
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARISA LEONARDI CIGADA, FIORENZA LARIA DE
BERNARDI, ANNA MARIA SCARPETTI BOLZERN

Sintesi di acidi ribonucleici e di proteine nelle diverse regioni dell'embrione di *Xenopus laevis*

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 59 (1975), n.1-2, p.
152-163.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1975_8_59_1-2_152_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/>

Zoologia. — *Sintesi di acidi ribonucleici e di proteine nelle diverse regioni dell'embrione di Xenopus laevis* (*). Nota (**) di MARISA LEONARDI CIGADA, FIORENZA LARIA DE BERNARDI e ANNA MARIA SCARPETTI BOLZERN, presentata dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — An analysis of RNA and protein synthesis has been carried out on *Xenopus laevis* embryos, cut into two portions, during the early stages of their development. Actinomycin D was employed to inhibit the synthesis. The action of actinomycin on synthesis is stronger during gastrulation than during neurulation.

In each stage a correlation between RNA synthesis inhibition and protein synthesis inhibition has been observed.

In the ventral fragments of the neurula the ratio between the two inhibitions is 1 : 1, in the dorsal fragments it is 2 : 1. Messengers which existed before the treatment with actinomycin D are likely to work in protein synthesis in the dorsal fragment.

This fact may be thought to be in connection with the greater histological differentiation of the dorsal fragments. Experiments carried out on embryos in a more advanced stage of development (st. 22) and cut into three pieces confirmed this hypothesis. We observe that inhibition of incorporation in RNA compared with the inhibition in proteins increases in the order: ventral portion, dorsal portion, head. In this last portion the incorporation in protein is increased in treated embryos.

This fact seems to indicate that actinomycin D inhibits the messengers controlling protein turnover.

La sintesi di acidi ribonucleici (RNA) e di proteine nel corso dello sviluppo embrionale degli Anfibi è stata studiata da parecchi Autori (Brown, 1967; Denis, 1968; Brachet e Malpoix, 1971). Successivamente Gurdon *e coll.* (1974) hanno posto in evidenza che messaggeri introdotti artificialmente permangono attivi durante un periodo abbastanza lungo dello sviluppo embrionale, mentre noi (De Bernardi *e coll.* 1969; Leonardi Cigada *e coll.* 1968, 1972, 1973, 1974) abbiamo visto che il LiCl inibisce le sintesi di RNA e di proteine e il NaSCN esalta queste sintesi. Per tutto questo è sembrato utile procedere ad un ulteriore studio di queste sintesi anche per studiare i rapporti tra sintesi di RNA e sintesi di proteine nelle differenti regioni dell'embrione.

Scopo dei nostri esperimenti era di verificare quando vengono sintetizzati gli RNA che dirigono il differenziamento istologico nelle diverse regioni dell'embrione. Perciò abbiamo tagliato gli embrioni in stadi successivi di sviluppo, abbiamo bloccato la sintesi di RNA con actinomycin D e li abbiamo sottoposti ad incubazione con precursori marcati dell'RNA e delle proteine subito dopo la chiusura del tubo neurale, quando il differenziamento istologico è ormai in atto.

1) *Taglio ed incubazione degli embrioni.* Sono state utilizzate uova di *Xenopus laevis* Daudin ottenute mediante iniezione di ormone gonadotropo (Pregnyl, Organon; 600 U.I.);

(*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Zoologia dell'Università statale di Milano: Contributo C.N.R., n. 74.00250.04.

(**) Pervenuta all'Accademia il 14 luglio 1975.

liberate manualmente dalla gelatina e lasciate a svilupparsi in soluzione di Holtfreter con aggiunta di streptomina e di penicillina fino allo stadio desiderato.

Gli embrioni da tagliare erano posti in una capsula Petri con fondo di paraffina annerita con nerofumo; con delle pinze da orologiaio a punte affilate si toglievano i resti della capsula gelatinosa e la membrana vitellina e quindi l'embrione veniva tagliato con un bisturi da oculistica a lama sottile; i frammenti così ottenuti venivano separati mediante un'ansa a capello e venivano delicatamente trasferiti, con una pipetta sottile, in scatole Petri contenenti la soluzione di Holtfreter.

Gli embrioni sono stati tagliati con modalità diverse secondo lo stadio prescelto:

a) allo stadio di gastrula precoce (st. 10 di Nieuwkoop e Faber) ogni embrione era diviso in due parti mediante un taglio obliquo rispetto all'asse polare eseguito orientando l'embrione con il solco blastoporale verso il basso, in modo da lasciare nella metà dorsale l'intera regione del neuroblasto presuntivo con la corda.

b) agli stadi di neurula (12 $\frac{1}{2}$ — 19 di Nieuwkoop e Faber) ogni embrione è stato diviso in due parti con un taglio orizzontale eseguito in modo da lasciare nella parte dorsale l'intera regione del capo, dei somiti, della corda e del neuroectoderma; il taglio era facilitato dalla possibilità di seguire la cavità dell'archenteron.

c) allo stadio di neurula avanzata (tubo neurale chiuso; st. 22 di Nieuwkoop e Faber) ogni embrione è stato diviso in tre parti: regione del capo; regione del dorso, comprendente il tubo neurale e i somiti adiacenti; regione ventrale, comprendente l'entoderma e l'ectoderma ventrale.

Per ogni esperimento sono stati tagliati 80 embrioni allo stadio di gastrula e di neurula e 100 embrioni allo stadio 22. I frammenti quindi, divisi in gruppi di 40 e 50 rispettivamente, erano allevati a 18 °C in scatole Petri contenenti la sola soluzione di Holtfreter (controlli) ovvero actinomicina D (trattati):

Ai liquidi di allevamento venivano poi aggiunti i precursori marcati: 2 μ C/ml di uridina 3 H (Radiochemical Centre, Amersham; a.s. 5 C/mmole) e 2 μ C/ml di leucina 14 C (a.s. 348 mC/mmole). L'incubazione con precursori marcati era condotta per 18 ore a 18 °C.

2) *Estrazione di RNA e di proteine.* Alla fine del periodo di incubazione i frammenti erano lavati con soluzione di Holtfreter contenente uridina e leucina non marcate e venivano omogenizzati in acido tricloroacetico (TCA) al 5%. Acidi nucleici e proteine erano separati secondo la tecnica di Schneider (1945): il materiale acido-insolubile contenente RNA e proteine è stato idrolizzato a 90 °C in TCA 5% per 20 minuti e centrifugato. Il materiale residuo dell'idrolisi acida contenente le proteine veniva solubilizzato mediante trattamento con NaOH 0,3 N per 18 ore a 37 °C. Entrambi gli idrolizzati e campioni del materiale acido-solubile erano neutralizzati e contati in scintillatore con la miscela Triton X-100 - Toluene + Perma-blend III con un'efficienza del 10% per 3 H e dell'89% per 14 C.

I dati ottenuti dalla lettura dell'incorporazione dei frammenti tagliati ed incubati con precursori radioattivi negli stadi che vanno dalla gastrula precoce (stadio 10 di Nieuwkoop) alla neurula avanzata (tubo neurale chiuso st. 21) mostrano chiaramente che l'aumento della quantità di RNA (fig. 1) è in rapporto a sintesi di RNA e proteine (figg. 2, 3). In particolare durante la fase di chiusura del tubo neurale (st. 15-20) si nota un forte incremento di sintesi di RNA, che nel frammento dorsale dell'embrione è di circa 10 volte. L'incorporazione di precursori marcati delle proteine ha pure un andamento simile: la sintesi è bassa agli stadi di gastrula e all'inizio della neurulazione per aumentare almeno quattro volte durante la chiusura del tubo neurale. Non vi sono differenze di rilievo nel comportamento del frammento dorsale e del frammento ventrale (figg. 2 e 3).

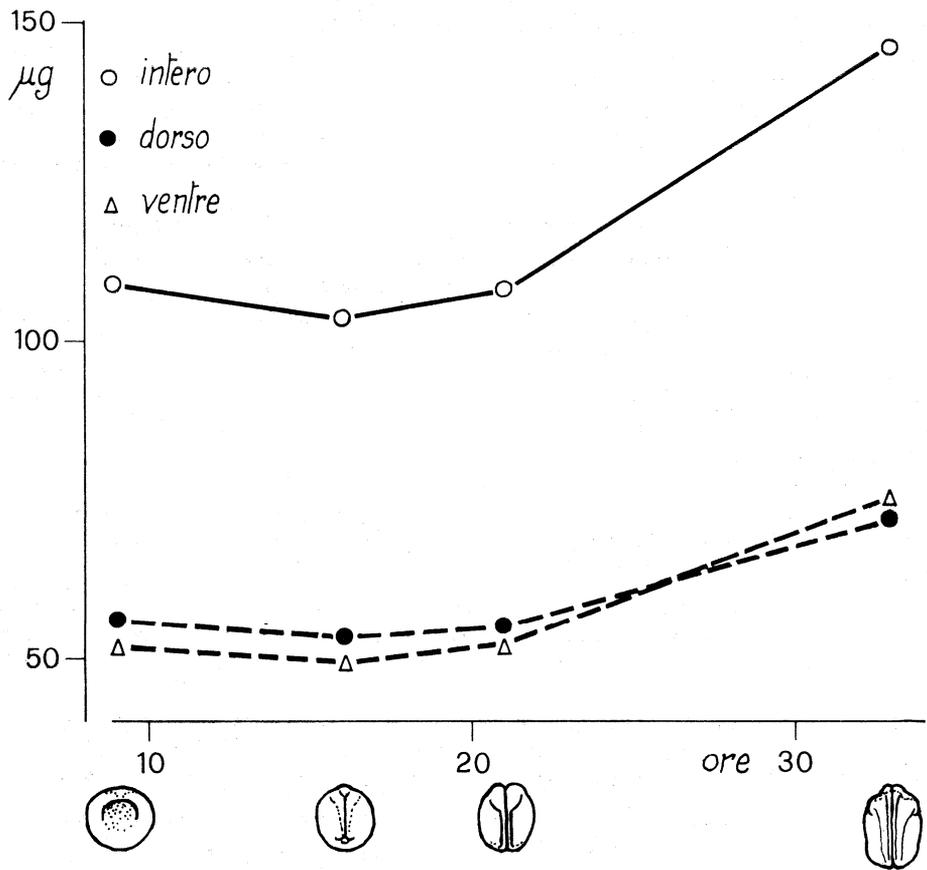


Fig. 1. - Quantità totale di RNA determinato quale assorbimento a 260 nm nei frammenti di embrioni di *X. laevis* e nell'embrione intero agli stadi di gastrula, neurula precoce (st. 13), neurula tardiva (st. 19) e bottone codale (st. 21).

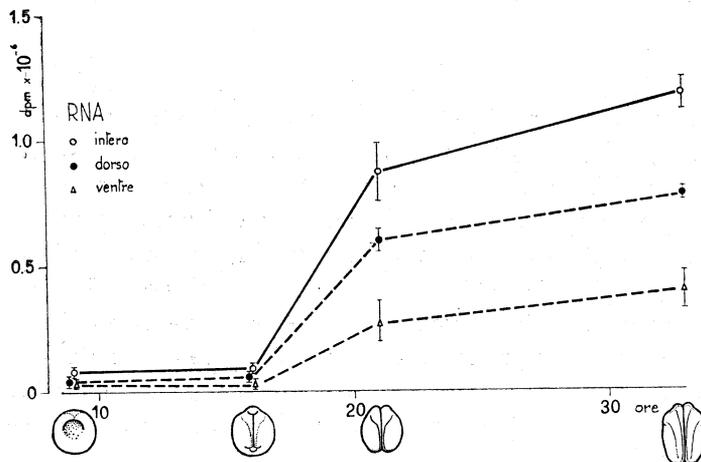


Fig. 2. - Incorporazione di uridina tritiata in frammenti di embrioni di *X. laevis* e nell'embrione intero agli stadi di gastrula, neurula precoce (st. 13), neurula tardiva (st. 19) e tubo neurale chiuso (st. 21).

Abbiamo quindi trattato i frammenti con actinomicina D alla concentrazione $1 \mu\text{g}/\text{ml}$. In questa serie di esperimenti gli embrioni sono stati tagliati in stadi successivi, partendo dallo stadio di gastrula precoce (10 di Nieuwkoop) fino alla neurula avanzata con tubo neurale chiuso (19 di Nieuwkoop); i frammenti venivano allevati in Holtfreter in presenza di actinomicina D fino al raggiungimento dello stadio 21/22 e quindi venivano incubati con i precursori radioattivi per 18 ore a 18°C , sempre in presenza di actinomicina. Per il trattamento con actinomicina abbiamo scelto la concentrazione $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ che negli esperimenti preliminari si era rivelata ben tollerata per il trattamento degli stadi più giovani (gastrula) per i quali il trattamento era più lungo (42 ore circa). I risultati dei conteggi sono stati posti in grafico espressi in percentuale rispetto al controllo.

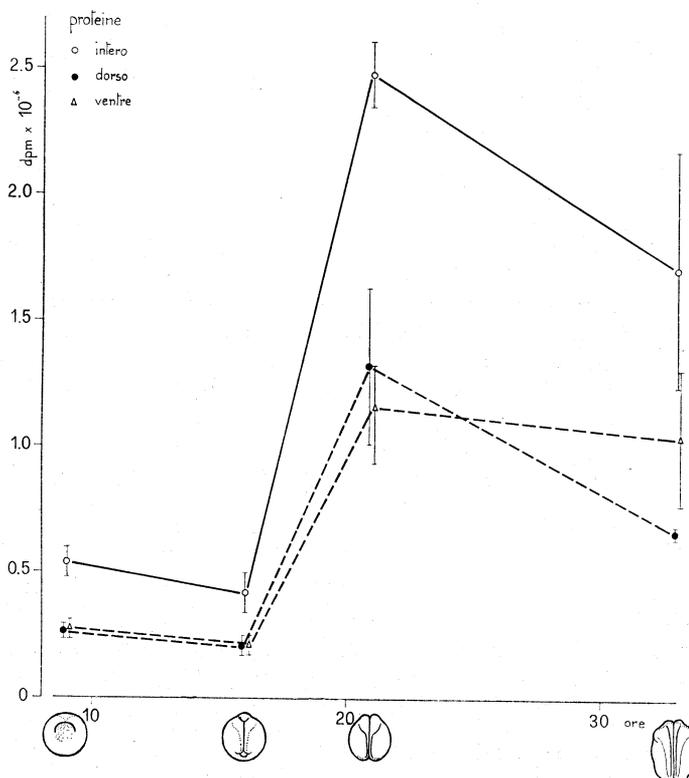


Fig. 3. - Incorporazione di leucina ^{14}C in frammenti di embrioni di *X. laevis* e nell'embrione intero agli stadi di gastrula, neurula precoce (st. 13), neurula tardiva (st. 19) e tubo neurale chiuso (st. 21).

Nel frammento dorsale (fig. 4) l'azione inibitrice dell'actinomicina D sulla sintesi di RNA è particolarmente marcata se il trattamento viene iniziato allo stadio di gastrula e durante le primissime fasi di formazione della piastra neurale (circa 80% di inibizione). Se il trattamento viene iniziato agli stadi di formazione del tubo neurale l'effetto è molto meno marcato: il livello di inibizione supera difficilmente il 50%.

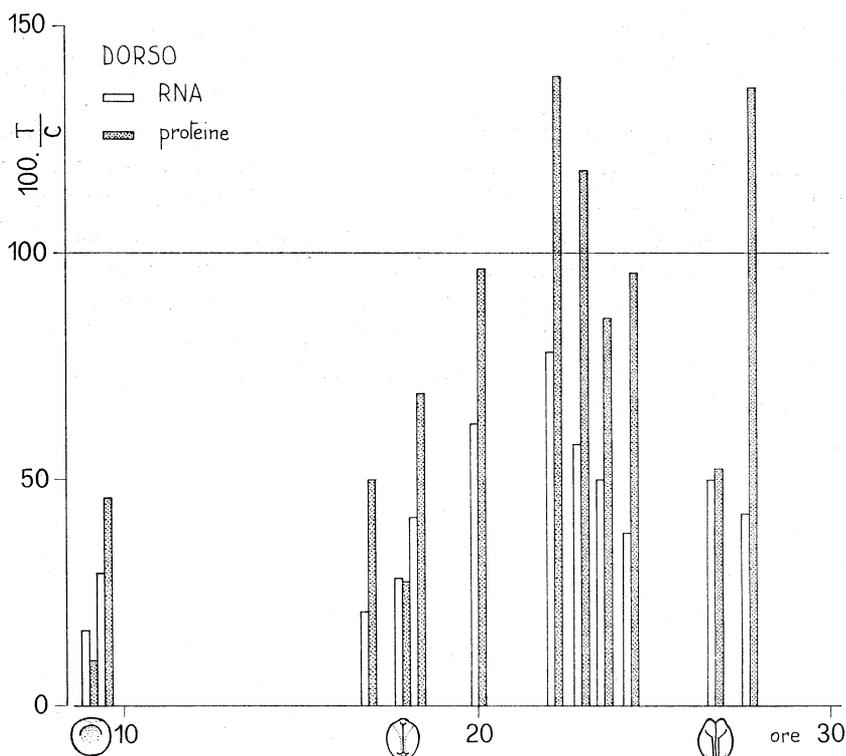


Fig. 4. - Incorporazione di precursori marcati espressa in percentuale rispetto ai controlli nell'RNA e nelle proteine dei frammenti dorsali di embrioni di *X. laevis* tagliati a diversi stadi di sviluppo e trattati con actinomicina D fino al raggiungimento dello stadio 25/26. L'incorporazione è stata effettuata durante le ultime 18 ore.

È interessante osservare l'azione dell'actinomicina sulla sintesi di proteine. Agli stadi precoci la sintesi di proteine viene fortemente inibita (sebbene percentualmente meno rispetto all'RNA). In embrioni più avanzati l'inibizione diminuisce e nei frammenti trattati agli stadi 15-17 si nota, a volte, un incremento, fino al 40 %, della incorporazione della leucina rispetto ai controlli. Se poi si fa il rapporto tra inibizione di incorporazione prodotta da actinomicina su RNA e su proteine si può notare che tale rapporto è, in quasi tutti gli stadi, dell'ordine 2 : 1 e cioè in tutti i frammenti trattati con actinomicina la diminuzione dell'incorporazione di ^{14}C nelle proteine è circa la metà della riduzione dell'incorporazione di tritio nel RNA.

Nel frammento ventrale (fig. 5) l'inibizione prodotta da actinomicina sulla sintesi di RNA è complessivamente minore. Si nota una forte inibizione allo stadio di gastrula (circa 70-80 %), ma già allo stadio di piastra neurale (st. 13) l'inibizione decresce fino a circa il 10 % e sembra molto spesso annullarsi negli stadi di formazione del tubo neurale. L'effetto sulla sintesi proteica risulta complessivamente meno marcato; analogamente a quanto visto per il frammento dorsale, anche nel frammento ventrale si nota in qualche caso una incorporazione di leucina più elevata rispetto al controllo. Il rapporto

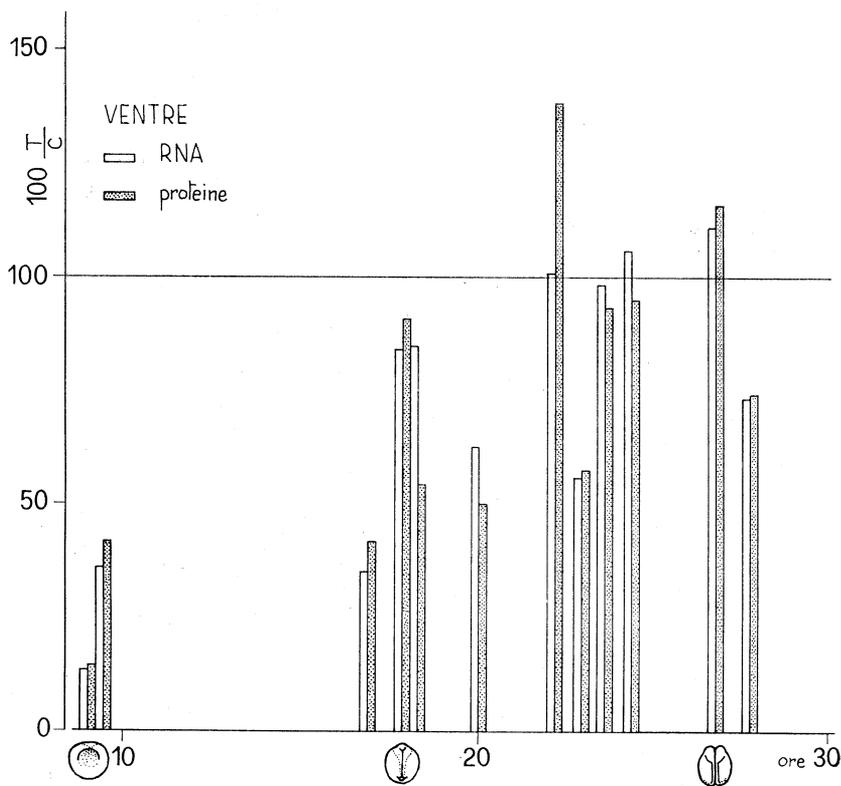


Fig. 5. - Incorporazione di precursori marcati espressa in percentuale rispetto ai controlli nell'RNA e nelle proteine di frammenti ventrali di embrioni di *X. laevis* tagliati a diversi stadi di sviluppo e trattati con actinomycin D fino al raggiungimento dello stadio 25/26. L'incorporazione è stata effettuata durante le ultime 18 ore.

inibizione RNA/inibizione proteine è dell'ordine 1 : 1 in quasi tutti gli stadi e cioè notevolmente differente da quello del frammento dorsale.

Il tempo che intercorre tra il taglio e trattamento con actinomycin (immediatamente successivo) e l'incubazione con precursori radioattivi è molto lungo allo stadio di gastrula (circa 24 ore a 18 °C) e diminuisce progressivamente fino allo stadio 19 (2 ore). La forte inibizione dei frammenti tagliati allo stadio di gastrula potrebbe essere dovuta ad una minor permeabilità ai precursori dei frammenti che hanno avuto un lungo tempo di cicatrizzazione. Abbiamo perciò provato a trattare i frammenti di gastrula agli stessi tempi utilizzati per i frammenti di nerula (intervallo di 6 ore). L'inibizione dei frammenti di gastrula in questa seconda serie di esperimenti è risultata minore di quella osservata con un lungo trattamento. D'altra parte l'osservazione dei preparati istologici dei frammenti ha dimostrato che la cicatrizzazione del taglio è più lenta nei frammenti trattati con actinomycin.

L'osservazione dei risultati raccolti nelle figg. 4 e 5 ha fatto sorgere il dubbio che la sensibilità dell'actinomycin si modifichi nel corso dello sviluppo

dell'embrione, dallo stadio di gastrula a quello di neurula: la sensibilità all'antibiotico sarebbe cioè più elevata negli stadi più giovani in cui il livello di sintesi di RNA e proteine è minimo (figg. 1, 2 e 3) e diminuirebbe quando la capacità di sintesi aumenta.

Per verificare questo punto abbiamo preso embrioni allo stadio di gastrula e durante la neurulazione, li abbiamo tagliati nella solita maniera e trattati con concentrazioni crescenti di actinomicina D. La concentrazione di

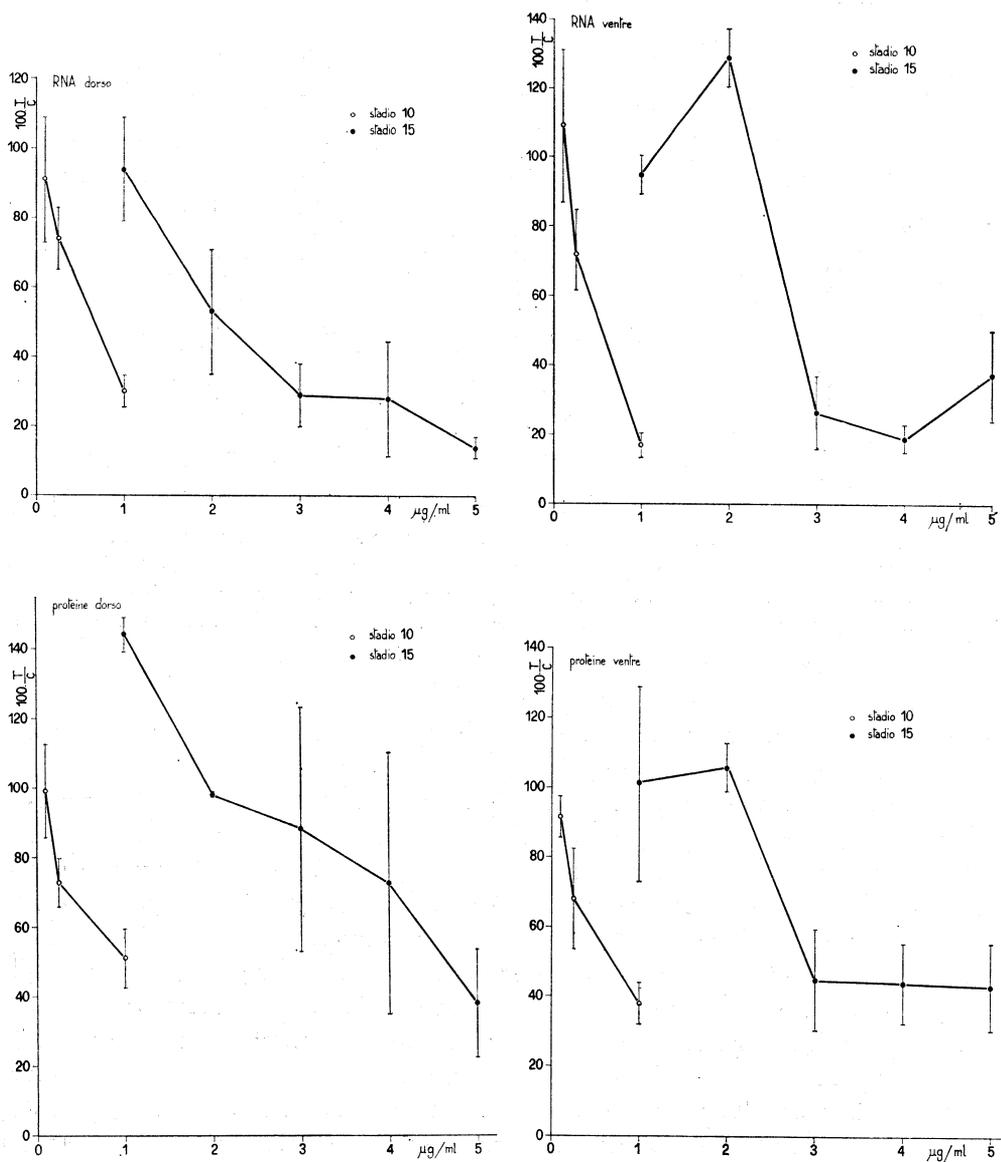


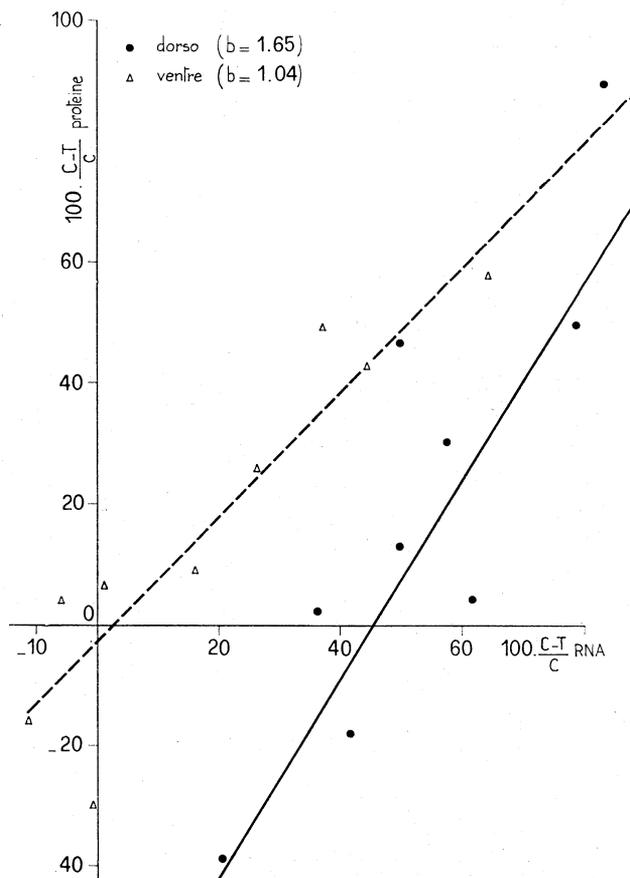
Fig. 6. - Incorporazione dei precursori marcati nella sintesi di RNA e proteine espressa in percentuale rispetto ai controlli con dosi crescenti di actinomicina D in frammenti di embrioni tagliati allo stadio di gastrula (10) e allo stadio di pieghe neurali (15).

0.1 $\mu\text{g/ml}$ è praticamente senza azione sulla incorporazione nel RNA in embrioni allo stadio di gastrula, l'inibizione diventa più marcata con l'aumentare della concentrazione e raggiunge il 70-80 % alla concentrazione di 1 $\mu\text{g/ml}$.

Allo stadio 15 (pieghe neurali) è necessario arrivare ad una concentrazione di 4-5 $\mu\text{g/ml}$ (la più elevata compatibile con lo sviluppo di un sufficiente numero di embrioni) per ottenere anche in questo caso un livello di inibizione dell'80 % (fig. 6). L'azione dell'actinomicina D sull'inibizione della incorporazione nelle proteine porta a risultati simili (fig. 6).

Fig. 7. - Correlazione tra inibizione della sintesi di RNA (ascisse) e inibizione della sintesi di proteine (ordinate) in frammenti dorsali e ventrali di embrioni di *X. laevis* trattati con actinomicina D in vari stadi da gastrula allo stadio di tubo neurale chiuso (19).

L'inibizione percentuale (i) è ricavata dalla formula $i = 100 \times \frac{C-T}{C}$ dove C è l'incorporazione del controllo e T l'incorporazione del trattato.



Il frammento ventrale è meno sensibile all'azione dell'actinomicina D: nella neurula alla concentrazione 2 $\mu\text{g/ml}$ infatti si è notato un incremento di sintesi di RNA che non ha riscontro nel pezzo dorsale.

L'osservazione comparata dei dati della fig. 6 con i dati delle figg. 4 e 5 ha fatto pensare all'esistenza di una correlazione tra inibizione della incorporazione nel RNA e inibizione della incorporazione nelle proteine. Per verificare l'esistenza di tale correlazione abbiamo posto in grafico valori corrispondenti della inibizione della incorporazione in RNA e proteine (fig. 7). Abbiamo visto che tali punti per il frammento dorsale e per il ventrale tendevano a disporsi

secondo due rette di diversa inclinazione, di cui abbiamo calcolato i parametri e il coefficiente di correlazione. I punti corrispondenti ai dati del pezzo ventrale sono strettamente correlati fra loro ($r = 0,9461$, altamente significativo) e sono disposti quasi secondo la bisettrice dell'angolo formato dalle due coordinate. I punti del dorso hanno invece una minor correlazione ($r = 0,7281$, significativo) e la retta che l'esprime forma con le ascisse un angolo superiore a 45° .

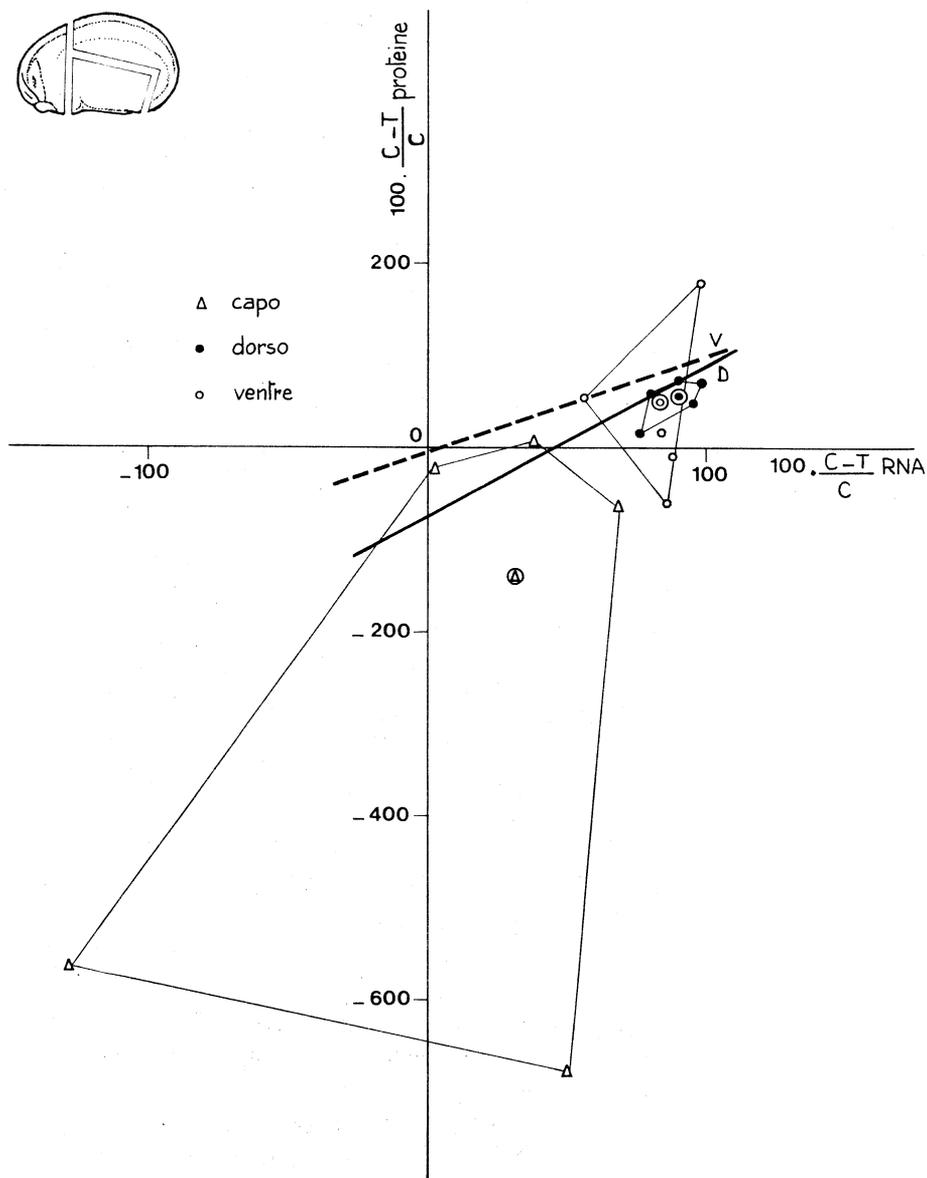


Fig. 8. - Correlazione tra inibizione della sintesi di RNA e di proteine in frammenti di embrioni di *X. laevis* tagliati in tre parti allo st. 22. Sono riportate le rette che rappresentano la correlazione dei punti analoghi degli embrioni tagliati in due parti (*D* dorso, *V* ventre). I punti, inclusi nei cerchi, sono i punti medi per ventre, dorso, capo.

La differente risposta del pezzo dorsale e del pezzo ventrale all'actinomicina D potrebbe essere posta in rapporto ai più intensi processi istogenetici che si osservano nella metà dorsale rispetto alla ventrale.

Per saggiare questa interpretazione abbiamo preso degli embrioni allo stadio di neurula avanzata (stadio 22) e li abbiamo tagliati in tre parti: capo, dorso, ventre e trattati con actinomicina D (50 µg/ml) per 18 ore a 18 °C perché a questo stadio la resistenza all'actinomicina è ulteriormente aumentata. Con i dati ottenuti abbiamo costruito un grafico (fig. 8). Abbiamo poi calcolato i punti medi del capo, del dorso, del ventre; essi giacciono a destra della retta che rappresenta il pezzo dorsale dei giovani embrioni, retta che giace a sua volta a destra della retta che rappresenta il pezzo ventrale (dove minore è il differenziamento). La posizione di questi punti medi esprime, pertanto, una maggiore incorporazione nelle proteine con sintesi di RNA ridotta. La distanza dalla retta, che rappresenta il pezzo dorsale, è maggiore per il capo, minore per il dorso, ancora minore per il ventre, e cioè esprime l'entità del differenziamento istologico. Nel capo, inoltre, la riduzione della sintesi di RNA (in un solo caso si osserva un aumento) si accompagna ad un aumento della sintesi proteica.

Questo esperimento è servito anche per precisare un altro punto che era emerso dai diagrammi delle figg. 4 e 5, e cioè l'incremento di incorporazione di precursori della sintesi di RNA e proteine che si nota nei frammenti di embrioni trattati con actinomicina D agli stadi 14-17. Si può pensare che questo fatto sia in rapporto alla mancata sintesi di enzimi che regolano il catabolismo del RNA e delle proteine secondo lo schema più generale elaborato da Tomkins e coll. (1969) che si può forse estendere anche a quanto osservato per azione di basse concentrazioni di LiCl e NaSCN.

Resta però da spiegare in termini di biologia molecolare la minor inibizione dell'incorporazione nelle proteine rispetto alla inibizione dell'RNA che si osserva nel pezzo dorsale e nel capo. Infatti per quanto concerne il pezzo dorsale la linea che lo rappresenta nella fig. 7 interseca le ascisse a circa 45 e cioè nel grafico circa 45 % di inibizione di sintesi di RNA corrisponde a 0 sulle ordinate che esprimono la percentuale di inibizione delle proteine. Nel pezzo ventrale, invece, se si inibisce la sintesi di RNA, la sintesi proteica è abbassata in misura identica.

La minor inibizione della sintesi proteica rispetto alla sintesi di RNA, che si osserva nel pezzo dorsale dove sono più attivi i fenomeni di differenziamento, si può porre in relazione alla presenza di messaggeri preesistenti. Gurdon e coll. (1974) hanno dimostrato sperimentalmente che è possibile, iniettando messaggeri di globina di mammifero in uova fecondate di *Xenopus laevis*, ottenere per lungo tempo sintesi di globina. Il fatto che nelle cellule embrionali gli mRNA possono rimanere stabili per lungo tempo, è favorevole all'ipotesi che durante il normale sviluppo embrionale vengano sintetizzati messaggeri stabili in una fase precoce di sviluppo e che la loro entrata in funzione attenda la formazione di un appropriato sistema di traduzione, come indicato da Woodland (1974).

La differenza di comportamento all'actinomicina D del pezzo ventrale e del pezzo dorsale potrebbe però essere interpretata anche in altra maniera, cioè potrebbe dipendere dalla possibilità che nel dorso i messaggeri lavorino più rapidamente che nel ventre. Ambedue i meccanismi potrebbero coesistere.

Durante lo sviluppo dell'embrione sintesi di RNA e incorporazione nelle proteine sono tra loro correlate nel senso che l'inibizione della sintesi di RNA si fa sentire sulla sintesi proteica. La sensibilità all'actinomicina è più forte in stadi giovani quando la sintesi di RNA è bassa e diminuisce nel corso dello sviluppo. In qualche caso si osserva nel frammento di embrione trattato con actinomicina D un aumento di proteine marcate rispetto al controllo; questo reperto si interpreta come una inibizione della sintesi di enzimi proteolitici funzionanti. Se si esaminano i rapporti tra inibizione di sintesi di RNA e inibizione di sintesi proteica si vede che nel frammento dorsale, o nel capo, dove sono attivi i fenomeni istogenetici, il rapporto dell'inibizione è 2 : 1 e dimostra cioè una continua sintesi di RNA ma anche probabilmente uso di RNA preesistente. Nel ventre il rapporto 1 : 1 indica che negli scarsi fenomeni istogenetici del ventre praticamente tutto l'RNA sintetizzato è necessario per la sintesi di nuove proteine.

LAVORI CITATI

- BRACHET J. e MALPOIX P. (1971) - *Macromolecular synthesis and nucleocytoplasmic interactions in early development*, « Adv. Morphogen. », 9, 263.
- BROWN D. D. (1967) - *The genes for ribosomal RNA and their transcription during Amphibian development*, « Curr. Top. Devel. Biol. », 2, 47.
- DE BERNARDI F., LEONARDI CIGADA M., MACI R. e RANZI S. (1969) - *On protein synthesis during the development of Lithium treated embryos*, « Experientia », 25, 211.
- DENIS H. (1968) - *Role of messenger ribonucleic acid in embryonic development*, « Adv. Morphogen. », 7, 115.
- GURDON J. B., WOODLAND H. R. e LINGREL J. B. (1974) - *The translation of mammalian globin in RNA injected into fertilized eggs of Xenopus laevis. I) Message stability in development*, « Devel. Biol. », 39, 125.
- LEONARDI CIGADA M., MACI R. e DE BERNARDI F. (1968) - *Azione a livello molecolare di alcune sostanze che interferiscono nei processi di determinazione embrionale*, « Ist. Lombardo (Rend. Sc.) », B 102, 213.
- LEONARDI CIGADA M., LARIA DE BERNARDI F. e BOLZERN A. M. (1972) - *Sintesi di RNA in embrioni di Xenopus trattati con LiCl*, « Rend. Acc. Naz. Lincei (Sc. Fis.) », (8) 52, 93.
- LEONARDI CIGADA M., LARIA DE BERNARDI F. e SCARPETTI BOLZERN A. M. (1973) - *Sintesi di proteine in embrioni di Xenopus laevis trattati con LiCl*, « Ist. Lombardo (Rend. Sc.) », B 107, 117.
- LEONARDI CIGADA M., LARIA DE BERNARDI F. e SCARPETTI BOLZERN A. M. (1974) - *Sintesi di acido ribonucleico e di proteine in embrioni di Anfibi trattati con solfocianuro*, « Rend. Acc. Naz. Lincei (Sc. Fis.) », (8) 55, 755.

-
- NIEUWKOOP P. D. e FABER J. (1956) - *Normal table of Xenopus laevis*, North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- SCHNEIDER W. C. (1945) - *Phosphorus compounds in animal tissues*. I) *Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid*, « J. Biol. Chem. », 161, 293.
- TOMKINS G. M., GELEHRTER T. D., GRANNER D., MARTIN D., SAMUELS H. H. e THOMPSON E. B. (1969) - *Control of specific gene expression in higher organisms*, « Science », 166, 1474.
- WOODLAND H. R. (1974) - *Changes in the polysome content of developing Xenopus laevis embryos*, « Devel. Biol. », 40, 90.