Atti Accademia Nazionale dei Lincei

Classe Scienze Fisiche Matematiche Naturali

Rendiconti

Silvio Ranzi

La determinazione embrionale nelle sue basi di biologia molecolare

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. **45** (1968), n.3-4, p. 173–179.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_45_3-4_173_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/

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Accademia Nazionale dei Lincei, 1968.

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Zoologia. — *La determinazione embrionale nelle sue basi di biologia molecolare* (*). Nota del Corrisp. SILVIO RANZI (**).

SUMMARY. — Results of previous research works of the author are discussed in relation to the more recent data. The aim is to present an actual status of the molecular embryology.

The transcription is a phenomenon that is acting during the embryonic determination.

In some embryonic areas cytoplasmic conditions induce the transcription related to the determination.

Amphibian neural inductors are substances of low molecular weight. These inductors are derepressors or induce the formation of the derepressors.

In sea urchin development it is possible to put in evidence a transcription corresponding to the animal pole rudiments and a transcription corresponding to the vegetal pole. These transcription processes are induced by the cytoplasm (denatured or stabilized proteins). The substances, that are able to change the determination, act on the cytoplasm.

Foreign nucleic acids enter and transform the cells.

Competence seems to be a particular kind of determination.

1. *Determinazione e competenza.* – L'embriologia sperimentale, in quasi un secolo di ricerche, ha dato un'idea a livello microscopico dei processi in atto durante lo sviluppo embrionale. Lo sviluppo della biochimica ha recentemente permesso di illustrare molti di questi processi da un punto di vista di biologia molecolare.

Scopo di questa Nota è pertanto di esaminare a livello molecolare due fenomeni fondamentali della embriologia, la determinazione e la competenza.

Una regione dell'embrione è determinata quando il suo valore prospettivo (*prospective Bedeutung*), e cioè quello che formerà nel normale sviluppo, coincide con la sua potenza prospettiva (*prospective Potenz*), e cioè con tutto quello che potrà formare se opportunamente trattata (1). Una regione dell'embrione non è, per contro, determinata quando la sua potenza prospettiva è più grande del valore prospettivo. Una simile condizione si osserva molto spesso nei più precoci stadi di sviluppo.

Una regione dell'embrione è invece competente per un dato sviluppo quando nella sua potenza prospettiva è inclusa la possibilità di essere influenzata da un'azione evocatrice e di orientare il suo sviluppo secondo questa azione.

(*) Pervenuta all'Accademia il 16 settembre 1968.

(**) Gruppo di ricerca per l'Embriologia del CNR presso il Laboratorio di Zoologia dell'Università statale di Milano.

(1) I termini sono di H. DRIESCH, *Philosophie des Organischen*, Leipzig, Engelmann 1909.

2. *Trascrizione e determinazione.* – In precedenti ricerche [2] osservammo che lo sviluppo dell'abbozzo cardiaco e del primo abbozzo dei vasi e del sangue dell'embrione di pollo non sono inibiti dall'actinomicina D e dalla daunomicina e cioè dagli antibiotici che inibiscono la formazione del RNA DNA–dipendente (trascrizione), se actinomicina D e daunomicina agiscono allo stadio di linea primitiva e cioè quando i due abbozzi sono già determinati. La puromicina invece, che inibisce la sintesi proteica a contatto del RNA (traduzione), può ancora bloccare lo sviluppo del cuore e dei vasi quando agisce allo stadio di linea primitiva.

Questi embrioni, trattati con actinomicina D, ovvero daunomicina a partire dallo stadio di linea primitiva o di piega cefalica trasversa, mostrano invece profonde inibizioni del processo di formazione del tubo neurale.

L'inibizione della trascrizione ha pertanto azione nulla, o quasi, su organi già determinati (cuore e sangue) mentre inibisce la determinazione in atto (sistema nervoso). Questo ci spinse a interpretare la trascrizione quale un fenomeno che avviene durante la determinazione embrionale dei primi organi dell'embrione di pollo.

Sembra che per quanto concerne la determinazione dei corrispondenti organi dell'embrione di anfibio si possa fare la stessa affermazione, perché Flickinger [3] ha visto simili inibizioni.

Si può concludere che nei casi osservati, *la trascrizione è fenomeno che avviene durante la determinazione* (fig. 1 *a*).

3. *Citoplasma e trascrizione.* – In alcuni casi si può porre in evidenza che questa trascrizione, che sempre coincide con la determinazione, viene indotta da particolari condizioni citoplasmatiche [4].

L'asse dorso ventrale dell'embrione di rana è determinato nell'uovo dall'entrata dello spermatozoo che, almeno negli esperimenti, induce la formazione della semiluna grigia [5]. Questa appare lungo il meridiano opposto a quello dove lo spermatozoo entra e, poiché la semiluna grigia corrisponde all'abbozzo della corda dorsale, l'abbozzo di questa è indotto dal punto di ingresso dello spermatozoo. Sono le proprietà dello speciale citoplasma, che forma la semiluna grigia, che inducono i fenomeni di trascrizione necessari per la determinazione della corda. In questo caso però, come in molti altri, per esempio quando l'actinomicina D blocca la gastrulazione della stella

(2) R. LEANI COLLINI e S. RANZI, « Atti Acc. Naz. Lincei (Mem. Sc. fis.) » [8] *8*, III, 47 (1967).

(3) R. A. FLICKINGER, « Science », *141*, 1063 (1963).

(4) La presente Nota che, in forma preventiva venne letta al Convegno dell'U.Z.I. del 1967 (S. RANZI, « Boll. Zoologia », *34*, 162, 1967), era già stesa quando è stato pubblicato: J. B. GURDON e H. R. WOODLAND, « Biol. Rev. », *43*, 233 (1968). Gli autori discutono il controllo citoplasmatico della trascrizione e portano alcuni esempi tra cui quello del lobo polare che è anche nella mia nota preventiva.

(5) Cfr. la recente revisione del problema in: J. CLAVERT in S. RANZI, *Symposium on the Germ Cells and Earliest Stages of Development*, p. 418 Fond. Baselli Istituto Lombardo 1961.

di mare [6], si possono fare due ipotesi. La prima è che la trascrizione interessa particolari geni, proprio quelli che corrispondono, nei casi in esame, alla corda o all'entoderma; la seconda che i geni interessati non sono così specifici [7] e che le proteine sintetizzate devono alle proprietà del citoplasma una particolare azione morfogenetica. Si pensi, per esempio, ad un enzima che viene formato in presenza di differenti substrati e che agisce in presenza di un substrato e non in presenza di un altro.

Un caso che sembra riconducibile al precedente è rappresentato dai primi stadi di sviluppo di *Ilyanassa*. Nell'uovo a 2 e 4 blastomeri di questo gasteropodo si osserva, sotto il quadrante D, il lobo polare. Se questo lobo

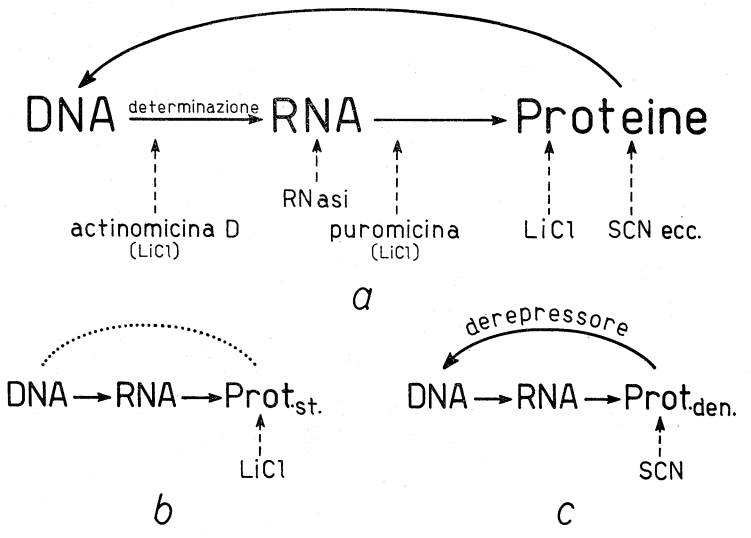

Fig. 1. – *a*) Schema di processi in atto durante la determinazione embrionale. Le frecce tratteggiate rappresentano i luoghi di azione delle sostanze prese in esame; *b*) Le proteine (Prot.st.) sono stabilizzate dal LiCl, almeno alcuni derepressori sembrano assenti; *c*) Le proteine (Prot.den.) sono denaturate, si formano derepressori.

viene asportato non si formano né organi di senso né entomesoderma. La cellula D forma larve con mesoderma e organi di senso ma, se privata del lobo polare, non presenta differenze di sviluppo dalle cellule A, B ovvero C che sono incapaci di formare mesoderma e organi di senso. In questo caso le ricerche di Davidson e collaboratori sarebbero riuscite a porre in evidenza un fenomeno di trascrizione che, in assenza del lobo polare, non ha luogo [8].

(6) C. BARROS, G. S. HAND JR. e A. MONROY, « Exp. Cell Res. », *43*, 167 (1966).

(7) Le ricerche di H. DENIS, « J. mol. Biol. », *22*, 285 (1966), mettono in evidenza la formazione durante la gastrulazione degli anfibi di un nuovo RNA a vita breve, ma non possono dire a quali sintesi questo RNA serva.

(8) E. H. DAVIDSON, G. W. HASLETT, R. J. FINNEY, V. G. ALLFREY e A. E. MIRSKY, « Proc. Nat. Ac. Sc. Washington », *54*, 696 (1965), cfr. però per alcune riserve sull'interpretazione J. B. COLLIER, « Courrent topics in developmental Biology », *1*, 39 (1966); d'altra parte C. CLEMENT e A. TYLER « Science », *158* 1457 (1967) dimostrano che il lobo polare isolato è sede di sintesi proteica.

La determinazione del quadrante D di *Ilyanassa* sarebbe così determinata dal citoplasma del lobo polare che indurrebbe la trascrizione. È questo cioè un altro caso nel quale un particolare citoplasma indurrebbe una particolare trascrizione, cui corrisponde una determinazione.

I due esempi addotti dimostrano che *esistono in alcune regioni dell'embrione condizioni citoplasmatiche che inducono la trascrizione necessaria per la determinazione.*

4. *Prima determinazione nei Vertebrati.* – Per quanto concerne la corda dorsale degli Anfibi i miei collaboratori ed io abbiamo dimostrato che le sostanze, che denaturano le proteine, producono un ingrandimento della corda dorsale ovvero inducono la formazione di corda dorsale in espianti ventrali [9]. Lo stesso risultato di ingrandimento della corda dorsale ha ottenuto Brachet [10] per azione della formamide che, come l'urea, rompe i ponti di idrogeno. Sembra più verisimile l'ipotesi che la denaturazione, interessando il citoplasma, liberi un derepressore che stimola il processo di trascrizione, ma non si può escludere che la sostanza denaturante agisca denaturando gli istoni, se questi sono i repressori dei geni. Un processo di trascrizione per la formazione della corda dorsale, fenomeno che avviene (o ha inizio) in stadio assai precoce, è indispensabile come è dimostrato dalla ricchezza di RNA del suo abbozzo e dal fatto che questo abbozzo è inibito dall'actinomicina D.

L'evocazione degli Anfibi, e cioè l'induzione di formazioni neurali a spese di ectoderma ventrale, che si può ottenere con un evocatore abnorme o con una sostanza chimica quale NaSCN, ci è apparsa in rapporto a una denaturazione proteica [11]. Vengono in questo caso indotte formazioni archencefaliche; tutto sembra dimostrare che la sostanza, che nel normale sviluppo entra nelle cellule competenti, è un catabolita che è in grado di denaturare le proteine. Viene così indotto l'archencefalo, che porta alla formazione del capo, da una sostanza che funziona da derepressore. Il problema è conoscere il livello al quale questo catabolita agisce denaturando. Tre possibilità sussistono: azione al livello del citoplasma liberando un derepressore; azione a livello degli istoni nucleari; azione al livello del DNA.

Il LiCl stabilizza le proteine, inibisce l'induzione e trasforma cellule dell'abbozzo cordale in cellule mesodermiche. Un tentativo per cercare di risolvere le questioni qui prospettate è stato fatto pertanto studiando comparativamente l'azione dell'actinomicina D, della daunomicina (che agisce come l'actinomicina D), della puromicina e del LiCl sullo sviluppo embrionale del pollo: e nelle alterazioni di sviluppo che queste sostanze sono in grado

(9) S. RANZI, « Adv. in Morphogenesis », *2*, 211 (1962). Sembra anche che l'urea sia in grado di indurre noduli di corda dorsale eterotopici nell'embrione di pollo: R. MARCONNET, *Action de l'urée sur le developpement embryonnaire du poulet*, présentée à la Faculté de Medicine Nancy 1962 (non altrimenti pubblicato).

(10) J. BRACHET, « Arch. Zool. Ital. », *51*, I, 395 (1966).

(11) S. RANZI, « Acc. Naz. Lincei: Problemi attuali di Scienza e Cultura », *104* (in stampa).

di produrre e nella loro azione sul meccanismo di sintesi proteica. Le alterazioni indotte da LiCl appaiono legate essenzialmente a una inibizione di movimenti morfogenetici che possiamo reputare correlati ai cambiamenti di viscosità che questo sale produce nel protoplasma. Si ottengono così mostri onfalocefali, ciclopi e platineuri [12]. Questi mostri non presentano chiare tracce di inibizione della sintesi proteica. Tutto sembra quindi indicare che il LiCl deprime, è vero, la trascrizione e la traduzione [13], ma si tratta di un fenomeno, probabilmente reversibile, legato al vasto alone di idratazione determinato dallo ione Li, quindi in definitiva non specifico.

Tornando all'induzione degli Anfibi bisogna ricordare l'esistenza dell'induttore mesodermico (spinocaudale) che Tiedemann [14] ha mostrato essere una proteina a basso peso molecolare. Questa proteina, entrando nelle cellule competenti, induce. Essa è quindi un derepressore o una sostanza che induce la formazione di un derepressore.

Gli induttori neurali degli Anfibi sono costituiti da sostanze con molecole relativamente piccole. Questi induttori sono o derepressori o sostanze che inducono la formazione di derepressori.

5. *Prima determinazione nei ricci di mare.* – Il primo sviluppo dell'uovo dei ricci di mare serve molto bene per lo studio della determinazione. NaSCN, acido o–iodosobenzoico, urea, ZnCl ed altre sostanze, che denaturano le proteine, inducono un ipersviluppo degli abbozzi che si formano al polo animale (animalizzazione). Questo ipersviluppo corrisponde a un cambiamento di determinazione in cellule che, nel normale sviluppo, formano entoderma. Il LiCl invece, e qualche altra sostanza che stabilizza le proteine, induce ipersviluppo degli abbozzi che si formano al polo vegetativo (vegetalizzazione) e cioè cambiamento di determinazione di cellule che dovrebbero fare ectoderma.

Gli abbozzi che compaiono al polo animale sono accompagnati da attiva trascrizione e questi abbozzi sono inibiti da actinomicina D.

Negli embrioni, nei quali per azione di LiCl dovrebbe svilupparsi un entoderma anormalmente grande, l'actinomicina D arresta lo sviluppo di questo entoderma, dimostrando che anche per questa determinazione è necessario un processo di trascrizione [15]. È qui interessante fare un parallelo con l'osservazione di Leone [16] che vide che blastule trattate con ribonucleasi si sviluppano senza entoderma. RNA è pertanto necessario allo sviluppo dell'entoderma: l'actinomicina D ne blocca la formazione, la ribonucleasi lo distrugge. Ambedue le azioni hanno lo stesso effetto: assenza di entoderma.

(12) R. LEANI COLLINI e S. RANZI, *op. cit.*

(13) M. LEONARDI CIGADA, R. MACI e F. DE BERNARDI, « Ist. Lombardo (Rend. Sc.) », *102* (in stampa).

(14) H. TIEDEMANN, « Current topics in develop. Biology », *1*, 85 (1966).

(15) J. RUNNSTRÖM e B. MARKMAN, « Biol. Bull. », *130*, 402 (1966).

(16) V. LEONE, « Acta Embryol. Morphol. exp. », *3*, 131 (1960).

Queste osservazioni permettono di comprendere il luogo di azione delle sostanze che inducono cambiamenti di determinazione embrionale. La determinazione, indotta dalle sostanze denaturanti le proteine, è inibita dall'actinomicina D che inibisce anche la determinazione indotta dalle sostanze stabilizzanti le proteine. Questo significa che il luogo di azione dell'actinomicina D e delle sostanze animalizzanti e vegetalizzanti è diverso. Poiché l'actinomicina D agisce al livello del DNA, ne segue che l'azione delle sostanze animalizzanti e vegetalizzanti è in sede diversa e cioè sulle proteine (fig. 1 *b*, *c*).

Nello sviluppo dell'uovo di riccio di mare si può porre in evidenza sia la trascrizione che corrisponde alla determinazione degli abbozzi che si formano al polo animale, sia la trascrizione che corrisponde alla formazione dell'entoderma. Tutto sembra dimostrare che queste trascrizioni vengono indotte da condizioni citoplasmatiche (proteine denaturate ovvero proteine stabilizzate). L'azione quindi delle sostanze che cambiano i processi di determinazione è sul citoplasma.

6. *Induzione e acidi nucleici.* – Gli induttori fin qui considerati non sono acidi nucleici. I virus (a DNA e a RNA) sono induttori costituiti da acidi nucleici che entrano nelle cellule e le modificano. In ricerche precedenti i miei Collaboratori ed io avevamo dimostrato che, impiantando estratti di ribonucleoproteine da fegato, muscolo scheletrico ecc. su membrana corioallantoidea di embrione di pollo, le cellule di questa si trasformano. Ribonucleoproteine di fegato inducono vescicole tappezzate da cellule cilindriche contenenti glicogeno; ribonucleoproteine di muscolo scheletrico inducono cellule allungate contenenti in qualche caso fibrille striate [17]. Abbiamo ripreso questi esperimenti ed abbiamo visto che la frazione ribosomica e polisomica, che può venir estratta dal fegato, è in grado di determinare la trasformazione in questione. Si tratta cioè di una trasformazione cellulare, determinata da RNA. Si noti bene però che questo fenomeno non concerne la determinazione embrionale, ma il citodifferenziamento, che avviene in un successivo stadio dello sviluppo, e che non abbiamo argomenti per dire che questo processo avviene nel normale citodifferenziamento. Esiste una induzione embrionale dovuta a RNA? Se è vero come i dati di Czihak [18] potrebbero indicare che l'RNA formato nei micromeri dell'embrione di riccio di mare passa nei macromeri inducendoli a differenziarsi in entoderma, sarebbe questo un esempio di tale processo.

Acidi nucleici estranei, entrando in cellule, le trasformano. Forse questo fenomeno si osserva nell'induzione dell'entoderma dei ricci di mare. Potrebbe anche avere una qualche importanza nella riparazione delle ferite.

(17) S. RANZI, G. LUCCHI GAVAROSI, M. PROTTI NECCHI e P. CITTERIO, «Monit. Zool. Ital.», *70–71*, 348 (1963).

(18) G. CZIHAK, H. G. WITTNANN e I. HINDENNACH, «Zeitschr. Naturf.», *22*, 1176 (1967).

7. *Competenza.* – Altra proprietà delle cellule embrionali è la competenza. Questa competenza ha inizio in un certo momento dello sviluppo e dura per un tempo limitato. La competenza corrisponde ad una forma di determinazione. La determinazione cioè che conferisce la possibilità di risentire di un particolare stimolo organizzativo. A questa prima determinazione segue una seconda che fa sparire la competenza, perché ormai il differenziamento cellulare è ulteriormente progredito. Quale sia il comportamento delle sintesi in questi processi è ancora da scoprire.

Si può omologare la competenza ad una particolare forma di determinazione.