
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

VINCENZO D'AMELIO, ELVIRA COSTANTINO

**Profilo polisomiale dei globuli rossi da embrioni di
pollo. Effetto della maturazione cellulare e
dell'incubazione in vivo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.6, p. 916-922.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_6_916_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. — *Profilo polisomiale dei globuli rossi da embrioni di pollo. Effetto della maturazione cellulare e dell'incubazione in vivo* (*).
Nota di VINCENZO D'AMELIO e ELVIRA COSTANTINO, presentata (**)
dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — It has been shown that both polyribosome content and protein synthesis activity decline during maturation of chick embryonic red blood cells.

A study on the modification of polyribosome and monosome profiles, during incubation in vitro, showed that red cells from five day embryos (polychromatic erythroblasts) are more dependent on the aminoacid concentration of the medium, than red cells from twelve day embryos (reticulocytes) in order to maintain a balance among the various phases of protein synthesis (attachment, migration and detachment of ribosomes from messenger RNA).

È comunemente accettato che la sintesi proteica avvenga a livello dei polisomi.

Nel caso dei globuli rossi si può dimostrare, sia in vivo che in vitro, che durante l'invecchiamento si ha declino contemporaneo della attività di sintesi proteica e caduta del contenuto cellulare in polisomi [1, 2, 3, 4 e 5].

Queste ricerche sono state condotte su reticulociti di coniglio che, per essere anucleati, si deve ritenere che contengano precedentemente accumulati nelle cellule sia lo RNA messaggero che i ribosomi che consentono il proseguimento della sintesi proteica dopo la scomparsa del nucleo. Queste nostre ricerche sono state invece condotte su globuli rossi embrionali in stadi di maturazione nei quali sia la sintesi dei ribosomi che il trasferimento dell'informazione dal nucleo al citoplasma avvengono ancora attivamente. Nelle nostre ricerche sono stati presi infatti in considerazione globuli rossi sin dallo stadio di eritroblasto policromatofilo nei quali tale sintesi è stata precedentemente dimostrata [6]. Oltre che le modificazioni del profilo polisomiale e il rapporto polisomi-monosomi durante la maturazione del globulo rosso abbiamo studiato anche la cinetica delle modificazioni del profilo polisomiale in seguito ad incubazione in diversi mezzi culturali.

MATERIALI E METODI.

La preparazione dei globuli rossi embrionali, dell'emolizzato e l'analisi di questa frazione su gradiente di saccarosio è stata precedentemente descritta [6].

L'incubazione dei globuli rossi viene effettuata (a) in plasma anemico al quale in alcuni esperimenti sono aggiunti aminoacidi alla concentrazione

(*) Istituto di Anatomia Comparata dell'Università e Unità di Embriologia Molecolare del C.N.R., Palermo.

(**) Nella seduta del 21 giugno 1967.

di $4 \times 10^{-3}M$ per ogni aminoacido oppure (b) nel mezzo di incubazione di Lingrell Borscock [7] con contenuto in aminoacidi uguale a quello su menzionato.

L'analisi della radioattività dopo incubazione in presenza di aminoacidi marcati con C^{14} viene effettuata prelevando o campioni dalle varie frazioni raccolte dal gradiente dell'emolizzato o dal sistema di incubazione dopo vario periodo dall'aggiunta degli aminoacidi C^{14} . I campioni vengono essiccati su dischetti di carta Whatman N° 1 che vengono successivamente estratti con acido tricloroacetico (TCA) 10 % a freddo per 40', quindi con TCA 5 % a 90° C per 30 minuti e con TCA 5 % a freddo per 5 minuti. I dischetti vengono quindi estratti con alcool-etero v/v a 37° per 30 minuti e finalmente asciugati con etere. La radioattività è stata misurata immergendo i dischetti in toluolo contenente PPO e POPOP in un spettrometro a scintillazione (Nuclear Chicago) a $-22^{\circ}C$.

RISULTATI.

La possibile contaminazione delle nostre preparazioni con tipi cellulari diversi da quelli della linea eritrocitaria è stata controllata come descritto [6]. Il bassissimo livello di tale contaminazione ci dà confidenza nel ritenere che il contributo di elementi della serie non eritrocitaria al profilo polisomiale sia trascurabile.

I risultati ottenuti da altri Autori indicano, come è stato accennato, che il contenuto in polisomi e il profilo di questi [1, 4, 5] varia durante il corso della maturazione dei reticolociti. Tuttavia, mentre vi è comune accordo sulla diminuzione della quantità dei polisomi, non è ancora sicuro se la scomparsa di tutte le classi di polisomi sia simultanea ed uguale o avvenga in modo differenziale cioè inizialmente a carico dei polisomi più pesanti e quindi dei più leggeri.

Per alcuni Autori questo fenomeno sarebbe dimostrabile mentre per altri l'invecchiamento del reticolocita condurrebbe ad una diminuita attività della frazione polisomiale nella sintesi proteica dimostrando così la presenza di frazioni polisomiali inattive [2, 3].

Noi abbiamo seguito le variazioni del profilo polisomiale durante la maturazione cellulare in globuli rossi da embrioni di cinque giorni, (principalmente eritroblasti policromatofili) e in reticolociti preparati da embrioni di 12 giorni. Nel primo caso l'area polisomiale rappresenta circa il 78 % di quella di monosomi. Nella preparazione di reticolociti da embrioni di 12 giorni il valore dell'area polisomiale è del settantuno per cento con valori che variano dall'81 per cento al 57 per cento. La scomparsa preferenziale della frazione polisomiale più pesante anche nel nostro caso non è stata osservata.

È stato accertato che il rapporto polisomi-monosomi oltre che durante la maturazione varia durante l'incubazione dei reticolociti *in vitro*. All'inizio dell'incubazione i monosomi si spostano verso la regione dei polisomi ed aumenta pure la percentuale dei polisomi più pesanti mentre col proseguire dell'incubazione ha luogo il fenomeno inverso [8].

Ci è stato possibile dimostrare che tale fenomeno avviene anche nel materiale da noi preso in considerazione ma che avviene con modalità diverse a seconda dello stadio di maturazione del globulo rosso o del mezzo di incubazione.

Il comportamento dei ribosomi di globuli rossi di dodici giorni incubati o in plasma anemico (al quale siano aggiunti aminoacidi nella stessa concentrazione a quella presente nel mezzo di incubazione) o nel mezzo di incubazione stesso, è simile a quello descritto per i reticolociti di coniglio (fig. 1).

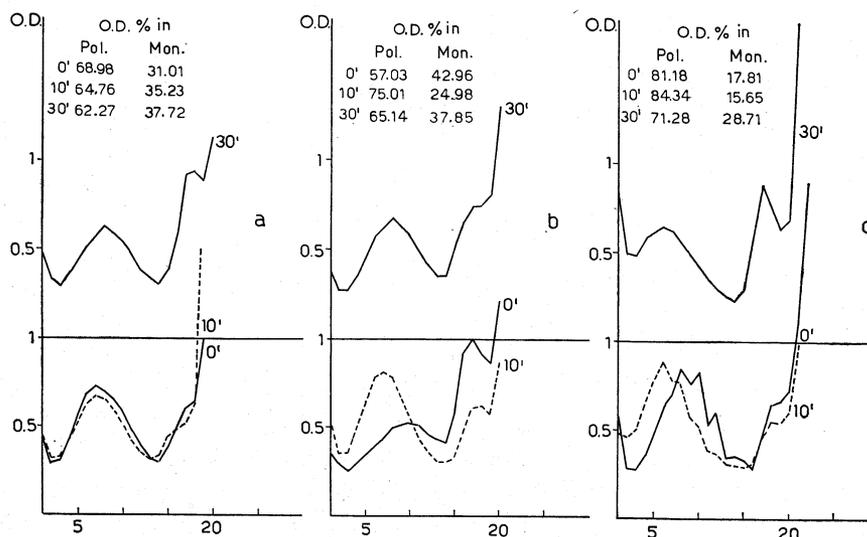


Fig. 1. - Cinetica delle modificazioni delle aree polisomiali e monosomiali nell'emozzato di globuli rossi di 12 giorni in seguito all'incubazione per 0, 10 e 30 minuti in a) plasma anemico, b) plasma anemico al quale sono stati aggiunti aminoacidi c) nel mezzo di incubazione [7]. L'emozzato è distribuito su di un gradiente di saccarosio 15-30 per cento in $\text{KCl } 10^{-2}\text{M}$, $\text{MgCl}_2 10^{-3}\text{M}$, $\text{Tris } 10^{-2}\text{M}$ (pH 7,4) e centrifugato a 25.000 r.p.m. per 165 minuti in un rotore SW 25 di una ultracentrifuga Spinco mod. 1.

Infatti dieci minuti di incubazione in questi mezzi determinano l'aumento del rapporto polisomi-monosomi ed un aumento della frazione più pesante dei polisomi. Dopo trenta minuti di incubazione il rapporto tende ad invertirsi, senza alcuna differenza apprezzabile tra le varie classi dei polisomi.

Diverso è il comportamento dai globuli rossi preparati da embrioni di cinque giorni. Dopo dieci minuti di incubazione in presenza di plasma anemico più aminoacidi o nel mezzo culturale di Lingrell e Borsoock, la percentuale dei polisomi più pesanti aumenta, ma (probabilmente a causa di una rottura più rapida dei polisomi) non si nota lo spostamento del rapporto monosomi-polisomi. Al contrario, si osserva un continuo accumulo di ribosomi nella frazione monosomiale (fig. 2).

Quando i globuli rossi da embrioni di cinque giorni vengono incubati in solo plasma anemico dopo dieci minuti si assiste ad una estesa disaggrega-

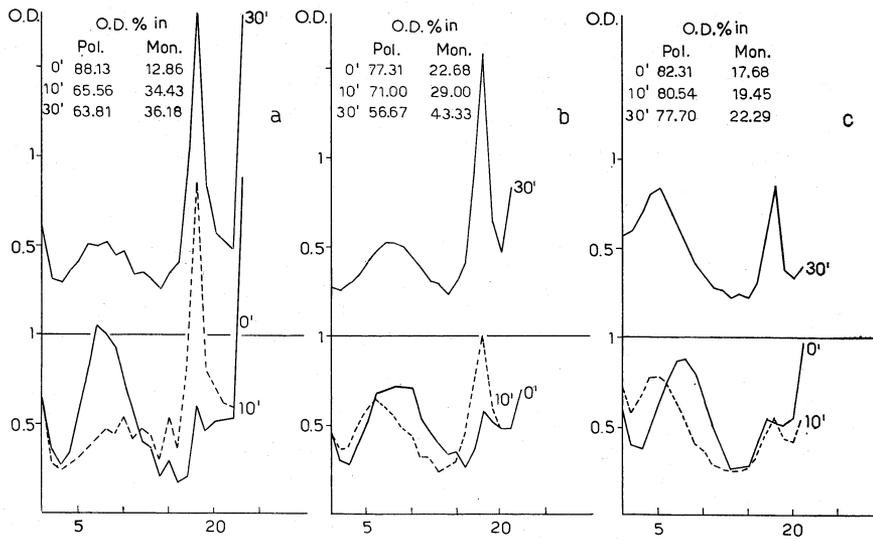


Fig. 2. - Cinetica delle modificazione delle aree polisomiali e monosomal di globuli rossi di 5 giorni in seguito alla incubazione per 0,10 e 30 minuti in *a*) plasma anemico, *b*) plasma anemico al quale sono stati aggiunti aminoacidi e *c*) nel mezzo di incubazione [7]. Analisi dell'emolizzato come nella fig. 1.

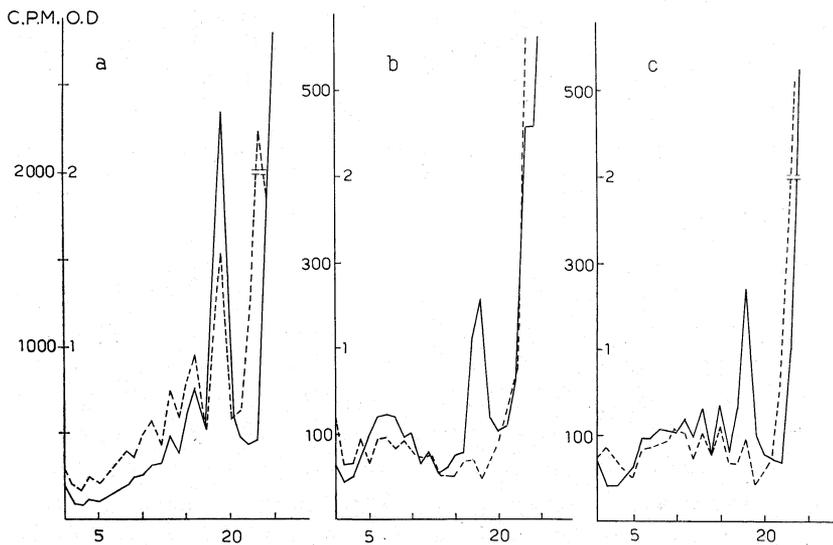


Fig. 3. - Profilo delle aree polisomiali e monosomal e distribuzione della radioattività in un emolizzato di globuli rossi di 5 giorni incubati per 10 minuti in *a*) plasma anemico, *b*) plasma anemico al quale sono stati aggiunti aminoacidi e *c*) mezzo di incubazione [7] in presenza di aminoacidi C^{14} . Analisi dell'emolizzato come in fig. 1. La linea continua indica le densità ottiche, quella tratteggiata le conte per minuto.

zione dei polisomi e soprattutto dei polisomi più pesanti. Col proseguire dell'incubazione il rapporto tra polisomi più pesanti e quelli più leggeri ridiviene simile a quella dei globuli rossi non incubati ma il rapporto tra polisomi e monosomi continua a decrescere (fig. 2). Tale effetto non è riscontrabile nella frazione polisomiale da globuli rossi di dodici giorni dove ha luogo solo una lenta perdita di ribosomi della frazione polisomiale mentre la grandezza media dei polisomi rimane costante (fig. 1).

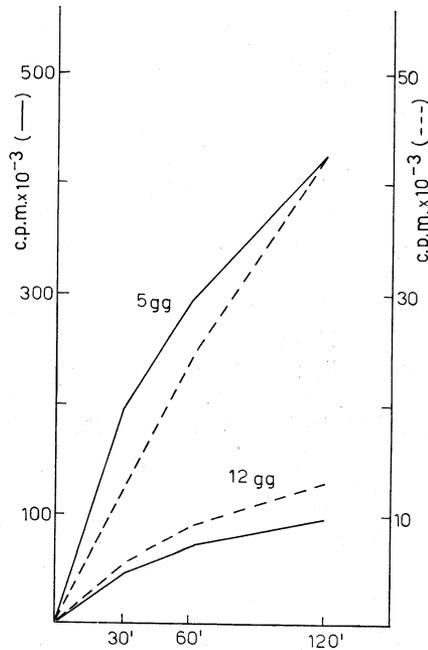


Fig. 4. - Incorporazione di aminoacidi C^{14} nella proteine totali di globuli rossi di 5 giorni e di 12 giorni durante l'incubazione in plasma anemico (linea continua) e nel mezzo di incubazione [7] (linea tratteggiata).

Data la relazione esistente tra polisomi e sintesi proteica è stata pure seguita la distribuzione della radioattività in un gradiente dell'emolizzato ottenuto da globuli rossi di cinque giorni incubati in plasma anemico con o senza aggiunta di aminoacidi. Nel primo caso, la maggior parte della radioattività è legata alla frazione polisomiale, nel secondo una larga parte della radioattività si ritrova nella frazione monosomiale (fig. 3). La radioattività nell'emolizzato di globuli rossi di dodici giorni si trova sempre legata principalmente alla frazione polisomiale dopo incubazione nel plasma anemico con o senza l'aggiunta di aminoacidi.

Dato il diverso effetto dimostrato dall'aggiunta di aminoacidi al plasma sul comportamento dei polisomi e sulla distribuzione della radioattività nei due stadi di maturazione dei globuli rossi ci è sembrato necessario studiare la velocità di sintesi proteica nei vari sistemi. Dai risultati è evidente innanzi

tutto che utilizzando lo stesso mezzo di incubazione la velocità di sintesi diminuisce con la maturazione cellulare. Inoltre l'incorporazione della radioattività nelle proteine dei globuli rossi di embrioni di cinque giorni è lineare per almeno due ore se l'incubazione è fatta nel mezzo di incubazione ciò che non si verifica incubando in solo plasma anemico. Nel caso di globuli rossi di dodici giorni, nei quali la velocità di sintesi è minore, l'effetto dell'alto contenuto in aminoacidi è molto meno evidente (fig. 4).

DISCUSSIONE.

Dai nostri risultati è possibile trarre le seguenti conclusioni:

1° Nel nostro materiale la sequenza della scomparsa dei polisomi pesanti prima e di quelli più leggeri poi durante la maturazione non è dimostrabile. A questo proposito dobbiamo notare però che ciò potrebbe in parte dipendere dalla eterogeneità della popolazione cellulare nella preparazione di globuli rossi di dodici giorni. Dato il diverso contenuto in polisomi nei diversi stati di maturazione, la presenza in queste preparazioni di una certa quantità di globuli rossi più immaturi, ad alto contenuto in polisomi pesanti, potrebbe mascherare la scomparsa preferenziale di essi nei globuli rossi più maturi ed a più basso contenuto di polisomi [4]. Tuttavia i recenti risultati di De Bellis et al. ottenuti seguendo tale fenomeno durante la maturazione in vivo di reticolociti di coniglio confortano l'idea di una perdita contemporanea di tutte le classi di polisomi [9].

2° Il profilo polisomiale varia durante l'incubazione in vitro in diverso modo nei globuli rossi a seconda del loro stadio di maturazione e del mezzo di incubazione. Tali differenze possono venire riassunte nel modo seguente:

a) Nei globuli rossi di cinque giorni, durante i primi minuti di incubazione in plasma anemico si osserva una rapida disaggregazione di tutte le classi di polisomi. I polisomi più pesanti ricompaiono con il proseguire della incubazione nonostante una continua perdita di ribosomi dalla frazione polisomiale;

b) La frammentazione iniziale dei polisomi è ridotta con l'aggiunta di aminoacidi al plasma anemico;

c) Nei globuli rossi di embrioni di 12 giorni invece l'incubazione in plasma anemico ha come risultato una continua ma lenta perdita di polisomi mentre non cambia il rapporto tra polisomi pesanti e leggeri;

d) Sia nei globuli rossi di cinque che di dodici giorni in seguito all'incubazione nel mezzo di incubazione o in plasma anemico con l'aggiunta di una quantità di aminoacidi pari a quella presente nel mezzo di incubazione si osserva uno spostamento di ribosomi dalla frazione monosomiale verso i polisomi.

Il meccanismo attraverso il quale avverrebbero i fenomeni su esposti potrebbe essere il seguente:

È noto che il numero dei polisomi sullo RNA messaggero, oltre che dalla lunghezza dello stesso [10] è determinato da un equilibrio tra le diverse fasi

della sintesi proteica cioè attacco e migrazione del ribosoma sullo RNA messaggero e successivo distacco al termine della sintesi della catena polipeptidica [18].

Queste fasi sono variamente influenzabili dal trattamento con vari agenti, ad esempio RNAasi, concentrazione ionica e aminoacidi nel mezzo di incubazione, essendo il distacco del ribosoma meno suscettibile, rispetto alle altre fasi, ad una diminuita concentrazione in aminoacidi [11] del mezzo.

Sembrerebbe che i globuli rossi più immaturi, nei quali la sintesi proteica è più veloce, richiedano una quantità maggiore di aminoacidi per mantenere l'equilibrio tra le diverse fasi della sintesi. Infatti, rimanendo costante la velocità di distacco del ribosoma durante i primi dieci minuti di incubazione in plasma anemico e diminuendo quella delle altre due fasi, si verrebbe a determinare una diminuzione del numero di ribosomi per molecola di RNA messaggero, con la conseguente scomparsa dei polisomi più pesanti. La presenza di polisomi pesanti nel profilo polisomiale di globuli rossi incubati in plasma anemico al quale siano stati aggiunti aminoacidi indica che tale meccanismo può essere realmente responsabile della cinetica su esposta.

Col proseguire dell'incubazione altri fattori potrebbero interferire con la velocità del distacco del ribosoma che determinerebbero l'instaurarsi di un nuovo equilibrio tra le varie fasi della sintesi proteica. A questo proposito dobbiamo accennare all'ipotesi dell'influenza del gruppo prostetico sul distacco della catena globinica del ribosoma [12]. Una diminuita disponibilità dell'eme col proseguire dell'incubazione potrebbe agire principalmente sulla fase finale della sintesi dell'emoglobina determinando un nuovo equilibrio tra le diverse fasi della sintesi proteica.

Nei globuli rossi di dodici giorni con velocità di sintesi meno rapida tale squilibrio non si manifesterebbe in modo così evidente.

Non ci è possibile a questo punto delle indagini affermare se la diminuita velocità di sintesi proteica durante la maturazione sia dovuta oltre che al diverso contenuto in strutture predisposte a tale processo (polisomi, RNA messaggero e RNA di trasferimento) anche ad una diminuita velocità nella lettura del messaggio e quindi nella formazione dei legami peptidici. Esperimenti sono in corso per accertare questa possibilità.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] R. A. RIFKIND, D. DANON e P. A. MARKS, « J. Cell. Biol. », 22, 599 (1964).
- [2] E. R. GLOWACKI e R. L. MILLETTE, « J. Mol. Biol. », 11, 116 (1965).
- [3] P. T. ROWLEY, « Nature », 208, 24 (1965).
- [4] D. DANON, T. ZEHAVI-WILLNER e G. R. BERMAN, « P.N.A.S. », 54, 873 (1965).
- [5] P. A. MARKS, R. A. RIFKIND e D. DANON, « P.N.A.S. », 50, 336 (1963).
- [6] V. D'AMELIO e E. COSTANTINO, « Rend. Sc. fis. mat. e nat., Accad. Lincei », vol. XLIII, fasc. 1-2 (1967).
- [7] J. B. LINGRELL e H. BORSOOCK, « Biochemistry », 2, 309 (1963).
- [8] P. M. KNOPF e H. LAMFROM, « B.B.A. », 95, 398 (1965).
- [9] E. R. BURKA e R. DE BELLIS, « Nature », 213, 724 (1967).
- [10] H. LATHAM e J. E. DARNELL, « J. Mol. Biol. », 14, 1 (1965).
- [11] A. J. MORRIS, « Biochemistry J. », 91, 611 (1964).
- [12] A. I. GRAYZEL, P. HÖRCHNER e I. M. LONDON, « P.N.A.S. », 55, 650 (1966).