
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

RAFFAELE SCOPELLITI, ORNELLA SENATORI, ANDREA
DELPINO, HARRY MANELLI

**Ribosomi traslanti e non traslanti in alcuni stadi di
sviluppo di Bufo bufo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 65 (1978), n.6, p. 362–366.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1978_8_65_6_362_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 e morfogenesi. — *Ribosomi traslanti e non traslanti in alcuni stadi di sviluppo di Bufo bufo.* Nota di RAFFAELE SCOPPELLITI (*), ORNELLA SENATORI (*), ANDREA DELPINO (**), e HARRY MANELLI (*), presentata (***) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The time-course of protein synthesis resumption following *Bufo bufo* egg fertilization has been evaluated from the relative amounts of high salt-dissociable and high salt-stable ribosomes, apparent in analytical sedimentation profiles.

The activation of protein synthesis is relatively slow. Only at tailbud stage does the synthetic rate reach a level comparable to that observed in adult differentiated cells.

In this respect the situation existing in developing *Bufo bufo* embryos parallels that described in *Xenopus* but appears markedly different from that observed in *Rana*.

INTRODUZIONE

Studi sulla sintesi proteica, condotti su embrioni, hanno potuto dimostrare che la fecondazione determina un progressivo incremento dell'attività sintetica. Nell'ambito di questo fenomeno, riscontrabile in tutti gli embrioni, si hanno da un punto di vista quantitativo ampie possibilità di diversificazione: talora (Riccio di mare, Rana) la fecondazione induce rapidamente una sintesi molto attiva (Monroy e coll., 1965; Smith e Ecker, 1966), in altri casi (*Xenopus*) l'incremento è più graduale (Woodland, 1974). Dagli esempi citati si deduce che in organismi anche tassonomicamente vicini, stadi embrionali corrispondenti non presentano necessariamente un'intensità di sintesi confrontabile. Infatti nell'ambito dello stesso Ordine degli Anuri sono state osservate intensità di sintesi alquanto diverse.

Al fine di contribuire alla formazione di un quadro più completo della situazione offerta dagli Anfibi nei confronti di questo fondamentale aspetto del differenziamento embrionale, noi abbiamo voluto studiare l'andamento della sintesi proteica nell'embrione di rospo (*Bufo bufo*), in previsione dello studio più approfondito dei meccanismi che presiedono all'attivazione della sintesi proteica.

MATERIALE E METODI

Coppie di rospi (*Bufo bufo*) sono state raccolte nella campagna romana durante la stagione riproduttiva (gennaio, febbraio) e tenute negli allevamenti sperimentali dell'Istituto di Zoologia. Gli animali si sono accoppiati ed hanno

(*) Istituto di Zoologia, Università di Roma.

(**) Laboratorio di Biofisica, Istituto Regina Elena, Roma.

(***) Nella seduta del 16 dicembre 1978.

deposto le uova spontaneamente. Per la raccolta delle uova vergini alcune femmine sono state separate dai maschi e dopo pochi giorni hanno anch'esse deposto le uova.

Le uova fecondate sono state lasciate in acqua corrente fino al raggiungimento dello stadio desiderato (riconosciuto secondo le tavole di Rossi (1958)). Abbiamo preso in considerazione i seguenti stadi: uovo vergine, uovo appena fecondato, morula, gastrula e bottone codale.

I cordoni gelatinosi, in cui le uova e gli stadi precoci sono avvolti, sono stati sciolti con una breve immersione in Na-tioglicolato al 2% (pH 8,5), secondo il metodo di Petrucci (1962).

È stato anche prelevato il fegato di individui adulti.

Il materiale è stato omogeneizzato nel rapporto 1:3 (P/V) in una soluzione 250 mM saccarosio in 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$ a 0-4 °C.

L'omogenato è stato centrifugato per 10' a 15000 rpm ed il sovranatante ottenuto (sovranatante postmitocondriale), trattato con Triton X-100 (concentrazione finale 4%), è stato diluito con una soluzione concentrata di KCl fino a raggiungere una concentrazione di 300 mM KCl e 3 mM $MgCl_2$.

Il materiale è stato quindi stratificato su gradienti lineari 15-40% di saccarosio in 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 300 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 7 mM β -mercaptoetanol e centrifugato per 90' a 40000 rpm a 4 °C nel rotore Spinco SW 40.

I gradienti sono stati poi letti a 260 nm e i profili registrati con apparato ISCO mod. 640.

RISULTATI

L'attivazione ed il successivo incremento della sintesi proteica nelle uova e negli embrioni di *Bufo bufo* dopo la fecondazione e durante le prime fasi dello sviluppo è stata valutata in base al rapporto tra la quantità di ribosomi traslanti e non traslanti, evidenziata nei profili di sedimentazione dei ribosomi estratti da uova vergini e appena fecondate e da embrioni allo stadio di morula, gastrula e bottone codale.

In presenza di un'elevata concentrazione di ioni monovalenti associata ad una relativamente bassa concentrazione di Mg^{++} , i ribosomi non impegnati nella sintesi proteica si dissociano nelle due subunità costitutive, mentre i ribosomi legati al mRNA e recanti il loro peptidil-tRNA rimangono indissociati (Falvey e Staehelin, 1970). Pertanto i profili di sedimentazione, ottenuti mediante ultracentrifugazione su gradienti di saccarosio preparati in 300 mM KCl e 3 mM $MgCl_2$, ben si prestano a caratterizzare il differente stato funzionale della popolazione ribosomale nei diversi stadi di sviluppo.

Infatti tutte le subunità 40S e 60S osservabili nei profili di sedimentazione delle figg. 1-2 corrispondono ai ribosomi inattivi presenti nell'intera popolazione ribosomale, mentre tutti i ribosomi indissociati (dai monosomi

80 S ai polisomi con più alto coefficiente di sedimentazione) rappresentano particelle attivamente traslanti.

La tabella riporta le percentuali ottenute con l'integrazione planimetrica delle aree sottostanti i picchi dei diversi grafici e dà, quindi, una valutazione quantitativa del rapporto tra ribosomi attivi e inattivi ai vari stadi.

TABELLA

Percentuali di ribosomi inattivi ed attivi in successivi stadi dello sviluppo di Bufo bufo.

	Uovo vergine	Uovo appena fec.	Morula	Gastrula	Bottone codale	Fegato adulto
Subunità ribosomali .	96%	91%	83%	57%	36%	29%
Ribosomi traslanti . .	4%	9%	17%	43%	64%	71%

Nelle uova vergini di *Bufo bufo* (fig. 1 A) praticamente tutta la popolazione ribosomale è costituita da ribosomi inattivi (subunità 40 S + 60 S = 96 % della frazione ribosomale); nei primi stadi della segmentazione (fig. 1 B) incomincia ad apparire una piccola percentuale di ribosomi attivi (subunità 40 S + + 60 S = 91 %, ribosomi traslanti 9 %); allo stadio di morula (fig. 1 C) la frazione attiva è aumentata (subunità 40 S + 60 S = 83 %, ribosomi traslanti 17 %); allo stadio di gastrula (fig. 1 D) appare ulteriormente aumentata

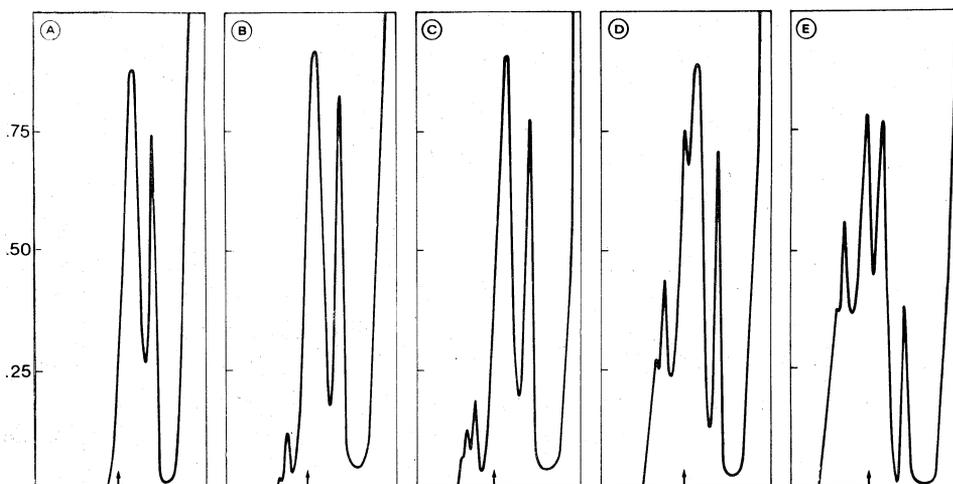


Fig. 1. - Ordinata: A_{260} . Profili di sedimentazione dei ribosomi isolati da uova vergini (A), appena fecondate (B), da embrioni allo stadio di morula (C), gastrula (D) e bottone codale (E) di *Bufo bufo*. La freccia indica il monomero 80 S.

la percentuale dei ribosomi traslanti, ma sono ancora preminenti le subunità libere (subunità 40 S + 60 S = 57 %; ribosomi traslanti 43 %). Allo stadio di bottone codale (fig. 1 E) la quantità dei ribosomi traslanti supera quella dei ribosomi inattivi (subunità 40 S + 60 S = 36 %, ribosomi traslanti 64 %), la qual cosa sta ad indicare che a questo stadio il mRNA, presente nel citoplasma, viene attivamente tradotto. Da un punto di vista quantitativo il livello

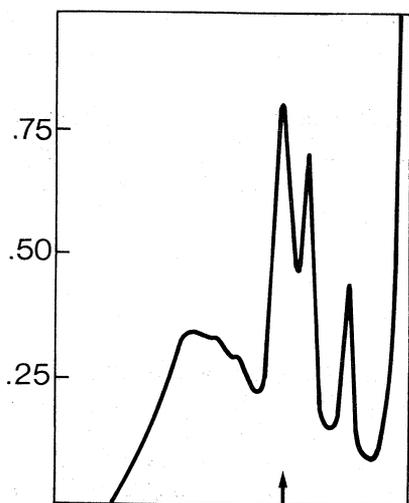


Fig. 2. - Ordinata: A_{260} . Profilo di sedimentazione dei ribosomi isolati da fegato di adulto di *Bufo bufo*. La freccia indica il monomero 80 S.

della sintesi proteica a questo stadio è dello stesso ordine di grandezza di quello riscontrabile in un tessuto adulto particolarmente attivo. Ciò risulta evidente, paragonando il profilo di sedimentazione della popolazione ribosomiale ottenuta dal bottone codale con quello relativo ai ribosomi del fegato (fig. 2), dove la percentuale dei ribosomi traslanti è del 71 %.

DISCUSSIONE

I risultati che si ritrovano in letteratura indicano che la ripresa della sintesi proteica dopo la fecondazione può presentare marcate differenze non solo confrontando animali filogeneticamente lontani, ma anche confrontando gruppi zoologici vicini. Nell'ordine degli Anuri i rappresentanti di sottordini diversi come *Rana pipiens* (Diplasioceli fam. Ranidi) e *Xenopus* (Opistoceli fam. Pipidi) si comportano in modo molto differente. In *Xenopus laevis* Woodland (1974) ha osservato che l'attività sintetica raggiunge un livello paragonabile a quello che si riscontra nelle cellule dell'adulto in tempi relativamente lunghi. Infatti solo dopo la gastrulazione (30 ore dopo la fecondazione) la percentuale di ribosomi attivi diventa rilevante. Invece in *Rana pipiens* la velocità di sintesi, già elevata nelle uova vergini, cresce molto velocemente dopo la fecondazione e raggiunge il massimo in meno di sei ore (circa allo stadio di 16 blastomeri) (Smith e Ecker, 1966).

I nostri dati consentono di confrontare la situazione che si ha durante lo sviluppo degli embrioni di *Bufo bufo* con quella descritta a proposito di *Xenopus* e *Rana*. Risulta evidente che l'attivazione della sintesi negli embrioni di *Bufo bufo* segue un andamento analogo a quello degli embrioni di *Xenopus*. Infatti dai profili di sedimentazione si evidenzia che solo allo stadio di bottone codale (78 ore dopo la fecondazione), la frazione dei ribosomi traslanti prevale sui ribosomi inattivi. A questo stadio il grado di polimerizzazione della popolazione ribosomiale è praticamente al suo valore massimo, come si può vedere dal confronto con il profilo di sedimentazione dei ribosomi estratti da fegato di rospo adulto.

Al momento attuale non è possibile precisare le ragioni delle differenti velocità di attivazione della sintesi proteica all'atto della fecondazione; il problema deve essere comunque inquadrato nell'ambito dei meccanismi di regolazione della sintesi proteica a livello di traduzione.

BIBLIOGRAFIA

- FALVEY A. K. e STAEHELIN T. (1970) - *Structure and function of mammalian ribosomes. I. Isolation and characterization of active liver ribosomal subunits*, « J. Mol. Biol. », 53, 1-19.
- MONROY A., MAGGIO R. e RINALDI A. M. (1965) - *Experimentally induced activation of the ribosomes of the unfertilized sea-urchin egg*. « Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. », 54, 107-111.
- PETRUCCI D. (1962) - *Correlazioni tra metabolismo energetico, ATP e sviluppo embrionale studiate negli Anfibi mediante l'azione di alcuni inibitori enzimatici*, « Acta Embryol. Morphol. Exp. », 5, 251-273.
- ROSSI A. (1958) - *Tavole cronologiche dello sviluppo embrionale e larvale del Bufo bufo*, « Monit. Zool. It. », 66, 133-143.
- SMITH L. D., ECKER R. E. e SUBTELNY S. (1966) - *The initiation of protein synthesis in eggs of Rana pipiens*, « Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. », 56, 1724-1728.
- WOODLAND H. R. (1974) - *Changes in the polysome content of developing Xenopus laevis embryos*, « Develop. Biol. », 40, 90-101.