
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

VINCENZO D'AMELIO, ELVIRA COSTANTINO

**La sintesi di acido ribonucleico nei globuli rossi da
embrioni di pollo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 43 (1967), n.1-2, p.
101-106.*

Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_43_1-2_101_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_43_1-2_101_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. — *La sintesi di acido ribonucleico nei globuli rossi da embrioni di pollo* (*). Nota di VINCENZO D'AMELIO e ELVIRA COSTANTINO, presentata (**) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — Ribosomal RNA synthesis has been shown to take place in chick embryonic red cells until the stage of polychromatic erythroblast. The newly synthesized RNA is incorporated into ribosomes.

Esistono nella letteratura pochi dati sulla sintesi dello RNA nei globuli rossi dell'embrione di pollo. Infatti essa è stata studiata solo con tecniche autoradiografiche da Cameron e Prescott [1] e da Fraser [2]. I risultati ottenuti da questi Autori indicano che queste cellule incorporano uridina marcata in forma acido-insolubile, fino allo stadio di eritroblasto policromatofilo tardivo. Tuttavia nulla si sa circa le classi di RNA sintetizzato. La possibilità di ottenere quantità sufficienti di globuli rossi embrionali a partire da quattro giorni di incubazione, con una grande prevalenza di uno stadio di maturazione sull'altro, a seconda dei periodi di incubazione, ci ha permesso di seguire la variazione nella capacità di sintesi di RNA durante la loro maturazione.

MATERIALI E METODI.

La tecnica di preparazione dei globuli rossi da embrioni di 4, 5 e 6 giorni, è la seguente. Gli embrioni lavati vengono sospesi ed agitati gentilmente in soluzione salina di Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB), e i globuli rossi così raccolti vengono a loro volta lavati 2 volte con la stessa soluzione. Per le preparazioni sono stati usati 150 embrioni di 4 giorni e 100 di 5 giorni e un numero sempre più piccolo di embrioni per gli stadii più avanzati. Da embrioni di 12 giorni il sangue viene raccolto con una pipetta direttamente dai vasi maggiori.

Il mezzo di incubazione utilizzato per le prove di incorporazione *in vitro* (6 volumi per 1 volume di cellule) è quello di Lingrell e Borsoock [3] e la molarità finale degli aminoacidi è 4×10^{-3} M. Il plasma per il mezzo di incubazione veniva raccolto da polli anemizzati con cinque iniezioni da 1 cc. di fenilidrazina (25 mgr/ml). Per lo studio della sintesi dello RNA e la sua distribuzione nei particolari cellulari si è usato sia P^{32} che uridina H^3 . L'incubazione viene bloccata per diluizione del mezzo di incubazione con cento parti di una soluzione di KRB freddo e le cellule dopo i lavaggi raccolte in un tubo conico graduato.

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

(**) Nella seduta del 21 giugno 1967.

L'emolisi delle cellule viene effettuata aggiungendo 4 volumi di una soluzione ipotonica tamponata (Tris HCl 10^{-3} M pH. 7,5) contenente $MgCl_2$ $1,5 \times 10^{-3}$ M per 90 secondi [4] e l'isotonicità ristabilita con NaCl 9%. La sospensione cellulare viene centrifugata a 10.000 rpm per 10 minuti e il supernatante utilizzato per l'estrazione dello RNA o distribuito su di un gradiente di saccarosio per lo studio della distribuzione della radioattività nei polisomi, monosomi e frazione postmonosomiale.

Per l'analisi dell'RNA nucleare la stessa preparazione cellulare, usata per la preparazione della frazione solubile, viene di nuovo lavata tre volte con la soluzione utilizzata per l'emolisi (10 ml/0,1 cc. di sedimento): il sedimento, che contiene nuclei, considerato come « frazione nucleare ». Lo RNA viene estratto dalle cellule o dalle frazioni cellulari con fenolo freddo a pH 5 [6] in presenza di bentonite con l'aggiunta di 60 mgr. di sodio-dodecil-solfato per 10 ml di sospensione [7]. Allo RNA estratto si aggiunge NaCl 1 M sino alla concentrazione dello 0,1 M e si precipita con 2 vol. di alcool. Il precipitato si riprende con K-acetato 10^{-2} M e si tratta con DNAasi (10 μ gr/ml per 30' a freddo), si riestrae con fenolo e si riprecipita con alcool in presenza di NaCl. L'RNA ridiscioltto in K-acetato viene analizzato su gradienti di saccarosio 5-20 per cento in K-acetato 10^{-2} M pH 5.

La radioattività nei campioni di RNA viene determinata diluendo i campioni di 1 ml raccolti dai gradienti con 10 ml della soluzione di Bray. L'incorporazione di P^{32} o uridina H^3 nei polisomi viene eseguita assorbendo 0.2 c.c. di ogni campione raccolto dal gradiente su dischetti di carta Wathman N° 1 che venivano quindi estratti con TCA 10% a freddo per 30', lavati con TCA 5% per 10', estratti con alcool etere a 37°C per 30', lavati con la stessa soluzione e asciugati con etere. In questo caso la radioattività viene determinata in 5 ml di POPOP-PPO in toluene [8].

RISULTATI.

Le preparazioni dei globuli rossi embrionali vengono osservate dopo colorazione con May-Grumwald Giemsa o con O. dianisidina. Si nota che solo il due o tre per cento delle cellule non dà colorazione con O. dianisidina e che nelle preparazioni la distribuzione dei globuli rossi nei diversi stadi di maturazione è d'accordo con i valori riferiti da altri Autori [9]. Fino al quinto giorno di incubazione si trovano solo eritrociti policromatofili precoci o tardivi; i primi sono più abbondanti nelle preparazioni di globuli rossi da embrioni di quattro giorni.

Al sesto giorno sono presenti soprattutto eritrociti di tipo definitivo, la maggior parte dei quali eritrociti policromatofili medi o tardivi. Sono pure presenti eritrociti maturi di tipo primitivo. Successivamente la percentuale degli eritrociti più immaturi diminuisce rapidamente.

La sintesi dello RNA di tipo ribosomiale viene seguita con lo studio della distribuzione della radioattività in un gradiente di saccarosio dello RNA

estratto da globuli rossi incubati in presenza di P^{32} . Dopo trenta o sessanta minuti di incubazione lo RNA estratto dai globuli rossi di 4 giorni presenta la radioattività quasi esclusivamente legata alle frazioni di RNA più leggere del 18s, dopo tre ore di incubazione sono presenti picchi di radioattività in corrispondenza dello RNA ribosomiale (fig. 1).

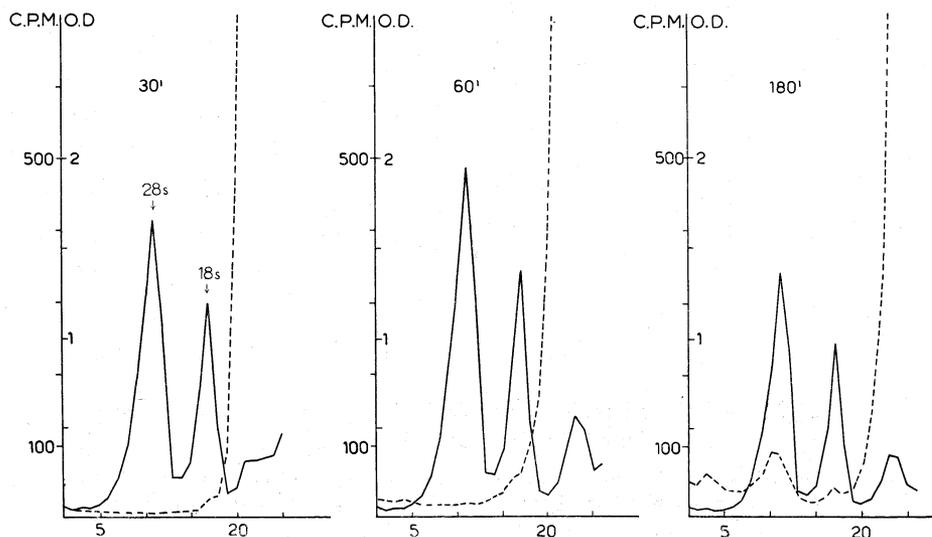


Fig. 1. - I globuli rossi da embrioni di 4 giorni vengono incubati in presenza di $5 \mu\text{C}/\text{ml}$ di P^{32} per 30, 60 e 180 minuti.

Lo RNA estratto è analizzato su un gradiente di saccarosio 5-20 per cento in K acetato 10^{-2}M pH 5 e centrifugato a 25.000 rpm per 12 ore in un rotore SW 25 in una ultra-centrifuga Spinco Mod. 1. La linea continua indica le densità ottiche, l'interrotta le conte per minuto.

Lo RNA estratto da ribosomi di globuli rossi da embrioni di 5 giorni presenta, dopo 2 ore di incubazione, due picchi di radioattività legati a frazioni di RNA di tipo ribosomiale con costante di sedimentazione 28s e 18s; e a frazioni più leggere del 18s. Uno studio dettagliato della distribuzione della radioattività in questa parte del gradiente non è stata possibile. L'attività specifica del 18s è più alta di quella del 28s (fig. 2).

Nel gradiente dello RNA estratto dalla frazione nucleare della stessa preparazione oltre a due picchi di radioattività legati alle frazioni ribosomiali 28s e 18s sono presenti due picchi con costante di sedimentazione 45s e 35s. Quest'ultimo è evidenziabile come una spalla del 28s. Un'altro picco di radioattività è dimostrabile tra il 28s e il 18s, e finalmente una forte radioattività è legata alla regione più leggera del gradiente. Nelle preparazioni di RNA estratto dalla frazione nucleare le attività specifiche del 28s e 18s sono simili (fig. 2).

Lo studio della capacità di sintesi di RNA di tipo ribosomiale è stato esteso a globuli rossi da embrioni più avanzati per stabilire sino a che stadio di maturazione del globulo rosso tale sintesi sia possibile. I risultati di questa analisi

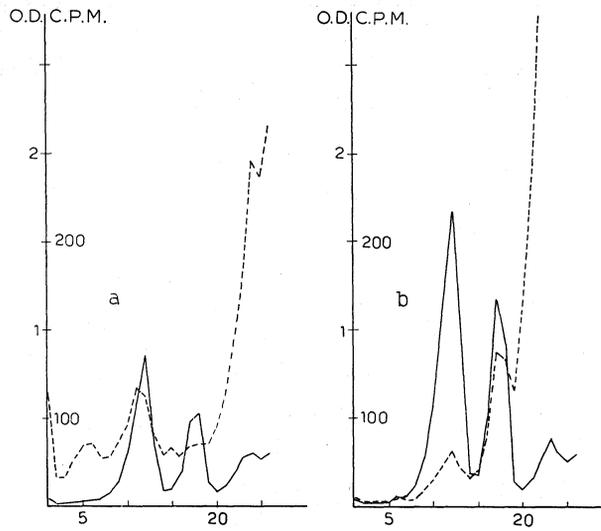


Fig. 2. - I globuli rossi da embrioni di 5 giorni vengono incubati in presenza di $20 \mu\text{C}$ P^{32}/ml per 120'.

Lo RNA estratto dalla frazione nucleare *a*) e dall'emobilizzato *b*) viene analizzato come nella fig. 1. La linea continua indica le densità ottiche, l'interrotta le conte per minuto.

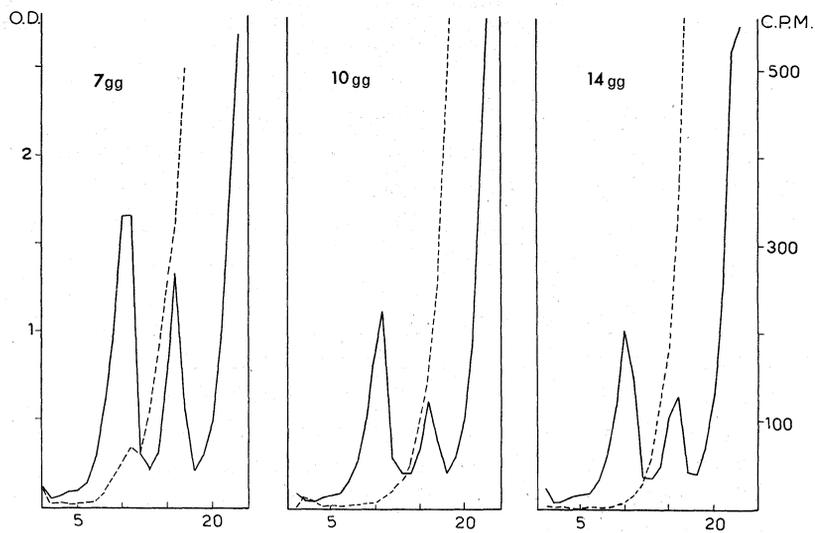


Fig. 3. - I globuli rossi da embrioni di sette, dieci e quattordici giorni vengono incubati in presenza di $1 \mu\text{C}$ di P^{32}/ml per cinque ore.

Lo RNA estratto viene analizzato come nella fig. 1. La linea continua indica le densità ottiche, l'interrotta le conte per minuto.

indicano che radioattività legata a RNA di tipo ribosomiale (28s) è dimostrabile in preparazione di globuli rossi da embrioni di sette giorni, mentre in preparazione di embrioni più avanzati la radioattività si trova legata solo alle frazioni dello RNA più leggere del 18s (fig. 3).

Alcuni esperimenti sono stati pure intrapresi per controllare se lo RNA di nuova sintesi venga utilizzato dalla cellula per la formazione di nuovi polisomi. È stata pertanto seguita la distribuzione di radioattività nel profilo di un gradiente di saccarosio di un emolizzato di globuli rossi da embrioni di 5 giorni incubati in presenza sia di Uridina H³ o di P³². Dopo un'ora di incubazione la radioattività è presente sia nella frazione polisomiale che monosomiale e un picco di radioattività è dimostrabile nella frazione più leggera dei monosomi.

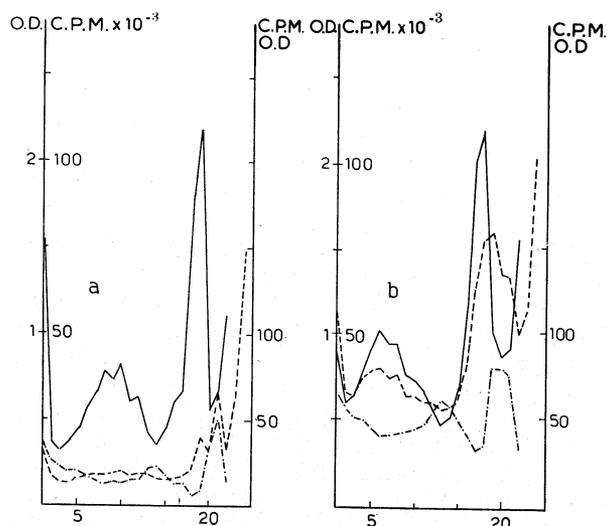


Fig. 4. - I globuli rossi da embrioni di 5 giorni vengono incubati in presenza di 100 μ C di uridina H³ per 1 ora *a*) o 3 ore *b*).

L'emolizzato è distribuito su un gradiente di saccarosio 15-30 per cento in KCl 10^{-2} M, MgCl₂ 10^{-3} M, Tris 10^{-2} 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. La linea continua indica le densità ottiche, l'interrotta le conte per minuto e la linea marcata con un tratto e un punto l'attività specifica.

Dopo tre ore di incubazione la radioattività nei polisomi aumenta mentre quella corrispondente alla frazione monosomiale viene mascherata da due alti picchi di radioattività la cui costante di sedimentazione è 60s e 40s.

DISCUSSIONE.

I nostri risultati indicano che la sintesi di RNA di tipo ribosomiale continua nei globuli rossi da noi studiati sino allo stadio di eritroblasti policromatofili tardivi, ancora presenti nel sangue circolante di embrioni di sette

giorni dimostrando in questo materiale una condizione simile a quella ritrovata da De Bellis et al. nei globuli rossi di coniglio [10].

Inoltre abbiamo dimostrato nei nuclei di globuli rossi di cinque o sei giorni la presenza di RNA ad alta attività specifica con costante di sedimentazione 45s e 35s che è considerato come precursore dell'RNA ribosomiale [11].

È stato suggerito [12] che la più alta attività specifica del 18s nel citoplasma rispetto a quella del 28s sia dovuta ad una asincronia da parte di queste due frazioni nel passare la membrana nucleare. Il fatto che l'attività specifica di queste due frazioni quando vengono estratte dalla preparazione nucleare è simile, indica invece la possibilità che la frazione 18s citoplasmatica sia contaminata da altre frazioni a rapida sintesi.

A questo proposito dobbiamo ricordare tra l'altro l'effetto stimolante la sintesi proteica *in vitro* da parte di una frazione con costante di sedimentazione 18s nel fegato di ratto [13]. È stato anche dimostrato che nell'embrione di riccio di mare la frazione 18s contiene RNA che si marca rapidamente e ha un altro rapporto A+U/G+C [14].

BIBLIOGRAFIA.

- [1] I. L. CAMERON e D. M. PRESCOTT, « Expt. Cell. Res. », 30, 610 (1963).
- [2] R. C. FRASER, « Expt. Cell. Res. », 25, 418 (1961).
- [3] J. B. LINGRELL e H. BORSOOCK, « Biochemistry », 2, 309 (1963).
- [4] P. A. MARKS, E. R. BURKA e D. SCHLESSINGER, « P.N.A.S. », 48, 2163 (1962).
- [5] P. A. MARKS, E. R. BURKA, E. M. CONCONI, W. PERL e R. RIFKIND, « P.N.A.S. », 53, 1437 (1965).
- [6] P. R. GROSS, L. I. MALKIN e M. HUBBARD, « J. Mol. Biol. », 13, 462 (1965).
- [7] W. K. ROBERTS, « B.B.A. », 108, 474 (1965).
- [8] F. J. BOLLUM, « J. Biol. Chem. », 234, 2733 (1959).
- [9] A. L. ROMANOFF, *The Avion embryo pag. 390*, The MacMillan Company, N. Y. 1960.
- [10] R. H. DE BELLIS, N. GLUCK e P. A. MARKS, « J. Clin. Invest. », 43, 1329 (1964).
- [11] R. P. PERRY, « National Cancer Institute Monography », n. 18, pp. 325 (1965).
- [12] M. GIRARD, H. LATHAM, S. PENMAN e J. E. DARNELL, « J. Mol. Biol. », 11, 187 (1965).
- [13] E. G. HENSHAW, M. ROVEL e H. H. HIATT, « J. Mol. Biol. », 14, 241 (1965).
- [14] G. GIUDICE e V. MUTOLO, « B.B.A. », 138, 276 (1967).