

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

GIOVANNA LEONARDI

## Attività proteolitica dell'acqua di schiusa di *Ciona intestinalis* (Ascidia)

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 35 (1963), n.1-2, p. 130-133.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1963\\_8\\_35\\_1-2\\_130\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_35_1-2_130_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.** — *Attività proteolitica dell'acqua di schiusa di Ciona intestinalis (Ascidia)* (\*). Nota (\*\*) di GIOVANNA LEONARDI, presentata dal Corrisp. P. PASQUINI.

#### INTRODUZIONE.

L'uovo di *Ciona intestinalis* è rivestito da un triplice involucro, e precisamente da uno strato interno di cellule « testali », da uno strato esterno di cellule « follicolari », e dalla membrana coriale, o chorion, anista, situata fra i due (cfr. Morgan, 1938) [1]. Da questi involucri fuoriesce la larva natante, per un processo di schiusa al quale prendono parte enzimi che la larva stessa produce. Berrill (1929) [2] per primo attribuì ad attività enzimatica il potere litico che l'« acqua di schiusa » esercita sugli involucri di uova vergini della stessa e anche di altre specie di Ascidi. Queste osservazioni sono state confermate più recentemente da Osti (1950) [3].

Sulla natura e sulle proprietà dell'« enzima di schiusa » delle Ascidi non era stata fatta finora alcuna ricerca. Tuttavia, il fatto che il chorion dell'uovo di Ascidi fosse attaccato da enzimi proteolitici [4, 5, 6] e le limitate conoscenze sulla composizione essenzialmente proteica di tale membrana (cfr. Morgan, 1939) [5], davano indicazione che l'acqua di schiusa avesse attività proteolitica. Ciò è stato dimostrato nella ricerca riferita nella presente Nota.

#### MATERIALI E METODI.

1° L'acqua di schiusa è stata ottenuta facendo sviluppare in un limitato volume di acqua di mare embrioni di *Ciona intestinalis* dallo stadio di bottone caudale fino alla schiusa spontanea. Con centrifugazione a mano venivano allontanate le larve e la maggior parte delle cellule testali e follicolari. I chorion rimasti in sospensione sono stati separati centrifugando a  $5000 \times g$  per 20 minuti, ed estratti con 0,6M KCl in mezzo alcalino, a freddo per 24 ore, per recuperare l'enzima rimasto ivi adsorbito. L'estratto è stato aggiunto al supernatante, e il tutto è stato dializzato contro acqua distillata e concentrato a pressione ridotta.

2° L'attività proteolitica dell'acqua di schiusa è stata determinata con l'idrolisi sia di emoglobina denaturata con urea, secondo il metodo di Anson [7] per la tripsina, sia di caseina, secondo il metodo di Kunitz [8]. In entrambi i metodi l'incubazione è stata protratta per 4 1/2 ore a 38° C. Dopo precipi-

(\*) Lavoro eseguito presso l'Istituto di Istologia ed Embriologia della Università di Palermo, sotto la direzione del prof. A. Minganti.

(\*\*) Pervenuta all'Accademia il 24 luglio 1963.

tazione delle proteine con acido tricloroacetico 0,3 M, i fenoli liberati sono stati determinati colorimetricamente dopo aggiunta del reattivo di Folin-Ciocalteu, e riportati a uno standard di tirosina.

Nelle determinazioni col metodo di Anson i valori di tirosina sono stati riferiti al numero di larve da cui era stata prodotta l'acqua di schiusa. Questo numero è stato calcolato dal contenuto di azoto totale delle larve, determinato con microkjeldhal e nesslerizzazione diretta. Conteggi e determinazioni preliminari avevano stabilito un contenuto medio di  $\gamma 158 \pm 2$  di N totale per 10.000 larve.

In parte delle determinazioni col metodo di Kunitz i valori di tirosina sono stati riferiti alle proteine totali presenti nell'acqua di schiusa, determinate col metodo di Lowry et al. [9]. Nelle determinazioni riguardanti l'azione di alcune sostanze sulla attività proteolitica, le quantità di tirosina liberate nelle varie condizioni sperimentali sono state raffrontate direttamente con quelle dei relativi controlli.

#### RISULTATI.

1° La determinazione dell'attività proteolitica col metodo di Anson è stata fatta su 6 lotti di acqua di schiusa, in triplicato per ogni lotto. È risultato che in 4 1/2 ore di incubazione a 38° C l'acqua di schiusa di 10.000 larve idrolizza in media, da emoglobina denaturata con urea,  $\gamma 16,45 \pm 2$  di tirosina. Per comparazione abbiamo trovato che la stessa quantità di tirosina è liberata, dallo stesso substrato e in pari condizioni sperimentali, da  $\gamma 1,4$  di tripsina 2× cristallizzata e priva di sali (Sigma Chem. Co.).

2° L'influenza del pH è stata provata in 6 lotti di acqua di schiusa, di ognuno dei quali è stata determinata l'attività proteolitica col metodo di Kunitz, su caseina in tampone di fosfati a quattro pH diversi. La quantità di tirosina liberata è stata riferita al contenuto di proteine totali dell'acqua di schiusa. Le medie delle diverse determinazioni (ognuna in triplicato) sono state le seguenti:

pH	7	6,5	6	5,8
Tirosina $\gamma$ /mg prot. . . . .	32,6 $\pm$ 8,7	26,7 $\pm$ 6,6	15 $\pm$ 4,4	11,7 $\pm$ 2,9
Valori relativi . . . . .	100	82	46	36

Questi dati indicano una diminuzione di attività proteolitica del 18%, 54% e 64% quando il pH da 7 è portato rispettivamente a 6,5; 6 e 5,8. Queste diminuzioni sono statisticamente significative, come pure significative sono le differenze tra le attività a pH 7 e pH 6,5, e tra quelle a pH 6,5 e pH 6 ( $P < 0,05$ ; statistica  $t$ ). Invece non è significativa la differenza tra le attività a pH 6 e pH 5,8 ( $P < 0,2$ ).

3° Gli effetti dell'ovomucoide (inibitore della tripsina), del p-idrossimercuribenzoato di sodio (inibitore dei gruppi SH) e degli ioni  $Mg^{++}$  sull'attività

proteolitica dell'acqua di schiusa sono stati studiati mediante l'aggiunta di tali sostanze al substrato di caseina secondo il metodo di Kunitz, a pH 7. L'ovomucoide (Sigma Chem. Co.) e il p-idrossimercuribenzoato sono stati aggiunti nella concentrazione finale di 0,1 %; ed è stato adoperato  $MgCl_2$  alla concentrazione finale di 0,2 %. Sono state fatte 6 determinazioni (ognuna in triplicato) di attività proteolitica in presenza delle prime due sostanze, e 3 per l'altra. I risultati sono qui riportati in percentuali medie di tirosina liberata rispetto ai controlli:

Controlli . . . . .	100
Ovomucoide 0,1 % . . . . .	71
p-idrossimercuribenzoato 0,1 % . . . . .	73
$MgCl_2$ 0,2 % . . . . .	100

L'ovomucoide ha dunque prodotto una inibizione media del 29 %, statisticamente significativa ( $P < 0,05$ ); il p-idrossimercuribenzoato una inibizione del 27 %, pure significativa ( $P < 0,02$ ). Gli ioni  $Mg^{++}$  non hanno prodotto alcun effetto.

Questi dati sono soltanto indicativi, perché, non essendo stata fatta alcuna determinazione sulla quantità di enzima contenuto nell'acqua di schiusa, non è possibile conoscere il rapporto quantitativo tra le sostanze adoperate e l'enzima stesso. Nelle singole determinazioni l'inibizione ha variato, per entrambi gli inibitori, dal 100 % nei lotti a debole attività enzimatica (e cioè a minore concentrazione di enzima) al 10-15 % in quelli a più alta attività.

#### DISCUSSIONE.

1° Il substrato naturale dell'azione proteolitica dell'« enzima di schiusa » di *Ciona* è, secondo ogni evidenza, la membrana coriale, della cui costituzione proteica abbiamo già accennato. È incerto che la schiusa in *Ciona* sia dovuta soltanto ad una proteolisi del chorion, non potendosi escludere che l'acqua di schiusa contenga altri enzimi attivi, per esempio, sulla componente glicidica che ricerche personali hanno rilevato nel chorion. Inoltre è possibile che alla completa rottura del chorion prendano parte le contrazioni muscolari che la larva presenta tanto più attivamente quanto più vicina è la schiusa. Ciò spiegherebbe perché l'attività proteolitica dell'acqua di schiusa sia tanto piccola: infatti è sufficiente che l'enzima indebolisca un solo punto del chorion, perché questo possa venire aperto dai movimenti della larva. Questo punto di rottura dovrebbe corrispondere alla regione embrionale dalla quale l'enzima viene prodotto; ma su un eventuale « organo della schiusa » nelle *Ascidie* non vi sono che delle supposizioni contraddittorie [2, 3, 10].

2° L'enzima di schiusa di *Ciona* è poco specifico, se idrolizza emoglobina e caseina; questa scarsa specificità era già stata osservata da Berrill [2] e

da Osti [3]. Del resto, come abbiamo detto, il chorion di *Ciona* è attaccato da tripsina e da altri enzimi proteolitici.

Circa le proprietà dell'enzima, esso ha un pH ottimo d'azione intorno a 7, è inibito da ovomucoide ed ha gruppi SH nel luogo attivo; è indifferente agli ioni  $Mg^{++}$ . In confronto, notiamo che una attività proteolitica è stata rilevata anche nell'acqua di schiusa di riccio di mare [11], del Polmonato di acqua dolce *Physa fontinalis* (Rizzo, non pubblicato) e di Anfibi anuri [12]. In *Physa* e negli Anfibi l'ovomucoide non produce alcuna inibizione, probabilmente in relazione con la grande quantità di glicoproteine (quale è pure l'ovomucoide) nei loro involucri ovarici.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] T. H. MORGAN, « J. Exp. Zool. », 79, 319 (1938).
- [2] N. J. BERRILL, « Phil. Trans. Roy. Soc. London », B 218, 37 (1929).
- [3] A. M. OSTI, « Rend. Ist. Sup. Sanità Roma », 13, 114 (1950).
- [4] N. J. BERRILL, « Biol. Bull. », 63, 381 (1932).
- [5] T. H. MORGAN, « J. Exp. Zool. », 80, 19 (1939).
- [6] A. MINGANTI, « Ric. Scient. », 22, 439 (1952).
- [7] M. L. ANSON, « J. Gen. Physiol. », 22, 79 (1938).
- [8] M. KUNITZ, « J. Gen. Physiol. », 30, 291 (1947).
- [9] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, « J. Biol. Chem. », 193, 265 (1951).
- [10] N. KNABEN, « Bergens Mus. Aarb. », 1, 1 (1936).
- [11] J. ISHIDA, « Zool. Mag. » (2), 55, 55 (1943).
- [12] A. MINGANTI & G. AZZOLINA, « Ric. Scient. », 26, 3675 (1955).

A. ROSSI-FANELLI e B. SEGRE