorno a 7,0, inattivata dalla cisteina ed attivata dagli ioni Ca^{++}) aumenta bruscamente alla comparsa della membrana di fecondazione, mentre le frazioni E I (pH optimum 6,7, attivata dalla cisteina) ed E III (pH optimum 7,8, attivata dalla cisteina ed inattivata dagli ioni Ca^{++}) aumentano subito dopo. È particolarmente interessante il fatto che le attività enzimatiche suddette nel breve tempo di 10' ritornano nuovamente ai bassi livelli iniziali. Per queste ricerche Lundblad ha impiegato come substrato la gelatina e come metodo di dosaggio quello viscosimetrico o, più raramente, la titolazione al formolo; una gran parte delle esperienze è stata condotta su materiale liofilizzato e conservato per lungo tempo. Un tentativo di riprodurre le sue esperienze usando substrato e metodo di dosaggio differenti (Maggio, 1957) non ha dato risultati comparabili a quelli da lui ottenuti. Impiegando come substrato la caseina ed eseguendo il dosaggio con il metodo di Duspiva (1939) si può mettere in evidenza nelle uova di *Paracentrotus lividus* una sola attività enzimatica che ha un pH optimum intorno a 5,4; pochi minuti dopo la fecondazione si nota una fugace attivazione che è però molto meno accentuata rispetto a quelle osservate da Lundblad.

Poiché lo studio del comportamento delle proteasi, ampiamente analizzato nello sviluppo embrionale di Vertebrati ed Invertebrati (Urbani, 1954, 1962), si prospetta interessante anche nei frammenti nucleati ed anucleati di uova di Echinodermi sottoposti a fecondazione o ad attivazione con acqua di mare ipertonica è stato per prima cosa necessario ripetere le esperienze di Lundblad su uova intere.

Le uova di *Arbacia lixula*, raccolte con le consuete modalità e lavate ripetutamente con acqua di mare filtrata sono state poste in provette in ciascuna delle quali è stato determinato il numero totale di uova presenti con l'ausilio di un microscopio e di un reticolo millimetrato. In tali provette è

(*) Pervenuta all'Accademia il 30 giugno 1965.

(**) L'autore, assistente incaricato presso la Cattedra di Istologia ed Embriologia della Facoltà di Scienze dell'Università di Roma, ringrazia vivamente il prof. J. Brachet che ha suggerito la presente ricerca e ne ha discusso i risultati.

(***) Ricerca eseguita presso il Laboratorio Internazionale di Genetica e Biofisica di Napoli con il contributo del C.N.R. e della Shell Internationale Research.

stata fatta avvenire la fecondazione o la attivazione con acqua di mare ipertonica (60‰). Dopo breve centrifugazione manuale ed allontanamento dell'acqua di mare le uova sono state sospese in un volume noto di acqua distillata tale da ottenere in tutti i campioni la stessa concentrazione di uova. La omogenizzazione è stata eseguita in omogenizzatore di Potter a 0°C e la qualità dell'omogenato è stata controllata al microscopio.

La determinazione dell'attività proteinasica è stata eseguita secondo le indicazioni di Duspiva (1939) usando come substrato caseina.

Sono state condotte le seguenti prove:

I prova: pH 7,0 (frazione E II di Lundblad); concentrazione delle uova: 100.000/ml di acqua distillata; tempo di incubazione: fino ad 8 ore.

5 serie di determinazioni sono state condotte sui seguenti campioni:

- a) uova vergini;
- b) uova fecondate, alla comparsa della membrana di fecondazione;
- c) uova fecondate, 10' dopo la comparsa della membrana di fecondazione;
- d) uova attivate con acqua di mare ipertonica per 10';
- e) uova attivate con acqua di mare ipertonica per 20';
- f) uova attivate con acqua di mare ipertonica per 30'.

Tali esperienze hanno rivelato sempre assenza di attività enzimatica.

II prova: pH 6,7 (frazione E I di Lundblad); concentrazione delle uova: 100.000/ml di acqua distillata; tempo di incubazione: fino ad 8 ore.

I dosaggi eseguiti a tutti gli stadi precedentemente elencati non hanno rivelato alcuna attività enzimatica anche dopo aggiunta di cisteina 0,010 M, dopo sottrazione completa degli ioni Ca^{++} o dopo aggiunta di lubrol 0,1 %. Una serie di esperienze è stata condotta su uova vergini, fecondate ed attivate di *Paracentrotus lividus* ed ha dato lo stesso risultato.

III prova: pH 5,4 (secondo le indicazioni di Maggio); concentrazione delle uova: 100.000/ml di acqua distillata; tempo di incubazione: 15'.

Sono state eseguite tre serie di determinazioni sui seguenti campioni:

- a) uova vergini;
- b) uova fecondate, alla comparsa della membrana di fecondazione;
- c) uova fecondate, 5' dopo la comparsa della membrana di fecondazione;
- d) uova fecondate, 20' dopo la comparsa della membrana di fecondazione.

Serie N°	1	2	3
a)	.180	.125	.075
b)	.200	.142	.049
c)	.220	.140	.102
d)	.175	.120	.119

Una ultima serie di esperienze ha indicato che il valore ottimale di pH per le attività proteinasiche è intorno a 5,4, confermando quanto osservato da Maggio su *Paracentrotus*.

Dall'esame delle esperienze condotte si osserva che i risultati ottenuti da Maggio risultano pienamente confermati anche su *Arbacia lixula*: il pH optimum dell'attività proteolitica è infatti intorno a 5,4 ed a questo valore di pH si può mettere in evidenza una sia pure modesta attivazione conseguente alla fecondazione.

Non è invece stato possibile, come si è detto, riprodurre i risultati di Lundblad con la metodica qui descritta.

Il problema della attivazione delle proteasi nelle uova fecondate ed attivate sarà ripreso quanto prima adottando substrati e metodi di dosaggio differenti: notevole è infatti l'interesse che potrebbe avere il porre in relazione tale fenomeno con il brusco aumento della velocità di sintesi proteica che si verifica nelle uova sottoposte a fecondazione o ad attivazione partenogenetica (Monroy, 1960; Hultin, 1961); tale brusco aumento sarebbe conseguente, secondo Brachet, allo sblocco dell'RNA messaggero sintetizzato durante l'oogenesi ed accumulato nel citoplasma dell'uovo vergine allo stato inattivo. Recenti esperienze di Maggio et al. (1965) hanno convalidato questa ipotesi dimostrando che la frazione ribosomiale di uova vergini di *Paracentrotus lividus* incorpora attivamente aminoacidi nelle proteine dopo trattamento con tripsina *in vitro*; la disinibizione della sintesi proteica che si verifica alla fecondazione potrebbe essere perciò conseguente alla rimozione di uno strato proteico che avvolge le molecole di RNA messaggero legate ai ribosomi.

Poiché Brachet et al. (1963) hanno dimostrato che l'attivazione delle sintesi proteiche si verifica sia nei frammenti nucleati che nei frammenti anucleati delle uova di *Arbacia*, sarà molto interessante conoscere il comportamento delle proteasi nei due tipi di frammenti.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] BRACHET J., FICQ A. e TENCER R., « Exp. Cell Res. », 32, 168 (1963).
- [2] DUSPIVA F., « Protoplasma », 32, 11 (1939).
- [3] HULTIN T., « Exp. Cell Res. », 25, 405 (1961).
- [4] LUNDBLAD G., « Nature », 163, 643 (1949).
- [5] LUNDBLAD G., « Exp. Cell Res. », 1, 264 (1950).
- [6] LUNDBLAD G., *Proteolytic activity in Sea Urchin Gametes*, Uppsala (1954).
- [7] MAGGIO R., « J. Cell. Comp. Physiol. », 50, 135 (1957).
- [8] MAGGIO R., MONROY A., RINALDI A.M. e VITTORELLI M. L., « C.R. Acad. Sc. », 260, 1293 (1965).
- [9] URBANI E., « Rend. Acc. Naz. Lincei », 16, 556 (1954).
- [10] URBANI E., « Advances in Morphogenesis », 2, 61 (1962).