

Ricerche su lipovitellina e lipovitellenina
con considerazioni sulla determinazione embrionale
e sulla denaturazione proteica

SUMMARY. — Lipovitellin and lipovitellenin changes in various experimental conditions were investigated in order to elucidate some embryonic processes at a molecular level.

Lipovitellin from hen egg, extracted following FUJII, appears to be monodisperse, in its ultracentrifugation pattern. This preparation corresponds to that which LANZAVECCHIA called lipovitellin A. It is a globular protein with a $[\eta] = 8,5$ in 2M NaCl (II, A). LiCl added to its solution increases the salting out constant, while NaSCN or *o*-iodosobenzoic acid (IBA) decreases it (II, B). In addition, LiCl increases its resistance to denaturation and digestion, and NaSCN or IBA (II, C, D, Fig. 4) decrease it. Ultracentrifugation patterns show no substantial changes in the lipovitellin molecule by LiCl action, while denaturation with sub-units formation is seen to occur after incubation with NaSCN or IBA.

Lipovitellenin from hen egg has folded fibrillar molecules (III, A). It is possible to extract from frog egg a lipovitellenin with the same properties (IV). By dilution, the reduced viscosity of these proteins increases (Figs. 6, 11). This may be referred to an unfolding of their molecules, consequent on dilution (II, B, V, Fig. 12). By denaturation with urea and ultracentrifugation analysis it seems evident that LiCl and NaSCN act on the lipovitellenin as on lipovitellin (III, C, D).

A procedure to recognize the shape of protein molecules by studying their denaturation processes is here discussed (VI, Fig. 13).

Determination in the sea urchin embryo, as well as the first steps of development in the Amphibian embryo, are considered in relation to protein denaturation processes (VII, Figs. 14, 15, 16).

I. — INTRODUZIONE

In precedenti ricerche (riassunte in RANZI 1957 e 1962) abbiamo posto in evidenza come la determinazione embrionale dei ricci di mare e degli Anfibi sia in rapporto a trasformazioni che subiscono le proteine dell'uovo.

La via che abbiamo seguito in queste ricerche è la seguente: erano da tempo ben note alcune alterazioni dello sviluppo embrionale e da tempo si conoscevano i mezzi per produrle. Queste alterazioni sono: nello sviluppo dell'embrione dei ricci di mare: ipersviluppo degli abbozzi, che si for-

(*) Accademico.

mano al polo animale dell'uovo, a spese di quelli che si formano al polo vegetativo (animalizzazione) e la alterazione inversa l'ipersviluppo degli abbozzi, che si formano al polo vegetativo, a spese di quelli che si formano al polo animale (vegetalizzazione); nello sviluppo degli Anfibi: la formazione di una grande corda dorsale e la alterazione inversa la riduzione della corda fino a completa scomparsa e trasformazione delle sue cellule in cellule dei miotomi; sempre negli Anfibi, lo sviluppo di sistema nervoso a spese dell'epidermide presuntivo (secondo il classico esperimento dell'organizzatore di Spemann) e l'alterazione inversa, la riduzione in sviluppo del sistema nervoso.

Aggiungendo un po' di NaSCN all'acqua di mare in cui si sviluppano uova di ricci di mare, all'acqua in cui si sviluppano gli embrioni di Anfibi, o al liquido di coltura in cui si sviluppa ectoderma capintato di Anfibi, è possibile ottenere: animalizzazione, corda grande, differenziamento di cellule ectodermiche in cellule nervose. Come NaSCN agiscono l'acido α -iodosobenzoico ed altre sostanze. Invece il LiCl, aggiunto al mezzo di coltura, determina vegetalizzazione, corda ridotta e inibisce il sistema nervoso.

Nelle nostre ricerche i tre fenomeni indotti da NaSCN (animalizzazione dei ricci di mare, ingrandimento della corda degli Anfibi, trasformazione di cellule epidermiche presuntive in cellule nervose degli Anfibi) sono apparsi in rapporto a un fenomeno di denaturazione proteica. Questa nostra conclusione è nata da una lunga serie di ricerche e principalmente dalle seguenti osservazioni:

- 1) Soluzioni di sostanze proteiche estratte sia da organismi adulti (seralbumina, miosina, actina ecc.) che da uova o embrioni (euglobulina α , euglobulina β , euglobulina γ , pseudoglobulina ecc.) sono denaturate se ad esse si aggiungono le sostanze che inducono le alterazioni in questione e questa denaturazione è rilevabile quale cambiamento di viscosità, quale un aumento dei gruppi reattivi α , se la molecola proteica è filamentosa (miosina), quale perdita della birifrangenza di scorrimento.
- 2) Le proteine estratte dagli embrioni, che presentano le malformazioni in questione, sono predisposte ad una ulteriore denaturazione, quale si può ottenere con urea, o più facilmente digerite da tripsina o papaina.
- 3) Gli embrioni di riccio di mare, che si sviluppano dopo trattamento con sostanze animalizzanti, sono meno resistenti all'azione dell'urea o della tripsina degli embrioni controllo.
- 4) L'urea, il classico agente denaturante le proteine, è in grado di produrre fenomeni di animalizzazione se aggiunta all'acqua di mare nella quale si sviluppano embrioni di riccio di mare. Sempre per azione di urea si sviluppano tratti di corda dorsale e noduli nervosi in metà ventrali di gastrale iniziali di Anfibi, che non posseggono gli abbozzi presuntivi di queste strutture e non le formano se coltivate in assenza di urea o di altra sostanza animalizzante gli embrioni dei ricci di mare.

I tre fenomeni indotti dal LiCl (vegetalizzazione degli embrioni dei ricci di mare, riduzione o scomparsa della corda dorsale degli Anfibi, riduzione degli abbozzi nervosi degli Anfibi) sono apparsi nelle nostre ricerche come un effetto della stabilizzazione delle molecole proteiche, che le preserva dalla denaturazione. Questa conclusione è nata essenzialmente dalle seguenti osservazioni:

- 1) Soluzioni di proteine estratte da uova o embrioni o da organismi adulti non appaiono denaturate se ad esse si aggiunge LiCl, od altra sostanza che abbia la stessa azione nello sviluppo embrionale, e cioè la viscosità, anche per le proteine a particella filamentosa, aumenta, i gruppi reattivi non aumentano, mai si osserva all'ultracentrifuga formazione di subunità, la birifrangenza di scorrimento non cambia.
- 2) Le proteine estratte da embrioni, che presentano le malformazioni in questione, sono più resistenti all'azione denaturante dell'urea e più difficilmente digeribili da tripsina o papaina.
- 3) Gli embrioni di riccio di mare, che si sviluppano dopo il trattamento con LiCl, sono più resistenti all'azione dell'urea o della tripsina degli embrioni controllo.

Abbiamo pertanto interpretato l'azione del LiCl dovuta al fatto che il Li si lega alla molecola proteica e ne aumenta il mantello acquoso grazie alla sua notevolissima idratazione. Il mantello acquoso, così formato, protegge la molecola proteica dalla denaturazione e dall'attacco degli enzimi proteolitici, si oppone quindi alla sua metabolizzazione, con un processo che al livello molecolare è in definitiva lo stesso che i vecchi embriologi sperimentatori avevano visto a un livello microscopico e chiamato *inibizione di sviluppo*.

Tutto quanto qui esposto, se riportato al normale sviluppo, ci porta a uno schema dei processi che in questo si svolgono. La formazione dell'ectoderma e degli organi del polo animale dei ricci di mare, la formazione della corda dorsale degli Anfibi e la formazione del tubo neurale in questi animali sono accompagnate da un'intensa sintesi proteica, che presuppone una rapida metabolizzazione delle preesistenti molecole. Questa metabolizzazione è preceduta da una denaturazione proteica. Se, aggiungendo per esempio NaSCN ovvero acido o-iodosobenzoico, questa denaturazione è esaltata, gli abbozzi in questione sono più grandi, se la denaturazione invece è inibita dai mantelli di acqua del Li lo sviluppo di questi abbozzi è ridotto e magari gli abbozzi in questione scompaiono (assenza di ciuffo ciliare apicale negli embrioni di riccio di mare vegetalizzati, trasformazione della corda in somiti negli Anfibi).

Le ricerche in questione vennero però condotte o su proteine dell'adulto o su estratti di proteine dell'uovo, quest'ultime ad una ulteriore analisi apparvero polidisperse. Di qui l'interesse di ripetere tutte le esperienze sulla lipovitellina di pollo e di rana che rappresenta buona parte delle sostanze di riserva dell'uovo, e la cui purificazione in vista del presente lavoro, è stata eseguita in questo Istituto da FUJII (1960).

Inoltre tra le frazioni proteiche che avevamo estratto da uova, embrioni e dal protoplasma dell'adulto, alcune avevano mostrato proprietà peculiari (CIGADA, CITTERIO, OELANDI, RANZI e TOSI 1949, RANZI 1952, CIGADA, LANZI e BRIOSCHI 1954). Queste particolari frazioni non presentavano birifrangenza di scorrimento, ma mostravano nelle loro soluzioni aumento di viscosità dopo denaturazione. Seguendo LAWRENCE, MIALI, NEEDHAM e SIEN (1944) noi chiamiamo queste frazioni proteine filamentose ripiegate. L'analisi di queste frazioni ci mostrò però che sia l'euglobulina *a* che l'euglobulina *b* sono polidisperse (RANZI, CITTERIO e MALDACEA 1959) mentre anche la pseudoglobulina è un materiale inomogeneo (GORINI e LANZAVECCHIA 1955). Reputammo pertanto necessario reperire, tra le proteine dell'uovo, una frazione monodispersa che avesse le caratteristiche delle proteine filamentose ripiegate e le nostre ricerche arrivarono ad estrarre questa proteina dall'uovo di pollo e constatammo che essa è la lipovitellina.

Nella presente memoria esamineremo: 1) Il comportamento della lipovitellina trattata con sostanze animalizzanti e vegetalizzanti. 2) Il comportamento della lipovitellina nelle medesime condizioni. 3) I cambiamenti delle differenti molecole in rapporto alla denaturazione. 4) Alcune conclusioni che si possono trarre sui fenomeni dello sviluppo embrionale.

II. — RICERCHE SULLA LIPOVITELLINA

A) Preparazione e viscosità

Per la preparazione della lipovitellina siamo partiti dal metodo di FUJII (1960) usando uova di pollo (*Gallus gallus* L., razza livornese); in alcuni esperimenti ci siamo anche serviti di uova di rana (*Rana esculenta* L.). Le uova (rosso dell'uovo) vennero usate sia fresche che liofilizzate e vennero anche variate le soluzioni usate per le estrazioni (2 M NaCl, 1 M KCl).

Il tuorlo d'uovo isolato dall'albume è lavato in soluzione fisiologica (0,9% NaCl). Dopo rottura della membrana vitellina il tuorlo dell'uovo viene filtrato attraverso garza. Il filtrato viene diluito con H₂O bidistillata a 0° C, 20 volte il volume. Il precipitato ripreso e omogenizzato in 2 M NaCl è diluito 10 volte il volume con H₂O bidistillata. Dopo una notte in camera fredda a 0° C si centrifuga e il sottostante è ripreso in 2 M NaCl. Questo procedimento è ripetuto 2 volte. Il precipitato finale è ripreso in 2 M NaCl e ultracentrifugato per 180 minuti a 105.000 × g (= 40.000 giri minuto). Il tubo in luteosteroido contenente il materiale viene gelato a -25° C e poi tagliato con un coltello in maniera da separare il supernatante dalla fase sottostante povera di grassi. Il sottostante viene disgelato e ripreso in 2 M NaCl, poi diluito 10 volte con H₂O bidistillata; il precipitato così ottenuto è ripreso in 2 M NaCl. Esso contiene il componente (lipovitellina A di LANZAVECCHIA 1955) che ha coefficiente di sedimentazione più elevato $s_{20,w}^{0}$ pari a 9,8 S misurato in 2 M NaCl (10,5 misurato in 1 M NaCl da BERNARDI e COOK 1960).

Se anziché partire dal tuorlo fresco si parte da tuorlo liofilizzato si ottiene in soluzione una sostanza che ha proprietà fisico chimiche differenti. Infatti col metodo di RANZI e CRITERIO (1954) appare contenere particelle filamentose ripiegate. Comunque preparata, la lipovitellina non mostra mai birifrangenza di scorrimento, sia che venga guardata alla cella di GERANDAS, sia che venga guardata all'apparecchio di SIGNER e la birifrangenza non compare nemmeno con l'aggiunta di glicerolo. Se però si preparano due campioni di 5 ml. e si aggiunge al controllo 0,6 ml. di 2 M NaCl e al campione da denaturare 0,6 ml. di una soluzione al 30% di urea e dopo 4 ore nel bagno del viscosimetro (14,0 ± 0,1° C) si leggono le viscosità: si ottengono i risultati della Tabella 1 e cioè la lipovitellina da tuorlo fresco appare globulare, quella da tuorlo liofilizzato filamentosa ripiegata.

TABELLA I.

| η_{sp} | controllo | urea | variazione percentuale |
|---|-----------|--------|------------------------|
| lipovitellina da tuorlo fresco 0,672% (*) | 0,1228 | 0,1351 | + 10,2% |
| lipovitellina da tuorlo liofilizzato 0,270% | 0,0293 | 0,0146 | - 50,2% |

Per vedere se questa differenza sia semplicemente in rapporto alla liofilizzazione, abbiamo preso la lipovitellina estratta da tuorlo fresco, l'abbiamo liofilizzata e poi ridisciolta in 2 M NaCl e abbiamo trovato un materiale che si comportava come la lipovitellina estratta da tuorlo fresco, Tabella 2.

(*) Ricordando che la lipovitellina contiene il 18,2% di grassi (LANZAVECCHIA, 1955) tutte le percentuali di lipovitellina sono ottenute determinando al Parnas la quantità di N e poi agguando col seguente calcolo $C = \frac{100 N \times 6,25}{81,8}$.

TABELLA 2.

| η_{sp} | controllo | urea | variazione |
|---------------------------------|-----------|--------|------------|
| concentrazione 0,817% | 0,1506 | 0,1749 | + 16,1% |

I dati di viscosità ridotta mostrano per la lipovitellina, preparata secondo FURTI da materiale fresco, una curva che risponde a quella di questo autore (Fig. 1) e cioè una viscosità intrinseca ⁽¹⁾ che nel nostro caso è $[\eta] = 8,5$ in 2 M NaCl.

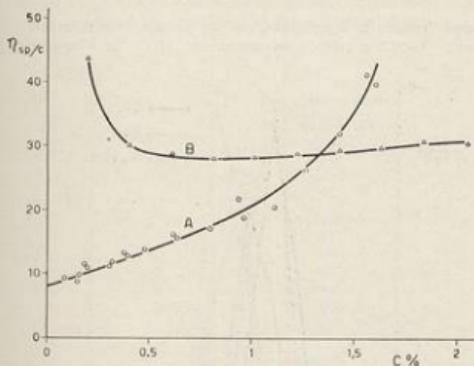


Fig. 1. - Viscosità ridotta: A, di lipovitellina estratta in 1M KCl da tuorlo di uovo fresco; B, di lipovitellina estratta nelle medesime condizioni da tuorlo liofilizzato.

⁽¹⁾ $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/c$; dove $[\eta]$ è la viscosità intrinseca; η_{sp} la viscosità specifica; c la concentrazione del soluto che si esprime come frazione del volume della fase dispersa includendo in questo volume il volume dell'acqua d'idratazione, e indicando poi questo valore con tutte le correzioni con la lettera Φ . In pratica però si finisce per usare il valore c espresso in gr per litro omettendo l'acqua d'idratazione, pertanto commettendo un errore; η_{sp}/c è la viscosità ridotta che ha un valore diverso col variare di c ; $\eta_{sp} = \eta_r - 1$ dove η_r è la viscosità relativa; $\eta_r = \frac{t_1 P_1}{t_2 P_2}$ dove t_1 è il tempo di caduta letto al viscosimetro per la soluzione e t_2 il tempo di caduta letto allo stesso viscosimetro per il solvente (a identica temperatura) e P_1 e P_2 rispettivamente il peso specifico della soluzione e del solvente. $[\eta] = \Phi v$ in questa eguaglianza compare il valore v che è l'incremento di viscosità del soluto e che dipende dalla forma delle molecole in soluzione $v = 2.5$ per particelle sferiche, aumenta con la asimmetria di queste. Le tavole calcolate da MEHL, ONCLEY e SUMMA (1946) permettono, immaginando le molecole come ellissoidi di rivoluzione, di calcolare da v il rapporto a/b tra i due assi dell'ellissoide. È questo il metodo che noi abbiamo seguito per calcolare lo spiegamento della lipovitellina per effetto della diluizione.

Nel caso invece di materiale estratto da tuorlo liofilizzato si ottiene una curva che dimostra un aumento della viscosità ridotta con la diluizione e pertanto non estrapolabile a 0 concentrazione (Fig. 1). Quindi, partendo da materiale liofilizzato, si ottiene in soluzione una proteina filamentosa ripiegata (diminuzione di viscosità dopo denaturazione, assenza di birifrangenza di scorrimento, aumento della viscosità intrinseca con la diluizione). In tutto quanto qui segue abbiamo pertanto usato sempre lipovitellina ottenuta da tuorlo di uovo fresco e ripresa in 2 M NaCl, per essere sicuri di avere davanti una proteina globulare monodispersa.

B) *Salting out*

Abbiamo trattato la lipovitellina sia con sostanze vegetalizzanti (LiCl) che animalizzanti (NaSCN e acido o-iodosobenzoico: IBA). La soluzione di proteina

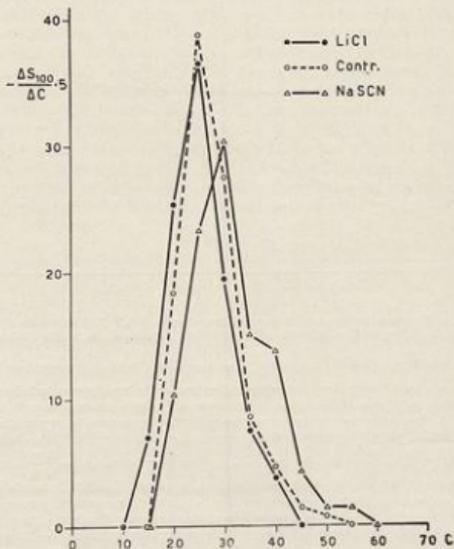


Fig. 2. - Salting out di lipovitellina ripresa in 2M NaCl (Controllo) trattata per una notte con LiCl (concentrazione finale 0,25M; forza ionica 2) o con NaSCN (concentrazione finale 0,25M; forza ionica 2).

(2 M NaCl) era diluita con una soluzione della sostanza in questione, preparata alla stessa forza ionica, e lasciata per una notte in ghiacciaia, la mattina dopo si montava il salting out e il giorno dopo si leggeva l'assorbimento del supernatante a 275 m μ , secondo il metodo descritto in RANZI, CITTERIO e SAMUELLI (1960).

Da una soluzione di lipovitellina al 0,704% vennero preparati cinque campioni, tre dei quali diluiti 7 : 1 come segue : 2 M NaCl (controllo); 2 M LiCl (concentrazione finale 0,25 M LiCl); 2 M NaSCN (concentrazione finale 0,25 M NaSCN); altri due vennero diluiti 1 : 1 con 2 M NaCl pH 8,6 (controllo); 0,013 M IBA in 2 M NaCl pH 8,6 (concentrazione finale 0,0065 M IBA).

Dai diagrammi di salting out (Figg. 2,3) si vede che la lipovitellina trattata con LiCl precipita a pi \dot{u} basse concentrazioni di ammonio solfato rispetto al controllo, mentre i campioni trattati con NaSCN e IBA hanno diagrammi di salting out molto

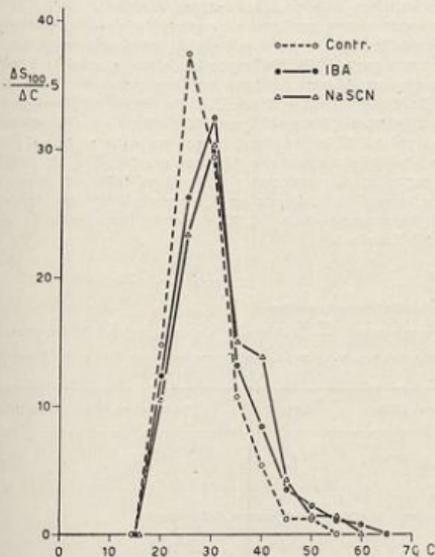


Fig. 3. - Salting out di lipovitellina ripresa in 2M NaCl a pH 8,6 (Controllo), trattata per una notte con NaSCN (concentrazione finale 0,25M; forza ionica 2) e con o-iodosobenzato (concentrazione finale 0,0065M; forza ionica 2).

simili tra loro e precipitano a più elevata concentrazione rispetto al controllo. Infatti al 25% di saturazione di ammonio solfato è precipitato il 69,0% del materiale precipitabile nel campione LiCl; il 57,2% nel controllo non tamponato; il 52,3% nel controllo a pH 8,6; il 33,8% nel campione con NaSCN; il 36,6% nel campione con IBA. Il LiCl aumenta cioè la costante di salting out ⁽¹⁾, il NaSCN e il IBA la diminuiscono.

C) Resistenza alla denaturazione indotta da urea

L'azione del LiCl, del NaSCN e dell'IBA sulla lipovitellina emerge anche da un'altra serie di esperimenti e cioè studiando l'azione di un energico denaturante quale l'urea sulla proteina trattata con queste sostanze. La Tabella 3 dimostra una maggiore resistenza all'azione demolente dell'urea, delle proteine trattate con LiCl, una minore resistenza delle proteine trattate con NaSCN o IBA.

L'esperimento veniva condotto col seguente schema. Si prendeva una soluzione di lipovitellina al 0,85% e a tre parti di essa si aggiungeva una parte di 2M NaCl, ovvero una parte di 2M NaCl mescolato a una soluzione 2M NaSCN, ovvero 2M LiCl, in maniera di avere nel tutto una concentrazione finale di 0,974M per LiCl e per NaSCN e $9,6 \times 10^{-3}$ M per IBA. Per l'acido o-iodosobenzoico invece si prendevano 25 parti di soluzione di lipovitellina e 2 parti di IBA sciolto in 2M NaCl tamponato a pH 8,6. Si lasciava incubare per una notte a 0°C e il giorno dopo si prendevano 5 ml della soluzione e si diluivano con 0,6 ml di 2M NaCl (questo serviva come controllo). Si prendevano poi altri 5 ml della soluzione e si diluivano con 0,6 ml di urea al 30%. Questo era il campione diluito con l'urea. Dopo quattro ore nel viscosimetro a $14,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ si leggeva la viscosità. Le viscosità sono riportate nella Tabella 3.

TABELLA 3.

Resistenza della lipovitellina all'urea.

I valori rappresentano $\frac{100 \eta_2}{\eta_1}$ dove η_2 è la viscosità specifica del campione trattato dopo incubazione con urea e η_1 è la viscosità dello stesso campione diluito con il solvente invece che con urea.

| Trattato con LiCl | Controllo | Trattato con IBA | Trattato con NaSCN |
|-------------------|--------------|------------------|--------------------|
| 194,4 ± 2,47 | 114,4 ± 0,14 | 115,8 | 118,1 ± 0,81 |

⁽¹⁾ La costante di salting out K_s emerge dall'equazione

$$\log S = \beta - \frac{K_s I}{2}$$

dove S è la solubilità, I la forza ionica espresse ambedue in gr. per 1000 e β è l'intercetta sulle ordinate della porzione lineare della curva di solubilità ottenuta riportando sulle ascisse I/2 e sulle ordinate log S.

D) Resistenza alla digestione con tripsina.

È questo un altro metodo per porre in evidenza l'azione del LiCl e del NaSCN o dell'acido o-iodosobenzoico.

Preparata la lipovitellina in 2M NaCl si diluisce 10:1 con una soluzione di 2M NaCl (controllo), 2M NaCl con aggiunto 2M LiCl, ovvero 2M NaSCN, ovvero 2M NaCl con disciolto acido o-iodosobenzoico (in questo ultimo caso la soluzione era tamponata a pH 8,6). La concentrazione finale nel tutto era 0,074M per LiCl e per NaSCN e $9,6 \times 10^{-5}$ M per l'IBA. Dopo una notte in ghiacciaia i quattro campioni erano dializzati a lungo contro una soluzione 2M NaCl a pH 8,6 rinnovata parecchie volte. Si riscaldavano poi a 37°C e a questa temperatura si facevano digerire, aggiungendo ad essi un ugual volume di 1% di tripsina Merck sciolta in liquido di WHEELER ed EDSALL (pH 8,6). Si prelevavano poi periodicamente campioni di 1 ml. e si precipitava diluendo ogni campione con 1 ml. di una soluzione 10% acido tricloroacetico. Dopo una notte in ghiacciaia si filtrava su carta Schleicher & Schüll N. 589³ e si assumeva la densità ottica del supernatante a 275 m μ (spettrofotometro di BECKMAN) come quantità delle sostanze digerite.

Nella Fig. 4 è riportato nel tempo l'aumento graduale delle sostanze digerite e da essa emerge che l'assorbimento, dopo precipitazione con acido tricloroacetico,

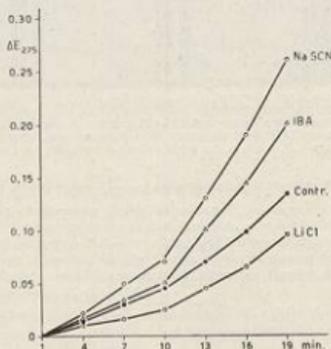


Fig. 4. - Una soluzione di lipovitellina di uovo di pollo venne incubata con NaSCN, IBA, LiCl, ovvero semplicemente diluita col solvente (Controllo), poi digerita con tripsina. Dopo un tempo di digestione indicato nelle ascisse è precipitata con acido tricloroacetico e letta la densità ottica del supernatante. Sulle ordinate le differenze tra le diverse letture e il valore di estinzione al tempo 1 (estimazione 0,360 a 275 m μ).

è più forte nel supernatante di lipovitellina trattata con NaSCN, minore nel caso dell'acido o-iodosobenzoico, e ancora minore nel controllo mentre è minore nel campione trattato con LiCl. Anche in questo caso si ha un andamento simile a quello già osservato per le proteine estratte da embrione (RANZI 1957) e cioè il LiCl protegge, il NaSCN facilita la digestione.

E) *Analisi all'ultracentrifuga*

Come abbiamo detto la lipovitellina da noi preparata e purificata appariva all'ultracentrifuga analitica monodispersa in 2M NaCl. Monodispersa è anche se diluita con 2M LiCl (concentrazione finale del LiCl nel tutto pari a 0,05-0,07M) e incubata per una notte in ghiacciaia. La costante di sedimentazione s_{20w}^0 non varia sensibilmente (s_{20w}^0 pari a 9,8 S in 2M NaCl; 10,5 S in 2M NaCl + LiCl) (1). C'è

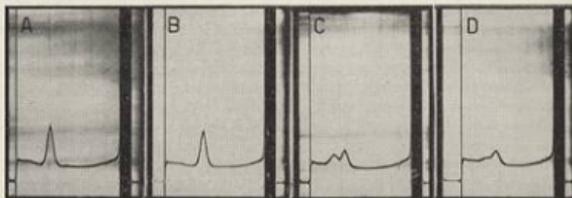


Fig. 5. - Comportamento all'ultracentrifuga della lipovitellina dell'uovo di pollo incubata con diverse sostanze. Ultracentrifuga Spinco a 59780 giri minuto. A, controllo (dopo 45 minuti dalla partenza); B, trattata con LiCl (dopo 45 minuti dalla partenza); C, trattata con NaSCN (dopo 39 minuti dalla partenza); D, trattata con acido iodobenzoico (dopo 45 minuti dalla partenza).

(1) Il coefficiente di sedimentazione s è uguale a $s = \frac{dx/dt}{\omega^2 x}$ dove ω è la velocità angolare, x è la distanza della punta che appare nel diagramma dall'asse di rotazione dell'ultracentrifuga e dx/dt gli spostamenti della punta nel tempo. s_{20} è il coefficiente di sedimentazione a 20°C e cioè determinato a 20°C (caso dei coefficienti qui presentati) o riportati a 20°. s_{20w} è il coefficiente di sedimentazione determinato in acqua ovvero riportato, in acqua ammettendo (ammissione in molti casi completamente teorica) che in acqua la molecola non cambi. La correzione si fa secondo la formula:

$$s_w = s \frac{\eta(1 - \bar{V}\rho)}{\eta_w(1 - \bar{V}\rho)}$$

che, con qualche approssimazione, per le proteine può essere scritta:

$$s_w = s \frac{\eta}{\eta_w} \cdot \frac{0,2523}{1 - \bar{V}\rho}$$

Dove s è il coefficiente di sedimentazione osservato per una soluzione di viscosità η e di densità ρ quando il volume specifico delle proteine è \bar{V} , mentre η_w è la viscosità dell'acqua.

s^0 è la costante di sedimentazione che si ricava graficamente estrapolando a concentrazione 0 i coefficienti di sedimentazione a diverse diluizioni. Pertanto s_{20w}^0 è la costante di sedimentazione in acqua a 20°C, come per convenzione si presentano le costanti di sedimentazione di tutte le proteine. L'unità che esprime la sedimentazione è lo Svedberg (S). 1S = 10¹³ s.

effettivamente un leggero aumento che corrisponde evidentemente alla differenza riscontrata da PEDERSEN (1958) per la costante di sedimentazione di serralbumina sciolta in LiBr rispetto a serralbumina sciolta in NaBr.

Dopo incubazione per una notte con NaSCN alla concentrazione finale di 0,05-0,5M o di acido o-iodosobenzoico (alla concentrazione finale di $6,10^{-2}$ M) (sempre aggiunti diluendo una soluzione in 2M NaCl con una soluzione di forza ionica 2: e cioè IBA era sciolto in 2M NaCl) la lipovitellina non è più monodispersa ma si vedono due frazioni, una con $s_{20,w}^0$ pari a 7,8 S l'altra con $s_{20,w}^0$ pari a 11,4 S. (Fig. 5) (4).

Di queste, la frazione lenta è evidentemente la subunità ottenuta da lipovitellina da BERNARDI e COOK (1960) per azione di soluzioni alcaline ($s_{20,w}^0 = 7,4$).

F) *Discussione*

Dai dati qui esposti emerge che le conclusioni cui giungemmo e cioè che il LiCl preserva la molecola proteica dalla denaturazione e dall'azione degli enzimi proteolitici e che viceversa il NaSCN e l'acido o-iodosobenzoico denaturano la molecola proteica e ne favoriscono la demolizione, possono essere dimostrate su di una proteina pura monodispersa: la lipovitellina dell'uovo di pollo.

In questa si osserva anche la formazione di subunità per azione delle sostanze denaturanti usate e si deve ammettere che a questa formazione di subunità possano essere dovute la predisposizione ad una ulteriore demolizione, indotta da urea, e la digestione dovuta a tripsina.

Risulta pertanto provato, anche per una proteina pura e monodispersa, quello che sempre abbiamo sostenuto e cioè che 1) le sostanze animalizzanti denaturano le proteine e inducono formazioni di subunità (nel 1950 RANZI diceva denaturazione e depolimerizzazione), 2) le sostanze vegetalizzanti stabilizzano la molecola proteica (RANZI e CITTERIO 1953).

III. — RICERCHE SULLA LIPOVITELLENINA DI POLLO

A) *Preparazione*

Con queste ricerche volevamo anche identificare la proteina che in soluzione appariva filamentosa ripiegata.

Abbiamo già detto che nelle soluzioni estratte da tuorlo di uovo di pollo si può ottenere una soluzione di lipovitellina monodispersa estraendo col metodo di FUJII. È possibile preparare questa proteina:

- 1) partendo da tuorlo fresco ed estraendo in NaCl (metodo descritto pag. 15).
- 2) partendo da tuorlo fresco ed estraendo in KCl.

(4) Si noti che, poiché $11,4 = 8,1 \times \sqrt{2}$, si può con molta verisimiglianza ammettere la rottura della molecola in due monomeri.

- 3) prendendo una soluzione di proteina preparata secondo FUJI, lioflizzando e riportando in soluzione.
- 4) prendendo una soluzione preparata secondo FUJI, sbattendolo ripetutamente con etere solforico onde delipidare ed eliminando poi l'etere col grasso sciolto.
- 5) prendendo una soluzione preparata secondo FUJI lioflizzandola e delipidandola poi.

Riassumendo: una volta estratta la lipovitellina è impossibile modificarne sensibilmente la forma delle molecole, con tutti i metodi di estrazione o di ripresa da noi usati.

Se però si lioflizza prima il tuorlo d'uovo e poi si estrae la lipovitellina, seguendo il metodo di FUJI, si ottiene una soluzione che contiene particelle filamentose ripiegate, e cioè la soluzione non presenta birifrangenza di scorrimento e diminuisce di viscosità se la proteina viene denaturata. Proprietà questa che si osserva nella soluzione ottenuta estraendo in 1M KCl e precipitando poi per diluizione a 0,3M e riprendendo in soluzione il precipitato in 1M KCl (soluzione questa che sempre abbiamo chiamato englobulina $a + b$). Questo sia che si parta da materiale lioflizzato, sia che si parta da materiale fresco, delipidato o no, e che si estraiga in KCl tamponato o no.

In conclusione esiste una frazione che è presente con la lipovitellina nella englobulina $a + b$, frazione che dà alla soluzione le caratteristiche delle proteine filamentose ripiegate. Questa frazione è estraibile anche da tuorlo non delipidato e, dopo lioflizzazione del tuorlo fresco, contamina sempre le soluzioni di lipovitellina estratta secondo FUJI.

Partendo da questo dato bisognava pensare che nel materiale che si scartava estraendo la lipovitellina secondo FUJI fosse presente questa frazione. Il metodo per ricercarla era semplice perché essa doveva diminuire di viscosità con la denaturazione (con NaSCN o urea) e non presentare birifrangenza di scorrimento. Un simile materiale è stato rinvenuto nel supernatante quando nella preparazione della lipovitellina si centrifuga a $144700 \times g$.

Il sistema di preparazione è pertanto il seguente. Quando si centrifuga per purificare la lipovitellina si trova un supernatante ricchissimo di grasso che si isola facilmente tagliando il tubo dell'ultracentrifuga precedentemente congelato a -29°C . Il supernatante di questo tubo viene riscaldato a 0°C , diluito con H_2O distillata a 0°C nelle proporzioni 1:5 e lasciato per una notte in camera fredda a 0°C . La mattina dopo si osserva un precipitato che è ripreso in 2M NaCl e delipidato con etere, saturo in una soluzione 2M NaCl, in imbuto separatore fino a completo allontanamento dei grassi liberi. La frazione così purificata è la lipovitellina. All'ultracentrifuga essa appare monodispersa ($S_{20,w}^0 = 10,4 \text{ S}$).

Per indagare la forma delle particelle in soluzione della lipovitellina così preparata abbiamo determinato i cambiamenti di viscosità dopo denaturazione, la viscosità ridotta, la birifrangenza di scorrimento, il comportamento all'ultracentrifuga.

B) Proprietà viscosimetriche

Come si è detto, la lipovitellenina non presenta birifrangenza di scorrimento e con la denaturazione la viscosità delle sue soluzioni diminuisce:

concentrazione 1,47% (1) controllo η_{sp} 0,0778, trattato con urea 0,0603.

La curva di viscosità ridotta η_{sp}/c tende asintoticamente a raggiungere l'asse delle y e pertanto non è estrapolabile a $c = 0$ (Fig. 6), una curva cioè simile a quella delle soluzioni di englobulina $a + b$. Non sembra vi siano molte proteine studiate

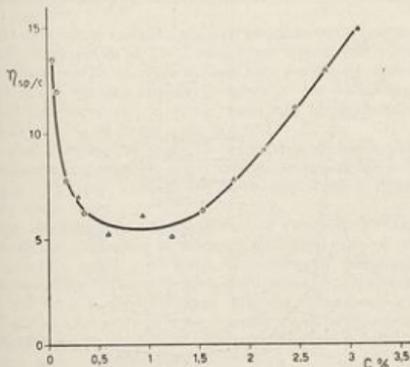


Fig. 6. - Viscosità ridotta di soluzioni di lipovitellenina in 2M NaCl. Diluendo a concentrazioni più basse di 0,5% la viscosità ridotta aumenta notevolmente.

che presentano una curva di viscosità ridotta di questo tipo se YANG (1961 pag. 388), rivedendo la questione della viscosità delle macromolecole, conosce questa curva per i polimeri sintetici, ma non per le proteine.

Si pone quindi per la lipovitellenina la domanda della forma delle molecole in soluzione tenendo conto di queste tre proprietà: assenza di birifrangenza di scorri-

(1) Ricordando che la lipovitellenina contiene circa il 40% di grassi (FEVOLD 1954) tutte le concentrazioni sono state ottenute determinando l'azoto e calcolando $C = \frac{100 N \times 6,25}{60}$. Lo stesso si è fatto per la lipovitellenina di rana, sebbene manchino dati sul tenore percentuale in lipidi di quest'ultima.

mento, aumento di viscosità con la denaturazione, viscosità ridotta che aumenta a elevate diluizioni (< 0,8%).

Per quanto concerne l'osservato aumento della viscosità ridotta (η_{sp}/c) con la diluizione e la conseguente impossibilità di estrapolare a 0 per determinare la viscosità intrinseca, varie sono le interpretazioni che se ne danno. Vi potrebbero essere due fenomeni: 1) un gonfiamento o spiegamento della molecola quando, per la diluizione, nella soluzione viene a diminuire l'interazione tra le diverse molecole (interpretazione data da BALTZER (1954) per soluzioni di polimeri sintetici), 2) una adesione di alcune molecole alla superficie del canale del viscosimetro per cui in soluzioni più diluite passano più lentamente (interpretazione data da ÖREN per soluzioni di

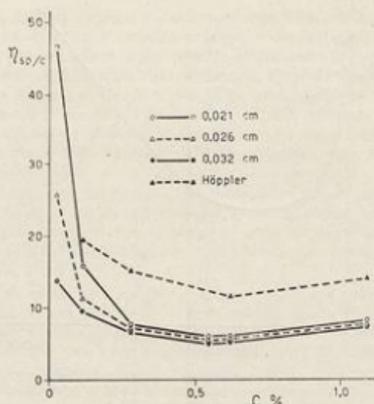


Fig. 7. - Valori di viscosità ridotta letti in tre viscosimetri di OSTWALD di calibro diverso (calibro indicato in cm) e nel viscosimetro di HÖPPLER.

polimeri sintetici). Per chiarire questo punto abbiamo preparato soluzioni variamente diluite e abbiamo determinato la loro viscosità ridotta seguendo il metodo proposto da ÖREN e cioè con viscosimetri OSTWALD di diverso calibro. I risultati di questa determinazione sono espressi nella Fig. 7. Essi dimostrano che l'aumento del valore η_{sp}/c a basse diluizioni è più evidente se la determinazione è eseguita con un viscosimetro a calibro piccolo. Sembrerebbe pertanto che la conclusione di ÖREN sia giusta. Abbiamo però preso un viscosimetro di HÖPPLER e con esso abbiamo eseguito le stesse determinazioni su di un'altra soluzione di lipovitellina. Anche

col viscosimetro di HÖPPLER si osserva lo stesso aumento del valore η_{sp}/c . Abbiamo quindi eseguito un altro esperimento.

Se si prende una soluzione di lipovitellenina all'1,33% e si diluisce col solvente portandola a 1,18% si vede dopo 4 ore che η_{sp} (viscosimetro di OSTWALD) aumenta del 15,0% (concentrazione 1,33% $\eta_{sp} = 0,100$; concentrazione 1,18% $\eta_{sp} = 0,115$). Vi è cioè un gonfiamento che si riesce a porre in evidenza quando si diluisce poco anche a elevate concentrazioni, alle concentrazioni cioè in cui diluendo maggiormente il valore di η_{sp} diminuisce. Per eliminare il dubbio di essere in presenza di un fenomeno dipendente dal tipo di viscosimetro usato abbiamo preso anche il viscosimetro di Höppler e abbiamo con esso ripetuto l'osservazione riscontrando un aumento del 14,3%.

Onde analizzare questo fenomeno abbiamo preparato una soluzione di lipovitellenina all'1,33% e diluendola all'1,18% nello stesso viscosimetro abbiamo letto la viscosità in tempi successivi. Lo stesso abbiamo fatto con una soluzione allo 0,133%. In entrambi i casi la viscosità aumenta gradatamente per stabilizzarsi dopo circa 4 ore dall'inizio dell'esperimento. In questo tempo tutte le trasformazioni responsabili dell'aumento di viscosità hanno avuto luogo (*).

Restava però il dubbio, seguendo l'interpretazione di ÖHRN, che il graduale aumento di viscosità corrispondesse non a un cambiamento della lipovitellenina in soluzione, ma a un graduale aumento dell'altezza degli strati di molecole aderenti alle pareti del viscosimetro.

Per questo abbiamo preso un viscosimetro di OSTWALD, abbiamo preparato una soluzione all'1,33% diluendo al momento e abbiamo letto al viscosimetro: al tempo 0 $\eta_{sp} = 0,098$; dopo 4 ore 0,115. Senza lavare il viscosimetro abbiamo preparato con una nuova diluizione un'altra soluzione all'1,33%, letta subito, abbiamo letto 0,098 e poi abbiamo visto l'aumento. Ripetuto l'esperimento con una soluzione 0,133% abbiamo osservato lo stesso fenomeno (0,017 al momento della diluizione, poi 0,043). E cioè lo spiegamento delle molecole con la diluizione si può mettere in evidenza anche in queste condizioni (**).

Le soluzioni di lipovitellina invece non presentano con la diluizione nessun aumento di viscosità. Se infatti si parte da una soluzione quale estratta al 7,5% e si diluisce nel viscosimetro portandola allo 0,133% la sua viscosità specifica dell'ordine di 0,009 al momento della diluizione non cambia sensibilmente nel tempo (esperimento della durata di 27 ore).

(*) Le variazioni di viscosità in funzione del tempo si comportano come quelle delle soluzioni di acetoinosina trattate con diverse sostanze (LiCl, NaSCN) (CIGADA, CITTERIO, ORLANDI, RANZI e TOSI 1949, RANZI e CITTERIO 1954).

(**) Il lavoro di ÖHRN (1958) ci spinse a rivedere se il metodo viscosimetrico basato sulla denaturazione, che noi usavamo per determinare la forma delle molecole proteiche in soluzione, dipendesse, per la lipovitellenina, dal tipo di viscosimetro usato (OSTWALD). Eseguimmo pertanto determinazioni con il viscosimetro di HÖPPLER e determinazioni di tensione superficiale valendosi del tensiometro di DU NOÛY dato che avevamo posto in evidenza (CIGADA, CITTERIO, ORLANDI, RANZI e TOSI 1949) che, anche seguendo le variazioni della tensione superficiale, si poteva riconoscere la

C) Resistenza alla denaturazione indotta da urea.

Abbiamo a questo punto voluto studiare la resistenza alla denaturazione indotta da urea delle soluzioni di lipovitellenina variamente trattate. La resistenza all'urea è stata studiata secondo lo schema di esperimento eseguito per la lipovitellenina. Si è diluita la soluzione con 2M NaCl (concentrazione finale nel tutto 0,5M LiCl) ovvero si è diluita con 2M NaSCN (concentrazione finale nel tutto 0,05M NaSCN ovvero 0,5M NaSCN). Il controllo era rappresentato da una soluzione diluita col solvente.

Dopo incubazione di una notte in camera fredda le diverse soluzioni, tutte preparate alla stessa concentrazione di proteine (1,3% in un esperimento, 1,1% in un altro), presentavano viscosità più elevata che nel controllo nei campioni trattati con LiCl, più bassa nei campioni trattati con NaSCN. Si aggiungevano poi 0,6 ml di una soluzione di urea al 30% ogni 5 ml di soluzione; nelle soluzioni che servivano di controllo 0,6 ml di 2M NaCl. Dopo quattro ore nel bagno del viscosimetro, la viscosità di tutti i campioni trattati con urea è diminuita rispetto a quella del controllo, diluito col solvente. Questa diminuzione è massima per i campioni trattati con NaSCN (più elevata nel campione trattato con 0,05M), minima per i campioni trattati con LiCl (Tabella 5).

La lipovitellenina si comporta cioè come la euglobulina $a + b$ negli esperimenti di RANZI e CITTERIO (1954).

forma delle molecole proteiche in soluzione. I dati delle nostre osservazioni sono riportati nella tabella 4.

TABELLA 4

| Metodo usato | Concentrazione della lipovitellenina | Controllo | NaSCN | Urea |
|--|--------------------------------------|-----------|-------|------|
| Viscosità ridotta (Höppler) | 1,33% | 16,0 | 14,3 | 13,8 |
| Tensione superficiale (dine) | 1,33% | 70,0 | 68,1 | 67,3 |
| Idem | 0,67% | 69,0 | 67,7 | 67,1 |
| Idem | 0,33% | 67,0 | 66,3 | 65,5 |
| Idem | 0,13% | 66,4 | 65,3 | 65,0 |

Da così emerge che sia col viscosimetro di HÖPPLER sia col tensiometro di DU NOÛY si può mettere in evidenza la diminuzione di viscosità o di tensione superficiale in rapporto alla denaturazione della lipovitellenina e che pertanto il metodo dipende dalle proprietà viscosimetriche della proteina, secondo quanto da noi precedentemente illustrato.

TABELLA 5.

Resistenza della lipovitellina all'urea. I valori rappresentano frazioni $\frac{1000 \eta}{\zeta}$ (cfr. Tabella 1).

| Trattato con LiCl | Controllo | Trattato con NaSCN |
|-------------------|-----------|--------------------|
| 770 ± 14,4 | 715 ± 0,7 | 581 ± 11,6 |

D) Analisi all'ultracentrifuga

Il comportamento della lipovitellina dopo incubazione con NaSCN (concentrazione finale 0,5M ovvero 0,05M) ovvero con LiCl (concentrazione finale 0,5M), (le diluizioni furono eseguite come negli altri esperimenti sopra descritti in maniera che la forza ionica fosse in tutti i campioni pari a 2) venne studiata all'ultracentrifuga (Fig. 8). La proteina, che presenta un $s_{20,w}^0$ pari a 10,4 S in 2M NaCl, è ancora monodispersa in presenza di LiCl e il suo $s_{20,w}^0$ è 10,4. Invece, dopo incubazione con

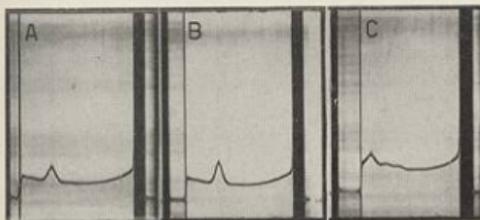


Fig. 8. - Comportamento all'ultracentrifuga di lipovitellina di pollo incubata con diverse sostanze. Ultracentrifuga Spinco a 59780 giri minuto. A, controllo (dopo 36 minuti dalla partenza); B, trattata con LiCl (dopo 38 minuti dalla partenza); C, trattata con NaSCN (dopo 37 minuti dalla partenza).

NaSCN, presenta oltre al componente originario due altri componenti a più bassa costante di sedimentazione. Gli $s_{20,w}^0$ dei tre componenti sono rispettivamente 11,7; 7,4; 3,4 e cioè evidentemente le molecole native, denaturandosi, danno origine alla formazione di più piccole unità, parallelamente a quanto avviene per la lipovitellina e a quanto da noi sempre sostenuto.

IV. — LIPOVITELLENINA DI UOVA DI RANA

A questo punto abbiamo voluto vedere se la lipovitellina, estratta da uova ovariche di *Rana esculenta*, presenta le stesse caratteristiche fisico chimiche riportate per quella dell'uovo di pollo.

Le uova ovariche, lavate e omogenizzate in NaCl 0,6%, vengono centrifugate per 3 minuti a 3500 giri. Il sedimento è ripreso in NaCl 10% e centrifugato; il supernatante viene diluito 10 volte il volume con H₂O bidistillata fredda. Questo procedimento è ripetuto una volta. Il precipitato finale è ripreso in NaCl 10% e ultracentrifugato per circa 180 minuti a 144700 × g. Le due fasi ottenute vengono separate dopo il congelamento a -25°C, tagliando i tubi. Il supernatante precipitato con H₂O bidistillata a 0°C nelle proporzioni 1:5 è lasciato per una notte in camera fredda. Il sottostante, ripreso in NaCl 10%, viene delipidato con etere saturo in NaCl in imbuto separatore fino a completo allontanamento dei grassi liberi.

Il materiale così purificato contiene la lipovitellenina.

L'analisi all'ultracentrifuga delle soluzioni all'1,56% di questa lipovitellenina in 10% NaCl mostra la presenza di quattro componenti a diverso coefficiente di sedimentazione ($s_{20,w} = 3,6; 9,8; 13,3; 19,2$ S); si tratta pertanto di materiale polidisperso (Fig. 9) che non abbiamo cercato di purificare ulteriormente. Lo spettro di assorbimento è abbastanza simile a quello della lipovitellenina di pollo (Fig. 10).

Come le soluzioni di lipovitellenina da tuorlo di uovo di pollo, quelle di lipovitellenina di rana mostrano contenere particelle filamentose ripiegate in quanto, osservate alla cella di Geradà, non presentano birifrangenza di scorrimento, ma trattate con i soliti agenti denaturanti presentano un abbassamento di viscosità.

Lipovitellenina da uova ovariche di rana, $c = 0,31\%$:

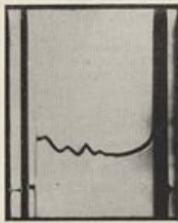


Fig. 9. - Diagramma di ultracentrifugazione della preparazione che contiene la lipovitellenina di rana. Ultracentrifuga Spinco a 59780 giri minuto dopo 37 minuti dalla partenza.

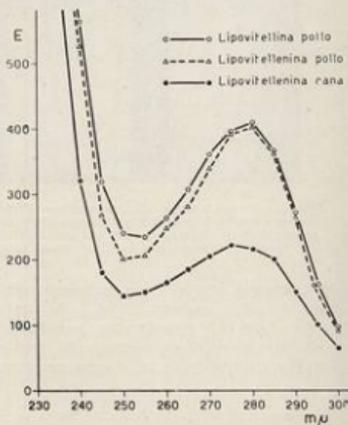


Fig. 10 - Spettro di assorbimento di lipovitellenina e lipovitellenina di pollo e della preparazione contenente lipovitellenina di rana (in tutti i campioni 5,9 mg N per ml di solvente: 2M NaCl).

Controllo $\tau_{sp} = 0,1022$; denaturata con urea $\tau_{sp} = 0,0649$; variazione — 36,5%.
Diluendo le soluzioni di lipovitellenina si vede che la viscosità ridotta, gradatamente diminuisce fino ad una concentrazione dell'1,2% di proteina e poi aumenta fino a valori notevolmente elevati (Fig. 11).

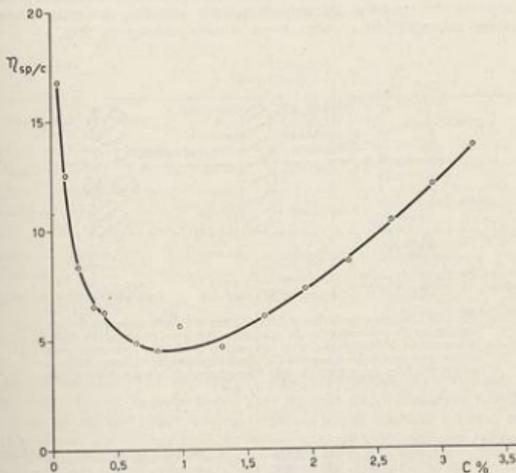


Fig. 11. - Viscosità ridotta della soluzione contenente lipovitellenina di rana in 2M NaCl. La soluzione corrisponde al diagramma di ultracentrifugazione della Fig. 9.

Possiamo pertanto concludere, anche se non abbiamo completamente purificato questa lipovitellenina, che nell'uovo di rana esiste una lipovitellenina che ha caratteristiche fisico chimiche identiche a quelle della lipovitellenina dell'uovo di pollo.

V. — CONSIDERAZIONI SULLA MOLECOLA DELLA LIPOVITELLENINA

Abbiamo mostrato che le soluzioni di lipovitellenina non presentano birifrangenza di scorrimento, diminuiscono di viscosità se la proteina è denaturata, la loro viscosità ridotta aumenta con la diluizione quando cioè l'interazione tra le molecole

del soluto viene a diminuire. Questa proprietà corrisponde a una molecola debolmente ellittica con un involucro proteico, e con un nucleo centrale lipidico che, secondo FEVOLD (1951), raggiunge il 40% in peso (1). La denaturazione corrisponde ad un crollo di questa struttura, con formazione di più piccole unità. La diluizione porta invece ad un aumento della viscosità ridotta e cioè ad uno spiegamento della molecola che possiamo immaginare o come aumento del volume occupato dalle catene polipeptidiche o come aumento della anisotropia (Fig. 12).

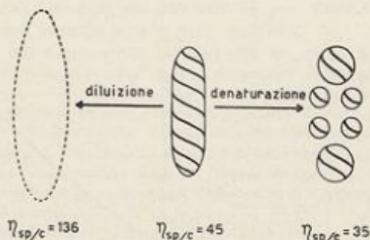


Fig. 12. - Schema ipotetico dello spiegamento della molecola di lipovitellina di pollo indotto da diluizione. La linea punteggiata indica la superficie dell'ellissoide, che circoscrive il volume occupato dalle catene polipeptidiche spiegate. La denaturazione è indicata immaginando sferiche le subunità del diagramma di ultracentrifugazione della Fig. 8, C.

Nel caso della lipovitellina siamo riusciti pertanto ad isolare e purificare una proteina che ha le proprietà delle proteine filamentose ripiegate di LAWRENCE, MIALI, NEEDHAM e SHEN (1944). Le frazioni *a* e *b* della eglobulina su cui questi autori e noi abbiamo lavorato contengono evidentemente questa lipovitellina insieme ad altre frazioni.

(1) Se si prova a calcolare (SCHACHMAN 1959) il peso molecolare, *M*, secondo la formula

$$M = \frac{4690 (s_{20,w}^0)^2 [\eta]^{1/2}}{(1 - \bar{V} \rho)^{3/2}}$$

in base alla costante di sedimentazione $s_{20,w}^0$ e alla viscosità intrinseca $[\eta]$ (assumendo per viscosità intrinseca la più bassa viscosità ridotta osservata). \bar{V} è il volume specifico della proteina e ρ la densità del solvente, il peso molecolare della lipovitellina risulta particolarmente elevato ($M = 3.5 \times 10^6$). Si tratta cioè di molecole particolarmente grandi.

VI. — VARIAZIONI DI VISCOSITÀ E DENATURAZIONE PROTEICA

È ora il caso di riprendere in esame lo schema che a suo tempo pubblicammo (CIGADA, CITTERIO, ORLANDI, RANZI e TOSI 1949) come metodo per riconoscere la forma delle molecole proteiche in soluzione (Tabella 6).

TABELLA 6.

| Forma della molecola in soluzione | Birifrangenza di scorrimento | La viscosità con la denaturazione | Esempio |
|---|------------------------------|-----------------------------------|--|
| Globulare | assente | aumenta | lipovitellina ribonucleasi |
| Filamentosa | presente | diminuisce | actomiosina diluita miosina |
| Filamentosa ripiegata | assente | diminuisce | lipovitellina euglobulina α , β |
| A graticciata (gel a struttura filamentosa) | presente | aumenta | actomiosina in soluzioni concentrate timonucleostone rigido |

Le trasformazioni che subiscono le differenti molecole possono essere schematizzate nella Fig. 13. Quando tredici anni or sono pubblicammo la tabella, i dati non erano tali da permettere una rappresentazione di essa con schemi; ma oggi i dati che si sono accumulati sulla struttura della molecola proteica permettono di farlo e lo schema che presentiamo tiene conto dei dati di FERRY (1948), COREY e PAULING (1955) e ANFINSEN e REDFIELD (1956) per quanto concerne la forma delle differenti molecole.

L'azione dello ione Li , stabilizzante le proteine e pertanto contrastante la denaturazione, può bene essere inquadrata nelle idee di KLOTZ (1958, 1960) sui fenomeni di denaturazione proteica. La stabilità delle proteine in soluzioni contenenti $LiCl$ dipende dal fatto che lo ione Li si lega alle proteine con un legame elettrostatico e ha intorno un mantello di idratazione costituito da una regione in cui l'acqua presenta una struttura caratteristica, orientata intorno alla carica dello ione, secondo quanto ha mostrato FRANK (1960). D'altra parte SZENT-GYÖRGYI (1957) e lo stesso FRANK hanno mostrato che lo ione I , noto agli embriologi come animalizzante e secondo noi denaturante le proteine, ha nelle soluzioni l'effetto di distruggere le strutture fatte dall'acqua. Con questo si ricondurrebbe alle proprietà dell'acqua citoplasmatica la chiave della determinazione embrionale e si arriverebbe a questa conclusione: acqua con molecole disposte regolarmente corrisponde a vegetalizzazione; acqua con molecole disordinate corrisponde ad animalizzazione; questo in accordo con le idee (cfr. per es. SZENT-GYÖRGYI 1956) che oggi sempre più

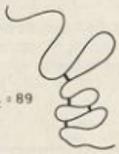
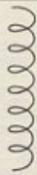
| | Nativa | Denaturata | η_{sp}/c |
|--------------------------|---|---|---------------------|
| Globulare |  $\eta_{sp}/c = 33$ |  $\eta_{sp}/c = 89$ | aumento al 270% |
| Filamentosa |  |  | riduzione al 33% |
| Filamentosa ripiegata |  $\eta_{sp}/c = 45$ |  $\eta_{sp}/c = 35$ | riduzione al 75% |
| Graticciata |  |  | aumento al 120% |

Fig. 13. - Schema delle trasformazioni che avvengono nei diversi tipi di proteine della Tabella 6. Come esempio di proteina globulare è presa la ribonucleasi secondo AMSTUTZ e KINGFIELD (1956); come proteina filamentosa è presa un tratto dell'elica 3,6 di COREY e PAULING (1955); come proteina filamentosa ripiegata è presa la lipovitellina dell'uovo di pollo secondo la Fig. 12; come proteina a graticciata è presa la figura di un gel secondo FERRY (1948), per il gel nativo, e la denaturata è desunta da questa.

si fanno strada: che buona parte delle proprietà della vita saranno chiarite quando le strutture dell'acqua nel protoplasma saranno note.

VII. — CONCLUSIONI CONCERNENTI I PRIMI STADI DI SVILUPPO EMBRIONALE DI RICCI DI MARE E DI ANFIBI

Tutto quanto qui e precedentemente (RANZI 1962) illustrato ci porta a ritenere che l'animalizzazione sia l'effetto di allargamento di un territorio nel quale è in atto un processo di denaturazione proteica, processo che è indispensabile per nuove sintesi, che viceversa la vegetalizzazione sia l'effetto del restringimento di questa area. Applicando questo ai due animali sui quali si hanno dati maggiorj:

A) *Ricci di mare* (Fig. 14). La fecondazione, attivando alcuni sistemi enzimatici secondo quanto illustrato da RUNNSTRÖM (1949, 1956), dà inizio ad un più elevato metabolismo al polo animale dove esistono proteine più facilmente digeribili. Ricordando che parecchi metaboliti (acido lattico, acido piruvico a debole concentrazione, ecc.) sono sostanze denaturanti le proteine, quindi animalizzanti, l'attivazione di enzimi e la susseguente sintesi di nuove molecole enzimatiche orientano lo sviluppo dell'emisfero animale, mentre impediscono lo sviluppo dell'emisfero vegetativo. Vi sono anche dei processi regolativi: così il piruvato a debole concen-

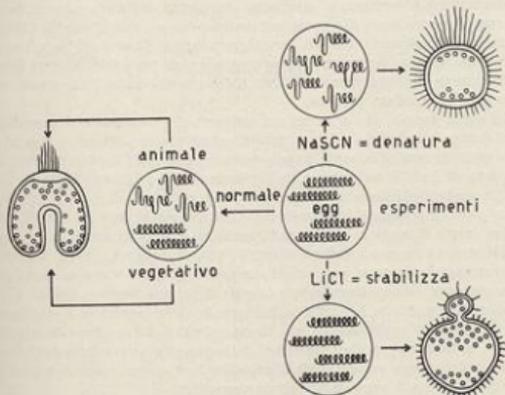


Fig. 14. - Interpretazione del comportamento delle molecole proteiche, immaginate quali eliche nello sviluppo normale del riccio di mare e nei cambiamenti che, a mezzo di sostanze chimiche, possono venire indotti (egg = uovo).

trazione animalizza, ad elevate vegetalizza. Si può in questo vedere un fenomeno attivo nel normale sviluppo. Piccole quantità di piruvato, formate all'inizio dello sviluppo al polo animale, favoriscono la denaturazione proteica, aumentano cioè la dimensione degli abbozzi al polo animale. Dopo un certo stadio la quantità di piruvato passa la soglia necessaria per la formazione di strutture animali e vengono indotte strutture dell'emisfero vegetativo. Sembra pertanto che meccanismi di questo genere siano la base del rapporto strutture dell'emisfero animale, strutture dell'emisfero vegetativo. Questo rapporto è quantitativamente cambiato se agiscono agenti denaturanti le proteine, come NaSCN o acido o-iodosobenzoico, ovvero agenti stabilizzanti le proteine, come LiCl. Coi primi si hanno embrioni animalizzati, coi secondi vegetalizzati. È però interessante osservare i casi nei quali, andando a studiare le attività enzimatiche, si vede che esse sono più attive nei controlli. Tale è il caso della glucoso-6-fosfato deidrogenasi che presenta un massimo di attività, prima nei controlli e poi negli embrioni trattati con LiCl ovvero con acido o-iodosobenzoico (BÄCKSTRÖM 1959). Questo coincide con la nostra interpretazione dell'azione delle due sostanze. Il LiCl aumenta il mantello di acqua intorno alle molecole proteiche, quindi anche intorno all'enzima. L'acido o-iodosobenzoico denatura le molecole proteiche, quindi anche l'enzima. In ambedue i casi l'attività enzimatica risulta minore.

B) *Anfibi* (Figg. 15, 16). La formazione della semiluna grigia, che appare dopo la fecondazione, è correlata a movimenti del cortex dell'uovo. Questi movimenti inducono un centro locale di elevato metabolismo (messo in evidenza da CHILD 1943) che mantiene localmente una più elevata respirazione (LØVTRUP 1958, LØVTRUP e PIGON 1958). Questo centro sembra corrispondere, da un punto di vista fisiologico, al polo animale dei ricci di mare (RANZI 1953) e lo dobbiamo immaginare come un centro di denaturazione proteica.

La corda dorsale, che si forma nel territorio che corrisponde alla semiluna grigia, si forma in rapporto ad una denaturazione proteica. RANZI e TAMINI (1939) hanno visto ingrandire la corda dorsale per azione di NaSCN; CORET (1930) sempre per azione di NaSCN ha visto corde soprannumerarie; LEONE (1952) ha ottenuto corda in espianti di mesoderma ventrale per azione di urea e ÖGI (1958) ha ottenuto corda in espianti di mesoderma ventrale per azione di NaSCN.

Per azione di sostanze denaturanti, anche in assenza di corda, si osserva induzione di sistema nervoso (RANZI e TAMINI 1940, HOLTRETER 1945, LEONE 1952). La denaturazione proteica può quindi ingrandire la corda e cioè la fonte della sostanza evocatrice e può direttamente evocare il sistema nervoso. Questo è schematizzato nella Fig. 15. Se il territorio dell'organizzatore presuntivo è stabilizzato dal LiCl, non si forma corda dorsale, ma le sue cellule si differenziano in cellule di somiti che formeranno poi fibre muscolari. Se le proteine delle cellule del labbro ventrale sono denaturate appare corda dorsale. Se l'ectoderma ventrale è trattato con sostanze denaturanti appaiono strutture neurali.

Analizziamo ora cosa avviene nella evocazione normale e in quella indotta artificialmente da NaSCN, urea, ecc. Il primo atto è un ispessimento dell'ectoderma, con formazione di un epitelio a cellule cilindriche.

Un epitelio da cubico può trasformarsi in cilindrico per due processi: o per un aumento di adesione elettiva delle sue cellule per cui due cellule vicine tendono ad aderire per una più vasta superficie, ovvero perché le cellule aumentano in volume per presa di acqua senza che la superficie su cui appoggiano vari.

La formazione della piastra neurale degli anfibî è stata accuratamente studiata e ormai sappiamo che durante la sua formazione il volume delle cellule non

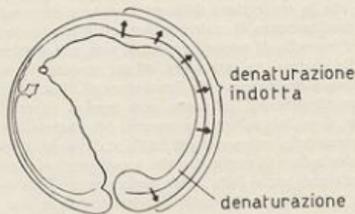
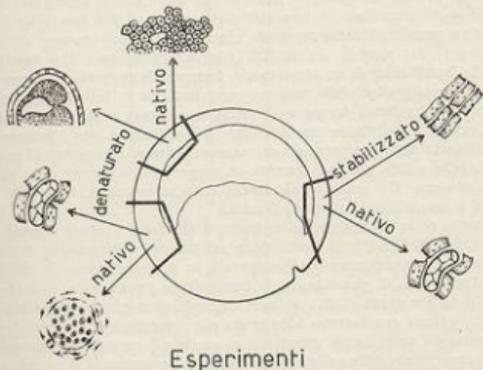


Fig. 15. - Effetti di differenti condizioni sperimentali su espianti di embrioni di Anfibî e interpretazione dei processi di determinazione durante lo sviluppo normale.

cambia (GILLETTE 1944) come non cambia sensibilmente la densità del tessuto (BROWN, HAMBURGER e SCHMITT 1941). Non c'è pertanto presa di acqua, o c'è una presa di acqua limitatissima, da parte del tessuto che forma la piastra neurale. Quello che si osserva è solo il cambiamento della forma delle cellule con aumento della superficie per cui aderiscono. SCHMITT (1941) ha messo in evidenza come un epitelio cubico può trasformarsi in cilindrico se tra le cellule si porta una sostanza desolvante, per es. un istone, in maniera tale da ridurre lo strato solvatato che è tra le cellule ed aumentare la loro attrazione reciproca. Nel caso della formazione della piastra neurale abbiamo mostrato che è in atto un processo di denaturazione proteica; ma secondo KLOTZ (1961) la denaturazione è una desolvazione, dovuta alla liquefazione di un idrotattoide, formato da molecole di acqua orientate intorno ai gruppi apolari della molecola proteica. Con la liquefazione dell'idrotattoide i gruppi superficiali divengono reattivi, e, nel caso delle cellule della piastra neurale, legano le cellule le une alle altre probabilmente con l'intermediario di ioni Ca e determinano una maggiore attrazione reciproca delle cellule (Fig. 16 A, B). La forma delle cellule pertanto cambia in rapporto all'aumento delle superfici di reciproca adesione. Un simile cambiamento della proprietà delle superfici cellulari non porta a sensibili variazioni di densità.

In seguito si ha la flessione della piastra a costituire le pieghe neurali (Fig. 16, C, D). RANZI (1924) richiamò l'attenzione sul fatto che, durante la flessione della piastra neurale per costituire il tubo neurale, la forma di tutte le cellule prende l'aspetto d'un tronco di piramide con la base minore rivolta verso l'esterno. Questo fenomeno è da BALINSKY (1961), in base a ricerche di microscopia elettronica, posto in rapporto ad una contrazione dello strato più superficiale delle cellule con conseguente passaggio dalla forma prismatica a quella piramidale. Se, come sembra, lo strato più superficiale delle cellule si contrae e di conseguenza la piastra neurale si piega a costituire la doccia, siamo in questo caso davanti ad una contrazione di molecole poste alla superficie esterna della piastra; ma SZENT-GYÖRGYI (1956) ha mostrato che la contrazione della miosina deve essere posta in rapporto ad un processo di riordinamento di molecole elementari (protomiosina) dovuto ad un cambiamento del mantello di acqua, iniziatesi con una disidratazione. Siamo quindi davanti, nella contrazione muscolare, ad un processo di soluzione di idrotattoidi che in definitiva è un processo di denaturazione. BRIOSCHI (1955) ha visto infatti che le sostanze denaturanti inducono una leggera contrazione delle fibre muscolari glicerate, dopo la quale non si osserva più contrazione per effetto di ATP.

Nel corso dello sviluppo degli Anfibi si deve quindi pensare ad una azione denaturante, che induce la corda dorsale, e poi questa azione denaturante, o un agente denaturante che parte dalla corda, agisce prima alla superficie delle cellule ectodermiche, trasformando l'epitelio ectodermico da cubico in cilindrico, e poi fa piegare la piastra in tubulo, entrando nelle cellule e inducendo la contrazione dello strato superficiale visto da BALINSKY (1961), con un processo simile a quello che fa contrarre la miosina, secondo lo schema di SZENT-GYÖRGYI (1956).

Mentre questi processi sono in atto vengono attivati processi di sintesi di nuove strutture, che presuppongono un'azione di acido ribonucleico precedente, secondo ogni verosimiglianza, da un'attivazione di alcuni geni. Possiamo immaginare questa

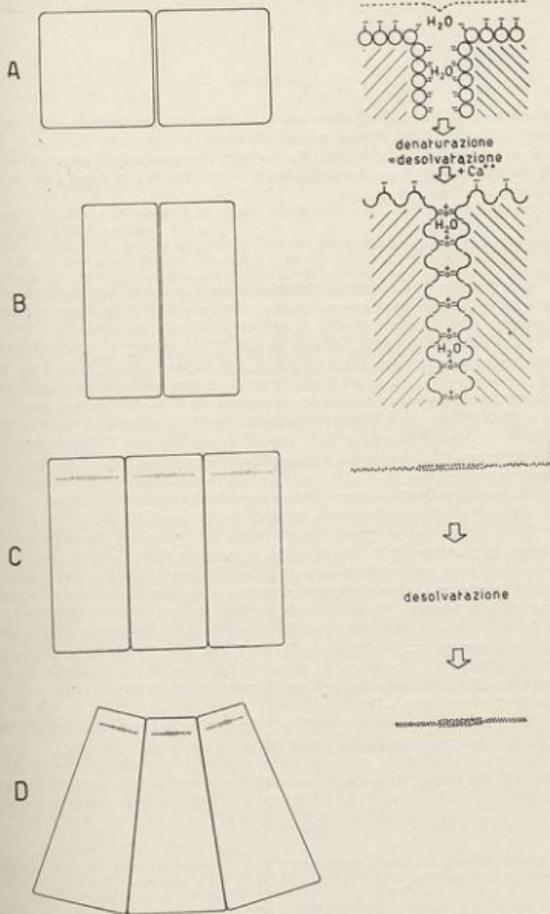


Fig. 16. - I differenti stadi di formazione della piastra neurale (A, B) e della trasformazione della piastra neurale in tubo neurale (C, D) sono rappresentati a sinistra dai perimetri delle cellule. Schemi di miosina prima (C) e dopo la contrazione (D) rappresentano il citoplasma più denso di BALINSKY (1961) nelle cellule C e D. Le più importanti trasformazioni a un livello molecolare, che subiscono le cellule rappresentate a sinistra, sono presentate a destra. E e F rappresentano la superficie di due cellule contigue; E e D rappresentano la contrazione della miosina secondo SZENT-GYÖRGYI (1956) (i punti rappresentano le subunità: protomiosina).

attivazione nella forma di eliminazione di un repressore che, secondo lo schema di JAKOB e MONOD (1961), blocca, magari attraverso un operatore, l'entrata in funzione di un certo numero di geni. Ma è chiaro che quest'ultima affermazione sta più che altro a significare che reputiamo di aver visto con la denaturazione solo una parte dei fenomeni in atto.

VIII. — RIASSUNTO

Con l'intento di ulteriormente studiare l'azione delle trasformazioni proteiche nel corso della determinazione embrionale, viene studiato il comportamento della lipovitellina e della lipovitellina in diverse condizioni sperimentali.

La lipovitellina di pollo, estratta secondo FUJII (1960), è all'ultracentrifuga monodispersa e corrisponde alla lipovitellina A di LANZAVECCHIA (1955). È una proteina globulare $[\eta] = 8,5$ in 2M NaCl (II A). Come già verificato per l'euglobulina $a + b$, il Li innalza la sua costante di salting out; il NaSCN e l'acido o-iodosobenzoico (IBA) l'abbassano (II B). Il trattamento con LiCl preserva la molecola dalla demolizione indotta da urea e dalla digestione con tripsina. Il trattamento con NaSCN, ovvero IBA, predispone la molecola alla demolizione indotta da urea e alla digestione con tripsina (II C, D, Fig. 4). L'analisi all'ultracentrifuga dimostra che il trattamento con NaSCN ovvero IBA denatura la molecola rompendola in subunità mentre il LiCl non determina sensibili cambiamenti (II E).

La ricerca nel tuorlo d'uovo di pollo di una proteina con molecola filamentosa ripiegata ha mostrato che la lipovitellina ha molecola filamentosa ripiegata. Lipovitellina è stata estratta dalle uova di pollo e di rana (III A, IV). La viscosità ridotta delle soluzioni di lipovitellina aumenta con la diluizione (Figg. 6, 11). Questo aumento della viscosità ridotta dipende in parte da una adesione delle molecole alla parete del viscosimetro, ma c'è anche un gonfiamento o spiegamento della molecola che si osserva con la diluizione (III B, V Fig. 12). Studiando la demolizione indotta dall'urea e i diagrammi di ultracentrifugazione di lipovitellina trattata con LiCl o NaSCN si vede che l'effetto di questi sali è identico a quello esplicito sulla lipovitellina (III C, D).

Viene ripreso in esame il metodo, per riconoscere la forma delle molecole proteiche in soluzione, basato sulla denaturazione proteica (VI Fig. 13).

Vengono presentate le conclusioni che si possono trarre sulla determinazione embrionale dei ricci di mare e sui primi stadi di sviluppo degli Anfibii (VII Figg. 14, 15, 16).

BIBLIOGRAFIA

- ANFISSEN, C. B. and REDFIELD, R. E. (1956). Protein structure in relation to function and biosynthesis. *Adv. Protein Chem.* **11**, 1.
- BÄCKSTRÖM, S. (1959). Activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in sea urchin embryos at different developmental trends. *Exp. Cell Res.* **18**, 347.
- BALINSKY, B. I. (1961). Ultrastructural mechanisms of gastrulation and neurulation. In «Symposium: Germ Cells and Develop.», p. 550. Istituto Lombardo, Milano.
- BALTER, H. (1954). Über die Konzentrationsabhängigkeit der Viscositätszahl bei linearen und verzweigten Makropolymeren. *Makromol. Chem.* **14**, 118.
- BERNHARDI, G. and COOK, W. H. (1960). Separation and characterisation of the two high density lipoproteins of egg-yolk, α - and β -lipovitellin. *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 96.
- BRIOSCHI, G. (1955). Sull'azione di alcune sostanze sulla possibilità di contrarsi di fibre muscolari glicerinate. *At. Lombardo, Rend. Sc.* **88**, 167.
- BROWN, M. G., HAMBURGER, V. and SCHMITT, F. O. (1941). Density studies on amphibian embryos with special reference to the mechanism of organizer action. *J. Exp. Zool.* **28**, 353.
- COADA, M., CITTERIO, P., OBLANDI, A., RANZI, S. e TOSI, L. (1949). Ricerche sulle proteine cellulari. *At. Lombardo, Rend. Sc.* **82**, 351.
- COADA, M., LANZI, C. e BRIOSCHI, G. (1954). Ricerche sul citoplasma. *At. Lombardo, Rend. Sc.* **87**, 365.
- CHILD, C. M. (1943). Differential dye reduction and reoxidation in *Triturus* development. *Physiol. Zool.* **16**, 61.
- COREY, R. and PAULING, L. (1955). The configuration of polypeptide chains in proteins. *At. Lombardo, Rend. Sc.* **89**, 10.
- FERRY, J. D. (1948). Protein gels. *Adv. Protein Chem.* **4**, 1.
- FLOYD, H. L. (1931). Egg proteins. *Adv. Protein Chem.* **6**, 187.
- FRANK, H. S. (1960). The structure of water and the properties of aqueous solutions. In «Fast Fundamental Transfer Processes», p. 22. Department of Biology, MIT, Cambridge, Mass.
- FUJII, T. (1960). Comparative biochemical studies of the egg-yolk proteins of various animal species. *Acta Embryol. Morphol. exp.* **3**, 260.
- GILLETTE, R. (1944). Cell number and cell size in the ectoderm during neurulation. *J. Exp. Zool.* **96**, 201.
- GORSI, I. e LANZAVECCHIA, G. (1955). La livetina dell'uovo di pollo. *At. Lombardo, Rend. Sc.* **88**, 351.
- HOLTYRETER, J. (1945). Neuralization and epidermization of gastrula ectoderm. *J. Exp. Zool.* **98**, 161.
- JAKOB, F. and MONOD, J. (1961). Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J. mol. Biol.* **3**, 318.
- KLOTZ, I. M. (1958). Protein hydration and behaviour. *Science* **128**, 815.
- KLOTZ, I. M. (1960). Protein hydration and behaviour. In «Fast Fundamental Transfer Processes», p. 38. Department of Biology, MIT, Cambridge, Mass.
- KLOTZ, I. M. (1962). Water. In «Horizons in Biochemistry» (M. KASHA and B. PULLMAN, eds.), p. 523. Academic Press, New York.
- LANZAVECCHIA, G. (1955). La lipovitellina dell'uovo di pollo. *At. Lombardo, Rend. Sc.* **89**, 224.
- LAWRENCE, A.S.C., MIALI, M., NEEDHAM, J. and SHEN, S. C. (1944). Studies of anomalous viscosity and low birefringence of protein solutions II. *J. gen. Physiol.* **27**, 233.
- LEONE, V. (1952). Effetti di trattamento con urea su episanti ventrali di gastrula di *Rana esculenta* L. *Rend. Acc. Lincei, Sc. fis.* (8) **12**, 195.
- LÖVTRUP, S. (1958). A physiological interpretation of the mechanism involved in the determination of bilateral symmetry in Amphibian embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* **6**, 15.

- LØVTRUP, S. and PIGON, A. (1958). Inversion of the dorso-ventral axis in Amphibian embryos by unilateral restrictions of oxygen supply. *J. Embryol. exp. Morph.* **6**, 486.
- MEHL, J. W., ONCLEY, J. L. and SIMHA, R. (1949). Viscosity and the shape of protein molecules. *Science* **92**, 192.
- ØIHEN, O. E. (1958). Precision viscosimetry of extremely dilute solution of high polymers. *Ark. Kemi* **12**, 397.
- ÖGI, K. I. (1958). The effect of sodium thiocyanate on isolates of the presumptive ectoderm and medio-ventral marginal zone of *Triturus gastrulae*. *J. Embryol. exp. Morph.* **6**, 412.
- PEDERSEN, K. O. (1958). Charge and specific ion effect on sedimentation in the ultracentrifuge. *J. Franklin Inst.* **265**, 503.
- RANZI, S. (1924). Contributo allo studio dei processi morfogenetici elementari del Ruffini. *Boll. Ist. Zool. Roma* **2**, 139.
- RANZI, S. (1950). Le proteine nei tessuti e nello sviluppo embrionale. *Rend. Ist. Sup. Sanità Roma* **13**, 811.
- RANZI, S. (1952). Alcune questioni sulle proteine protoplasmatiche. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **28**, 487.
- RANZI, S. (1957). Les changements protéiques au cours du développement embryonnaire et larvaire. *Ann. Biol.* **33**, 523.
- RANZI, S. (1962). The proteins in embryonic and larval development. *Adv. Morphogenesis* **2**, 211.
- RANZI, S. e CITTERIO, P. (1953). Stabilità della molecola proteica e determinazione embrionale. *Ist. Lombardo, Rend. Sc.* **87**, 445.
- RANZI, S. e CITTERIO, P. (1954). Sul meccanismo di azione degli ioni che inducono cambiamenti nella precoce determinazione embrionale. *Publ. Staz. Zool. Napoli* **25**, 201.
- RANZI, S. e CITTERIO, P. (1954). Ancora su un metodo viscosimetrico per lo studio della forma delle particelle proteiche in soluzione. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **30**, 217.
- RANZI, S., CITTERIO, P. e MALDACEA, L. (1959). Sulle proprietà delle proteine dell'uovo trattate con sostanze animalizzanti. *Acta Embryol. Morphol. exp.* **2**, 323.
- RANZI, S., CITTERIO, P. e SAMURALI, C. (1960). Proteine e antigeni durante l'accrescimento embrionale e larvale di due specie di rospi (*Bufo bufo* e *Bufo viridis*) e dei loro incroci. *Acta Embryol. Morphol. exp.* **3**, 65.
- RANZI, S. und TAMINI, E. (1939). Die Wirkung von NaSCN auf die Entwicklung von Proschembryonen. *Naturwissenschaften*, **27**, 566.
- RANZI, S. e TAMINI, E. (1940). Azione di NaSCN sullo sviluppo di embrioni di Anfibi II. *Ist. Lombardo, Rend. Sc.* **73**, 525.
- RUNNSTRÖM, J. (1949). The mechanism of fertilization in Metazoa. *Adv. Enzymology* **9**, 241.
- RUNNSTRÖM, J. (1956). Some consideration on metabolic changes occurring at fertilization and during early development of the sea urchin egg. *Publ. Staz. Zool. Napoli* **28**, 315.
- SCHICHMAN, H. K. (1959). « Ultracentrifugation in Biochemistry ». Academic Press, New York.
- SCHMITT, F. O. (1941). Some protein patterns in cells. *Third Growth Symp.* **5**, 1.
- SZENT-GYÖRGI, A. (1936). Bioenergetics. *Science* **124**, 873.
- SZENT-GYÖRGI, A. (1937). « Bioenergetics ». Academic Press, New York.
- YANG, J. T. (1961). The viscosity of macromolecules in relation to molecular conformation. *Adv. Protein Chem.* **16**, 323.