
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIOVANNI GIUDICE, VINCENZO MUTOLO

**Importanza delle interazioni cellulari nel controllo
della sintesi dell'RNA durante lo sviluppo embrionale**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.2, p. 252–258.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_2_252_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/>

Citologia. — *Importanza delle interazioni cellulari nel controllo della sintesi dell'RNA durante lo sviluppo embrionale* (*). Nota di GIOVANNI GIUDICE e VINCENZO MUTOLO, presentata (**) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — The synthesis of ribosomal RNA is initiated in aggregating cells dissociated from mid gastrulae at the same time as in control embryos.

On the other hand aggregates of cells dissociated from a younger stage (mesenchyme — blastula) fail to undergo the synthesis of ribosomal RNA when control embryos do.

The conclusion is drawn that some time between the blastula and the gastrula stage the cells become « committed » for the synthesis of ribosomal RNA.

INTRODUZIONE.

È stato dimostrato (Giudice, 1962) che è possibile dissociare in singole cellule embrioni di riccio di mare dallo stadio di blastula fino a quello di giovane pluteo. Poste in opportune condizioni di coltura in acqua di mare, queste cellule isolate si aggregano a formare dapprima degli ammassi solidi che poi divengono organizzati e si differenziano in strutture simili a blastule. Queste acquistano in seguito un intestino, uno scheletro, cellule pigmentate, ed infine danno origine a larve simili a plutei.

Il fenomeno della aggregazione cellulare e della morfogenesi negli aggregati di cellule di embrioni di riccio di mare è fondamentalmente paragonabile alla aggregazione e ricostruzione di tessuti da parte di cellule dissociate di embrioni di vertebrati (Moscona, 1965) e di spugne (Moscona, 1963; Humphreys, 1963). Esso è particolarmente utile per l'analisi dei meccanismi di controllo del differenziamento nei sistemi multicellulari.

È stato osservato (Giudice, 1962) che lo sviluppo morfogenetico degli aggregati di cellule di embrioni di riccio di mare è ritardato di diverse ore rispetto agli embrioni di controllo. Le cellule dissociate da gastrule non si riaggregano a formare direttamente gastrule. Esse sembrano ricapitolare gli stadi più precoci dello sviluppo, formando prima ammassi solidi (in un certo senso paragonabili alle morule) quindi blastule, prima di acquisire un intestino e di assumere dunque una morfologia simile a quella delle gastrule.

Se si assume che lo sviluppo implichi una trascrizione genetica ordinata nel tempo, è interessante indagare se l'ordine di questa trascrizione viene alterato dal ritardo dello sviluppo che si ha in seguito al processo di dissociazione e riaggregazione.

(*) Lavoro eseguito presso l'Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Palermo e l'Unità di Embriologia Molecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(**) Nella seduta dell'11 febbraio 1967.

Una opportunità di attacco sperimentale al problema viene fornita dalla osservazione che la comparsa nel citoplasma di RNA ribosomiale (rRNA) di nuova sintesi aumenta in maniera significativa dopo lo stadio di gastrula media (Giudice e Mutolo, 1967). Questo aumento fornisce una spia dell'attività genetica di questo particolare stadio di sviluppo.

Si può allora porre la domanda se l'inizio della sintesi di rRNA ⁽¹⁾ sia condizionato da una corretta interazione cellulare o se esso possa aver luogo ugualmente, indipendentemente da una organizzazione multicellulare. Per rispondere a questa domanda si sono dissociati in singole cellule embrioni allo stadio di gastrula media o più giovani; si sono lasciate riaggregare le cellule e si è studiata la sintesi dell'rRNA al momento in cui questa aveva inizio nei corrispondenti embrioni di controllo.

I risultati qui riportati indicano che cellule dissociate da gastrule medie, cioè poco prima che gli embrioni diano inizio alla sintesi dell'rRNA, iniziano tale sintesi allo stesso momento degli embrioni di controllo, mentre stanno aggregandosi, nonostante si trovino ancora nella fase di aggregati solidi amorfi. Se invece le cellule sono state dissociate da uno stadio molto più giovane, esse durante l'aggregazione non sono capaci di iniziare la sintesi dell'rRNA al momento in cui gli embrioni di controllo arrivano allo stadio di gastrula media.

MATERIALI E METODI.

Culture degli embrioni:

Sono state condotte in acqua di mare filtrata contenente antibiotici e sulfamidico, come precedentemente descritto (Giudice e Mutolo, 1967). La concentrazione degli embrioni era di 4000/cc, corrispondenti a circa 0,3 mg di proteina/cc, determinati secondo la tecnica di Lowry et al. (1962).

Disaggregazione e riaggregazione cellulare:

È stata effettuata secondo la tecnica già descritta (Giudice, 1962) basata sull'uso di una soluzione contenente saccarosio 0,44 M in tampone citrato-tris 0,05 M pH 8,1 contenente etilendiaminotetracetato 10^{-3} M. La disaggregazione viene operata trattando gentilmente gli embrioni sospesi in tale soluzione con un omogenizzatore di tipo Potter. La riaggregazione veniva operata in acqua di mare con antibiotici e sulfamidico, mantenuta in agitazione da un'elica rotante. La concentrazione delle cellule era di 0,3 mg di proteine/cc.

Marcatura con isotopi:

È stato aggiunto del P³² (20-40 c/mg P, Amersham) alla concentrazione finale di 0,5 µc/cc a sospensioni di embrioni o di cellule risospesi in acqua di mare fresca con nuovo antibiotico, poco prima dell'inizio della marcatura.

(1) Questa espressione « inizio della sintesi dell'rRNA » viene usata per brevità nel senso di notevole aumento della sintesi dell'rRNA estraibile dal citoplasma.

Alla fine del periodo di marcatura gli embrioni o le cellule venivano raccolti per centrifugazione.

Estrazione dell'RNA:

Si è impiegato il procedimento già descritto (Giudice e Mutolo, 1967).

In breve, sono stati usati due metodi:

Metodo I (per la determinazione della attività specifica dell'RNA « totale »):

Estrazione con dodecilsolfato di sodio e fenolo caldo, dopo omogenizzazione in tampone succinato 0,01 M pH 6,0, contenente bentonite 0,1 % finale ed acetato di magnesio 10^{-3} M. Precipitazione con etanolo-NaCl; trattamento con desossiribonucleasi e dialisi contro lo stesso tampone.

Metodo II (per l'analisi dell'rRNA):

Estrazione con fenolo freddo, dopo omogenizzazione con tampone come nel metodo I. La bentonite veniva aggiunta solo insieme al fenolo. Le tappe successive erano le medesime del metodo I.

Gradienti di saccarosio:

Secondo quanto descritto in precedenza (Giudice e Mutolo, 1967), l'RNA estratto col metodo II veniva stratificato su 25 cc di un gradiente lineare 5-20 % di saccarosio in tampone. Dopo 12 h di centrifugazione a 25.000 giri/minuto nel rotore SW 25 della ultracentrifuga Spinco modello L, si raccoglievano campioni da 1 cc per la misurazione della densità ottica a 260 m μ e della radioattività.

Misurazione della radioattività:

Aliquote di RNA ottenute col metodo I sono state essiccate su dischetti di carta da filtro e lavate in acido tricoloraocetico, etanolo-etere, ed etere secondo la tecnica di Bollum (1959), per allontanare il materiale a basso peso molecolare. I dischetti venivano quindi contati in un sistema di scintillazione liquida a base di toluene-PPO-POPOP in un contatore Nuclear Chicago, con una efficienza del 100 %. I campioni raccolti dai gradienti di saccarosio sono stati essiccati su carta da filtro e contati come tali senza alcun lavaggio.

RISULTATI E DISCUSSIONI.

Cellule isolate da embrioni allo stadio di gastrula media sono state rissese in acqua di mare con P^{32} e lasciate riaggregare. Allo stesso tempo l'isotopo è stato aggiunto agli embrioni di controllo, provenienti dallo stesso lotto di uova. Dopo 5 h gli aggregati hanno raggiunto lo stadio di ammassi solidi, mentre gli embrioni di controllo si sono sviluppati fino a prisma. Vi era dunque una notevole discrepanza tra lo stato di organizzazione morfologica degli aggregati e degli embrioni di controllo. Allo scadere della quinta ora di marcatura si è estratto l'RNA col metodo II sia dagli aggregati che dagli

embrioni e lo si è analizzato per gradiente di saccarosio. Come si vede nella fig. 1, vi è una notevole incorporazione di P^{32} in tutti e due casi nell'RNA ribosomiale. Che vi sia sintesi di rRNA è suggerito in particolare dagli alti livelli di radioattività raggiunti dal picco 28 S (Giudice e Mutolo, 1967). La distribuzione della radioattività è molto simile per cellule ed embrioni attraverso tutto il gradiente.

Questi dati dimostrano che, sebbene le cellule della gastrula media siano state rimosse dalla loro normale posizione nell'embrione, esse hanno tuttavia

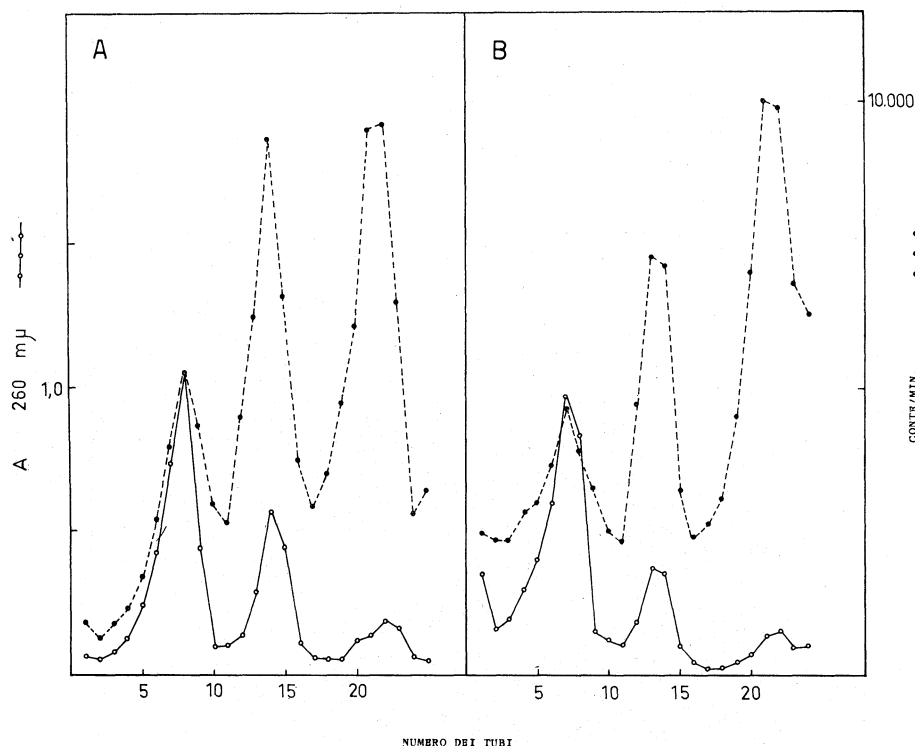


Fig. 1. - Profili di densità ottica (linea unita) e di radioattività (linea tratteggiata) di RNA analizzato per gradiente di saccarosio da embrioni A e da aggregati di cellule isolate da gastrule medie (B).

Sulle ascisse il numero dei tubi; sulle ordinate a sinistra la densità ottica ed a destra la radioattività in conte/minuto. Le condizioni di marcatura sono descritte nel testo.

realizzato il tipo di sintesi di rRNA caratteristico degli embrioni interi a quello stadio. Si è allora passati ad esaminare la questione se in cellule dissociate da embrioni più giovani l'inizio della sintesi dell'rRNA abbia ugualmente luogo allo stesso momento che negli embrioni di controllo.

A tal scopo si sono dissociate le cellule dallo stadio di blastula con mesenchima, cioè molto prima del caratteristico inizio della sintesi dell'rRNA e le si sono lasciate riaggregare come descritto. Al momento in cui i corrispondenti embrioni di controllo raggiungevano lo stadio di gastrula si è saggiata la sintesi

dell'rRNA, come già descritto, sia negli aggregati che negli embrioni. La fig. 2 dimostra che, mentre negli embrioni si ha la stessa marcatura dell'rRNA, questa volta gli aggregati non hanno accumulato che scarsa radioattività nell'rRNA, in particolare nel picco 28 S. Essi non sono stati dunque capaci di iniziare la sintesi dell'rRNA allo stesso tempo dei controlli.

Deve essere qui notato che il profilo della distribuzione della radioattività per il gradiente di saccarosio in molti esperimenti è risultato simile e riproducibile in embrioni e cellule aggregate provenienti da gastrule medie.

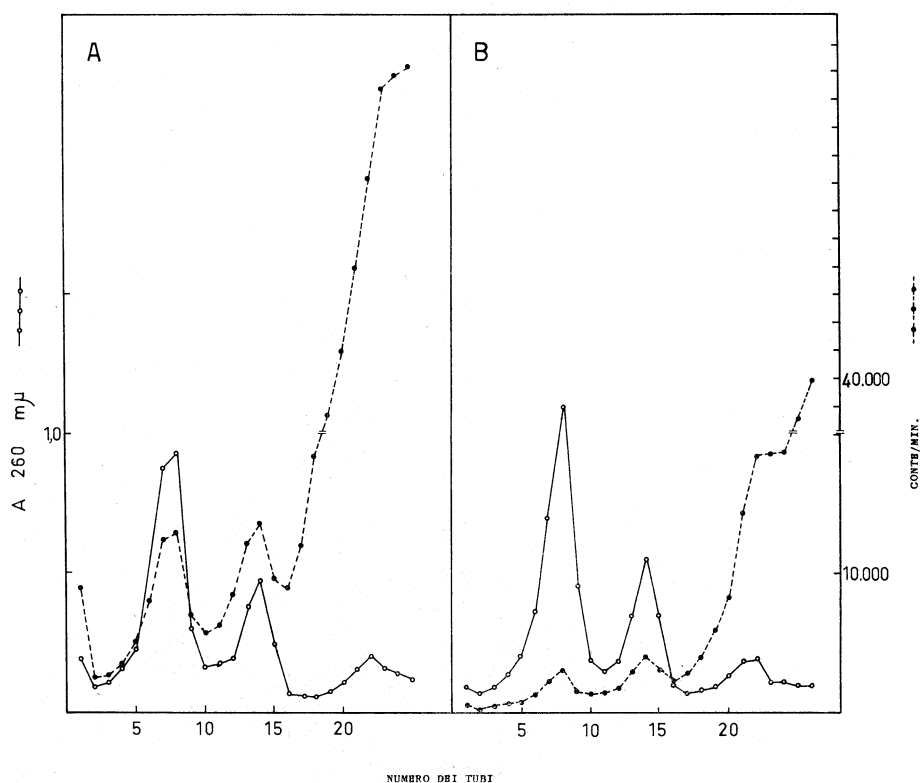


Fig. 2. - Come nella fig. 1. Gli aggregati (B) derivano da cellule isolate allo stadio di blastula con mesenchima.

Tuttavia, l'attività specifica di tutto l'RNA di questi aggregati è stata spesso più bassa di quella degli embrioni. Questa attività specifica più bassa potrebbe, in linea di principio, essere dovuta o ad una minore sintesi di rRNA negli aggregati rispetto agli embrioni oppure ad un qualche danno cellulare causato dal processo di disaggregazione e riaggregazione, che abbia ridotto la incorporazione di precursori in tutto l'RNA cellulare. In questo secondo caso ci dovremmo aspettare di trovare in esperimenti di marcatura un'attività specifica più bassa in tutte le classi di RNA estratto dagli aggregati. I risultati di un controllo di tale ipotesi sono riportati nella Tabella I. Vi si mostrano

alcuni esperimenti, scelti da una serie, in cui il picco 28 S dell'RNA degli aggregati di cellule di gastrule medie ha raggiunto, in seguito ad esperimenti di marcatura di 5 h, una attività specifica minore di quella degli embrioni corrispondenti. In questi casi si è raggiunta una attività specifica corrispondentemente più bassa anche nelle altre classi di RNA degli aggregati. Dunque la percentuale di incorporazione nel picco 28 S rispetto alla incorporazione nell'RNA « totale » è stata praticamente la stessa per aggregati e per embrioni. Ciò suggerisce ancora che gli aggregati sono andati anche essi incontro all'aumento della sintesi dell'rRNA relativo alla sintesi di altre classi di RNA, descritto come caratteristico di questo stadio (Giudice e Mutolo, 1967).

TABELLA I.

Attività specifica di varie classi di RNA dopo 5 h di marcatura con P³².

EMBRIONI (da gastrula media a prisma)				AGGREGATI (di cellule da gastrula media)			
RNA « totale »	28 S	18 S	4 S	RNA « totale »	28 S	18 S	4 S
Esper. 3 - 1.292.040	7.050 (0,50)	22.000 (1,57)	487.500 (34,99)	492.700	3.597 (0,73)	15.595 (3,10)	161.764 (32,83)
Esper. 5 - 1.701.000	10.638 (0,62)	27.160 (1,59)	400.000 (23,51)	804.729	5.026 (0,62)	13.154 (1,63)	178.125 (22,13)
Esper. 6 - 936.000	5.118 (0,54)	18.265 (1,95)	267.346 (28,56)	410.150	2.170 (0,52)	6.300 (1,53)	129.800 (31,64)

L'attività specifica è espressa in conte/minuto/mg di RNA.

Le figure in parentesi esprimono i risultati come percentuale dell'attività specifica dell'RNA totale.

Il termine RNA « totale » è usato nel senso descritto nell'introduzione.

CONCLUSIONI.

I risultati esposti costituiscono una ragionevole prova del fatto che le cellule isolate dalla gastrula media sono capaci di iniziare la sintesi dell'rRNA, nel senso che abbiamo dato all'inizio a questa frase, malgrado esse non siano più nel loro corretto rapporto intercellulare. Ciò però non significa che una corretta interazione cellulare non sia rilevante ai fini del succedersi ordinato di eventi metabolici legati allo sviluppo, quale quello della trascrizione dell'rRNA. Se le cellule infatti vengono isolate da uno stadio meno avanzato, esse si dimostrano incapaci di andare incontro alla sintesi dell'rRNA al tempo stesso degli embrioni. Sembra dunque ragionevole concludere che in qualche momento tra la blastula con mesenchima e la gastrula media, in dipendenza da normali interazioni cellulari, le cellule divengono « determinate » o « programmate » per la sintesi dell'rRNA. Dopo questo momento, ma non prima,

esse possono intraprendere tale sintesi anche al di fuori della struttura ordinata dell'organismo. La natura delle interazioni cellulari e dei cambiamenti intracellulari responsabili di una tale «programmazione» è del tutto sconosciuta. Né la teoria esposta pretende di essere l'unica valida a spiegare i risultati ottenuti. Essa è tuttavia quella che più si avvicina alle correnti teorie sulla trascrizione di messaggeri stabili dal DNA nei sistemi embrionali ed in particolare nel riccio di mare (Gross et al., 1964) ed è in accordo anche con i risultati di esperimenti sull'effetto della disaggregazione su altre variazioni metaboliche legate allo sviluppo (Giudice e Pfohl, 1967).

BIBLIOGRAFIA.

- [1] F. J. BOLLUM, « J. Biol. Chem. », 234, 2733 (1959).
- [2] G. GIUDICE, « Develop. Biol. », 5, 402 (1962).
- [3] G. GIUDICE e V. MUTOLO, « Rend. Accad. Naz. Lincei », ser. VIII, vol. XLII, fasc. 3 (1967).
- [4] G. GIUDICE e R. PFOHL, vedi questi « Rendiconti », pp. 259-263 (1967).
- [5] P. R. GROSS, L. I. MALKIN e W. A. MOYER, « Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. », 51, 407 (1964).
- [6] T. HUMPHREYS, « Develop. Biol. », 8, 27 (1963).
- [7] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, L. A. FARR e R. J. RANDALL, « J. Biol. Chem. », 193, 265 (1952).
- [8] A. A. MOSCONA, *Chapter 14 in Cells and Tissues in Culture*, pp. 489-524; edited by E. N. Willmer, Academic Press, London and New York, 1965.
- [9] A. A. MOSCONA, « Proc. Natl. Acad. Sci., U.S. », 49, 742 (1963).
- [10] A. A. MOSCONA (dati non pubblicati).