

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

TOMMASA CUSIMANO-CAROLLO, MARIO MOLINARO

## Azione degli istoni sullo sviluppo dell'uovo di Anfibi

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 39 (1965), n.6, p. 593–600.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1965\\_8\\_39\\_6\\_593\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_39_6_593_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.** — *Azione degli istoni sullo sviluppo dell'uovo di Anfibi* (\*). Nota di TOMMASA CUSIMANO-CAROLLO e MARIO MOLINARO, presentata (\*\*) dal Corrisp. P. PASQUINI.

#### INTRODUZIONE.

I. Molti risultati sperimentali suggeriscono che gli istoni svolgono un importante ruolo nella regolazione della sintesi degli acidi nucleici e dell'attività genetica [1, 2].

Esperimenti effettuati *in vivo* e *in vitro* dimostrano la notevole inibizione esercitata dagli istoni sulla incorporazione di precursori marcati nell'RNA e nel DNA [3, 4, 5]. Le diverse frazioni hanno una diversa capacità d'inibizione che appare collegata al rapporto arginina/lisina: frazioni ricche in lisina sembrano avere una azione più spiccata, probabilmente per una maggiore affinità con la molecola del DNA [6-9]. L'attività dell'RNA-polimerasi risulta fortemente inibita e a concentrazioni d'istone più alte, anche la DNA-polimerasi [7, 10-12]: questo stesso effetto è prodotto anche da diverse poliamine naturali e sintetiche [10, 11].

Non si può escludere l'effetto degli istoni anche su altri sistemi enzimatici: a causa della loro natura cationica sono capaci di legarsi, oltre che con gli acidi nucleici, con molte sostanze acide. È nota l'inibizione sulla citocromo-ossidasi e sulla sintesi mitocondriale dell'ATP [13, 14].

D'altra parte la rimozione degli istoni dal nucleo della cellula mediante blando trattamento con tripsina, causa una notevole attivazione del metabolismo cellulare. Particolarmente stimolata è la produzione di RNA nucleare, che presenta in parte le caratteristiche dell'RNA-messenger [9, 10].

Questi risultati suggeriscono un possibile intervento degli istoni nella regolazione dell'attività del gene. L'ipotesi è anche sostenuta dai risultati ottenuti trattando con istoni, *in vitro*, cromosomi a spazzola isolati da oociti di Anfibi [9]. I tipici cappi localizzati lungo l'asse del cromosoma, sono ritenuti espressione della funzionalità del gene. Sotto l'azione dell'istone i cappi si retraggono e il cromosoma assume la struttura condensata, tipica del cromosoma in riposo. Questi cambiamenti della morfologia del cromosoma, che tuttavia non sembrano essere strettamente specifici, suggeriscono che gli istoni svolgono nella cellula la funzione di repressori fisiologici del gene.

(\*) Lavoro eseguito con un contributo del CNR presso l'Istituto di Zoologia dell'Università di Palermo, sotto la direzione del prof. G. Reverberi.

(\*\*) Nella seduta dell'11 dicembre 1965.

2. Nello sviluppo embrionale sono stati messi in evidenza con metodi citochimici cambiamenti nelle affinità tintoriali degli istoni nei diversi stadi: tali cambiamenti sono attribuiti alla trasformazione degli « istoni della segmentazione » negli « istoni adulti » responsabili della differenziazione [15-17]. D'altra parte questi risultati non sono confermati nei diversi materiali embriologici studiati e sono contraddetti da molti lavori [18-20].

Sono stati anche descritti cambiamenti della distribuzione degli istoni nel nucleo e nel citoplasma durante lo sviluppo embrionale e correlati con i fenomeni della differenziazione [20, 21].

In *Rana pipiens* Markert e Ursprung [22] hanno iniettato nelle uova fecondate frazioni proteiche nucleari e citoplasmatiche, estratte dal fegato dell'individuo adulto. Le albumine e le globuline e meno gli istoni causano nell'embrione trattato inibizione della divisione cellulare ed arresto dello sviluppo allo stadio di blastula.

Notevoli effetti d'inibizione sono stati ottenuti anche nelle uova di *Pleurodeles* mediante trattamento con istoni ricchi in lisina, nei vari stadi di sviluppo [23].

Il trattamento effettuato sino a blastula precoce causa arresto di sviluppo a gastrula. Negli stadi successivi si ha una progressiva diminuzione di sensibilità.

Nel seguente lavoro sono stati studiati gli effetti esercitati dagli istoni sullo sviluppo embrionale di *Discoglossus pictus*. Gli embrioni sono stati trattati in vari momenti dello sviluppo con differenti frazioni d'istone, allo scopo di evidenziarne l'azione nelle fasi della morfogenesi.

#### MATERIALE E TECNICA.

Le uova di *Discoglossus* ottenute per deposizione spontanea erano private del coat gelatinoso manualmente e messe, allo stadio di 2 blastomeri, entro capsule contenenti soluzione di Holtfreter, in numero di 10 uova per capsula. Quando le uova avevano raggiunto lo stadio desiderato, erano passate in capsule contenenti 2 ml di soluzione Holtfreter addizionata rispettivamente a frazioni di istone ad alto contenuto di lisina (HL) e frazioni ad alto contenuto di arginina (HA), estratte da timo di vitello [24]. Il pH della soluzione Holtfreter non era modificato dall'aggiunta dell'istone. Controlli dello stesso lotto erano fatti sviluppare nelle medesime condizioni, in assenza d'istone. Gli istoni ci furono gentilmente forniti dal dr. A. E. Mirsky che gli Autori ringraziano vivamente.

#### RISULTATI.

A) In una prima serie di esperimenti le uova sono state fatte soggiornare nel mezzo contenente istone a partire dallo stadio scelto sino alla schiusa dei controlli. La concentrazione di istone era di 0,40; 0,20; 0,10; 0,05 mg/ml.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

a) La frazione HL (Tabella I) alle concentrazioni più alte (0,4-0,2 mg/ml) blocca la segmentazione alle prime divisioni; i blastomeri che si formano sono di grandezza anomala, successivamente si rifondono andando in citolisi. Alla concentrazione 0,1 mg/ml lo sviluppo è bloccato a morula: solo una piccola percentuale (20%) raggiunge lo stadio di gastrula.

TABELLA I.

*Trattamento a partire da 2 blastomeri (\*)*

Istone	Conc. mg/ml	Segmen- tazione	Blastula	Gastrula	Neurula	Bottone codale	Larva (**)	
							anom.	norm.
H-L . . . .	0,40	100	—	—	—	—	—	—
	0,20	100	—	—	—	—	—	—
	0,10	80	—	20	—	—	—	—
	0,05	—	—	100	—	—	—	—
H-A . . . .	0,40	100	—	—	—	—	—	—
	0,20	—	—	80	—	—	20	—
	0,10	—	—	—	—	—	—	100

(\*) Le cifre riportate indicano la percentuale di embrioni arrestati nello stadio indicato.

(\*\*) Le cifre riportate indicano gli embrioni che hanno superato la schiusa.

Alla concentrazione 0,05 mg/ml la segmentazione è normale, però lo sviluppo si arresta allo stadio di gastrula.

La frazione HA ha effetti meno drastici sulla segmentazione: solo con 0,4 mg/ml le segmentazioni vengono bloccate; con 0,2 mg/ml si ha sviluppo sino a gastrula, però una certa percentuale di embrioni (20%) riesce a sgusciare, dando larve con anomalie generali. In queste larve il sistema nervoso è scarsamente differenziato o iposviluppato; gli organi adesivi sono spesso fusi; si nota ciclopia, talvolta assenza delle fossette olfattive, corda vacuolizzata, masse muscolari atrofiche, spina bifida.

Con 0,1 mg/ml si ha sviluppo normale.

b) Il trattamento delle blastule con HL (0,4; 0,2; 0,1 mg/ml) (Tabella II) permette lo sviluppo fino lo stadio di tappo vitellino. Alla concentrazione di 0,05 mg/ml, solo in qualche caso, si ottengono larve normali (20%); il 50% non supera la schiusa, il restante 30% è formato da larve con anomalie soprattutto a carico del tronco che è ridotto, e nella coda che si presenta tozza e con il margine ondulato.

TABELLA II.  
*Trattamento a partire da blastula (\*)*.

Istone	Conc. mg/ml	Gastrula	Neurula	Bottone codale	Larva (**)	
					anom.	norm.
H-L . . . .	0,40	100	—	—	—	—
	0,20	100	—	—	—	—
	0,10	100	—	—	—	—
	0,05	—	—	50	30	20
H-A . . . .	0,40	60	40	—	—	—
	0,20	—	70	—	30	—
	0,10	—	—	—	50	50

(\*) Le cifre riportate indicano la percentuale di embrioni arrestati nello stadio indicato.

(\*\*) Le cifre riportate indicano gli embrioni che hanno superato la schiusa.

Il trattamento con HA, alla concentrazione di 0,4 mg/ml, causa arresto di sviluppo a gastrula nel 60% dei casi, il resto non supera la schiusa. Alla concentrazione 0,2 mg/ml lo sviluppo procede più innanzi sino allo stadio di neurula nel 70% dei casi; per il resto si ottengono larve sgusciate microcefale e con coda ricurva ventralmente.

Con 0,1 mg/ml si hanno larve natanti nel 50% dei casi.

c) Il trattamento a partire dallo stadio di *gastrula* (Tabella III) con la frazione HL, alla concentrazione 0,2 mg/ml, causa arresto di sviluppo nel 50% dei casi, ovvero porta alla formazione di larve con anomalie diffuse. Con 0,1 mg/ml, invece, quasi la totalità degli embrioni riesce a superare la schiusa, presentando anomalie diffuse a carico di tutti gli apparati. Solo con 0,05 mg/ml si ha sviluppo normale.

Con la frazione HA si ottiene arresto di sviluppo a bottone codale, con 0,2 mg/ml; invece larve natanti con 0,1 mg/ml.

Quando il trattamento fu fatto in stadi che precedono la gastrulazione si ebbe frequentemente exogastrulazione.

d) Il trattamento sia con la frazione HL che con quella HA (0,2 ; 0,1 mg/ml) a partire dallo stadio di *tappo vitellino*; provoca anomalie quasi esclusivamente funzionali: le larve che si ottengono giacciono sul fondo del recipiente incapaci di spostarsi e presentano contrazioni fibrillari della coda.

La conclusione che si ricava da questi esperimenti è che gli istoni esercitano una spiccata azione inibitrice sullo sviluppo: essa è più marcata per

la frazione HL che per la frazione HA; l'effetto inibente tuttavia decresce a partire dallo stadio di blastula.

Una notevole azione di arresto dello sviluppo è anche esercitata dalla protamina (0,2 mg/ml), estratta da spermatozoi di Salmone, la quale sembra avere un effetto molto simile a quello degli istoni.

La sieralbumina bovina (0,2 mg/ml), diversamente da quanto osservato da altri [21], nelle nostre condizioni non ha effetti sullo sviluppo.

TABELLA III.

*Trattamento a partire da gastrula (\*)*.

Istone	Conc. mg/ml	Neurula	Bottone codale	Larva (**)	
				anom.	norm.
H-L . . . . .	0,20	50	—	50	—
	0,10	—	—	100	—
	0,05	—	—	—	100
H-A . . . . .	0,20	—	100	—	—
	0,10	—	—	—	100
	0,05	—	—	—	100

(\*) Le cifre riportate indicano la percentuale di embrioni arrestati nello stadio indicato.

(\*\*) Le cifre riportate indicano gli embrioni che hanno superato la schiusa.

B) Per accertare se la progressiva diminuzione dell'effetto dello istone è dovuta ad una sensibilità differenziale nei diversi stadi di sviluppo, ovvero alla minore durata di azione della sostanza, gli embrioni sono stati messi in soluzione HL per 2 ore allo stadio di 2 blastomeri, blastula e gastrula. Si è stabilita per ogni stadio la concentrazione minima della sostanza necessaria per ottenere i primi effetti d'inibizione dello sviluppo. Questo tipo di esperimenti consente anche di accertare se vi sono anomalie specifiche corrispondenti al trattamento nei diversi stadi e cioè se vi sia una specificità dell'effetto.

Come risulta dalla fig. 1, a partire dallo stadio di blastula la concentrazione soglia aumenta: 0,025 mg/ml è efficiente per il periodo della segmentazione e blastulazione; mentre per la gastrula i primi effetti d'inibizione si hanno a partire da 0,2 mg/ml. Negli stadi più avanzati (neurula e embrione sgusciato) la concentrazione di 0,5 mg/ml è inefficace per 2 ore. Con 0,2 mg/ml è necessario un trattamento di 10 ore per ottenere i primi effetti d'inibizione.

Per quanto riguarda le anomalie, negli embrioni ottenuti da uova trattate alla segmentazione e allo stadio di blastula e che superano la gastrulazione, esse sono a carico di quasi tutti i sistemi e sono molto simili a quelle descritte precedentemente per il trattamento continuo.

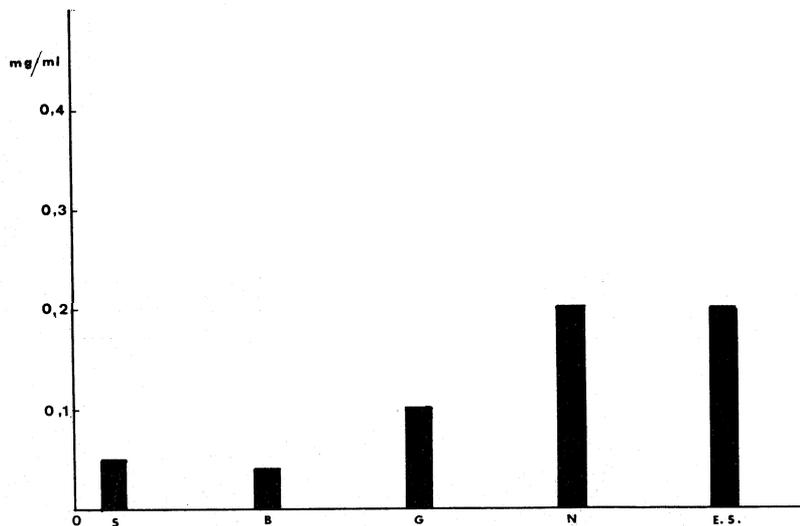


Fig. 1. - Concentrazione minima di HL necessaria per ottenere effetti di inibizione. Il trattamento è della durata di 2 ore per la segmentazione, blastula e gastrula; di 10 ore per la neurula e l'embrione sgusciato.

Negli embrioni ottenuti dal trattamento a gastrula, invece, le anomalie sono ridotte alla coda che è poco sviluppata. Lo studio istologico mette in evidenza una notevole ipotrofia delle masse muscolari ed anomalie della corda.

Negli embrioni ottenuti da neurule trattate, le anomalie sono quasi esclusivamente a carico della funzionalità della coda.

Questi esperimenti confermano che gli stadi più sensibili al trattamento con istoni sono quelli corrispondenti alla segmentazione e alla blastula. Le anomalie ottenute in questi stadi sono a carico di tutti i sistemi; anche per trattamenti brevi e a basse concentrazioni non è stato possibile evidenziare alcuna selettività nell'effetto degli istoni.

C) In alcuni esperimenti si è cercato di accertare se le anomalie ottenute siano effettivamente da imputarsi alla penetrazione dell'istone nell'uovo, oppure alla penetrazione dei suoi prodotti di depolimerizzazione. A tale scopo si sono trattate le uova con lisina, che è presente in alta percentuale nella molecola della frazione HL. In seguito al trattamento con questo amminoacido (0,2 mg/ml) non si ha alcuna anomalia.

Allo scopo di vedere se le anomalie del movimento fossero dovute ad inibizione del metabolismo respiratorio e della sintesi dell'ATP [3, 14], gli

embrioni sono stati pretrattati con ATP (4 mM) e quindi posti in istone (0,1 mg/ml) oppure trattati prima con istone e quindi passati in soluzione Holtfreter addizionata con ATP. In entrambi i casi non si sono avuti risultati diversi da quelli ottenuti per il trattamento con il solo istone.

#### CONCLUSIONI.

I risultati riferiti mostrano che il periodo più sensibile al trattamento con gli istoni è quello corrispondente alla segmentazione e alla blastula. Il trattamento a questo periodo causa arresto immediato dello sviluppo alle concentrazioni più alte (0,4-0,2 mg/ml); alle concentrazioni più basse (0,50-0,025 mg/ml) la segmentazione procede indisturbata e gli effetti si rivelano alla gastrulazione. Questi effetti differenziali, alle diverse concentrazioni, sono probabilmente in rapporto alla inibizione esercitata dagli istoni sulla RNA-polimerasi (a basse concentrazioni) e sulla DNA-polimerasi (ad alte concentrazioni) [7, 10-12]. L'inibizione della DNA-polimerasi causa blocco della sintesi del DNA, arresto delle mitosi e quindi blocco della segmentazione. Con dosi più basse è evidenziabile solo l'effetto sulla RNA-polimerasi DNA-dipendente, che causa blocco della sintesi dell'RNA nucleare e soprattutto della frazione messenger. Il fatto che il trattamento a queste concentrazioni causi blocco allo stadio di gastrula porta a ritenere che in questo stadio sono necessarie nuove molecole di RNA messenger e che esse sono sintetizzate in fasi precedenti dello sviluppo.

A partire dallo stadio di gastrula la sensibilità al trattamento decresce e gli effetti si ottengono solo ad alte concentrazioni.

Poiché il trattamento durante la segmentazione e la blastula, anche per tempi molto brevi e a basse concentrazioni, colpisce tutti i sistemi dell'embrione, si può dedurre che in questa fase dello sviluppo la maggior parte dei geni responsabili della morfogenesi sono attivi e che gli istoni esercitano su di essi una inibizione generalizzata. È interessante notare che gli stessi effetti sono riproducibili mediante la frazione HA (ma a concentrazioni più alte che HL) e con protamina.

È noto che la capacità della molecola del DNA a funzionare come « template » *in vitro* è fortemente ridotta dall'aggiunta di istone, in seguito alla ricostruzione del nucleoistone. Le frazioni più ricche in lisina sono inibitori più efficaci e questo sembra correlato alla maggiore affinità a combinarsi con la molecola del DNA [6, 8]. Nei nostri esperimenti la frazione ricca in lisina è risultata più efficace, meno quella più ricca in arginina.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] E. STEDMAN & E. STEDMAN, « Nature (London) », 166, 780 (1950).
- [2] I. LESLIE, « Nature (London) », 189, 260 (1961).
- [3] I. L. IRVIN, D. J. HOLBROOK, J. H. EVANS, H. C. McALLISTER & E. D. STILES, « Exptl. Cell. Res. », suppl. 9, 359 (1963).

- [4] V. G. ALLFREY, « Exptl. Cell Res. », suppl. 9, 183 (1963).  
[5] V. G. ALLFREY & A. E. MIRSKY, « Proc. Nat. Acad. Sci. », 48, 1590 (1962).  
[6] E. W. JOHNS & J.A.V. BUTLER, « Nature (London) », 204, 853 (1964).  
[7] R. C. HUANG & J. BONNER, « J. Mol. Biol. », 8, 54 (1964).  
[8] R. C. HUANG & J. BONNER, « Proc. Nat. Acad. Sci. », 48, 1216 (1962).  
[9] V. G. ALLFREY & A. E. MIRSKY, « Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. », 28, 247 (1963).  
[10] V. G. ALLFREY, V. C. LITTAU & A. E. MIRSKY, « Proc. Nat. Acad. Sci. », 49, 414 (1963).  
[11] L. R. GURLEY, I.L. IRVIN & D. J. HOLBROOK, « Biochem. Biophys. Res. Comm. », 14, 527 (1964).  
[12] G. C. BARR & J. A. BUTLER, « Nature (London) », 199, 1170 (1963).  
[13] P. PERSON & A. FINE, « Science », 132, 43 (1960).  
[14] B. S. MCEWEN, V. G. ALLFREY & A. E. MIRSKY, « J. Biol. Chem. », 238, 758 (1963).  
[15] D.P. BLOCH & H.Y. HEW, « J. Biophys. Biochem. Cytol. », 8, 69 (1960).  
[16] C. C. DAS, B. P. KAUFMANN & H. GAY, « J. Cell. Biol. », 23, 423 (1964).  
[17] E. C. HORN, « Proc. Nat. Acad. Sci. », 48, 257 (1962).  
[18] D. C. MOORE, « Proc. Nat. Acad. Sci. », 50, 1018 (1963).  
[19] D.P. BLOCH, « J. Histochem. Cytochem. », 10, 137 (1962).  
[20] S. BÄCKSTRÖM, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », 8, 20 (1965).  
[21] P. TALEPOROS, « J. Histochem. Cytochem. », 7, 322 (1959).  
[22] C. L. MARKERT & E. H. URSPRUNG, « Develop. Biol. », 7, 560 (1963).  
[23] J. BRACHET, « Nature (London) », 204, 1218 (1964).  
[24] E. W. JOHNS & A. V. BUTLER, « Biochem. J. », 82, 15 (1962).

SUMMARY. — Eggs of Anurans (*Discoglossus pictus*) were treated with lysine-rich (HL) and arginine-rich (HA) fractions of calf thymus histones.

The eggs treated with 0,4-0,1 mg/ml of HL fraction at the two cell stage were blocked in their cleavage. At lower concentrations (0,05-0,025 mg/ml) the development stops at the gastrula stage.

After the gastrula stage the sensibility to the treatment decreases.

The HA fraction has the same effect but at higher concentrations.