

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

ANTONIO MINGANTI, SANTINA RIZZO

## Proteasi della schiusa in *Physa acuta* (Gasteropodo Polmonato)

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 39 (1965), n.1-2, p. 123-128.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1965\\_8\\_39\\_1-2\\_123\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_39_1-2_123_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.** — *Proteasi della schiuma in Physa acuta* (*Gasteropodo Polmonato*)<sup>(\*)</sup>. Nota <sup>(\*\*)</sup> di ANTONIO MINGANTI e SANTINA RIZZO, presentata dal Corrisp. P. PASQUINI.

#### INTRODUZIONE.

L'embrione di *Physa acuta*, come quelli di altri Gasteropodi Polmonati, si schiude dai complessi involucri ovulari in due tempi. Allo stadio di trocofora l'embrione si libera della membrana vitellina, e viene a trovarsi direttamente nell'albumine contenuto nella capsula ovulare [1, 2]. Più tardi, al termine dello sviluppo larvale, l'animale fuoriesce dalla «membrana solida» interna e dalla «membrana lamellata» esterna [3] che ne costituiscono la capsula individuale, e dalla massa gelatinosa (avvolta dalla membrana ootecale) che racchiude 20-50 capsule [4]. È questo secondo tempo quello che, com'è d'uso, viene qui considerato come schiusa.

La schiusa in diverse specie di Gasteropodi è stata attribuita a vari fattori: osmotici [5], meccanici [3, 5] ed enzimatici [4, 6]. Riguardo a questi ultimi, non si conosce di quale sorta di enzimi si tratti. Poiché uno studio condotto in questo laboratorio ha mostrato che gli involucri ovulari di *Physa* contengono proteine, abbiamo voluto vedere se l'acqua di schiusa di *Physa* avesse attività enzimatica proteolitica.

#### MATERIALI E METODI.

1. *Acqua di schiusa.* — Sono state adoperate masse ovulari di *Physa acuta* Draparnaud, deposte spontaneamente in laboratorio e sviluppate alla temperatura ambiente di circa 20° C. A 1-2 giorni dalla schiusa, e cioè all'11-12° giorno dalla deposizione, le singole larve, contenuta ognuna nella sua capsula, sono state isolate manualmente dalla massa gelatinosa e lasciate schiudere in un piccolo volume di acqua di fonte (20-80 larve per ml). Subito dopo la schiusa gli animali e i residui degli involucri ovulari sono stati allontanati per filtrazione, e il filtrato è stato adoperato come « acqua di schiusa ».

2. *Determinazioni di attività proteolitica.* — L'attività proteolitica dell'acqua di schiusa è stata determinata dalla quantità di amino acidi aromatici liberati (a) da emoglobina bovina (Eastman) denaturata con urea, in tampone fosfato 0,1 M, pH 7,5, secondo il metodo di Anson [7] per la tripsina; (b) su caseina (Merck, secondo Hammarsten) in tampone fosfato 0,1 M, pH 7,

(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Istologia ed Embriologia della Università di Palermo e nel Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R.

(\*\*) Pervenuta all'Accademia il 27 luglio 1965.

secondo il metodo di Kunitz [8]. Ad entrambi i substrati era aggiunto mercuriolato alla concentrazione finale di 0,001 %. L'incubazione è durata 4 ore a 37,5° C. Dopo precipitazione delle proteine residue con acido tricloroacetico, gli amino acidi aromatici rimasti in soluzione sono stati determinati dall'assorbimento a 280  $\mu\text{m}$  con spettrofotometro Unicam SP 500, e riferiti a uno standard di tirosina.

Alcune determinazioni sulla caseina sono state fatte aggiungendo all'acqua di schiuma una di queste sostanze: *p*-idrossimercuribenzoato di sodio (Sigma Chem. Co.); ovomucoide (Sigma Chem. Co.), entrambe alla concentrazione finale di 0,1 %; cloruro di magnesio 0,2 %.

3. - Osservazioni sull'azione litica dell'acqua di schiuma sulle membrane delle capsule sono state fatte ponendo delle capsule al 1° giorno dalla deposizione, isolate dalla massa gelatinosa, in acqua di schiuma, alla temperatura ambiente di circa 18° C, e seguendone le modificazioni al microscopio.

#### RISULTATI.

1. - I risultati delle determinazioni di attività proteolitica dell'acqua di schiuma sono riportati nella Tabella I e nella colonna dei controlli della Tabella II. La variabilità tra i diversi lotti non pare che sia dipendente dal diverso numero di larve per volume di acqua di schiuma, ma piuttosto dalla durata di permanenza delle larve nell'acqua di schiuma, durata della quale non si è tenuto conto preciso. Non sono da escludere fattori stagionali.

L'attività di 5 lotti di acqua di schiuma sulla emoglobina è stata di  $17,6 \pm 3,2$   $\mu\text{g}$  di tirosina per 100 larve. Nelle stesse condizioni tecniche,  $\mu\text{g}$  1,4 di tripsina 2 volte cristallizzata e priva di sali (Type I, Sigma Chem. Co.), dell'attività di complessive 14 Unità BAEE, hanno liberato dalla emoglobina  $\mu\text{g}$  16,5 di tirosina.

L'attività sulla caseina di 16 lotti di acqua di schiuma è stata in media di  $21,2 \pm 1$   $\mu\text{g}$  di tirosina per 100 larve. La differenza con l'emoglobina è significativa ( $P < 0,02$ , calcolata con la statistica *t* di Student). Nessuna differenza di attività proteolitica sulla caseina è stata riscontrata portando il pH del mezzo di incubazione a 6,5.

2. - Una parte dell'acqua di schiuma del lotto 7 (Tabella I), tenuta a 100° C in bagnomaria per 15 minuti, si è dimostrata priva di ogni attività proteolitica.

3. - A 4 lotti di acqua di schiuma è stato aggiunto ovomucoide alla concentrazione finale di 0,1 %, e dopo 1 ora di permanenza a temperatura ambiente (18°-20° C) se ne è determinata l'attività proteolitica sulla caseina. I risultati (Tabella II) mostrano una liberazione media di  $22,7 \pm 1,2$   $\mu\text{g}$  di tirosina per 100 larve, che è maggiore di circa il 35 % di quella dei rispettivi controlli ( $16,8 \pm 2,0$   $\mu\text{g}$  tirosina per 100 larve). La differenza è statisticamente significativa ( $P < 0,01$ ).

4. - Il *p*-idrossimercuribenzoato di sodio, aggiunto a 5 lotti di acqua di schiuma alla concentrazione finale di 0,1 %, ha provocato una diminuzione media di circa il 30 % dell'attività proteolitica sulla caseina, che è stata di  $15,9 \pm 1,2$   $\mu\text{g}$  tirosina/100 larve, mentre nei controlli essa era di  $23,8 \pm 0,8$   $\mu\text{g}$  tirosina/100 larve (Tabella II). La differenza è statisticamente significativa ( $P < 0,01$ ).

TABELLA I.

*Attività proteolitica di acqua di schiuma di Physa.*

Lotto	Data di raccolta	Larve per ml di acqua	$\mu\text{g}$ tirosina/100 larve
A) <i>Determinazioni su emoglobina.</i>			
1	Novembre 1962 . . . . .	44	15,7
2	» . . . . .	25	29,5
3	» . . . . .	36	17,9
4	Dicembre 1962 . . . . .	23	13,0
5	» . . . . .	23	11,7
Media $\pm$ E.S. . . . .			17,6 $\pm$ 3,2
B) <i>Determinazioni su caseina.</i>			
6	Febbraio 1963 . . . . .	42	17,6
7	» . . . . .	88	11,6
8	» . . . . .	34	18,0
9	» . . . . .	71	19,0
10	» . . . . .	42	22,7
11	» . . . . .	46	23,5
12	Marzo 1963 . . . . .	82	24,9
13	» . . . . .	38	21,1
14	» . . . . .	86	22,1
15	» . . . . .	43	24,0
16	» . . . . .	61	24,5
Media $\pm$ E.S. . . . .			20,8 $\pm$ 0,9

5. - In 3 lotti di acqua di schiusa l'aggiunta di  $MgCl_2$  alla concentrazione finale di 0,2 % non ha affatto modificato l'attività proteolitica sulla caseina (Tabella II).

TABELLA II.

*Azione di alcune sostanze sull'attività proteolitica dell'acqua di schiusa.*

(Attività espressa in  $\mu g$  tirosina/100 larve).

Lotto	Controllo	Sperimentale
<i>A) Ovomucoide 0,1 %.</i>		
6 . . . . .	17,6	27,1
7 . . . . .	11,6	25,5
8 . . . . .	18,0	19,6
9 . . . . .	21,1	23,5
Media $\pm$ E.S. . . .	16,8 $\pm$ 2,0	22,7 $\pm$ 1,2
<i>B) p-Idrossimercuribenzoato di sodio 0,1 %.</i>		
14 . . . . .	22,2	12,6
17 . . . . .	24,2	20,0
18 . . . . .	24,5	15,5
19 . . . . .	21,0	14,5
20 . . . . .	25,0	17,0
Media $\pm$ E.S. . . .	23,8 $\pm$ 0,8	15,9 $\pm$ 1,2
<i>C) Cloruro di magnesio 0,2 %.</i>		
9 . . . . .	19,2	19,2
10 . . . . .	23,1	23,1
21 . . . . .	30,0	30,0
Media $\pm$ E.S. . . .	24,1 $\pm$ 3,2	24,1 $\pm$ 3,2

6. — In 5 lotti di acqua di schiuma sono state poste delle capsule isolate al 1° giorno dalla deposizione della massa gelatinosa. Dopo circa 24 ore, alla temperatura ambiente di 18° C, il 75 % delle capsule mostrava una apertura più o meno ampia nella «membrana lamellata» esterna; la «membrana solida» interna non era apparentemente modificata. Dove la lisi interessava una zona ristretta, la membrana interna, racchiudente l'albume, formava un'ernia sporgente dalla apertura.

#### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

Poiché gli «enzimi della schiuma» agiscono sugli involucri ovulari, la loro attività deve essere messa in relazione con la costituzione chimica degli involucri stessi. Tra i costituenti degli involucri sono molto diffuse le proteine [9, 10]. In corrispondenza, una secrezione di «proteasi della schiuma» è stata supposta per molti gruppi animali [11, 12], e per alcuni di essi è stata anche dimostrata, come per il riccio di mare (cfr. [13]), le Ascidie [14], gli Anfibi [15] e i Pesci [16, 17]. A questo si aggiunge ora *Physa acuta*.

Caratteristiche di alcune di queste proteasi sono: (a) attività su diversi substrati, come emoglobina (in Anfibi [15]; Ascidie [14]; *Physa*), gelatina (Anfibi [15]), caseina (Ascidie [14]; Murenoidi [16]; *Physa*), elastina («corionasi» di *Fundulus* [17]); (b) inibizione da *p*-idrossimercuribenzoato, che blocca i gruppi -SH (Anfibi [15]; Ascidie [14]; *Physa*). Nelle Ascidie le proteasi di schiuma sono inibite da ovomucoide [14], che invece è inattivo per Anfibi [15] e *Physa*: è da notare al riguardo che l'ovomucoide è una glicoproteina, e che negli Anfibi e in *Physa* gli involucri ovulari sono ricchi di glicoproteine (cfr. [10]). Ciò spiega perché in *Physa* l'ovomucoide non solo non inibisce, ma pare venga idrolizzato dall'acqua di schiuma.

È molto verosimile che alla schiuma di *Physa* contribuiscano altri fattori, oltre alle proteasi. Anzitutto non è da escludere la presenza, nell'acqua di schiuma, di altri enzimi: per esempio, alla schiuma di un Ciprinoide prenderebbe parte la ialuronidasi [18]. Inoltre si deve tener conto della erosione degli involucri da parte della radula della larva, già osservata dagli Autori (cfr. [4]). Del resto, in diversi casi si è dimostrato che la schiuma è dovuta alla cooperazione di fattori enzimatici e meccanici [9, 19]. Noi riteniamo che in *Physa* l'erosione da parte della radula sia agevolata dalle proteasi della schiuma, le quali, oltre a disciogliere, almeno in parte, alcuni degli involucri (come la «membrana lamellata» delle capsule), probabilmente indeboliscono gli altri.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. WIERZEJSKI, «Z. wiss. Zool.», 83, 502 (1905).
- [2] CHR. P. RAVEN, «Arch. Néerl. Zool.», 7, 353 (1946).
- [3] A. D. NEKRASSOV, «Z. Morphol. u. Oekol.», 13, 1 (1929).
- [4] P. BONDESEN, «Natura Jutlandica», 3, 1 (1950).

- 
- [5] H. HERTLING, « *Wiss. Meeresuntersuch., Abt. Helgoland* », 17, 1 (1928).  
[6] D. A. HANCOCK, « *Proc. Zool. Soc. London* », 127, 565 (1956).  
[7] M. L. ANSON, « *J. Gen. Physiol.* », 22, 79 (1938).  
[8] M. KUNITZ, « *J. Gen. Physiol.* », 30, 291 (1947).  
[9] J. NEEDHAM, *Chemical Embryology*, Cambridge Univ. Press (1931).  
[10] A. MINGANTI, « *Boll. Zool.* », 25, 55 (1958).  
[11] J. NEEDHAM, *Biochemistry and Morphogenesis*, Cambridge Univ. Press (1950).  
[12] W. B. ROWN, « *Exptl. Parasit.* », 5, 118 (1954).  
[13] G. LUNDBLAD, « *Arkiv Zool* », (2) 7, 127 (1954).  
[14] G. LEONARDI, « *Rend. Accad. Naz. Lincei* » (8), 35, 130 (1963).  
[15] A. MINGANTI & G. AZZOLINA, « *Ric. Scient.* », 25, 2103 (1955).  
[16] E. REMOTTI, « *Atti R. Accad. Peloritana* », 30, 5 (1923).  
[17] M. E. KAIGHN, « *Develop. Biol.* », 9, 56 (1964).  
[18] G. A. BUZNIKOV, « *Dokl. Akad. Nauk SSSR* », 125, 1382 (1959).  
[19] G. A. BUZNIKOV & G. M. IGNATIEVA, « *Uspechi Sovrem. Biol.* », 46, 337 (1958).