
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

DELIO PETRUCCI, DARIO BOTTI, CLAUDIO PANTANI

Profili enzimatici mitocondriali di ovario, fegato e cuore di Bufo

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 57 (1974), n.3-4, p. 280-284.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1974_8_57_3-4_280_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/>

Biologia generale. — *Profili enzimatici mitocondriali di ovario, fegato e cuore di Bufo.* Nota (*) di DELIO PETRUCCI, DARIO BOTTI e CLAUDIO PANTANI, presentata dal Socio P. PASQUINI.

SUMMARY. — The liver, heart and large oocytes mitochondria of *Bufo bufo* were isolated by differential centrifugation and purified on density gradient. These mitochondria showed a different enzymatic profile. The mitochondrial enzymatic profile of oocytes resulted similar to that of embryos at early stages.

This finding substantiates the hypothesis that the peculiar mitochondrial population existing in the early stages of embryonic development arises from vitellogenesis.

In precedenti ricerche su mitocondri di *B. bufo* [1] abbiamo dimostrato che l'attività specifica della citocromo ossidasi, COX, si mantiene pressoché costante nel corso dello sviluppo embrionale. I mitocondri degli embrioni presentano un'attività specifica della COX comparabile a quella dei mitocondri di fegato, ma nettamente inferiore a quella dei mitocondri di cuore. Le attività specifiche della isocitrico deidrogenasi specifica per il TPN, ICDH (TPN⁺), e della succinico citocromo *c* ossidoreduttasi, tendono invece ad aumentare progressivamente nel corso dello sviluppo embrionale. Tali attività specifiche risultano, nei primi stadi dello sviluppo, notevolmente inferiori a quelle dei mitocondri di fegato e di cuore dell'adulto. Al contrario l'attività specifica della MDH è più alta nei primi stadi dello sviluppo e manifesta una netta diminuzione allo stadio di circolazione nelle branchie. L'adenilato cinasi, che nei mitocondri degli embrioni presenta attività specifica circa 30 volte maggiore di quella dei mitocondri del cuore e del fegato, si mantiene pressoché costante nell'intero corso dello sviluppo.

Tali osservazioni dimostrano chiaramente che nel corso del citodifferenziamento si avvicendano popolazioni mitocondriali differenti per i loro profili enzimatici.

Nello stesso lavoro è stato visto che la popolazione mitocondriale caratteristica degli stadi preneurulari è già presente nelle uova mature. Trascurabile risulta l'apporto dello spermatozoo.

In queste ricerche ci proponiamo in particolare di stabilire se detta popolazione mitocondriale risulti già insediata nei grossi oociti melaninizzati, prima della maturazione dell'uovo. Le attività enzimatiche sono state comparate a quelle dei mitocondri di fegato e di cuore, determinate nelle stesse condizioni, assunte come paradigma.

(*) Pervenuta all'Accademia il 25 settembre 1974.

MATERIALI E METODI

I mitocondri di fegato e di cuore furono isolati come è descritto nel precedente lavoro [1].

Per quanto riguarda l'ovario, i mitocondri vennero isolati prevalentemente dagli oociti grandi, melaninizzati, al termine della vitellogenesi, operando l'omogenizzazione delicatamente con un potter di larga « clearance » (1 mm) ad evitare la rottura dell'epitelio follicolare, degli oociti piccoli trasparenti, previtellogenetici e di quelli medi, bianchi avorio, all'inizio della vitellogenesi. L'omogenato fu preparato in saccarosio 0,5 M K-EDTA 10^{-3} M pH 7,4 alla concentrazione del 20-30 % (peso organo/volume totale) e filtrato attraverso maglia di nylon con fori di 0,4-0,5 mm. I mitocondri vennero isolati mediante centrifugazione differenziale e purificati in gradiente di densità di saccarosio secondo il metodo descritto nel precedente lavoro [1].

La COX, la succinico citocromo *c* ossidoreduttasi, la ICDH (TPN⁺) la MDH, la adenilato cinasi e la GOT furono determinate spettrofotometricamente secondo i metodi già descritti [1]. Parziale modifica fu apportata per la determinazione della succinico citocromo *c* ossidoreduttasi, aggiungendo il KCN al sistema reattivo dopo l'avvio della reazione, e per quella dell'adenilato cinasi e della MDH decriptizzando l'enzima con lubrol aggiunto all'inizio della reazione.

La NADH citocromo *c* ossidoreduttasi insensibile al rotenone fu determinata preincubando la sospensione mitocondriale per 10 min a 30° C in un sistema reattivo contenente in un volume finale di 3 ml: K-PO₄ pH 7,4 50 mM, cit. *c* 0,1 mM, rotenone 4 μM. La reazione venne avviata con l'aggiunta di NADH 0,3 mM e di KCN 1 mM. L'attività fu determinata misurando la variazione della densità ottica a 550 nm.

La succinico deidrogenasi (SDH) fu determinata preincubando la sospensione mitocondriale per 10 min a 30° C in un sistema reattivo contenente in un volume finale di 3 ml: K-PO₄ pH 7,4 50 mM, rotenone 4 μM, CaCl₂ 0,7 mM. La reazione venne avviata con l'aggiunta di: 2,6-diclorofenolindofenolo 30 μM, fenazina metosolfato 3,3 mM, K-succinato 20 mM, KCN 1 mM. L'attività fu determinata misurando la variazione della densità ottica a 600 nm (confronta Arrigoni e Singer [2]).

L'attività della COX fu determinata anche con l'elettrodo di Clark secondo il metodo di Petrucci, Botti e Pantani [3].

Le proteine furono determinate, come nel precedente lavoro, secondo il metodo di GOA, modificato pretrattando il campione con DOC prima della precipitazione delle proteine con TCA [4].

Furono impiegati composti chimici di grado analitico ed enzimi puri della SIGMA e della Boehringer.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella Tabella I sono riportate le attività specifiche di enzimi determinate nei mitocondri di oociti avanzati, di fegato e di cuore di *B. bufo*. Dal confronto delle attività emerge che il profilo enzimatico dei mitocondri degli oociti avan-

zati è simile a quello trovato, nel precedente lavoro [1], nei mitocondri delle uova in ovidutto e degli embrioni preneurulari. Nei mitocondri di tali oociti, l'attività specifica della COX determinata sia per via spettrofotometrica che mediante elettrodo ad ossigeno di Clark non differisce sostanzialmente da quella presente nei mitocondri di fegato, ma risulta inferiore a quella dei mitocondri di cuore.

TABELLA I

Attività specifiche di enzimi nei mitocondri di ovario, fegato e cuore di B. Bufo.

	Ovario	Fegato	Cuore
1) Citocromossidasi (polarograf.)	980	850	—
2) Citocromossidasi (spettrofot.)	40,9	31,5	93,7
3) NADH cit. <i>c</i> ossidoreduttasi	930	220	—
4) Succinico cit. <i>c</i> ossidoreduttasi	35	136	400
5) Succinico deidrogenasi	27	105	—
6) Malato deidrogenasi	18.800	4.920	12.500
7) Isocitrico deidrogenasi (TPN ⁺)	32	504	1.690
8) Adenilato cinasi	1.760	120	—
9) Glutamico ossaloacetico transaminasi.	1.970	1.210	—

1) nmoli O₂/min/mg prot.; 2) K/min/mg prot. (K = costante di velocità della reazione di 1° ordine della ossidazione del citocromo *c*); 3) e 4) nmoli cit. *c* ridotto/min/mg prot.; 5) nmoli 2,6-diclorofenolindofenolo ridotto/min/mg prot.; 6) nmoli NADH ossidato/min/mg prot.; 7) nmoli TPN⁺ ridotto/min/mg prot.; 8) nmoli TPN⁺ ridotto/min/mg prot.; 9) nmoli NADH ossidato/min/mg prot.

L'ICDH(TPN⁺) e la succinico citocromo *c* ossidoreduttasi sono negli oociti molto meno attive che nei mitocondri di fegato; in quelli di cuore tali attività risultano circa tre volte maggiori di quelle manifestate dai mitocondri di fegato. Sia nei mitocondri degli oociti che in quelli dei due organi non è evidenziabile l'attività della ICDH(NAD⁺). La scarsa attività della succinico citocromo *c* ossidoreduttasi manifestata dai mitocondri degli oociti avanzati risulterebbe limitata dal complesso 2 [5]. Sta di fatto che la SDH è in questi mitocondri più bassa che in quelli di fegato. Viceversa la NDAH citocromo *c* ossidoreduttasi è più alta nei mitocondri degli oociti.

L'attività specifica della MDH dei mitocondri degli oociti è circa quattro volte più alta di quella dei mitocondri di fegato e corrisponde a quella osservata nei mitocondri dei primi stadi embrionali. Più alta è anche l'adenilato cinasi la quale peraltro nei mitocondri degli oociti come in quelli dei primi stadi embrionali risulta avere un'attività specifica più di 10 volte maggiore di quella dei mitocondri di fegato.

La GOT presenta nei mitocondri degli oociti circa la stessa attività di quella dei mitocondri di fegato.

La scarsa attività specifica della SDH rilevata nei mitocondri degli oociti dà ragione della difficoltà di mettere in evidenza citochimicamente tale enzima nelle sezioni di ovario, al contrario di quanto è stato verificato per la NADH diaforasi [6].

Peraltro la bassa attività della SDH e della ICDH (TPN⁺) manifestata da tali mitocondri spiega le difficoltà che essi hanno a completare l'ossidazione del fumarato e del piruvato attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici, come fu evidenziato in precedenti lavori [7], nonostante che gli stessi mitocondri manifestassero una congrua attività della citrato sintetasi [8]. Ciò fa prevedere un accumulo di citrato che verosimilmente potrebbe essere incanalato lungo vie metaboliche di sintesi.

Secondo la nostra interpretazione anche l'elevata attività dell'adenilato cinasi assume nei mitocondri degli oociti di *Bufo* significato anabolico. Ad opera di questo enzima l'AMP che si forma nei processi endergonici di sintesi viene convertita ad ADP a spese dell'ATP. È possibile così il completamento del ciclo dell'ATP essendo l'ADP e non l'AMP l'accettore specifico del fosfato nelle fosforilazioni mitocondriali e citoplasmatiche [9]. L'alta attività adenilato cinasica sarebbe correlata all'intensità dei processi di sintesi che si svolgono nella cellula.

È evidente invece il carattere più tipicamente bioenergetico del profilo enzimatico dei mitocondri del fegato e più ancora di quello dei mitocondri di cuore nei quali i livelli dei vari enzimi consentono l'attivo svolgimento del CAT.

Possiamo concludere che la popolazione mitocondriale colla tipica facies enzimatica dei primi stadi dello sviluppo sia già presente negli oociti avanzati. È molto verosimile che tale popolazione si insedi nel corso della vitellogenesi durante la quale l'aumento dei mitocondri segue l'accrescimento esponenziale dell'oocita, come indicano le variazioni della COX. Al termine della vitellogenesi il tenore di questo enzima raggiunge quello dell'uovo maturo, che non differisce sostanzialmente da quello dell'uovo in segmentazione [10].

Riteniamo pertanto che la popolazione mitocondriale dell'uovo maturo e dei primi stadi dello sviluppo debba dipendere dagli mRNA trascritti durante la vitellogenesi, dalla velocità con cui essi vengono tradotti nelle corrispondenti proteine enzimatiche e dalle condizioni di assemblaggio di queste con i lipidi, che si determinano in detto momento dell'oogenesi.

Sembrerebbe che la facies enzimatica sia diversa nei mitocondri degli oociti piccoli previtellogenetici risultando, da prime osservazioni, più bassa l'attività specifica della COX e molto elevata quella della GOT.

È notevole il fatto che in corrispondenza degli aumenti della popolazione mitocondriale che si verificano nella vitellogenesi [10] e nella istogenesi [11] anche la facies enzimatica si modifichi.

La facies enzimatica mitocondriale evidenziata negli oociti al termine della vitellogenesi di *B. bufo* non è generalizzabile a quella dei corrispon-

denti oociti di altre specie di Anfibi. Nei mitocondri degli oociti avanzati di *Xenopus laevis* l'attività specifica della SDH e della ICDH(TPN⁺) risultano più alte ed in particolare quella della SDH è maggiore di quella dei mitocondri del fegato della stessa specie [12]. Ciò è in accordo con il fatto che i mitocondri degli oociti di *X. laevis* a differenza di quelli di *B. bufo* esplicano attivamente l'ossidazione completa del fumarato e del piruvato attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici [13]. Tuttavia in base all'incorporazione di precursori negli acidi nucleici mitocondriali Chase e Dawid concludono che anche in *X. laevis* i mitocondri presenti nell'embrione ai primi stadi dello sviluppo sono sintetizzati durante l'oogenesi [14].

BIBLIOGRAFIA

- [1] PETRUCCI D., BOTTI D., DI COLA M. e PANTANI C. - *Prime osservazioni sui profili enzimatici nel differenziamento di Bufo*, «Acta Embryol. Exp.» (in corso di stampa).
- [2] ARRIGONI O. and SINGER T. P. (1962) - *Limitations of the phenazine methosulfate assay for succinic and related dehydrogenases*, «Nature», 193, 1256.
- [3] PETRUCCI D., BOTTI D. e PANTANI C. (1972) - *Azione di alcuni tensioattivi sull'attività citocromo ossidasi di preparazioni mitocondriali*, «Boll. Soc. It. Biol. Sper.», 48, 531.
- [4] KING T. E. (1967) - *The Keilin-Hartree heart muscle preparation*, in «Methods in Enzymology», Ed. R. W. Estabrook and M. E. Pullman, Academic Press N. Y., X, 202.
- [5] GREEN D. E. e BAUM H. (1970) - *Energy and the mitochondrion*. Academic Press, N.Y., 8.
- [6] PETRUCCI D., BALDONI G., BOTTI D. e PANTANI C. (1973) - *Interazione del nitroblu di tetrazolio con le ossidoriduzioni mitocondriali e microsomiali e localizzazione di deidrogenasi negli oociti di anfibi*, «Acta Embryol. Exp.», 236.
- [7] PETRUCCI D. (1967) - *Ossidazione del fumarato a piruvato e controllo esplicato dal NAD nei mitocondri degli embrioni di anfibi*, «Riv. Biol.», 60, 91.
- [8] PETRUCCI D. e MIRANDA M. (1971) - *Ricerche comparative sulla reazione condensante in mitocondri di cellule embrionali e differenziate di varie specie zoologiche*. Comunicazione S.I.B.S., Palermo.
- [9] WAINIO W. W. (1970) - *The mammalian mitochondrial respiratory chain*. Academic Press, N. Y.
- [10] PETRUCCI D. (1960) - *La citocromo c-ossidasi nell'oogenesi degli anfibi*, «Acta Embryol. et Morphol. Exp.», 3, 237.
- [11] PETRUCCI D., BOTTI D., DI COLA M. e PANTANI C. - *Profili enzimatici dei mitocondri e citocromo ossidasi nel differenziamento degli anfibi*, «Acta Embryol. Exp.» (in corso di stampa).
- [12] PETRUCCI D., AMICARELLI F., DI COLA M. e PAPONETTI B. - *Facies enzimatiche mitocondriali di ovario e fegato di Xenopus laevis* (in corso di stampa).
- [13] PETRUCCI D. e MIRANDA M. (1968) - *Ossidazione aerobica ed anaerobica del fumarato nei mitocondri degli oociti di Xenopus laevis*, «Ric. sci.», 38, 564.
- [14] CHASE J. W. and DAWID I. B. (1972) - *Biogenesis of Mitochondria during Xenopus laevis Development*, «Develop. Biol.», 27, 504.