
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ELEONORA PATRICOLO, CATERINA
MANSUETO-BONACCORSO

**Gli effetti di alcuni amino acidi sullo sviluppo delle
uova di *Ciona intestinalis***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 48 (1970), n.6, p. 690–696.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_48_6_690_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. — *Gli effetti di alcuni amino acidi sullo sviluppo delle uova di Ciona intestinalis* (*). Nota di ELEONORA PATRICOLO e CATERINA MANSUETO-BONACCORSO (**), presentata (***) dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — The action of proline and its analogues (Hydroxyproline and pipecolic acid), glycine, sarcosine and histidine has been tested on the eggs of *Ciona intestinalis*, before and after fertilization. It has also been investigated by autoradiography if proline- H^3 , sarcosine- C^{14} and histidine- C^{14} are incorporated.

The amino acids used do not exert any action on the unfertilized egg even after a treatment for twelve hours. However, in the developing egg, they exert their influence at early tailbud stage, giving rise to larvae with abnormalities which are mainly localized in the notochord. Histidine produces generalized abnormalities.

Histidine is incorporated in the unfertilized egg; the other amino acids instead are not incorporated in the unfertilized egg but are abundantly taken up in early tail-bud stage.

Nell'uovo di Ascidie alcune ricerche riguardanti gli amino acidi liberi, hanno mostrato:

a) che il pool cambia quantitativamente lungo lo sviluppo [1]; b) che la utilizzazione di tali amino acidi aumenta progressivamente durante l'accrescimento embrionale; c) che l'aggiunzione al mezzo di cultura di determinate concentrazioni di L-cisteina, istidina, fluorotriptofano, fluorofenilalanina e nitrofenilalanina causa anomalie nelle larve che si sviluppano [2], [3]. Continuando tali ricerche abbiamo esaminato su tali uova l'azione della prolina e suoi analoghi (idrossiprolina e acido pipecolico), della glicina, della sarcosina e della istidina. Mediante tecnica autoradiografica è stata ulteriormente verificata la penetrazione degli amino acidi usati e la loro incorporazione.

MATERIALI E METODI.

Le uova di *Ciona intestinalis*, sia vergini che fecondate, e queste a diversi stadi di sviluppo sono state poste in acqua di mare addizionata, rispettivamente, di DL-prolina, e acido DL-pipecolico-HCl, alle concentrazioni di 0.1 M, 0.08 M, 0.05 M; di sarcosina-HCl a concentrazioni di 0.1 M, 0.05 M e 0.01 M; di glicina 0.1 M, e di L-istidina 0.1 M. Il pH fu sempre aggiustato a 7,8. I trattamenti sono stati continui a partire dallo stadio di uova appena fecondate fino a larva, o interrotti a diversi stadi e per brevi periodi. Si è tenuto conto solo dei lotti i cui controlli hanno dato larve natanti almeno

(*) Lavoro eseguito presso l'Istituto di Zoologia della Università di Palermo.

(**) Ricercatore del C.N.R.

(***) Nella seduta del 13 giugno 1970.

per il 90 %. Un'altra serie di controlli fu costituita da uova immesse in acqua di mare addizionata di 0.1 M NaCl. Per la ricerca autoradiografica furono usate L-prolina- H^3 (concentrazioni 0.03 mM in acqua di mare con attività specifica 20 μ C/ml); L-sarcosina- $I-C^{14}$ (concentrazione 0.02 M att. spec. 8 μ C/ml); L-istidina- C^{14} (concentrazione 0.0005 M, att. spec. 10 μ C/ml). Le uova furono incubate per tempi diversi in questi amino acidi, successivamente lavate in soluzione di corrispondenti amino acidi non marcati, fissate in alcool acetico, tagliate a 7 μ e soggette alle normali tecniche istologiche. Le sezioni furono ricoperte con film Kodak AR 10. I tempi di esposizione variarono da un minimo di tre giorni a un massimo di 58. Dopo il trattamento fotografico le sezioni furono colorate con il verde di metil-pironina ⁽¹⁾.

RISULTATI.

I Parte ⁽²⁾

I) TRATTAMENTO CON DL-PROLINA (0.1 M).

1) *Trattamento continuo.*

a) uova *vergini*: trattamento da due a dodici ore. Dopo fecondazione le uova si sviluppano in modo del tutto normale.

b) uova *fecondate* (15 minuti dopo la fecondazione, o allo stadio di due blastomeri) lasciate continuativamente nella soluzione. Si segmentano in modo tipico, però danno larve profondamente anomale. Le anomalie sono a carico soprattutto della coda che è corta, tozza e ricurva; ciò è da imputarsi terminalmente alla coda le cui cellule sono dissestate e parzialmente fuse: a conseguenza di ciò si formano grossi vacuoli soprattutto alla base della coda (fig. 2). Anche le cellule muscolari risultarono iposviluppate: il movimento delle larve risultò conseguentemente ridotto. Lo sviluppo avvenne con ritardo rispetto ai controlli e così pure la metamorfosi.

2) *Trattamento parziale.*

a) Dallo stadio di *due blastomeri* fino a gastrula, o neurula, o bottone codale. Si hanno larve completamente normali.

b) Trattamento limitato al solo *periodo della gastrulazione*, rispettivamente della *neurulazione*, del *bottone codale*. Anche in questo caso si hanno larve normali.

(1) DL-prolina, Idrossi-L-prolina, Acido-DL-pipecolico-HCl, L-istidina, sono stati forniti dalla Sigma Chemical Company; Glicina, dalla Eastman Organic Chemicals; Prolina- H^3 , Sarcosina- $I-C^{14}$ e istidina- C^{14} sono state fornite dal Radiochemical Centre, Amersham, England.

(2) Agli esperimenti con la DL-prolina e suoi analoghi ha collaborato la Sig.na M. Campana.

c) Trattamento compreso tra lo stadio di *bottone codale iniziale* e la *larva pronta per la schiusa*. Le larve che si sviluppano sono profondamente anomale, come sopra descritto (fig. 2).

d) Il trattamento esercitato a partire da bottone codale molto avanzato o da larva appena arrotolata non produce anomalie di sorta.

Questi dati portano a concludere che vi è un periodo dello sviluppo particolarmente sensibile all'azione della prolina; tale periodo è quello compreso tra fine neurula e la larva arrotolata.

II) TRATTAMENTO CON GLI ANALOGHI DELLA PROLINA.

1) *Idrossi-L-prolina* (0.1 M).

Per gli stessi tempi che nel trattamento con la prolina si ottengono le stesse anomalie sopra descritte (fig. 3) o anche più marcate.

2) *Acido-DL-pipecolico-HCl*.

Per la concentrazione 0.1 M il trattamento portato sulle uova appena fecondate o a due blastomeri blocca la segmentazione.

Per soluzioni 0.08 M in tutti gli esperimenti si hanno risultati del tutto uguali a quelli ottenuti con la DL-prolina e la idrossi-L-prolina.

III) TRATTAMENTO CON GLICINA (0.1 M).

Se il trattamento è fatto nel periodo compreso tra lo stadio di bottone codale e larva si ottengono larve con coda gibbosa, ricurva, accorciata; il movimento è ridotto.

Il tronco risulta leggermente tozzo e nella maggioranza dei casi gli organi di senso risultano fusi.

IV) TRATTAMENTO CON SARCOSINA-HCl.

1) 0.01 M sulle uova fecondate: non si riscontra alcun effetto.

2) 0.05 M sulle uova allo stadio di due blastomeri. Si ha segmentazione e sviluppo fino a bottone codale; le larve che ne risultano sono però anomale, non escono dalle membrane; presentano organi di senso esterni, code tozze, palpi ridotti.

3) 0.1 M:

a) Il trattamento delle uova vergini per quattro ore non produce alcun effetto.

b) Il trattamento portato sulle uova fecondate rende la segmentazione anomala.

c) Il trattamento portato su uova allo stadio di due blastomeri e continuato fino a larva produce larve mostruose.

d) Il trattamento portato sulle uova a partire dallo stadio di 16 blastomeri produce larve con rilevanti anomalie: organi di senso esterni, palpi poco pronunziati; coda corta, grossa, storta (a manubrio) cellule cordali fuse (fig. 4): le anomalie sono in tutto simili a quelle riscontrate nelle larve trattate con prolina e glicina.

e) Nel caso di trattamento per intervalli comprendenti rispettivamente la gastrulazione, la neurulazione, il bottone codale fino a larva, solo in questo ultimo caso si hanno larve anomale.

V) TRATTAMENTO CON ISTIDINA (0.1 M)

Il trattamento portato sulle uova subito dopo la fecondazione e fino a larva, produce anomalie generalizzate: tronco tozzo, code ricurve, prive di movimento.

Il trattamento delle uova vergini per quattro ore, delle uova a due blastomeri fino a neurula iniziata, degli embrioni allo stadio di gastrula, non produce alcuna anomalia. Gli embrioni trattati dallo stadio di neurula fino a larva danno origine a larve anomale senza movimento, con code ricurve, tronco completo ma più tozzo di quello dei controlli.

In conclusione la istidina esercita la sua azione nel periodo posteriore alla neurulazione, e interessa tutti i sistemi della larva.

II Parte.

Le ricerche ora esposte mettono in luce l'azione sullo sviluppo embrionale di alcuni amino acidi e loro analoghi. È naturale pensare che questa azione si espliciti attraverso qualche alterazione metabolica da essi prodotta: per affermare ciò è, però, necessario dimostrare che le sostanze impiegate realmente penetrino nell'interno dell'uovo o delle cellule da esso derivate. Questa assicurazione può essere fornita trattando le uova con amino acidi marcati.

A) L-prolina- H^3 (att. spec. 20 $\mu C/ml$, conc. 0.03 mM):

Il trattamento fu condotto per tre ore su uova vergini e per un'ora e 30 minuti per tutti gli altri stadi. I risultati furono i seguenti:

- a) uova vergini: nessuna incorporazione
- b) uova allo stadio di 4-8 blastomeri: incorporazione scarsa
- c) embrioni allo stadio di gastrula e di neurula iniziale: tutti i territori incorporano (l'incorporazione è prevalentemente a carico del nucleo) (fig. 5).
- d) embrioni allo stadio di fine neurula: incorporazione, ma meno intensa che nella gastrula: tutti i territori incorporano, poco l'entoderma.
- e) embrioni allo stadio di bottone codale iniziale: l'incorporazione è molto intensa in tutti i territori: la radioattività è presente tanto nei nuclei quanto nel citoplasma.

Minore attività si ha nell'entoderma (figg. 6-7). Ai bordi delle cellule cordali si nota un particolare addensamento di granuli (fig. 6).

B) Sarcosina-L-C¹⁴ (att. spec. 8 μ C/ml, conc. 0.02 M).

Le uova vergini incubate per quattro ore e le uova ai primi stadi di sviluppo (da due blastomeri a 16 blastomeri, 1 ora e 15 minuti) non incorporano.

Gli embrioni trattati a gastrula incorporano debolmente: tutti i territori incorporano con uguale intensità.

Gli embrioni incubati da neurula iniziale a bottone codale incorporano; tutti i territori risultano marcati: più il sistema nervoso e quello mesenchimale (fig. 8): l'entoderma dimostra scarsa incorporazione.

C) Istidina-C¹⁴ (att. spec. 10 μ C/ml; conc. 0.0005 M).

Le uova vergini incubate per tre ore incorporano (fig. 9). Allo stadio di 8 blastomeri la incorporazione è abbondante: le tracce sono in maggiore quantità nelle zone pironofile dei singoli blastomeri, attorno ai nuclei in divisione (fig. 10).

Negli embrioni trattati per tutta la gastrulazione e la neurulazione, il sistema nervoso, il mesenchima e la muscolatura presentano incorporazione intensa (fig. 11).

DISCUSSIONE.

Da quanto sopra esposto possono trarsi le seguenti conclusioni:

1) L'uovo vergine, anche se lasciato a lungo nelle soluzioni degli amino acidi usati, incorpora solo la istidina non gli altri amino acidi.

Questo fatto può essere espressione di un metabolismo molto scarso; al quale, in ogni caso provvede con il pool in dotazione.

2) L'incorporazione è molto attiva, invece, nell'uovo in sviluppo. La istidina è incorporata in tutti gli stadi a partire dall'uovo fecondato: la sarcosina e la prolina a gastrula (debolmente) e soprattutto a bottone codale: della glicina fu riferito in un lavoro precedente [4]. Questi risultati spiegano le anomalie riscontrate nelle larve trattate.

3) Sorge ora il problema del meccanismo responsabile di dette anomalie: al proposito vanno fatti i seguenti rilievi.

La prolina è un amino acido tipico del collagene; nei Cordati si rinviene nella corda. Deuchar [5] in *Xenopus laevis* ha mostrato che le cellule della corda sintetizzano attivamente collagene e che tale sintesi è preceduta da una demolizione delle proteine ricche in prolina, durante la gastrulazione. Che un eccesso di prolina produca gravi anomalie della corda può essere spiegato col fatto noto che gli amino acidi ed elevate concentrazioni, esercitano effetti deprimenti sulla crescita di certi organismi [6]; tale depressione, a sua volta, può determinare uno squilibrio nel pool e la conseguente mancata utilizzazione di qualche altro amido acido; ovvero col fatto della messa in atto di un meccanismo inibitore di controllo sulla biosintesi dell'amino acido stesso.

L'effetto degli analoghi della prolina (idrossiprolina e acido pipecolico) è più facile a spiegarsi: questi analoghi competono con la prolina. Che la idrossiprolina libera sia antagonista della prolina e inibisca la crescita degli animali e delle piante è dimostrato da diverse esperienze [7-9]. L'effetto antagonistico può causare riduzione della sintesi proteica; interferenza con l'idrossilazione della prolina; diretta incorporazione della idrossiprolina con conseguente produzione di proteine non funzionali [10]. L'acido pipecolico, l'omologo superiore della prolina, è inibitore solo a forti concentrazioni [11, 10]; nelle uova di riccio di mare Lallier [12] ha riscontrato insorgenze di lievi anomalie a forti concentrazioni. Alle concentrazioni usate da Lallier noi abbiamo avuto blocco della segmentazione.

Per quanto riguarda la glicina con la quale abbiamo ottenuto le stesse anomalie della prolina, va rilevato che anch'essa è un componente essenziale del collagene.

L'effetto della sarcosina è difficile a spiegarsi dato che essa non viene incorporata nelle proteine dell'uovo [1]. Probabilmente la traccia autoradiografica che qui si è riscontrata è dovuta a glicina in cui essa sembra convertirsi [13-15]: di fatto le anomalie provocate da essa sono simili a quelle prodotte dalla glicina.

Per quanto riguarda la istidina le cui anomalie interessano tutti i sistemi, va rilevato che Reverberi [2] in concentrazioni lievi (0.01 M) ha ottenuto larve normali ma prive di movimento. Questo risultato potrebbe essere in relazione con il fatto che la istidina- C^{14} è stata riscontrata in forti quantità nella muscolatura. Probabilmente l'istidina è un amino acido abbondante nelle proteine delle cellule muscolari.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] U. FERRINI, L. M. MARCANTE, A. CAPUTO, S. MINAFRA e G. REVERBERI, « Ric. Sci. », 34 (II-B), 213 (1964).
- [2] G. REVERBERI, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », 8, 132 (1965).
- [3] A. M. FIASCONARO, « Ric. Sci. », 35, (II-B) 387 (1965).
- [4] C. MANSUETO, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », 5, 135 (1962).
- [5] E. M. DEUCHAR, « Acta Embryol. Morphol. Exper. », 7, 49 (1964).
- [6] W. SHIVE e C. G. SKINNER, in: *Metabolic Inhibitors*, R. M. Hochster & J. H. Quastel Eds., Vol. I, p. 2. Acad. Press, London, 1963.
- [7] J. HOLLEMAN, « Proc. Nat. Acad. Sci. », 57, 50 (1967).
- [8] F. C. STEWARD e J. POLLARD, « Nature (London) », 182, 828 (1958).
- [9] R. CLELAND, « Nature (London) », 200, 908 (1963).
- [10] L. FOWDEN, D. LEWIS e H. TRISTRAM, « Adv. Enzymol. », 29, 89 (1967).
- [11] L. FOWDEN, S. NEALE e H. TRISTRAM, « Nature (London) », 199, 35 (1963).
- [12] R. LALLIER, « Exptl. Cell. Res. », 40, 630 (1965).
- [13] W. G. GORDON e R. W. JACKSON, « J. Biol. Chem. », 110, 151 (1935).
- [14] L. D. ABBOTT e H. B. LEWIS, « J. Biol. Chem. », 131, 479 (1939).
- [15] K. BLOCK e R. SCHOENHEIMER, « J. Biol. Chem. », 135, 99 (1940).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

TAVOLA I.

Fig. 1. - Controlli.

Fig. 2. - Larve ottenute dopo trattamento con prolina 0.1 M a partire dallo stadio di neurula.

Fig. 3. - Larve ottenute dopo trattamento con idrossiprolina 0.1 M a partire dallo stadio di bottone codale.

Fig. 4. - Larve ottenute dopo trattamento con sarcosina 0.1 M a partire da 16 blastomeri.

TAVOLA II.

Fig. 5. - Gastrula, sezione trasversale (trattamento con prolina- H^3).

Fig. 6. - Bottone codale, sezione parasagittale (trattamento con prolina- H^3).

Fig. 7. - Bottone codale, sezione frontale (trattamento con prolina- H^3).

Abbreviazioni: *c* = cellule cordali; *i* = intestino; *m* = cellule muscolari; *me* = cellule mesenchimali;
n = tessuto neurale.

TAVOLA III.

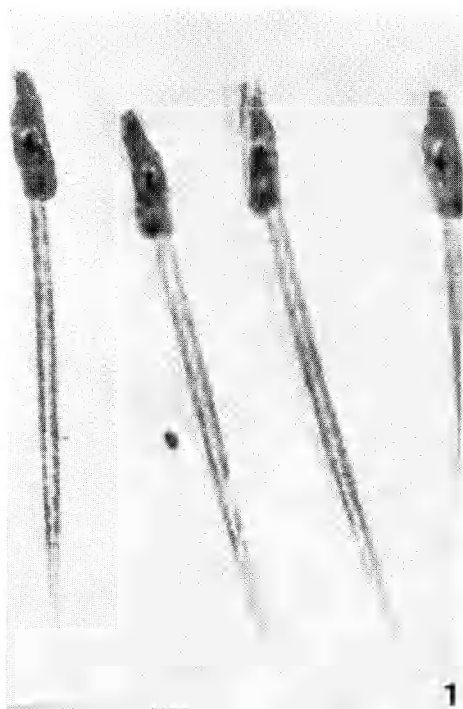
Fig. 8. - Bottone codale (trattamento con sarcosina- C^{14}), sezione frontale inclinata in senso dorso ventrale.

Fig. 9. - Uovo vergine (trattamento con istidina- C^{14}).

Fig. 10. - Stadio di 8 blastomeri (trattamento con istidina- C^{14}).

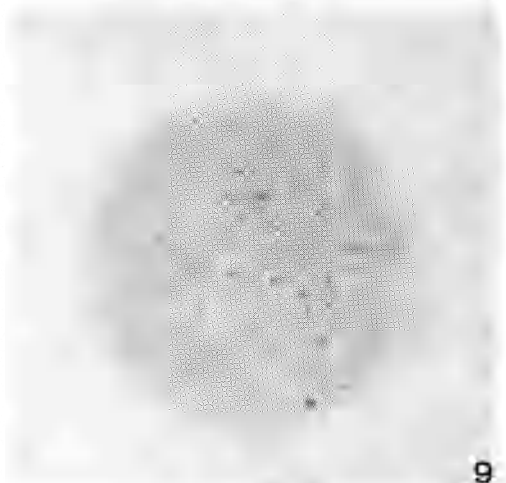
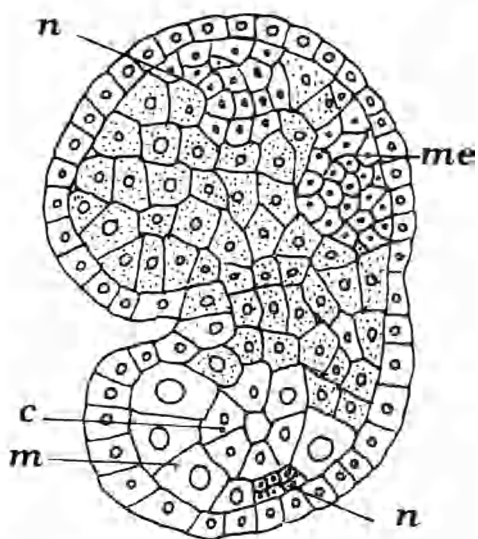
Fig. 11. - Bottone codale (trattamento con istidina- C^{14}) sezione frontale.

Abbreviazioni come in Figg. 5-7.

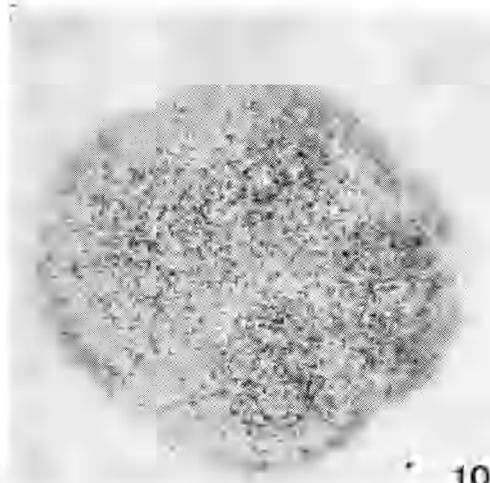




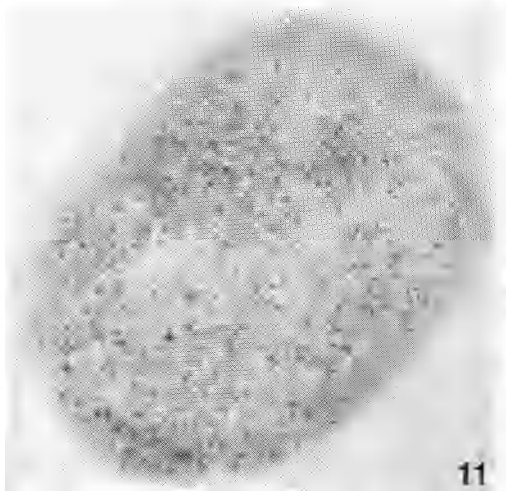
8



9



10



11

