

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

GIOVANNI GIUDICE, RONALD J. PFHOL

## Importanza delle interazioni cellulari nel controllo dell'attività enzimatica 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. 259–263.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1967\\_8\\_42\\_2\\_259\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_2_259_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 dell'attività enzimatica durante lo sviluppo embrionale*<sup>(\*)</sup>. Nota di GIOVANNI GIUDICE e RONALD J. PFHOL, presentata<sup>(\*\*)</sup> dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — The alkaline phosphatase activity of extracts of *Arbacia punctulata* embryos undergoes a marked increase after the early pluteus stage.

Reaggregating cells dissociated from embryos shortly before the early pluteus stages underwent the same increase in enzymatic activity at the same time as the controls. On the other hand if the cells had been dissociated at a much younger stage, they failed to undergo the above increase at the time of the controls.

#### INTRODUZIONE.

È stata sottolineata in un precedente lavoro (Giudice et al., 1967) l'importanza della morfogenesi nello stabilirsi di nuovi schemi metabolici durante il differenziamento, con uno studio sulla sintesi dell'RNA ribosomiale (rRNA) in cellule dissociate da embrioni di riccio di mare.

Nel citoplasma delle cellule di questi embrioni compare infatti nuovo rRNA soltanto dopo lo stadio di gastrula media. In aggregati di cellule dissociate da embrioni poco prima dello stadio di gastrula media, la sintesi dell'rRNA inizia allo stesso tempo che negli embrioni di controllo. Se però gli aggregati sono costituiti da cellule dissociate da uno stadio più giovane (blastula), non si ha il descritto inizio della sintesi dell'rRNA al momento in cui esso ha luogo negli embrioni di controllo.

Da questi esperimenti fu tratta la conclusione che in qualche momento tra gli stadi di blastula e gastrula le cellule divengono « programmate » per la sintesi dell'rRNA. Da quel momento in poi, ma non prima, l'attivazione della sintesi dell'rRNA può aver luogo indipendentemente dal normale contatto intercellulare e dalla normale morfogenesi.

In un lavoro precedente (Pfohl, 1965) è stato descritto un aumento dell'attività dell'enzima fosfatasi alcalina durante lo sviluppo embrionale del riccio di mare *Arbacia punctulata*. Ciò ha fornito lo spunto alle ricerche riportate nella presente Nota. Si è cercato infatti di accertare se anche per l'aumento di questa attività enzimatica fosse possibile identificare nel corso dello sviluppo embrionale un periodo di « programmazione » analogamente a quanto descritto per l'aumento della sintesi dell'rRNA.

(\*) Lavoro eseguito presso il Marine Biological Laboratory di Woods Hole, Massachusetts U.S.A.

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

## MATERIALI E METODI.

Si sono fatti sviluppare embrioni di *Arbacia punctulata* alla concentrazione di 4.000/cc di acqua di mare in presenza di 100 U.I. di penicillina, 0,05 mg di streptomina e 0,05 mg di sulfadiazina, per cc, a 18°C.

*Dissociazione e riaggregazione cellulare.*

La dissociazione cellulare è stata operata come già descritto (Giudice 1962). La riaggregazione è stata condotta lasciando le cellule sospese in acqua di mare alla concentrazione di  $2 \times 10^6$  cellule/cc, senza agitazione in vassoi di vetro coperti, di 25 cm di diametro, a 18°C. Le cellule così sospese si raccolgono per gravità sul fondo del recipiente, dove si riaggregano come descritto (Giudice, 1965). Di solito non si sono usati antibiotici e sulfamidici, eccetto che in una serie di esperimenti, che ha dato risultati comparabili a quelli riportati.

*Estrazione dell'enzima e saggio dell'attività enzimatica.*

Circa 0,5 cc di embrioni sedimentati per centrifugazione venivano omogenati in 2 cc di tampone Tris pH 7,5 a 2°C., con un omogenizzatore di tipo Potter. Si aggiungevano quindi 1,5 cc di *n*-butanolo e si continuava l'omogenizzazione per altri 4 minuti, a 40°C.

La fase acquosa ottenuta per centrifugazione a  $10.000 \times g$  per 15 minuti veniva dializzata a lungo contro tampone Tris 0,14M pH 7,5 a 2°C. Il dializzato veniva chiarificato da eventuali impurezze per centrifugazione a  $105.000 \times g$  per 30 minuti. Aliquote di 0,2 ml venivano usate per la determinazione delle proteine (secondo la tecnica di Lowry et al., 1952) e per il saggio della attività enzimatica. Quest'ultimo veniva condotto incubando a 37°C 0,2 cc dell'estratto con 1 cc di Tris 1 M pH 9,4 contenente acetato di magnesio 0,01 M finale ed 1 mg di *p*-nitrofenilfosfato (substrato per la fosfatasi, Sigma 104). Dopo 10-45 minuti di incubazione la reazione veniva interrotta aggiungendo 0,2 cc di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 N. Si elevava il pH con 3 cc di NaOH 1 N per consentire lo sviluppo del colore giallo dovuto al nitrofenolo liberato. Si determinava quindi l'assorbimento alla lunghezza d'onda di 410 m $\mu$  con uno spettrofotometro Zeiss PM Q II.

## RISULTATI E DISCUSSIONE.

*Esperimenti di controllo.*

1) L'estraibilità in butanolo delle proteine di questi embrioni non varia significativamente durante lo sviluppo. Questo tipo di estrazione riesce inoltre a trasferire nella fase acquosa pressoché tutto l'enzima dosabile (Pfohl, 1965). Inoltre la quantità di proteine totali per embrione non varia apprezzabilmente durante lo sviluppo almeno del riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Giudice e Vittorelli, dati non pubblicati). Per conseguenza, l'attività

della fosfatasi alcalina negli estratti in butanolo (riferita a milligrammi di proteine dello stesso estratto) può verosimilmente essere presa come una misura relativa della attività totale per embrione.

2) La reazione procede linearmente per almeno 1 h a 37° C. I valori dell'attività enzimatica sono stati pertanto calcolati come  $\mu$ mole di nitrofenolo liberate per ora per milligrammo di proteine dell'estratto dializzato. Da una serie di 10 esperimenti si è calcolato che questo valore è di 0,30 per lo stadio di blastula (12 h dopo la fecondazione).

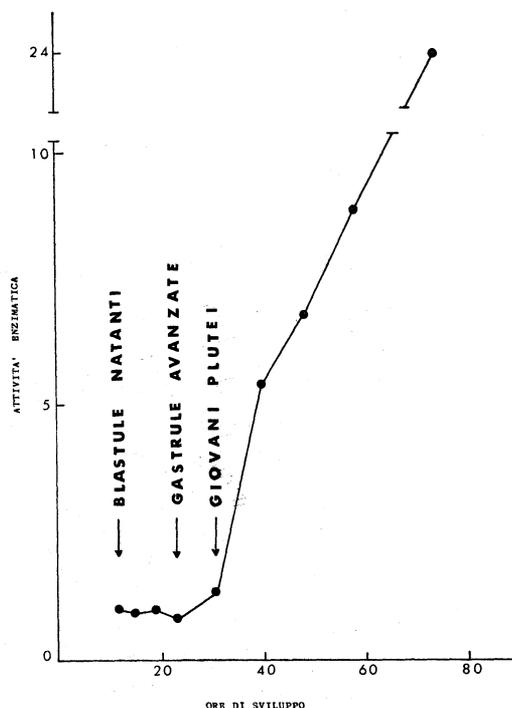


Fig. 1. — Attività della fosfatasi alcalina durante lo sviluppo. I valori, che risultano dalla media di 9 esperimenti, sono stati normalizzati, assumendo come 1,0 il valore della blastula con mesenchima.

La fig. 1 riporta i valori della attività della fosfatasi alcalina a vari stadi di sviluppo. Non si osservano variazioni di rilievo dallo stadio di blastula natante fino a quello di giovane pluteo. A questo punto ha luogo un notevole e brusco aumento dell'attività enzimatica, che a 40 h dalla fecondazione è di 5,4 volte quella della blastula. L'attività dell'enzima continua ad aumentare per almeno altre 40 ore.

#### *Esperimenti di riaggregazione.*

In una serie di 5 esperimenti si sono dissociate le cellule da embrioni allo stadio di blastula con mesenchima o di giovane pluteo, corrispondenti rispettivamente a parecchie ore prima, o immediatamente prima che l'au-

mento della fosfatasi alcalina avesse luogo negli embrioni di controllo. Si lasciavano quindi riaggregare le cellule come descritto. A vario tempo dall'inizio della aggregazione si è determinata l'attività della fosfatasi alcalina negli aggregati in formazione e negli embrioni di controllo.

Come si vede nella fig. 2, l'attività degli aggregati provenienti da cellule dissociate allo stadio di giovane pluteo va incontro ad un notevole aumento allo stesso tempo che nei controlli e ciò nonostante il fatto che a 40 ore (10 ore

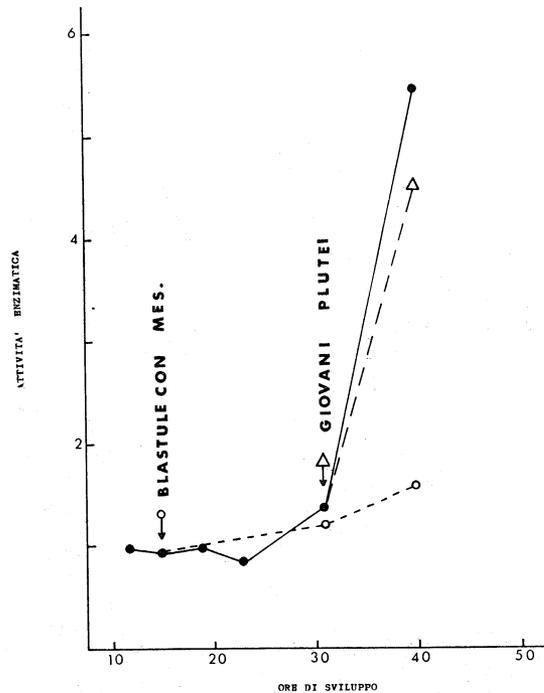


Fig. 2. - Sono riportati nello stesso diagramma i valori dell'attività della fosfatasi alcalina delle cellule in aggregazione, derivati dalla media di 5 esperimenti, insieme a quelli degli embrioni di controllo. Si è adottato lo stesso criterio di normalizzazione della figura 1.

●—● = Embrioni di controllo.      ○—○ = Cellule dissociate da blastule con mesenchima.  
 △—△ = Cellule dissociate da giovani plutei.      Le frecce indicano il momento della dissociazione.

dall'inizio della riaggregazione) gli aggregati avessero ancora l'aspetto di ammassi cellulari amorfi.

D'altro canto però, se le cellule erano state dissociate dallo stadio di blastula con mesenchima, gli aggregati mostravano a 40 ore solo un aumento molto modesto dell'attività fosfatasi. In quel momento (25 ore dall'inizio della riaggregazione) questi ultimi aggregati avevano un aspetto simile a quello delle blastule natanti, talora con intestino. A 75 ore (60 ore dopo l'inizio della riaggregazione) essi davano origine a larve simili a plutei. A questo punto l'attività della loro fosfatasi alcalina era salita di 4,2 volte quella delle blastule con mesenchima.

In un esperimento si sono dissociate le cellule di gastrule avanzate (24 h dopo la fecondazione) e le si sono lasciate riaggregare come descritto. L'aumento della fosfatasi alcalina degli aggregati fu in questo caso piuttosto vicino a quello delle cellule dissociate dallo stadio di giovane pluteo. Si raggiunse infatti un valore di 3,6 a 40 h (16 ore dall'inizio della riaggregazione).

#### CONCLUSIONI.

Questi risultati suggeriscono che in qualche momento tra gli stadi di blastula con mesenchima e giovane pluteo abbia luogo una « programmazione » per l'aumento della attività della fosfatasi alcalina. Una volta che le cellule sono « programmate », la distruzione della normale organizzazione dell'embrione non ha influenza sulle variazioni dell'attività enzimatica. Ciò è in accordo con quanto illustrato in precedenza per l'aumento della sintesi dell'RNA ribosomiale. Anche qui, come dicemmo a proposito dell'rRNA, questa ipotesi non pretende di essere l'unica a spiegare i risultati ottenuti.

È interessante notare come, nel caso delle cellule dissociate da blastule con mesenchima, al momento della ricostruzione della normale morfologia si accompagni la ricomparsa di una normale attività enzimatica. Ciò indica che le cellule dissociate prima di una certa « programmazione » non perdono la capacità di realizzare quel particolare aspetto del differenziamento metabolico. Questo piuttosto sembra subire un arresto momentaneo seguito da un recupero quando siano state ristabilite un'altra volta le normali interazioni cellulari.

#### BIBLIOGRAFIA.

- G. GIUDICE, « *Develop. Biol.* », 5, 496 (1962).  
G. GIUDICE, « *Develop. Biol.* », 12, 233 (1965).  
G. GIUDICE e V. MUTOLO, vedi questi « *Rendiconti* », pp. 252-258 (1967).  
O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, L. A. FARR e R. J. RANDALL, « *J. Biol. Chem.* », 193, 265 (1952).