
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIOVANNI GIUDICE, VINCENZO MUTOLO

**Sintesi dell'RNA ribosomiale durante lo sviluppo del
riccio di mare**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.3, p. 415–425.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_3_415_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. — *Sintesi dell'RNA ribosomiale durante lo sviluppo del riccio di mare*^(*). Nota di GIOVANNI GIUDICE e VINCENZO MUTOLO, presentata^(**) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — The synthesis of ribosomal RNA, which can be recovered from the cytoplasm, starts at the stage of mid gastrula.

The suggestion is made of the synthesis of a precursor of the cytoplasmic ribosomal RNA.

A discussion about the extractive methods is presented. It is shown that the 18 s peak contains some DNA-like RNA.

INTRODUZIONE.

Le ricerche qui riportate fanno parte di uno studio sulla formazione dei ribosomi durante lo sviluppo. È apparso importante ai fini di una tale indagine stabilire con esattezza il momento dell'inizio della sintesi dell'RNA ribosomiale (rRNA) durante le prime fasi dello sviluppo.

Esistono in proposito già dei dati nella letteratura (Nemer, 1963; Gross et al., 1965), che indicano che la sintesi dell'rRNA ha inizio negli embrioni di riccio di mare qualche tempo dopo la gastrulazione. Altri dati però pongono in dubbio una tale affermazione (Comb et al., 1965).

MATERIALI E METODI.

Coltura degli embrioni:

Si sono raccolte le uova da *Paracentrotus lividus* agitando in acqua di mare le ovaie. Dopo ripetuti lavaggi con acqua di mare, le uova sono state fecondate, lavate ancora due volte e sospese alla concentrazione di 3.700/cc in acqua di mare filtrata, contenente 100 UI di penicillina, 0,05 mg di streptomicina e 0,05 mg di 3-sulfonamide-6-metossipiridazina, per cc. Le uova si sono lasciate sviluppare in rotazione a 20°C.

Marcatura con isotopi:

Ai tempi scelti gli embrioni si sono sedimentati per centrifugazione, e risospesi in acqua di mare contenente antibiotici e sulfamidico nella quantità già indicata. Si aggiungevano a questo punto 0,5 µc/cc di uridina- $H^3(U)$ (1,2 c/mme) o di P^{32} (30-60 c/mg) (Radiochemical Centre, Amersham, England).

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

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

Alla fine della incubazione gli embrioni venivano sedimentati per centrifugazione ed usati subito per il frazionamento cellulare, o congelati.

Frazionamento cellulare:

Alcuni campioni sono stati omogenati in tampone Tris 0,01 M pH 7,4 contenente desossicolato di sodio 0,3 % ed etilendiaminotetracetato (EDTA) 10^{-3} M. Si centrifugava quindi a $700 \times g$ per 10 minuti. Il supernatante veniva centrifugato a $105.000 \times g$ per 60 minuti. La superficie del sedimento si lavava con tampone succinato 0,01 M pH 6, contenente acetato di magnesio 10^{-3} M (SM). Il sedimento così ottenuto viene considerato sedimento ribosomiale.

Preparazione dell'RNA.

a) *Estrazione dell'RNA « totale »:* Il materiale congelato proveniente da 10 ml di sospensione di embrioni veniva sospeso in 1 ml di SM contenente dodecilsolfato di sodio (SDS) 1 % e bentonite 0,1 %. Si agitava per 10 minuti con un volume di fenolo 85 % a 60° C. Alla fase acquosa ottenuta per centrifugazione si aggiungeva NaCl 0,1 M finale e due volumi di etanolo a 20° C. Il precipitato veniva risospeso in SM e trattato con 10 µg di desossiribonucleasi (Worthington, purificata elettroforeticamente), per 10 minuti a temperatura ambiente. Si prelevano campioni per la determinazione dell'RNA (col metodo dell'orcinolo) e per la determinazione della radioattività. Questi ultimi venivano essiccati in dischetti di carta da filtro, estratti con acido tricloroacetico freddo, etanolo ed etere, secondo la tecnica di Bollum (1959), e contati in liquido scintillatore toluene-PPO-POPOP - (Nuclear Chicago).

b) *Estrazione col metodo SDS fenolo caldo, per l'analisi su gradiente di saccarosio:* Il materiale proveniente da 150 cc. di sospensione di embrioni veniva omogenato in 5 ml di SM contenente SDS 1 % e bentonite 0,1 %.

Si aggiungeva un volume di fenolo 85 % e si estraeva a 60° C per 5 minuti. Dopo centrifugazione si scartava la fase fenolica e si estraeva tutto il rimanente ancora due volte con fenolo. L'ultima centrifugazione era condotta a $10.000 \times g$ per allontanare la bentonite.

L'RNA, precipitato con NaCl-etanolo, veniva trattato con desossiribonucleasi (20 µg/cc), come descritto. Dopo precipitazione, l'RNA veniva dializzato contro SM prima di essere analizzato per gradiente di saccarosio.

c) *Estrazione col metodo del fenolo freddo, per l'analisi su gradiente di saccarosio:* Embrioni provenienti da 150 cc di sospensione venivano omogenati con 5 cc di SM freddo. L'omogenato veniva sbattuto per 5 minuti con un volume di fenolo 85 % a freddo in presenza di bentonite 0,1 %. La fase acquosa veniva estratta ancora due volte con fenolo. Le operazioni successive venivano condotte come in b).

In alcuni esperimenti il « sedimento ribosomiale » derivante da 250 cc di sospensione di embrioni veniva estratto come qui descritto.

Analisi per gradiente di saccarosio:

Si stratificavano 0,25 mg di RNA in SM, su di un gradiente lineare di saccarosio 5–20% in SM. Si centrifugava a 25.000 giri/minuto per 12 h nel rotore SW 25 della ultracentrifuga Spinco modello L. Alla fine della centrifugazione il materiale veniva raccolto goccia a goccia in campioni da 1 cc attraverso un buco praticato sul fondo del tubo da centrifuga. Si analizzava la densità ottica a 260 m μ e la radioattività di ogni frazione. Quest'ultima veniva misurata contando direttamente in liquido scintillatore campioni da 0,1 cc essiccati su carta da filtro.

Analisi della composizione nucleotidica percentuale:

Campioni scelti dal gradiente di saccarosio venivano precipitati con etanolo NaCl in presenza di un RNA « carrier » di riccio di mare, non marcato. Dopo idrolisi con KOH 0,3M a 38°C per 20 ore, i campioni venivano neutralizzati con Dowex 50 in forma H⁺ e chiarificati per centrifugazione. I nucleotidi venivano separati per elettroforesi su acetato di cellulosa (Sephadex III). Si otteneva una buona risoluzione dopo 70 minuti a 400 V, in tampone citrato 0,02M a pH 3,45. Le strisce di carta venivano tagliate sotto luce ultravioletta, per individuare la posizione dei singoli nucleotidi. Ogni frammento veniva quindi essiccato e immerso in liquido scintillatore per la misurazione della radioattività.

Misurazione della radioattività:

È stato usato un contatore a scintillazione tipo « Nuclear Chicago ». Si sono ottenute efficienze del 100% con il P³² e del 5% con l'H³.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

È noto che metodi che impiegano l'SDS ed il fenolo caldo consentono una estrazione praticamente totale dell'RNA, incluso l'RNA messaggero (mRNA). D'altra parte il metodo del fenolo a freddo senza SDS, non estrae l'RNA nucleare. Il materiale estratto consiste fondamentalmente di rRNA ed sRNA (RNA di trasferimento), insieme a piccole quantità di mRNA (Sibatani et al., 1962; Georgiev et al., 1962; Nemer et al., 1965; Slater et al., 1966).

Poiché lo scopo della nostra ricerca è fondamentalmente lo studio dell'rRNA, abbiamo deciso di usare il metodo basato sulla estrazione con fenolo freddo, senza SDS. In esperimenti preliminari, tuttavia, abbiamo paragonato i due metodi di estrazione dopo marcature degli embrioni *in vivo* con P³² per periodi di 6 h (dalla fecondazione fino alla comparsa del blastocle) o di 25 h (dalla fecondazione allo stadio di giovane prisma). Secondo i dati della letteratura (Nemer et al., 1963; Gross et al., 1965; Nemer et al., 1965) nel primo esperimento dovrebbero risultare marcati solo sRNA e dell'RNA di tipo messaggero, mentre nel secondo dovrebbe marcarsi anche l'rRNA.

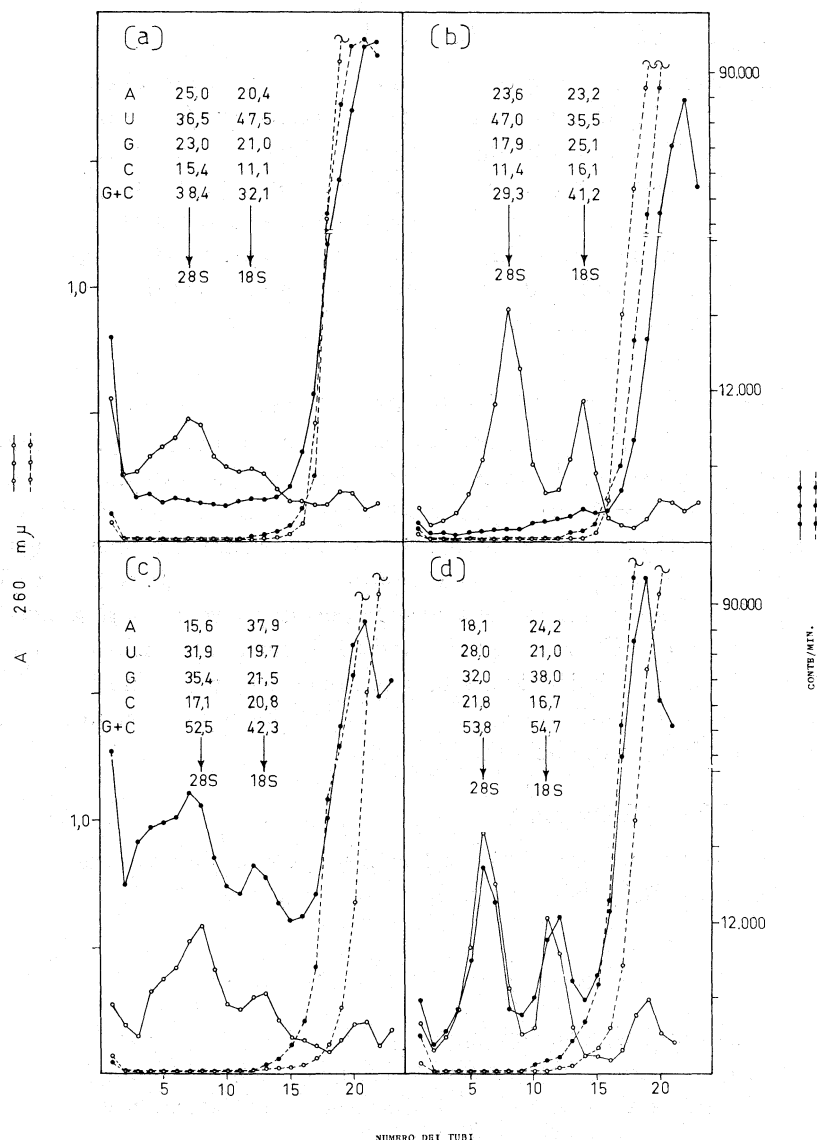


Fig. 1. - Profili di gradienti di saccarosio di RNA estratto con:

a) SDS - fenolo caldo, dopo 6 h di marcatura; b) Fenolo freddo, dopo 6 h di marcatura; c) SDS - fenolo caldo, dopo 25 h di marcatura; d) Fenolo freddo, dopo 25 h di marcatura. Le linee tratteggiate indicano le densità ottiche e le radioattività degli stessi campioni dopo trattamento con RNAasi. La composizione in basi (mole%) si riferisce alle zone dei gradienti indicate dalle frecce.

Nella fig. 1 sono riportati i risultati delle analisi per gradienti di saccarosio degli RNA estratti. Se l'RNA è stato estratto con SDS e fenolo caldo, il profilo della densità ottica mostra, accanto alle frazioni 4S, 18S e 28S, una spalla nel lato pesante del picco 28S ed una frazione che si porta sul fondo del tubo.

La radioattività, dopo 6 h di marcatura, è pressoché uniformemente distribuita in tutto il gradiente, eccettuato la zona del 4S, dove è molto elevata, ed una zona vicina al fondo del tubo. La distribuzione del P^{32} tra i quattro nucleotidi indica la sintesi di un RNA di tipo DNA. Ciò conferma le preesistenti osservazioni di sintesi di RNA messaggero in questo periodo di sviluppo.

L'estrazione con fenolo freddo dopo 6 h di marcatura dà dell'RNA molto scarsamente radioattivo (a parte l'alta radioattività della zona del 4S); il che conferma come questa tecnica estragga molto meno mRNA che la precedente. È interessante notare che il profilo della densità ottica mostra ora soltanto tre distinti picchi, riferibili all'sRNA ed all'rRNA, mentre la spalla del 28s e la frazione più pesante sono scomparse. Ciò suggerisce la localizzazione nucleare di queste frazioni pesanti. La composizione nucleotidica dell'RNA marcato è ancora di tipo A—U; ciò che indica che in questo periodo non vi è sintesi di alcun rRNA che venga almeno trasferito al citoplasma. L'RNA marcato potrebbe rappresentare RNA messaggero citoplasmatico.

Dopo 25 h di marcatura, l'estrazione con SDS-fenolo caldo dà lo stesso profilo di densità ottica descritto per la marcatura di 6 h. La radioattività è molto più alta e segue solo grossolanamente il contorno della densità ottica.

L'estrazione con fenolo freddo dopo 25 h di marcatura dà luogo ad un RNA la cui densità ottica mostra un chiaro profilo di rRNA in aggiunta al picco del 4S. La radioattività segue abbastanza esattamente il profilo della densità ottica, a parte la zona del 4S, sempre più marcata.

La composizione nucleotidica dell'RNA radioattivo estratto con fenolo freddo dopo il lungo periodo di marcatura, indica la sintesi di un RNA di tipo ribosomiale, mentre l'RNA estratto con SDS-fenolo caldo non ha una composizione di tipo G—C nel picco 18S. Ciò dimostra che in qualche momento tra 6 e 25 ore dalla fecondazione ha luogo la sintesi di rRNA. Ciò è particolarmente evidente quando si impieghi la tecnica di estrazione con fenolo freddo. L'uso dell'SDS causa l'estrazione anche di RNA di tipo messaggero che modifica il profilo della densità ottica ed altera la composizione nucleotidica specialmente del picco 18S.

Il trattamento delle nostre preparazioni con 0,02 mg di ribonucleasi pancreatica (cristallizzata 5 volte) per mg di RNA per 20 minuti a 37°C, sposta sia la densità ottica che la radioattività totalmente alla sommità del gradiente in tutti i casi; mentre l'incubazione in analoghe condizioni con l'omissione dell'enzima è assolutamente priva di effetto.

Per stabilire più accuratamente il momento dell'inizio della sintesi dell'RNA ribosomiale durante le prime fasi di sviluppo si è somministrata della uridina H^3 per periodi di 6 h a vari stadi di sviluppo. Alla fine di ogni periodo di marcatura l'RNA, estratto con fenolo freddo, è stato analizzato per gradiente di saccarosio. Gli stadi studiati saranno indicati da I a IV, come spiegato nella fig. 2.

Come prevedibile, si è trovata scarsa radioattività in tutte le frazioni nello stadio I. Nello stadio II si ha un notevole aumento della radioattività

a livello del picco 18 S e del 4 S; vi è però scarsa attività al livello del picco 28 S. Nello stadio III la radioattività del picco 18 S è ancora aumentata, mentre comincia ad apparire una certa radioattività anche in coincidenza del picco 28 S. Nello stadio IV il picco 28 S è diventato intensamente radioattivo e tutto il quadro parla evidentemente per una sintesi di rRNA.

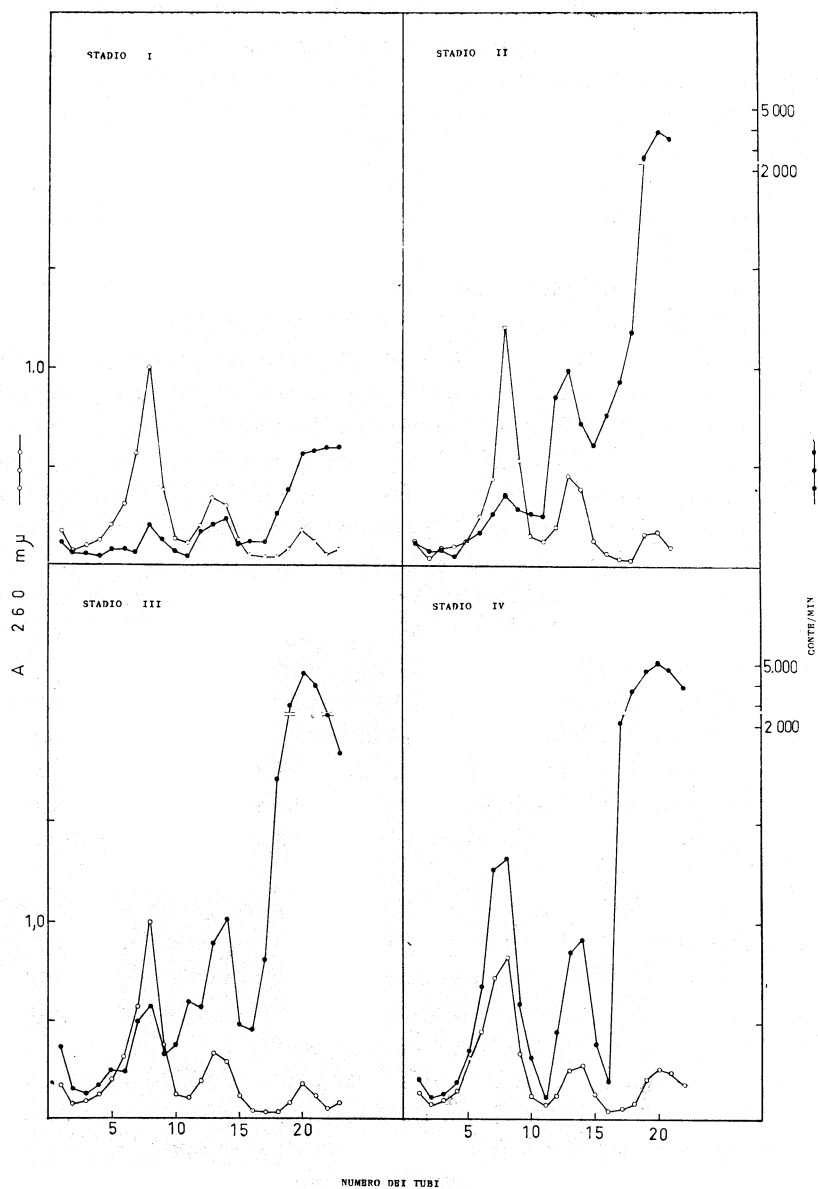


Fig. 2. - Profili di gradienti di saccarosio di RNA estratto con fenolo freddo, dopo 6 h di marcatura con uridina H^3 , durante i seguenti periodi:

Stadio I) da 0 a 6 h, cioè dalla fecondazione fino alla prima comparsa del blastocle; Stadio II) da 6 a 12 h, cioè fino alla blastula natante; Stadio III) da 12 a 18 h, cioè fino alla gastrula media; Stadio IV) da 12 a 24 h, cioè fino allo stadio di prisma.

Sorge dunque la questione del perché la frazione 18 S si marchi prima della 28 S. È ciò perché il 18 S ha una sintesi più veloce, o contiene un precursore del 28 S o perché contiene qualche altro RNA diverso dall'rRNA?

Per risolvere questa questione si è ripetuto lo stesso tipo di esperimento usando però P^{32} come marcatore in modo da rendere possibile un'analisi della composizione nucleotidica dell'RNA sintetizzato. I risultati, riportati nella Tabella I, dimostrano che la frazione 28 S, in tutti gli stadi in cui è marcata, è chiaramente di tipo ribosomiale. D'altro canto, la composizione nucleotidica dell'RNA marcato del picco 18 S è inequivocabilmente di tipo A-U nello stadio II e si sposta verso il tipo G-C negli stadi successivi. Dunque prendendo la marcatura del picco 28 S come spia della sintesi dell'rRNA, si può concludere che l'rRNA di nuova sintesi è chiaramente dimostrabile nel citoplasma tra lo stadio III e IV. Esso raggiunge valori consistentemente più elevati nello stadio IV.

TABELLA I.

Composizione nucleotidica percentuale dell'RNA di riccio di mare marcato durante diversi stadi di sviluppo.

	A	U	G	C	G+C
28 S Stadio III . .	22,7	18,3	34,8	24,2	59,0
Stadio IV . .	24,4	16,2	33,8	25,6	59,4
18 S Stadio II . .	21,6	43,0	23,0	12,2	35,2
Stadio III . .	25,0	27,3	30,3	17,3	47,6
Stadio IV . .	24,6	25,5	30,7	19,2	49,9

Per rispondere alla domanda se l'rRNA di nuova sintesi sia nel citoplasma ancora libero o già associato alle proteine in forma di ribosomi completi, si sono condotti esperimenti di frazionamento cellulare in seguito a marcatura. La fig. 3 mostra che l'RNA estratto con fenolo freddo dai ribosomi isolati dopo 6 h di marcatura con uridina H^3 allo stadio IV è radioattivo. In particolare va notato che anche il 28 S mostra una buona radioattività. Ciò dimostra che l'rRNA sintetizzato durante lo stadio IV viene, almeno in parte, durante lo stesso stadio associato alle proteine in forma di particolato ribosomiale. Periodi di marcatura più brevi (1 ora) non riescono a rendere radioattivo il picco 28 S, neanche durante lo stadio IV. Questo fatto potrebbe suggerire la sintesi di un precursore dell'rRNA non estraibile con fenolo freddo.

Per provare questa ipotesi si sono marcati con P^{32} per 6 h degli embrioni durante lo stadio IV e si è paragonata la radioattività raggiunta dall'RNA

estratto con fenolo freddo con quella ottenuta dopo periodi di marcatura di 3 h effettuati durante la prima o durante la seconda metà dello stesso stadio IV. Come si vede nella fig. 4, la somma della radioattività dei picchi 28 S dopo ciascuna delle marcature da 3 h è inferiore alla radioattività raggiunta nello stesso picco dopo una singola marcatura di 6 h. D'altra parte, la somma della radioattività dei picchi 18 S e 4 S dei due periodi più brevi uguaglia esattamente quella raggiunta negli stessi picchi nella singola marcatura più lunga. Dunque, per ottenere una buona radioattività del picco 28 S, è necessario un periodo di marcatura *in vivo* superiore a 3 h. Questo risultato

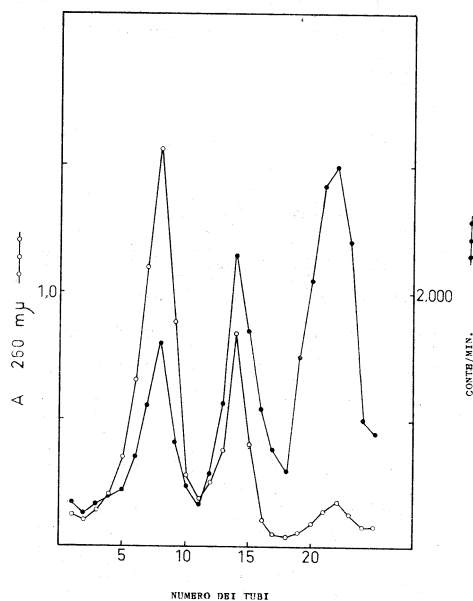


Fig. 3. - Analisi per gradiente di saccarosio dell'RNA estratto da ribosomi isolati da prismi, dopo 6 h di marcatura con uridina H^3 .

è in accordo con l'ipotesi della sintesi di un precursore dell'rRNA citoplasmatico (almeno del 28 S) non estraibile con fenolo freddo, probabilmente a causa della sua localizzazione nucleare.

Non si può pensare che il ritardo della comparsa della radioattività nel picco 28 S sia dovuto ad una diluizione preliminare dell'isotopo nel «pool», perché questo dovrebbe essere vero anche per i picchi 18 S e 4 S, il che non è.

Una domanda che si può ancora porre è se il marcato aumento della sintesi dell'rRNA citoplasmatico che ha luogo nello stadio IV sia indicativo di una sintesi preferenziale di questo tipo di RNA durante questo stadio o se sia l'espressione di un'aumento di sintesi di tutte le classi di RNA.

Per rispondere a questa domanda si è paragonato il grado, di radioattività raggiunto dall'RNA «totale» estratto col metodo a), dopo un periodo di marcatura di 6 h durante lo stadio III, con quello raggiunto dopo un analogo periodo di marcatura durante lo stadio IV. Esperimenti preliminari hanno

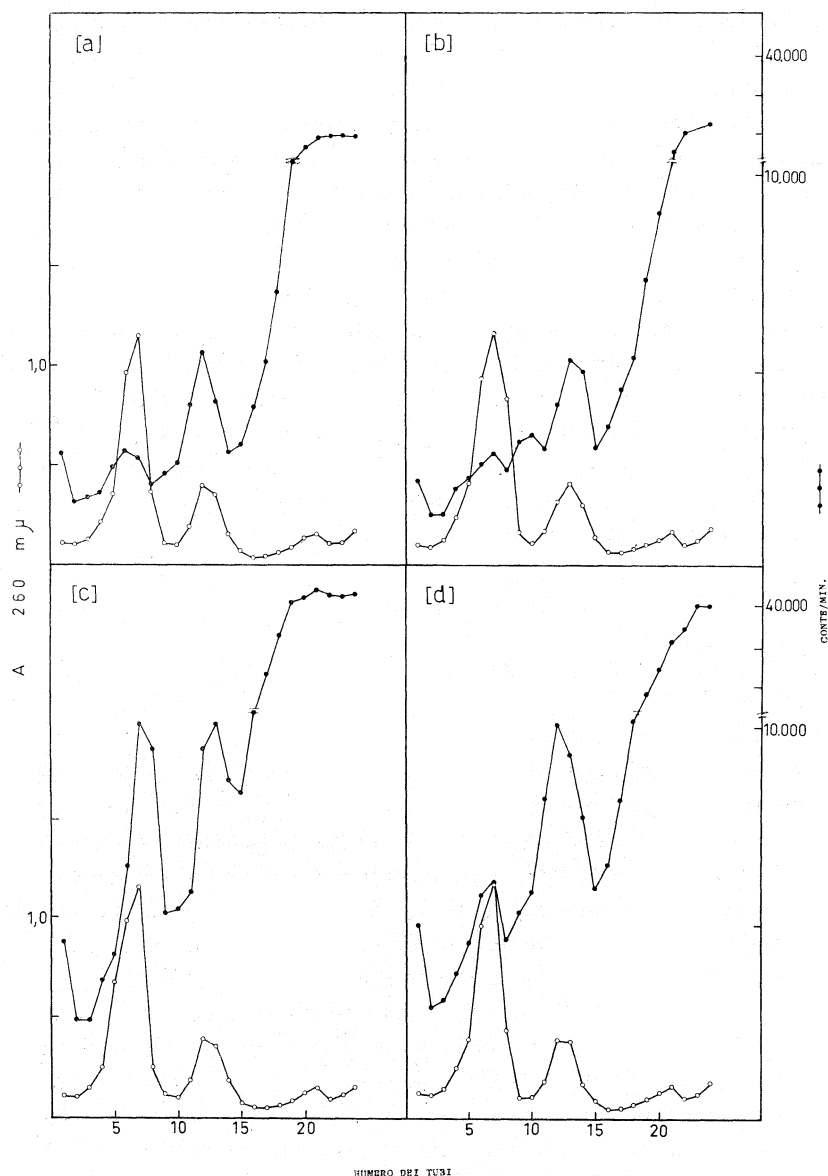


Fig. 4. — Profili di gradienti di saccarosio di RNA estratto con fenolo freddo dopo i seguenti periodi di esposizione al P^{32} :

a) da 18 fino a 21 h dopo la fecondazione; b) da 21 fino a 24 h dopo la fecondazione; c) da 18 fino a 24 h dopo la fecondazione. In d) è riportata la somma delle radioattività mostrate in c) e in b), insieme alla media delle densità ottiche dei due gradienti.

dimostrato che la radioattività dell'RNA totale, in queste condizioni sale linearmente fino ad almeno 6 ore.

I risultati di una serie di sei esperimenti hanno dimostrato che l'aumento dell'attività specifica dell'RNA totale marcato durante lo stadio IV, rispetto a quello marcato durante lo stadio III è del 35 % (± 26). D'altro canto,

l'aumento della marcatura dell'rRNA estratto con fenolo freddo, misurato dalla attività specifica raggiunta negli stessi stadi all'apice del picco 28S, è del 116% (± 20). Dunque l'aumento dell'attività specifica dell'RNA « totale » dallo stadio III allo stadio IV è marcatamente e significativamente ($P < 0,02 > 0,01$) più basso di quello del 28S. Si può dunque prospettare che il notevole aumento della sintesi dell'rRNA nello stadio IV non riflette solamente un aumento della sintesi dell'RNA « totale » in questo stadio, ma sembra essere espressione della attivazione preferenziale della trascrizione di cistroni relativi all'rRNA. Due fatti però devono essere tenuti in considerazione: 1° la valutazione della marcatura del nostro RNA « totale » può essere in qualche modo inficiata dal ricambio attivo dei nucleotidi terminali dell'RNA di trasferimento; 2° i nostri risultati dimostrano che durante lo stadio IV ha luogo, per la prima volta durante lo sviluppo, una attiva sintesi di rRNA seguita da trasferimento di quest'ultimo al citoplasma; essi però non escludono che in uno stadio precedente possa aver luogo la sintesi di un precursore dell'rRNA citoplasmatico, non estraibile con fenolo freddo.

CONCLUSIONI.

I risultati dimostrano che nel periodo tra la gastrula media ed il prisma dell'embrione di *Paracentrotus lividus* la sintesi dell'rRNA citoplasmatico diviene particolarmente attiva. Essi sottolineano l'importanza della estrazione con fenolo freddo dopo lunghi periodi di marcatura e della purificazione per gradiente di saccarosio quando si voglia rivelare la sintesi dell'rRNA in questo materiale. L'uso dell'SDS comporta l'estrazione di forti quantità di radioattività legata ad RNA non ribosomiale, che oscura il profilo dei gradienti. Perfino dopo estrazione con fenolo freddo una parte della radioattività legata al picco 18S è dovuta ad un RNA di tipo A—U. Ciò può spiegare perché non si riesca ad ottenere una composizione nucleotidica di tipo ribosomiale analizzando l'RNA di nuova sintesi con metodi, come la cromatografia su albumina metilata, che non consentono, almeno nelle cellule animali, una buona separazione del 28S dal 18S. È interessante notare in proposito che anche in altri materiali si è trovato che l'RNA 18S contiene dell'RNA messaggero (Brown et al., 1965; Latham et al., 1965; Henshaw et al., 1965).

Poiché il metodo del fenolo freddo consente l'estrazione preferenziale dell'RNA citoplasmatico, i nostri esperimenti non escludono la possibilità teorica che in stadi precedenti al IV, possa aver luogo nel nucleo una sintesi di rRNA non seguita da trasferimento di quest'ultimo al citoplasma.

La cinetica di marcatura del picco 28S suggerisce invero l'esistenza di un precursore dell'rRNA non estraibile con fenolo freddo.

L'rRNA sintetizzato nello stadio IV viene incorporato nei ribosomi durante lo stesso stadio, almeno in parte.

Si può ragionevolmente prospettare che nello stadio IV la sintesi dell'rRNA divenga più attiva che la sintesi di altri tipi di RNA, rispetto agli stadi precedenti.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] F. J. BOLLUM, « J. Biol. Chem. », 234 2733 (1959)
- [2] D. D. BROWN e E. LITTNA, « J. Mol. Biol. », 8, 669 (1964).
- [3] D. G. COMB, S. KATZ, R. BRANDA e C. J. PINZINO, « J. Mol. Biol. », 14, 195 (1965).
- [4] G. P. GEORGIEV e V. L. MANTIEVA, « Bioch. Biophys. Acta », 61, 153 (1962).
- [5] P. R. GROSS, K. KRAEMER, L. I. MALKIN, « Bioch. Biophys. Res. Comm. », 18, 569 (1965).
- [6] E. C. HENSHAW, M. REVEL e H. H. HIATT, « J. Mol. Biol. », 14, 241 (1965).
- [7] H. LATHAM e J. E. DARNELL, « J. Mol. Biol. », 14, 1 (1965).
- [8] M. NEMER, « Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. », 50, 230 (1963).
- [9] M. NEMER e A. A. INFANTE, « Science », 150, 217 (1965).
- [10] A. SIBATANI, S. R. DE KLOET, V. G. ALLFREY e A. E. MIRSKY, « Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. », 48, 471 (1962).
- [11] D. W. SLATER e S. SPIEGELMAN, « Biophys. J. », 6, 385 (1966).