

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

ANGELA ROCCHI BRASIELLO

**Variazioni degli istoni nucleari durante la  
spermiogenesi di *Asellus aquaticus***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 48 (1970), n.3, p. 365–368.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1970\\_8\\_48\\_3\\_365\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_48_3_365_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/>



### SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

**Citologia.** — *Variazioni degli istoni nucleari durante la spermiogenesi di Asellus aquaticus.* Nota di ANGELA ROCCHI BRASIELLO, presentata (\*) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — By means of cytochemical and staining techniques two changes have been observed in the type of nuclear basic proteins occurring during the last stages of spermatogenesis in *Asellus (Asellus) aquaticus* (Crust. Isopoda). The first occurs in the early spermatids: their nucleus becomes full of arginine rich histones; the second change, which occurs in the heads of the sperms just before maturation, consists in the complete loss of histones which are substituted by protamines.

Negli ultimi anni è stata attribuita agli istoni nucleari una notevole importanza, e sebbene non sia del tutto chiarita la loro funzione, sembra possibile che essi abbiano un qualche ruolo di regolatori genici. Sia gli istoni sia le protammine sono proteine di peso molecolare non molto alto, ricche in arginina e lisina e perciò altamente basiche; sono normalmente associate al DNA, fanno cioè parte del componente specifico dei cromosomi insieme ad una piccola quantità di RNA e a proteine non istoniche; non mostrano differenze significative nei vari tessuti di un determinato organismo, le loro proporzioni relative sono notevolmente costanti da una cellula all'altra, non sono comunque del tutto invariabili: le variazioni più notevoli sono state osservate nella spermiogenesi di alcuni animali e nei primi stadi dello sviluppo embrionale. In alcune specie, come in *Drosophila* [8, 9], nel topo [12, 13], negli ortotteri *Chortophaga viridifasciata* [5], *Schistocerca gregaria* [10] e in altre ancora gli spermi maturi contengono un istone nucleare ricco in arginina che si è sostituito, ad un certo punto della spermatogenesi, ai precedenti istoni somatici che sono ricchi in lisina. In altre specie avviene, durante la maturazione degli spermi, una ulteriore sostituzione e cioè agli istoni ricchi in arginina si sostituiscono delle protammine: ciò accade ad esempio in *Helix aspersa* [6] e in alcuni salmonidi [10, 11]. Esistono invece specie come *Rana pipiens* [4] nelle quali gli istoni degli spermi sono del tutto simili a quelli delle cellule somatiche.

È sembrato interessante, dopo aver condotto varie ricerche sulla sintesi degli acidi nucleici nella spermatogenesi di *Asellus aquaticus* [14, 15] studiare il comportamento degli istoni nucleari nell'ultima parte della spermatogenesi

(\*) Nella seduta del 14 marzo 1970.

di questo crostaceo, si è quindi cominciato affrontando il lavoro con le tecniche citochimiche, in attesa di completare la ricerca con l'uso di precursori radioattivi e di tecniche autoradiografiche.

#### MATERIALI E METODI.

Il lavoro è stato eseguito su gonadi di maschi di *Asellus* (*Asellus*) *aquaticus* (Crust. Isop.) raccolti in natura. Le gonadi sono state fissate per 3-6 h, con formalina neutra al 10 % (i soliti fissativi sono stati evitati perché contengono forti precipitanti delle proteine) tenute in acqua corrente per circa 12 h ed infine schiacciate in una goccia di acido lattico al 50 %, il vetrino è stato fatto saltare con la tecnica del ghiaccio secco. A questo punto i preparati sono stati divisi in tre serie e trattati come segue:

- a) idrolisi con acido tricloroacetico (TCA) al 5 % per 15' a 90°C e quindi colorazione con Fast Green portato a pH 8;
- b) idrolisi con TCA, come sopra, quindi trattamento con anidride acetica a 60° per 1 h e colorazione con Fast Green [2];
- c) colorazione con Fast Green o con Emallume di Mayer.

L'idrolisi con acido tricloroacetico a 90°C estrae gli acidi nucleici permettendo una migliore colorazione delle proteine e asporta nello stesso tempo quasi completamente le protammine che sono in esso solubili; poiché a pH 8 i gruppi più responsabili della colorazione con Fast Green sono i gruppi guanidinici dell'arginina e gli  $\epsilon$ -amino gruppi della lisina, nella prima serie di preparati (a) la colorazione nucleare è soprattutto a carico degli istoni ricchi in arginina e di quelli ricchi in lisina. Il trattamento con anidride acetica altera gli  $\epsilon$ -amino gruppi della lisina, di conseguenza nella seconda serie di preparati (b) sono soprattutto responsabili della colorazione nucleare gli istoni ricchi in arginina.

L'ultima serie (c) è stata fatta per controllo perché anche se gli acidi nucleici interferiscono competitivamente con la colorazione delle protammine, esse comunque mantengono un certo grado di colorabilità con Fast Green a pH 8; perciò confrontando questa serie di preparati con le altre si può avere qualche informazione sulla presenza di eventuali protammine negli spermii.

#### RISULTATI E DISCUSSIONE.

I trattamenti citochimici descritti sopra hanno permesso di mettere in evidenza la presenza dei vari tipi di istoni nelle cellule spermatogenetiche e nelle cellule nutrici di *Asellus*, l'attenzione si è comunque appuntata soprattutto sulla spermiogenesi dove appunto avvengono i cambiamenti più grossi.

Il trattamento con TCA porta come conseguenza più vistosa il fatto che le teste degli spermii maturi perdono ogni capacità di colorarsi con Fast Green

(figg. 1 e 2); gli spermatozoi non completamente maturi mantengono una leggera colorazione, gli spermatidi sono colorati normalmente (fig. 3) così come i nuclei di ogni altro tipo di cellula nutrice e spermatogenetica. Queste osservazioni inducono a ritenere che in *Asellus* gli spermatozoi maturi contengono protammine e che il cambiamento istoni → protammine avvenga proprio nell'ultima parte della spermiogenesi, durante il periodo di allungamento della testa dello spermio. Poiché questo trattamento non influenza gli istoni ricchi in lisina né quelli ricchi in arginina, i nuclei di tutte le altre cellule si colorano normalmente, dimostrando di possedere questi istoni in notevole quantità. Sia i nuclei intercinetici sia i cromosomi profasici e metafasici mostrano esattamente la stessa morfologia di quelli fissati e colorati per mettere in evidenza il DNA (fig. 4).

Sembra chiaro quindi che dove c'è DNA ci sono istoni in proporzioni ben definite; è infatti opinione di molti Autori che non ci siano segmenti di DNA nudi. I nuclei delle cellule nutrici contengono quasi sempre due o più cariosomi più intensamente colorati del resto del nucleo (fig. 4). Il trattamento con anidride acetica dopo idrolisi con TCA porta ad una diminuita colorazione dei nuclei di molti tipi di cellule, ciò che rende abbastanza netta la differenza di colorazione tra spermatidi più giovani e meno giovani. Si può quindi pensare che i secondi contengano molti più istoni ricchi in arginina rispetto ai primi, i quali evidentemente contenevano in gran parte quelli ricchi in lisina che sono ora andati perduti col trattamento con anidride acetica (figg. 5 e 6).

In conclusione sembra che nell'ultima parte della spermatogenesi ci siano due notevoli variazioni nel tipo di istoni nucleari: la prima riguarda gli spermatidi precoci, e porta il nucleo di queste cellule a caricarsi di istoni ricchi in arginina mentre in precedenza erano soprattutto carichi di istoni ricchi in lisina; la seconda riguarda la testa degli spermatozoi non ancora maturi, che si caricano esclusivamente di protammine. È molto probabile che questo ultimo cambiamento coincida proprio con il raggiungimento della maturità degli spermatozoi. In attesa di completare la ricerca con l'uso di precursori radioattivi si deve comunque ritenere, come riportato da vari Autori per altri animali, che le variazioni descritte siano vere e proprie sintesi di nuove proteine; queste avverrebbero praticamente in assenza di sintesi di RNA, la quale, come abbiamo potuto osservare in un precedente lavoro [14], termina allo stadio di profase dello spermatozoo primario.

Il significato biologico di tali variazioni non è molto chiaro: molte sono le ipotesi avanzate dai vari Autori [3, 4] ma nessuna ha trovato sinora una chiara conferma; l'ipotesi più suggestiva e in parte anche provata [7] è che gli istoni siano dei repressori genici (seppure generici, dato che non è stato per ora possibile dimostrare una loro stretta specificità) e che quindi questi cambiamenti servano a regolare l'attività genica e in special modo a rendere il nucleo dello spermio incapace di sintetizzare RNA.

È stato però dimostrato che *in vitro* gli istoni ricchi in arginina e le protammine sono deboli inibitori della trascrizione [11].

## BIBLIOGRAFIA.

- [1] ALFERT M. (1956). - *Chemical differentiation of nuclear proteins during spermatogenesis in the salmon*. « J. Biophys. Biochem. Cytology », 2, 109-114.
- [2] ALFERT M. e GESCHWIND F. (1953). - *A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei*. « Proc. Natl. Acad. Sci., U.S. », 39, 991-999.
- [3] BLOCH D. P. (1966). - *Cytochemistry of the histones*. « Protoplasmatologia », 5, 1-56.
- [4] BLOCH D. P. (1969). - *A catalog of sperm histones*. « Genetics, Suppl. », 61, 93-111.
- [5] BLOCH D. P. e BRACK S. D. (1964). - *Evidence for the cytoplasmic synthesis of nuclear histone during spermiogenesis in the grasshopper Chortophaga viridifasciata (De Geer)*. « J. Cell Biol. », 22, 327-340.
- [6] BLOCH D. P. e HEW H. Y. C. (1960). - *Changes in nuclear histones during fertilization and early embryonic development in the pulmonate snail Helix aspersa*. « J. Biophys. Biochem. Cytol. », 8, 69-81.
- [7] BONNER J., DAHMUS M. E., FAMBROUGH D., HUANG R. C., MARUSHIGE K. e TUAN D.Y.H. (1968). - *The biology of isolated chromatin*. « Science », 159, 47-54.
- [8] DAS C. C., KAUFMANN B. P. e GAY H. (1964 a). - *Histone-protein transition in Drosophila melanogaster. I. Changes during spermatogenesis*. « Exptl. Cell Res. », 35, 507-514.
- [9] DAS C. C., KAUFMANN B. P. e GAY H. (1964). - *Autoradiographic evidence of synthesis of an arginine rich histone during spermiogenesis in Drosophila melanogaster*. « Nature », 204, 1008-1009.
- [10] DAS N. K., SIEGEL E. P. e ALFERT M. (1965). - *Synthetic activities during spermatogenesis in the locust*. « J. Cell Biol. », 25, 387-395.
- [11] HUANG R. C., BONNER J. e MURRAY K. (1964). - *Physical and biological properties of soluble nucleohistones*. « J. Mol. Biol. », 8, 54-64.
- [12] MONESI V. (1965). - *Autoradiographic evidence of a nuclear histone synthesis during mouse spermiogenesis in the absence of detectable quantities of nuclear ribonucleic acid*. « Exptl. Cell Res. », 36, 683-688.
- [13] MONESI V. (1965). - *Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse. RNA and protein*. « Exptl. Cell Res. », 39, 197-224.
- [14] ROCCHI BRASIELLO A. (1968). - *Autoradiographic study of ribonucleic acid synthesis during spermatogenesis of Asellus aquaticus (Crust. Isopoda)*. « Exptl. Cell Res. », 53, 252-260.
- [15] ROCCHI BRASIELLO A. e VITAGLIANO TADINI G. (1969). - *Autoradiographic study of spermatogenesis in Asellus aquaticus during reproductive stasis*. « Caryologia », 22, 323-330.

## SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Preparato trattato con TCA e colorato con Fast Green. Gli spermii hanno perso ogni capacità di colorarsi.
- Fig. 2. - Spermii come appaiono normalmente senza il trattamento con TCA.
- Fig. 3. - Preparato trattato con TCA e colorato con Fast Green. La testa degli spermii appare non colorata, gli spermatidi sono invece normalmente colorati.
- Fig. 4. - Preparato trattato con TCA e colorato con Fast Green. Metafase meiotica I normalmente colorata e cellule nutrici con cariosomi più intensamente colorati del resto del nucleo.
- Fig. 5 e 6. - Preparati trattati con TCA e con anidride acetica. Gli spermatidi hanno mantenuto la loro colorazione mentre le altre cellule spermatogenetiche e nutrici appaiono scarsamente colorate.

