

Gli enzimi proteolitici nella cellula e nell'embrione

Di E. URBANI¹, Roma

Introduzione

Nel corredo enzimatico delle cellule animali e vegetali sono reperibili vari fermenti proteolitici i quali sono stati prevalentemente studiati nella loro possibilità di idrolisi di substrati diversi. Così sono state identificate e purificate varie dipeptidasi, tripeptidasi e proteinasi, le prime agenti su dipeptidi e tripeptidi, le seconde su protidi ad elevato peso molecolare come la caseina, l'emoglobina, la gelatina. Gli enzimi proteolitici intracellulari vanno distinti funzionalmente da quelli extracellulari perché mentre questi ultimi agiscono fuori delle cellule preparando i materiali che verranno impiegati nel metabolismo, i primi sono direttamente ingranati nei processi vitali che hanno sede a livello del protoplasma. Nei protozoi e in cellule isolate, capaci di fagocitosi e per le quali si parla di digestione intracellulare, in realtà gli enzimi proteolitici compiono la demolizione dei prodotti alimentari non nel citoplasma ma in vacuoli.

A contatto del protoplasma arrivano perciò sia nei metazoi che nei protozoi i prodotti della digestione proteica, cioè gli aminoacidi, e si pone perciò la domanda di quale possa essere la funzione degli enzimi proteolitici intracellulari. In risposta a tale quesito varie ipotesi sono state avanzate. WILSTÄTTER e BAMANN² hanno chiamato col termine generico di «catepsine» gli enzimi proteolitici cellulari che avrebbero lo scopo di digerire il protoplasma quando la cellula è morta. Alle catepsine sarebbero perciò dovuti i fenomeni di autolisi che si verificano nei tessuti morti tenuti in condizioni di asepsi. Questa concezione, che ha senza dubbio una parte di verità, è attendibile solamente per quegli enzimi che hanno un pH di azione in gamma acida come le proteinasi ma non è verosimile per le dipeptidasi che funzionano a pH prossimi alla neutralità cioè nel protoplasma vivente e non morto. Per questo motivo e per altri, che saranno esposti in seguito, è da ritenere che non tutti gli enzimi proteolitici abbiano una funzione postmortale ma intervengano invece direttamente nei fenomeni metabolici della cellula.

¹ Istituto di Anatomia Comparata «G. B. GRASSI» della Università, Roma.

² R. WILLSTÄTTER e E. BAMANN, Z. Physiol. Chem. 180, 127 (1929).

Così per le dipeptidasi DUSPIVA¹ ha avanzato l'ipotesi che il loro compito consista nella demolizione dei peptidi che compaiono continuamente con il rinnovamento delle proteine protoplasmatiche.

Molti autori hanno da tempo prospettato l'idea che la funzione degli enzimi proteolitici intracellulari sia quella della sintesi delle proteine. Cioè quei fermenti che normalmente studiamo con la scissione di substrati, in realtà nel protoplasma provvedono alla edificazione della molecola proteica a partire dagli aminoacidi.

Ad appoggio di questa teoria vi sono le classiche esperienze di DANILEWSKI (1886)², WASTENEYS e BORSOOK (1930)³, BERGMANN e FRAENKEL-CONRAT (1938)⁴, VIRTANEN e Coll. (1949)⁵ che hanno ottenuto *in vitro* la sintesi di peptidi (plasteina) facendo agire gli enzimi proteolitici su idrolizzati proteici concentrati⁶.

La concezione che gli enzimi proteolitici possano realizzare il legame peptidico non è contraria ai presupposti teorici della enzimologia: è noto infatti che lo stesso enzima può, a seconda delle condizioni energetiche del sistema, agire sia nel senso della analisi che nel senso della sintesi di un legame, essendo la catalisi enzimatica teoricamente reversibile (TERROINE⁷).

BORSOOK⁸ e LINDERSTRÖM-LANG⁹ hanno compiuto uno studio delle condizioni termodinamiche necessarie perché le peptidasi possano agire nel senso della

¹ F. DUSPIVA, Protoplasma 32, 211 (1939).

² H. DANILEWSKI, citato in E. F. TERROINE, *La synthèse protéique* (C.N.R.S., Parigi 1952).

³ H. WASTENEYS e H. BORSOOK, cit. da H. BORSOOK, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*, Vol. IX (Ed. ZECHMEISTER, Vienna, 1952).

⁴ M. BERGMANN e H. FRAENKEL-CONRAT, J. Biol. Chem. 124, 1 (1938).

⁵ A. VIRTANEN, citato da H. BORSOOK, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*, Vol. IX (Ed. ZECHMEISTER, Vienna, 1952).

⁶ Si vedano: E. L. SMITH in «The Enzymes», Edited by J. B. SUMNER and K. MYRBÄCK, Vol. I, parte 2^a (Acad. Press. Inc., New York 1951). — J. B. SUMNER e G. F. SOMERS, *Chemistry and Methods of Enzymes* (Acad. Press. Inc., New York 1953), e la recente rassegna di RUSSO-CAIA e ROGNONE, dedicata al ruolo di alcuni sistemi cellulari nella sintesi delle proteine («Ricerca scientifica», ottobre 1954).

⁷ E. F. TERROINE, *La synthèse protéique* (C.N.R.S., Parigi 1952).

⁸ H. BORSOOK, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*, Vol. IX (Ed. ZECHMEISTER, Vienna 1952).

⁹ K. U. LINDERSTRÖM-LANG, *Proteins and Enzymes*, Lane Medical Lect. (Stanford University Press, 1952).

sintesi e si è visto che tali condizioni sono possibili e compatibili con lo stato fisiologico delle cellule.

Prove dirette e concrete che gli enzimi proteolitici svolgano nel protoplasma attività di sintesi delle proteine per ora non esistono ma vi sono una serie di fatti, frutto della sperimentazione su materiali diversi, che rendono verosimile questa ipotesi (BRACHET¹, FRUTON², BERGMANN e FRAENKEL-CORAT³, LINDERSTRØM-LANG⁴, ROTSHILD e JUNQUEIRA⁵).

Scopo di questa rassegna non è la dimostrazione delle attività sintetiche degli enzimi proteolitici ma l'esposizione di alcuni risultati ottenuti in gran parte nel nostro Istituto con lo studio delle dipeptidasi e proteinasi su materiali diversi in condizioni normali e sperimentali; molte volte lo studio di questi enzimi è stato accompagnato da dosaggi dell'acido ribonucleico per considerazioni alle quali conviene accennare.

È nota l'importanza attribuita agli acidi nucleici nei fenomeni di sintesi ma il meccanismo con il quale l'RNA interverrebbe nella sintesi delle proteine è ignoto e si può solamente congetturare in merito. Comunque gli acidi pentosonucleici possono essere considerati degli «indicatori» delle attività sintetiche della cellula (COTRONEI⁶).

Un aspetto interessante della questione è dato dalle ricerche di BINKLEY⁷ il quale ha dimostrato che la dipeptidasi che idrolizza la cisteinilglicina ha una struttura nucleotidica. Vi sarebbero perciò degli acidi nucleici che posseggono una attività dipeptidasica. In realtà non è stato ancora possibile dimostrare che gli acidi pentosonucleici abbiano possibilità enzimatiche e CHANTRENNE⁸ con la centrifugazione frazionata non ha trovato parallelismo di localizzazione tra cisteinilglicinadipeptidasi e RNA.

Le ricerche di BINKLEY hanno il merito di aver aperto una nuova strada allo studio degli acidi nucleici e mentre da un lato ci si augura che esse vengano confermate conviene non trascurare lo studio comparativo degli acidi nucleici e delle dipeptidasi. Molte volte infatti si è visto, come sarà indicato nella presente rassegna, che acido ribonucleico e dipeptidasi presentano un parallelismo di comportamento (URBANI⁹) altre volte questo parallelismo non è evidente e questo potrebbe giustificare il disaccordo tra i risultati di BINKLEY e quelli di CHANTRENNE.

Metodi di Studio

A. *Dipeptidasi*. L'attività dipeptidasica degli oogenati, eseguiti in acqua distillata, è stata misurata con il metodo di LINDERSTRØM-LANG e HOLTER, substrato *d-l*-alanilglicina¹ 0,2 M sciolta in NaOH alla molarità necessaria per ottenere il pH desiderato. Titolazione degli aminogruppi liberati con HCl 0,06 N in ambiente acetonico, rosso naftile come indicatore. L'attività enzimatica viene espressa in μl HCl 0,06 N. È stato usato anche il metodo chromatografico che ha dato risultati qualitativamente soddisfacenti (URBANI, RGNONE, RUSSO²).

B. – *Proteinasi*. L'attività proteinasica degli oogenati eseguita in acqua distillata è stata determinata con il metodo di DUSPIVA con gli adattamenti portati da HOLTER e LØVTRUP³. Substrato: caseina portata al pH voluto con tampone fosfato, citrato ammonio. Il colore dell'idrolizzato proteico è stato sviluppato con il reattivo di Folin-Ciocalteau e letto al microscopio a cellula fotoelettrica (URBANI⁴). L'attività proteinasica può essere espressa in unità di tirosina liberata dalla idrolisi enzimatica o direttamente in estinzione.

C. – *Acido ribonucleico*. L'estrazione dell'acido ribonucleico è stata fatta con acido perclorico al 10% secondo la tecnica di OGUR e ROSEN con le modifiche introdotte da STEINERT⁵. Il dosaggio dell'RNA estratto è stato fatto in microcuvette di quarzo al microscopio di quarzo con cellula fotoelettrica 1 P 28 RCA (URBANI⁶, URBANI e DE CESARIS COROMALDI⁷, URBANI e SALVIDIO⁸). Le estinzioni lette sono state tradotte in γ RNA a mezzo di una curva di taratura eseguita con acido ribonucleico Schwarz del lievito.

D. – *Peso ridotto*. Per il lavoro su materiale embrionario è stato necessario eseguire il peso ridotto di embrioni e di parti di embrioni di Anfibi. Per questo è stato determinato il peso ridotto RW (ZEUTHEN⁹) a mezzo di bilancia a diavoletto di Cartesio con l'attrezzatura del microrespiometro di LINDERSTRØM-LANG e HOLTER (URBANI¹⁰).

E. – *Consumo di O₂*. Il consumo di ossigeno degli embrioni di *Bufo vulgaris* tagliati allo stadio di bottone caudale in tre parti (cefalica, intermedia, caudale) è stato determinato con il microrespiometro di GREGG modificato da BRACHET¹¹. I risultati sono perfettamente

¹ J. BRACHET, Exp. Ann. Bioch. Med. Ser. XII, 1951, 1.

² J. S. FRUTON, Yale J. Biol. Med. 22, 263 (1950).

³ M. BERGMANN e H. FRAENKEL CONRAT, J. Biol. Chem. 119, 707 (1937).

⁴ K. U. LINDERSTRØM-LANG, Exp. Cell. Res. Suppl. 1, 1 (1949).

⁵ H. A. ROTHSCHILD e L. C. U. JUNQUEIRA, Arch. Bioch. and Biophys. 34, 453 (1951).

⁶ G. COTRONEI, Rend. Adunanza solenne Acc. naz. Lincei del 4 giugno 1950, fasc. 5.

⁷ F. BINKLEY, Nature 167, 888 (1951); Exp. Cell. Res., Suppl. 2, 145 (1952).

⁸ H. CHANTRENNE, Arch. Internat. Physiol. 60, 186 (1952).

⁹ E. URBANI, Rend. Acc. naz. Lincei 16, 556 (1954).

¹⁰ E. URBANI e E. SALVIDIO, Haematologica 38, 1 (1954).

¹¹ E. ZEUTHEN, C. R. Lab. Carlsberg 26, 243 (1948).

¹² E. URBANI, Ric. Scient. 17, 5 (1947).

¹³ J. BRACHET, Bull. Soc. Chem. Biol. 31, 724 (1949).

concordanti con quelli ottenuti da STEFANELLI¹ con il suo microrespirometro sullo stesso materiale.

Risultati

I. — *Amebe*. Il corredo enzimatico delle amebe (*Amoeba proteus*, *Amoeba chaos*) è noto soprattutto grazie ai lavori di HOLTER e Coll. del Carlsberg Laboratorium. Questi Autori hanno messo in evidenza l'esistenza di numerosi enzimi tra i quali le dipeptidasi e le proteinasi. HOLTER e LØVTRUP² in *Amoeba chaos* (*Chaos chaos* L.) hanno dimostrato che le dipeptidasi si troverebbero legate al citoplasma ialino o ai microsomi o ad ambedue mentre le proteinasi sono legate ai mitocondri. Vi è perciò una differente localizzazione di queste due categorie di enzimi proteolitici. Lavorando in *Amoeba proteus* ho potuto dimostrare (URBANI³) che i frammenti nucleati di ameba mantengono inalterato il loro corredo enzimatico mentre i frammenti anucleati mostrano un diverso comportamento a seconda che si tratti delle dipeptidasi o delle proteinasi. Le dipeptidasi subiscono una diminuzione fino al terzo giorno della operazione e poi si mantengono stazionarie con valori che oscillano intorno al 40% in meno rispetto alle dipeptidasi dei frammenti nucleati. Le proteinasi invece mostrano lo stesso comportamento nei due tipi di frammenti (Fig. 1).

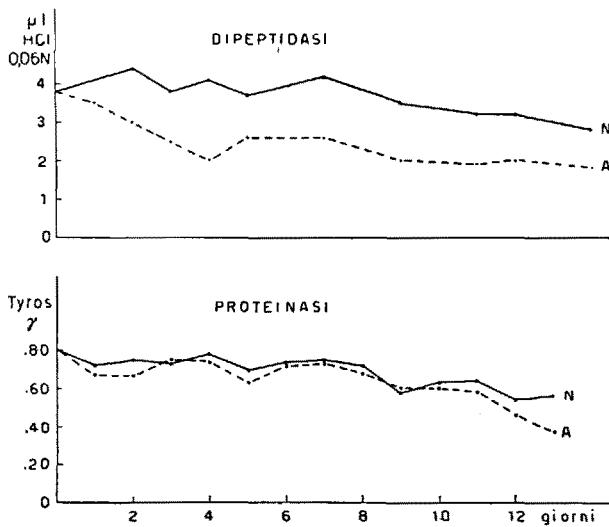


Fig. 1. Dipeptidasi e proteinasi nei frammenti nucleati (N) e anucleati (A) di *Amoeba proteus*. In ascisse i giorni dalla operazione, in ordinate l'attività enzimatica di 10 frammenti nucleati o nucleati tenuti a digiuno.

Queste osservazioni che rientrano nel quadro delle ricerche di BRACHET⁴ sui rapporti tra nucleo e citoplasma sono state precedute dal lavoro di LINET e BRACHET⁵ sul comportamento dell'RNA nei fram-

menti nucleati e anucleati di ameba. Dalle osservazioni qualitative e quantitative di questi Autori risulta che nei frammenti anucleati si ha una rapida caduta del tenore in RNA del citoplasma.

Poiché l'RNA citoplasmatico è localizzato nei microsomi e questi si trovano sotto il controllo nucleare è logico spiegare la scomparsa dell'RNA a seguito della asportazione del nucleo. Per quanto riguarda le dipeptidasi se si ammette che queste siano localizzate in parte nei microsomi e in parte nello ialoplasma si spiega la scomparsa di circa un 40% della attività dipeptidasica con la scomparsa dei microsomi. Le proteinasi invece, localizzate nei mitocondri, non sono influenzate dalla scomparsa del nucleo e lo stesso accade per le amilasi (URBANI¹) che sono anche esse localizzate nei mitocondri.

BRACHET² ha recentemente coordinato questi risultati ed osserva che differenti proteine citoplasmatiche si trovano sotto un ineguale controllo nucleare, probabilmente dipendente anche dalla loro localizzazione: i mitocondri si dimostrano largamente indipendenti dalla influenza del nucleo mentre i microsomi si trovano sotto un diretto controllo nucleare. Rimane da osservare che c'è un certo parallelismo di comportamento tra dipeptidasi e RNA nei frammenti anucleati mentre non ve n'è alcuno tra proteinasi e RNA. Comportamento molto simile all'RNA hanno invece la fosfatasi acida e l'esterasi.

II. — *Eritrociti*. Un materiale sul quale abbiamo (SALVIDIO e URBANI³, URBANI e SALVIDIO⁴, RUSSO⁵) potuto estesamente studiare il comportamento delle dipeptidasi e dell'RNA è costituito dagli eritrociti di cinque classi di Vertebrati e degli eritroblasti di Mammifero.

Questo lavoro zoologico di citochimica comparata ha dato dei risultati che confermano quelli ottenuti sulle amebe ed ha permesso inoltre di trarre altre interessanti considerazioni. Per lo studio delle dipeptidasi sono stati esaminati gli eritrociti di *Carassius auratus*, *Triton cristatus*, *Rana esculenta*, *Bufo vulgaris*, *Lacerta viridis*, *Anser anser*, *Gallus domesticus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*.

Si è visto che le dipeptidasi sono negli eritrociti nucleati localizzate esclusivamente o quasi nel citoplasma in quanto i dosaggi eseguiti su nuclei isolati dei globuli rossi di *Triton* hanno mostrato una attività enzimatica trascurabile rispetto a quella del citoplasma.

L'esame comparativo degli eritrociti di cinque classi di Vertebrati ha dimostrato che la quantità di enzima di un eritrocita è «grossomodo» proporzionale al volume

¹ A. STEFANELLI, Arch. Sci. Biol. 27, 71 (1941).

² H. HOLTER e S. LØVTRUP, C. r. Lab. Carlsberg, Sér. Chim. 27, 27 (1949).

³ E. URBANI, Arch. internat. Physiol. 60, 189 (1952).

⁴ J. BRACHET, *Recent Developments in Cell Physiology* (Butterworths Sci. Public. 1954, pag. 91); *Le rôle des acides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon* (Masson & Desoer, Parigi 1952).

⁵ N. LINET e J. BRACHET, Biochim. biophys. Acta 7, 607 (1951).

¹ E. URBANI, Biochim. biophys. Acta 9, 108 (1952).

² J. BRACHET, Biochim. biophys. Acta 14, 449 (1954); *Recent Developments in Cell Physiology* (Butterworths Sci. Public. 1954, p. 91).

³ E. SALVIDIO e E. URBANI, Haematologica 37, 1001 (1953); Exper. 10, 25 (1954).

⁴ E. URBANI e E. SALVIDIO, Haematologica 38, 1 (1954).

⁵ S. RUSSO, Haematologica 38, 53 (1954).

dell'eritrocita stesso. La quantità di dipeptidasi per unità di volume protoplasmatico può essere considerata una costante negli eterotermini; negli omeotermini il tenore in dipeptidasi, per unità di volume, è minore che negli eterotermini.

Nei Vertebrati a sangue caldo presentanti i due tipi di eritrociti: nucleati (Uccelli) e anucleati (Mammiferi) il tenore in enzima è più basso nei Mammiferi ed inoltre è il minore rispetto a tutti gli altri Vertebrati.

Tabella I. - Dipeptidasi negli eritrociti dei Vertebrati

| Specie | Optimum pH | Volume cellulare μ^3 | Scissione standard | Scissione |
|------------------------------------|------------|--------------------------|-----------------------------|-----------|
| | | | $\mu\text{l HCl}$ 0,06 N | Volumic |
| <i>Carassius auratus</i> | 7,4 | 225 | 27 | 1,50 |
| <i>Triton cristatus</i> | 7,7 | 2500 | 270 | 1,46 |
| <i>Rana esculenta</i> | 7,7 | 930 | 93 | 1,45 |
| <i>Bufo vulgaris</i> | 7,7 | 815 | 70 | 1,33 |
| <i>Lacerta viridis</i> | 7,7 | 290 | 33 | 1,40 |
| <i>Anser anser</i> | 7,7 | 130 | 8 | 0,80 |
| <i>Gallus domesticus</i> | 7,7 | 100 | 6 | 0,75 |
| <i>Mus musculus</i> | 7,7 | 51 | 2,6 | 0,60 |
| <i>Homo sapiens</i> | 7,9 | 80 | 2,5 | 0,41 |

Questi risultati sono riassunti nella Tabella I e permettono alcune considerazioni mentre per la discussione generale e per la letteratura si rimanda ai lavori originali.

Appare innanzi tutto quale sia l'influenza del nucleo sul tenore enzimatico del citoplasma. Gli eritrociti di Mammifero che con il differenziamento hanno perduto il nucleo presentano un contenuto in dipeptidasi nettamente inferiore agli eritrociti nucleati degli altri Vertebrati. Se si compara inoltre l'attività dipeptidasica del citoplasma degli eritroblasti di ratto albino con quella degli eritrociti della stessa specie si vede come la perdita del nucleo influisca in modo netto sul tenore in dipeptidasi della cellula (Fig. 2). Queste osservazioni confermano quanto visto nelle amebe sul con-

trollo nucleare di questi enzimi a localizzazione citoplasmatica.

Inoltre la termoregolazione mostra la sua influenza sul contenuto in dipeptidasi degli eritrociti permettendo di differenziare, anche da un punto di vista enzimatico, gli eterotermini dagli omeotermini: negli eterotermini la quantità di enzima è maggiore che negli omeotermini.

Condizioni interessanti presentano gli Uccelli che realizzano, si può dire, una esperienza naturale che li rende partecipi di condizioni comuni ai Pesci, Anfibi e Rettili da una parte e ai Mammiferi dall'altra. Infatti per la morfologia degli eritrociti troviamo la presenza del nucleo caratteristica dei Vertebrati a loro inferiori mentre per i fenomeni fisiologici della termoregolazione partecipano delle qualità dei Mammiferi. Queste caratteristiche mostrano di avere una corrispondenza nel contenuto in dipeptidasi degli eritrociti che è quantitativamente intermedio: minore che nei Pesci, Anfibi e Rettili (influenza della termoregolazione) e maggiore che nei Mammiferi (influenza del nucleo).

Sullo stesso materiale siamo passati allo studio dell'RNA citoplasmatico (URBANI e SALVIDIO¹) e si è visto che l'acido ribonucleico nelle specie esaminate è proporzionale al volume dei globuli rossi; ciò concorda con quanto è stato detto a proposito delle dipeptidasi. Negli eritrociti di Mammiferi l'RNA è nettamente inferiore, per unità di peso secco, a quello contenuto nel citoplasma dei globuli rossi degli altri Vertebrati (Tabella II). L'acido ribonucleico citoplasmatico mostra di essere sotto il controllo nucleare come hanno visto LINET e BRACHET² nelle amebe sperimentalmente anucleate. Anche in questo caso perciò vi è parallelismo di comportamento tra RNA e dipeptidasi, tenuto conto anche della localizzazione dell'RNA nei microsomi. Il metodo citochimico comparativo spostato dal campo zoologico ai problemi del differenziamento ha mostrato che negli eritroblasti di ratto albino il tenore in RNA citoplasmatico è nettamente superiore all'RNA degli eritrociti, cellule differenziate anucleate.

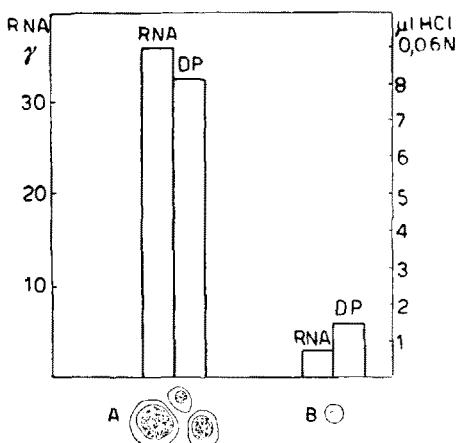


Fig. 2. Schema rappresentante l'attività dipeptidasica (D.P.) e il tenore in acido ribonucleico (RNA) del citoplasma di eritroblasti (A) ed eritrociti (B) di ratto albino.

Tabella II. - RNA Citoplasmatico negli eritrociti dei Vertebrati

| Specie | Volume cellulare μ^3 | γ RNA citopl. 10^6 eritrociti | γ RNA citopl. 1 mg peso secco |
|------------------------------------|--------------------------|--|--------------------------------------|
| <i>Pomotis gibbosus</i> | 75 | 1,0 | 21,5 |
| <i>Triton cristatus</i> | 2500 | 13,0 | 15,0 |
| <i>Rana esculenta</i> | 950 | 3,5 | 13,7 |
| <i>Bufo vulgaris</i> | 790 | 5,7 | 13,9 |
| <i>Lacerta muralis</i> | 293 | 2,6 | 23,0 |
| <i>Anser anser</i> | 115 | 0,7 | 20,6 |
| <i>Gallus domesticus</i> | 98 | 0,4 | 8,8 |
| <i>Cavia cobaya</i> | 75 | 0,11 | 2,8 |
| <i>Mus norvegicus</i> | 55 | 0,17 | 3,2 |
| <i>Homo sapiens</i> | 80 | 0,26 | 3,4 |

¹ E. URBANI e E. SALVIDIO, Haematologica 38, 1 (1954).

² N. LINET e J. BRACHET, Biochim. biophys. Acta 7, 607 (1951).

Queste osservazioni sugli eritroblasti e eritrociti confermano le ricerche spettrofotometriche di THORELL¹ che ha determinato quantità decrescenti di RNA citoplasmatico negli elementi della serie rossa durante il differenziamento. Questa diminuzione di RNA e di dipeptidasi accompagnata da una sintesi di emoglobina può lasciar pensare a relazioni tra dipeptidasi e RNA nella sintesi delle proteine.

Così anche KORITZ e CHANTRENNE² studiando l'incorporazione di glicina marcata nei reticolociti hanno visto che le dipeptidasi e l'RNA mostrano un eguale andamento.

L'influenza delle condizioni omeoterme e eteroterme non è chiaramente visibile per l'RNA come lo è per le dipeptidasi. Lo studio delle proteinasi non ha ancora dato risultati precisi in quanto presenta notevoli difficoltà per la presenza della emoglobina, probabilmente le stesse che hanno incontrato KORITZ e CHANTRENNE che hanno studiato anche le proteinasi ma non hanno rilevato attività enzimatica.

III. - Organismi in vita latente. Lo studio citochimico della vita latente presenta un grande interesse per i problemi di biologia generale che sono connessi con questo particolare stato biologico che fu definito da SPALLANZANI di «Vita minima». Gli organismi che hanno la possibilità di cadere in anabiosi resistono alle condizioni ambientali e sperimentali le più avverse, in quanto il protoplasma disidratato mostra di aver acquistato delle proprietà di eccezionale resistenza. Uno dei materiali sui quali questo problema può essere studiato è costituito dai germi incistati di *Artemia salina*. Questi embrioni, chiamati correntemente uova, sono protetti da una spessa cuticola e possono essere conservati a secco per molti anni. Quando vengono posti in acqua salata cominciano ad idratarsi e già dopo tre ore sono bene misurabili gli scambi respiratori (URBANI³); dopo circa 26 ore i naupli sono sgusciati e nuotano liberamente.

Lo studio enzimatico di queste cisti in vita latente ha dato interessanti risultati in quanto si è visto che posseggono una attività dipeptidasica (URBANI, ROGNONE e RUSSO⁴) proteinasica (URBANI e DE CESARIS COROMALDI⁵), amilasica (URBANI, RUSSO e ROGNONE⁶) fosfatasicia (URBANI e URBANI MISTRUZZI⁷).

Il reperto mostra che questi enzimi devono essere legati al citoplasma disidratato in modo tale da non

venire inattivati dalle molteplici avverse condizioni ambientali alle quali questi organismi vanno incontro durante l'anabiosi, che è durata, in uno dei casi studiati, circa quattordici anni.

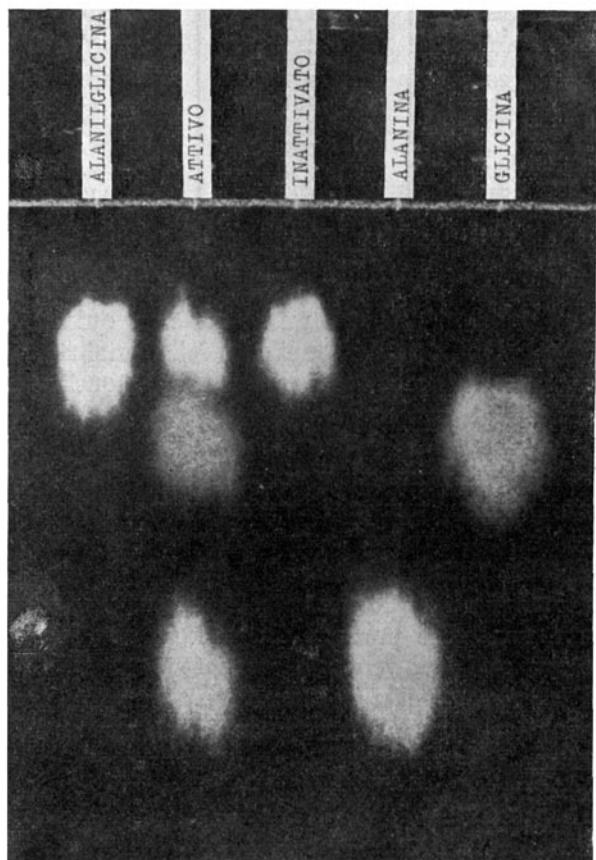


Fig. 3. Cromatografia della scissione enzimatica della alanilglicina da parte di un omogenato di germi incistati di *Artemia salina* L; lo stesso omogenato inattivato con l'ebollizione non idrolizza il dipeptide. Sullo stesso cromatogramma figurano come segno di repere le macchie della alanilglicina, della alanina e della glicina. (Propanolo 80, Acqua 20: rivelato con ninidrina.)

Quando i germi vengono omogenati con l'acqua, immediatamente gli enzimi (Fig. 3) sono in grado di idrolizzare l'alanilglicina o la caseina. Evidentemente ciò dimostra che nelle cisti restano conservati, sotto forma inattiva, dipeptidasi e proteinasi e la questione può essere prospettata come una sorta di *preformismo enzimatico* preparatorio alle condizioni di sviluppo.

Se poi volessimo considerare dipeptidasi e proteinasi esclusivamente come catepsine non si spiegherebbe il perché della loro presenza nei germi incistati in quanto anche se queste uova perdono ad un certo momento la possibilità di «reviviscenza» non vanno mai incontro a fenomeni di autolisi. Dipeptidasi e proteinasi, come fosfatasi ed amilasi fanno perciò parte del corredo enzimatico del germe che entrerà in funzione non appena l'acqua idratando i colloidii cellulari permetterà l'instaurarsi dei fenomeni metabolici dell'embrione in sviluppo.

¹ B. THORELL, *Studies on the Formation of Cellular Substances During Blood Cell Production* (Edit. H. Kimpton, London 1947).

² S. KORITZ e H. CHANTRENNE, Biochim. biophys. Acta 13, 209 (1954).

³ E. URBANI, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 22, 2 (1946).

⁴ E. URBANI, L. ROGNONE e S. RUSSO, Rend. Acc. naz. Lincei 13, 300 (1952).

⁵ E. URBANI e L. DE CESARIS COROMALDI, Rend. Acc. naz. Lincei 14, 144 (1953).

⁶ E. URBANI, S. RUSSO e L. ROGNONE, Rend. Acc. naz. Lincei 14, 697 (1953).

⁷ E. URBANI e L. URBANI MISTRUZZI, Rend. Acc. naz. Lincei 15, 126 (1953).

Tabella III. - Dipeptidasi negli oociti di *Rana esculenta*

| Volume degli oociti in mm ³ | Attività enzimatica in µl HCl 0,06 N | Attività enzimatica Volume |
|---|---|-------------------------------|
| 0,04 | 0,2 | 5,0 |
| 0,12 | 1,0 | 8,3 |
| 0,16 | 1,6 | 10,0 |
| 0,18 | 1,7 | 9,4 |
| 0,26 | 1,5 | 5,7 |
| 0,41 | 1,8 | 4,3 |
| 0,70 | 1,6 | 2,2 |
| 0,86 | 2,5 | 2,9 |
| 1,07 | 2,6 | 2,4 |
| 1,71 | 6,6 | 3,8 |

È noto in letteratura che questi enzimi possono essere messi in evidenza anche nei semi quiescenti (ENGEL e HEINS¹) dove con l'inizio della germinazione probabilmente svolgono un ruolo analogo a quello che hanno nell'*Artemia salina*.

IV. - *Sviluppo embrionale e larvale degli Anfibi.* L'uovo vergine possiede un corredo enzimatico molto vario in quanto numerosi fermenti possono già essere messi in evidenza prima della fecondazione (NEEDHAM², BRACHET³). Non è qui il caso di parlare del metabolismo delle uova e come la respirazione possa essere un indice prezioso dei vari processi che si svolgono nell'uovo vergine e fecondato (STEFANELLI⁴).

Per quanto riguarda i fermenti proteolitici negli Invertebrati marini le osservazioni più importanti si debbono a LINDEMSTRÖM-LANG e HOLTER⁵ che hanno riconosciuto l'alanilglicina dipeptidasi in diverse specie, localizzate nell'ooplasma e probabilmente assente nel nucleo.

Nel caso particolare dell'uovo degli Anfibi BRACHET⁶ ha constatato che nella vescicola germinativa vi è una quantità di dipeptidasi facilmente misurabile e nei giovani oociti dove appena inizia la vitellogenesi vi è una quantità di enzima tre volte superiore, a parità di peso, a quella dei grandi oociti. Questi risultati sono stati ottenuti su *Rana fusca*. DUSPIVA⁷ lavorando su *Rana esculenta* e su *Rana fusca* ha rilevato un elevato tenore in dipeptidasi al momento dell'inizio della vitellogenesi.

Il tenore in dipeptidasi dell'oocita in crescita è stato studiato anche nel nostro Istituto (DE CESARIS COROMALDI⁸) ed i risultati ottenuti, che confermano quelli di DUSPIVA, sono riassunti nella Tabella III.

¹ CHR. ENGEL e J. HEINS, Bioch. biophys. Acta 1, 190 (1947).

² J. NEEDHAM, *Biochemistry and Morphogenesis* (Univ. Press, Cambridge 1942).

³ J. BRACHET, *Embryologie Chimique* (Masson & Desoer, Paris 1947).

⁴ A. STEFANELLI, *Fenomeni respiratori nella fecondazione e attivazione dell'uovo*, Simposio speciale dell'IUBS (1948).

⁵ K. U. LINDEMSTRÖM-LANG, *Proteins and Enzymes*, Lane Medical Lect. (Stanford University Press, 1952).

⁶ J. BRACHET, *Embryologie Chimique* (Masson & Desoer, Paris 1947).

⁷ F. DUSPIVA, Biol. Zbl. 62, 403 (1942).

⁸ L. DE CESARIS COROMALDI, osservazioni inedite.

Si noterà come il massimo tenore in dipeptidasi per unità di volume è nel periodo di accrescimento nel quale cominciano a comparire le prime formazioni vitelline. Il parallelismo tra comportamento delle dipeptidasi e dell'RNA citoplasmatico degli oociti in crescita di Anfibi (BRACHET¹, STEINERT²) è evidente. È noto infatti che negli oociti in crescita di molte specie animali il comportamento dell'RNA è di massima concentrazione nel periodo precedente la vitellogenesi e quando questa è appena iniziata (URBANI³). Questo fatto rende verosimile l'idea che dipeptidasi e acido ribonucleico intervengano nella sintesi del vitello.

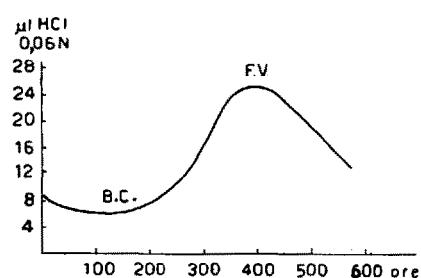


Fig. 4. Dipeptidasi nello sviluppo embrionale e larvale di *Bufo vulgaris*. In ordinate l'attività enzimatica, in ascisse le ore di sviluppo alla temperatura del laboratorio. B.C. = stadio di bottone caudale, F.V. = stadio di fine vitello. Si noti la caduta della attività dipeptidasa che si verifica con il passaggio alla vita larvale.

Nella fecondazione si ha, per quanto riguarda le dipeptidasi, un aumento rispetto all'uovo vergine sia in *Rana esculenta* (DE CESARIS COROMALDI⁴) che in *Bufo vulgaris* (URBANI e DE CESARIS COROMALDI⁵).

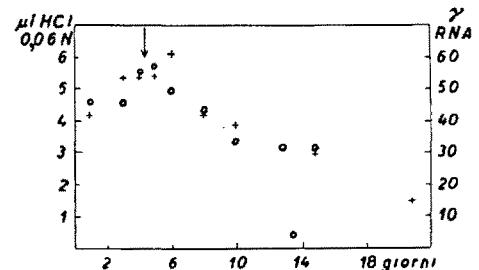


Fig. 5. Comportamento delle dipeptidasi (0) e dell'RNA (+) in embrioni e larve di *Bufo vulgaris*. In ascisse i giorni di sviluppo dall'inizio dei dosaggi. La freccia indica la fine del vitello. Si noti il parallelismo di comportamento tra dipeptidasi e RNA.

e questi dati trovano corrispondenza nello studio di LUNDBLAD⁶ sulla attività proteinasica (substrato gelatina) di uova vergini e feconde di *Paracentrotus* e di *Arbacia*. DOYLE⁷ invece non ha riscontrato diffe-

¹ J. BRACHET, *Embryologie Chimique* (Masson & Desoer, Paris 1947).

² M. STEINERT, Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 549 (1951).

³ E. URBANI, Riv. di Biologia 41, 331 (1949); Rend. Acc. naz. Lincei 14, 558 (1953).

⁴ L. DE CESARIS COROMALDI, La Ricerca scient. 24, 319 (1954).

⁵ E. URBANI e L. DE CESARIS COROMALDI, Ric. Scient. 24, 1275 (1954).

⁶ G. LUNDBLAD, Exp. Cell. Res. 1, 264 (1950).

⁷ W. L. DOYLE, C. R. Lab. Carlsberg, Sér. Chim. 21, 291 (1938).

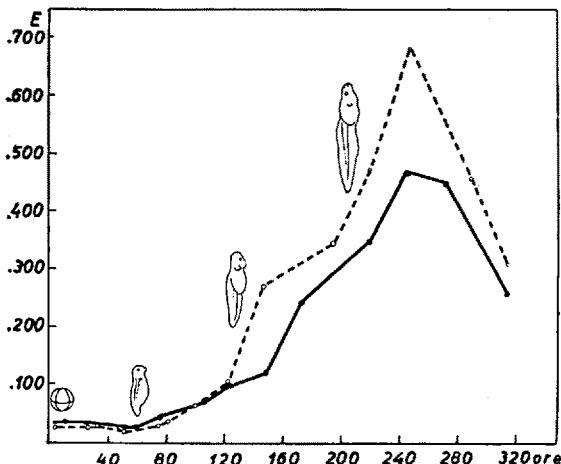


Fig. 6. Comportamento delle proteinasi durante lo sviluppo embrionale e larvale di *Rana esculenta*. Sono rappresentati nel grafico i dosaggi eseguiti su due diversi lotti di uova sviluppatisi a temperatura del laboratorio. In ascisse le ore di sviluppo, in ordinate l'attività enzimatica espressa in estinzioni. Con il passaggio alla vita larvale si ha anche per le proteinasi una caduta della attività enzimatica.

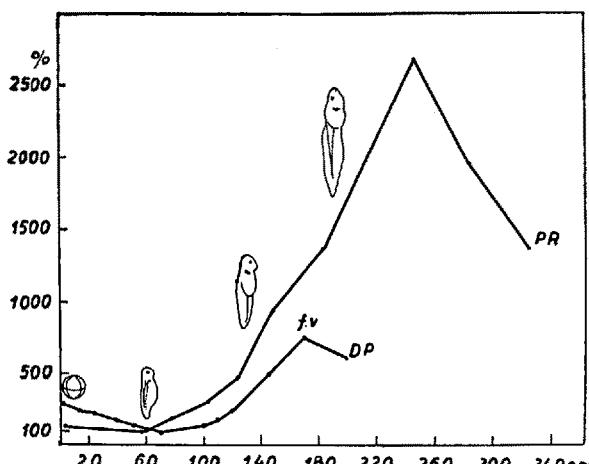


Fig. 7. Rappresentazione comparativa della attività dipeptidasica e proteinasica nello sviluppo embrionale e larvale di *Rana esculenta*. L'attività enzimatica minima riscontrata (stadio di bottone caudale-giovane pinna caudale) è stata posta sia per le dipeptidasie che per le proteinasi uguale a 100. Tutti gli altri valori sono stati riportati in per cento della attività enzimatica minima.

renze significative nella attività dipeptidasica di uova vergini e fecondate di *Psammechinus miliaris*. Rimane aperta perciò la questione se tutte le uova presentino modifiche della attività proteolitica con la fecondazione o se invece non accada qualcosa di analogo a quanto dimostrato da STEFANELLI¹ per la respirazione.

Sia in *Rana esculenta* che in *Bufo vulgaris* il tenore di dipeptidasie diminuisce dopo la fecondazione fino allo stadio di bottone caudale per poi aumentare fino alla fine del periodo embrionale (Fig. 4). COTRONEI² ha dimostrato che con la fine del vitello, si modificano le correlazioni umorali e metaboliche degli Anfibi ed è con il termine del riassorbimento del tuorlo che si ha il passaggio dalla vita embrionale alla vita larvale. Questo stadio critico dello sviluppo mostra un preciso comportamento delle dipeptidasie sia in *Rana* che in *Bufo*, infatti, con la fine del tuorlo, si ha una caduta del tenore enzimatico (Fig. 4 e 5).

Le dipeptidasie mostrano perciò una diminuzione dalla segmentazione al bottone caudale ed un aumento da questo stadio fino alla fine del vitello cioè con il periodo di forte accrescimento dell'embrione.

Mentre questa seconda fase appare spiegabile se si pensa che le dipeptidasie sono particolarmente abbondanti in tutti i tessuti ed organi in accrescimento e dove i poteri di sintesi sono elevati, rimane enigmatica la diminuzione fino allo stadio di bottone caudale. Queste osservazioni confermano anche quanto visto da LØVTRUP³ nelle sue belle ricerche sulle dipeptidasie e tripeptidasie degli Urodeli ma la diminuzione dello sta-

dio di fine vitello non è stata messa da questo Autore in relazione con il riassorbimento del tuorlo e con l'arresto dello sviluppo che si ha nelle giovani larve se queste non vengono alimentate.

Le proteinasi sono state per ora studiate solo in *Rana esculenta* (URBANI e DE CESARIS COROMALDI¹) ed abbiamo potuto vedere che il loro andamento durante lo sviluppo embrionale e larvale è somigliante a quello delle dipeptidasie. Dalla segmentazione al bottone caudale si ha una diminuzione molto lieve delle proteinasi; dal bottone caudale alla fine del vitello un forte aumento e, con il passaggio alla vita larvale, una caduta del tenore di proteinasi (Fig. 6).

Se si pone uguale a 100 l'attività dipeptidasica e proteinasica allo stadio di bottone caudale si vede però che il comportamento quantitativo dei due enzimi varia in modo notevolmente diverso durante lo sviluppo. Allo stadio di fine vitello infatti le dipeptidasie sono aumentate del 763% e le proteinasi del 2703%, perciò durante l'accrescimento l'attività di queste due categorie di enzimi varia con diverso rapporto (Fig. 7).

Dipeptidasie e proteinasi di *Rana esculenta* sono anche diversamente sensibili alla inattivazione spontanea. Come è illustrato nella Tabella IV dove l'attività dipeptidasica e proteinasica di un omogenato di embrioni (bottone caudale) è stata posta per il tempo zero uguale a 100. Si vede come le dipeptidasie si inattivano molto più rapidamente delle proteinasi.

Dato che l'aumento degli enzimi proteolitici si verifica dallo stadio di bottone caudale abbiamo voluto studiare la loro distribuzione negli embrioni a questo stadio. Già alcuni autori si sono posti il quesito della localizzazione delle dipeptidasie nella gastrula degli

¹ A. STEFANELLI, *Fenomeni respiratori nella fecondazione e attivazione dell'uovo*, Simposio speciale dell'IUBS (1948).

² G. COTRONEI, Arch. Zool. Ital. 10, 85 (1922); Mon. Zool. Ital. 41, 8 (1930); Rend. Acc. naz. Lincei 6, 15 (1932) e Note segg. sugli stessi Rendiconti.

³ S. LØVTRUP, C. R. Lab. Carlsberg, Sér. Chim. 28, 426 (1953).

¹ E. URBANI e L. DE CESARIS COROMALDI, La Ricerca Scient. 24, 2364 (1954).

Tabella IV. – Inattivazione delle dipeptidasi e delle proteinasi nel l'omogenato di embrioni di *Bufo vulgaris*.

L'attività enzimatica al tempo zero è stata posta uguale a 100

| Tempo ore | Dipeptidasi | Proteinasi |
|-----------|-------------|------------|
| 0 | 100 | 100 |
| 5 | 25 | 77 |
| 24 | 6,2 | 62 |
| 31 | — | 60 |
| 72 | — | 40 |

Anfibi (PICKFORD¹, GREGG e LØVTRUP², BARTH e SZE³) ed hanno riconosciuto un gradiente animale vegetativo. Lo stadio di bottone caudale riveste invece un particolare interesse perché è da questo momento in poi che si verifica il forte aumento degli enzimi proteolitici.

Embrioni di *Bufo vulgaris* e di *Rana esculenta* sono stati tagliati in tre parti, cefalica, intermedia e caudale, le parti stesse pesate con la bilancia a diavoletto di Cartesio per determinare il peso ridotto (RW) e poi usate per la determinazione delle dipeptidasi, proteinasi, acido ribonucleico, consumo di ossigeno (micro-respirometro di BRACHET); i risultati ottenuti sono illustrati nella Figura 8 dove i valori desunti dai dosaggi (riportati a unità di peso) sono stati posti uguali a 100 per la parte intermedia. È evidente come in *Bufo vulgaris* le dipeptidasi siano più forti nella parte cefalica e caudale e così l'RNA che mostra parallelismo di comportamento con questi enzimi. Anche il consumo di O₂ è più elevato nella parte cefalica e caudale.

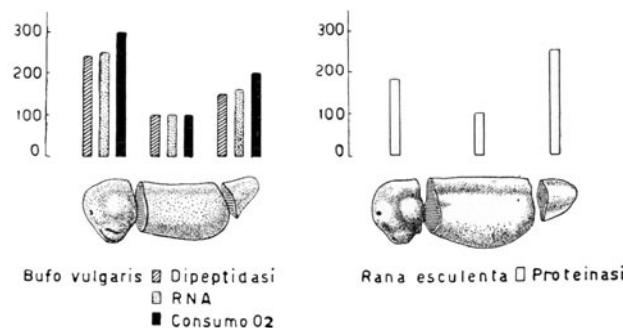


Fig. 8. Distribuzione delle dipeptidasi, RNA e consumo di O₂ nell'embrione di *Bufo vulgaris* allo stadio di bottone caudale e delle proteinasi nell'embrione di *Rana esculenta* allo stesso stadio. I valori trovati per il pezzo intermedio (divisi per il peso) sono stati posti uguali a 100 e quelli della parte cefalica e caudale (divisi per il peso) riportati in percento.

Le proteinasi, studiate per ora solo su *Rana esculenta*, mostrano analogo comportamento con la differenza di un massimo tenore nella parte caudale.

Tabella V
Dipeptidasi nel pancreas di ratto albino espresse in µl HCl 0,06 N

| Controlli | Ore dopo lo stimolo pilocarpinico | | | | |
|-----------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 7 |
| 2,3 | 1,4 | 2,6 | 3,8 | 3,4 | 3,6 |
| 3,3 | 1,6 | 2,9 | 3,9 | 3,5 | 3,4 |
| 3,1 | 2,2 | 2,4 | 5,2 | 4,6 | 4,0 |
| 3,2 | 2,7 | 3,3 | 3,9 | 3,8 | 3,6 |
| Media | 2,9 | 1,9 | 2,8 | 4,2 | 3,8 |
| % | 100 | 65 | 96 | 144 | 131 |
| | | | | | 124 |

Da questi risultati appare evidente che gli enzimi proteolitici si trovano nella maggior concentrazione in quelle zone di maggiore attività morfogenetica e dove i processi di accrescimento sono più spiccati come nella parte cefalica e nel bottone caudale. La parte intermedia che è quella che ha la maggiore quantità di cellule vitelline mostra, per unità di peso, il minore tenore in dipeptidasi, proteinasi e RNA. Che le parti cefaliche e caudali siano quelle che hanno il più elevato metabolismo è documentato dalle determinazioni del consumo di O₂.

Questo studio sugli embrioni di Anfibi ha suggerito varie considerazioni per le quali rimando ai lavori originali, limitandomi qui a rilevare che, mentre rimane enigmatico il comportamento degli enzimi proteolitici dalla segmentazione al bottone caudale, il forte aumento da questo stadio in poi può essere interpretato come un'espressione delle continuamente aumentanti esigenze metaboliche dell'embrione nei processi di morfogenesi e di accrescimento: i risultati ottenuti perciò non contrastano con l'idea che questi enzimi intervengano nei fenomeni di sintesi.

V. – *Rigenerazioni*. I blastemi rigenerativi sono stati studiati, nei riguardi del tenore in enzimi proteolitici, da ORECHKOVITCH¹ che ha visto che nella coda in rigenerazione di larve di *Rana* e di *Axolotl* l'attività dipeptidasica aumenta fino al 10–12° giorno di rigenerazione. Le proteinasi (substrato, gelatina) aumentano pure ma con un ritmo diverso in quanto raggiungono il massimo dopo 3–4 giorni. Questa differenza di comportamento tra dipeptidasi e proteinasi, già notata nei frammenti nucleati e anucleati di ameba e nello sviluppo embrionale degli Anfibi, è una prova delle diverse funzioni assolte dalle dipeptidasi e dalle proteinasi nel metabolismo cellulare (cfr. NEEDHAM²).

Nel nostro Istituto P. SETTE³ ha ripreso lo studio delle dipeptidasi nella rigenerazione della coda e della zampa di *Triton cristatus* e i risultati ottenuti sono schematizzati nella Figura 9 dove l'attività enzima-

¹ V. N. ORECHKOVITCH, Bioch. Z. 286, 91 (1936) e citato in J. NEEDHAM.

² J. NEEDHAM, *Biochemistry and Morphogenesis* (Univ. Press, Cambridge 1942).

³ Osservazioni inedite.

¹ G. PICKFORD, J. Exp. Zool. 92, 143 (1943).

² J. R. GREGG e S. LØVTRUP, C. r. Lab. Carlsberg, Sér. Chim. 27, 307 (1950).

³ L. G. BARTH e L. C. SZE, Physiol. Zool. 26, 205 (1953).

tica della coda e zampa normali è posta eguale a 100 e quella dei blastemi di rigenerazione è riportata in per cento della attività normale. È noto che l'RNA è elevato nei blastemi di rigenerazione (CLEMENT-NOËL¹) ed anche in questo caso vi è forse un parallelismo di comportamento tra RNA e dipeptidasi. L'argomento merita di essere indagato con dosaggi contemporaneamente condotti dell'acido ribonucleico delle dipeptidasi e delle proteinasi anche perché nei blastemi di rigenerazione è molto probabile che vi siano fenomeni di autolisi e quindi una vera e propria attività di catepsine. I risultati ottenuti finora mostrano però indubbiamente l'esistenza di relazioni tra il tenore in enzimi proteolitici del blastema e la sintesi di nuova sostanza vivente che si realizza nei processi rigenerativi.

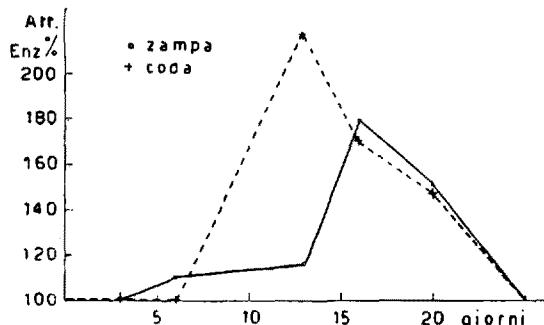


Fig. 9. Attività dipeptidasica del blastemo rigenerativo della zampa e della coda di *Triton cristatus* a vari giorni (ascisse) dalla amputazione. L'attività enzimatica dei controlli è stata posta eguale a 100 e quella dei tessuti in rigenerazione riportata in per cento.

Lo studio enzimatico dei fenomeni rigenerativi riveste un grande interesse, non solo per il problema particolare ma anche per le considerazioni generali che derivano dal confronto con i risultati che si ottengono sul materiale embrionale.

In ambedue i casi infatti si realizza l'attuazione di «potenze» e i potenziali morfogenetici dell'embrione e dell'organismo in rigenerazione hanno certamente il loro fondamento biochimico nel tenore enzimatico. Queste ricerche meritano perciò di essere estese alle rigenerazioni nelle larve degli Anuri e degli Urodeli allo scopo di chiarire il ruolo degli enzimi proteolitici nel complesso quadro dei problemi regolativi.

VI. - *Cellule ghiandolari*. VAN WHEEL² ha studiato il comportamento della glicil-glicina dipeptidasi nel pancreas di ratto dopo stimolazione pilocarpina ed ha visto che il ciclo di lavoro della ghiandola esocrina è accompagnato da un tipico comportamento delle dipeptidasi. Quando i granuli di secreto sono espulsi dalla cellula a seguito dello stimolo pilocarpino le dipeptidasi diminuiscono e poi cominciano ad aumentare di nuovo con la sintesi del secreto.

URBANI MISTRUZZI e VECCHIOLI¹ hanno ripreso queste osservazioni ed alcuni risultati da loro ottenuti su pancreas di ratto albino sono riportati nella Tabella dove l'attività dipeptidasica è espressa in μl HCl 0,06 N.

C'è una certa corrispondenza tra il ciclo delle dipeptidasi e il ciclo dell'RNA nella stessa ghiandola dopo stimolazione pilocarpinica (URBANI MISTRUZZI e PACINI²) e queste osservazioni meritano di essere completate con lo studio degli acidi nucleici condotto quantitativamente, cosa che in parte è stata fatta da CAPPELLETTI¹ e che conferma i risultati istochimici di URBANI MISTRUZZI e PACINI. Mancano dati sulle proteinasi che invece è desiderabile avere per integrare il quadro enzimatico della attività secretoria. Altra questione che bisogna tener presente degli studi sul pancreas è che il secreto della parte acinosa è un secreto enzimatico e perciò i risultati vanno diversamente interpretati da quelli ottenuti in altre cellule nelle quali gli enzimi studiati sono esclusivamente intracellulari.

Conclusioni

La presente rassegna ha lo scopo di inquadrare una serie di risultati ottenuti da me e dai miei Collaboratori, sugli enzimi proteolitici studiati nei materiali biologici più diversi.

Si è detto nella introduzione che i compiti che svolgono gli enzimi proteolitici intracellulari non sono chiari in quanto possono essere le loro attività diversamente interpretate.

L'idea che essi abbiano un ruolo postmortale nella cellula provvedendo alla autolisi del protoplasma rispecchia solo un lato della questione in quanto essi probabilmente intervengono direttamente nei processi metabolici.

La loro ubiquità, il fatto che essi siano presenti in tutti i tessuti in accrescimento (ci si riferisce particolarmente alla dipeptidasi), hanno fatto pensare che essi intervengano nella sintesi delle proteine e questo è un dato attendibile anche per le relazioni che sembrano esservi tra dipeptidasi e acidi nucleici.

Dipeptidasi e proteinasi, le prime idrolizzanti composti a basso peso molecolare, le seconde composti ad elevato peso molecolare mostrano oltre che questa differenza nell'attacco dei substrati anche differente localizzazione cellulare e differente comportamento nelle condizioni fisiologiche e sperimentali.

Nelle amebe le dipeptidasi sarebbero localizzate, secondo HOLTER e Coll. nei microsomi o nel citoplasma ialino, o in ambedue; le proteinasi come le amilasi ed altri enzimi nei mitocondri.

Le prime si trovano sotto il controllo nucleare, se non esclusivamente almeno in gran parte, mentre le seconde non mostrano di essere turbate dall'asportazione del nucleo.

¹ Osservazioni inedite.

² L. URBANI MISTRUZZI e V. PACINI, Rend. Acc. naz. Lincei 10, 427 (1951).

¹ H. CLEMENT-NOËL, Ann. Soc. roy. Zool. Belgique 286, 91 (1936).

² H. VAN WHEEL, Z. Zellforsch. 27, 65 (1939).

Negli eritrociti nucleati e anucleati e negli eritroblasti si ritrova questa dipendenza delle dipeptidasi e dell'RNA dal nucleo cellulare.

Negli oociti in crescita le dipeptidasi mostrano, al pari dell'RNA strette relazioni con la sintesi del vitello. Nello sviluppo embrionale degli Anfibi sia le dipeptidasi che le proteinasi sono maggiormente concentrate nelle zone di morfogenesi e di accrescimento e sembrano collegate con la crescente attività metabolica dell'embrione in sviluppo. Dipeptidasi e proteinasi mostrano anche negli Anfibi differenti caratteristiche indicatrici di un diverso ruolo nello sviluppo.

Negli organismi in vita latente le osservazioni hanno mostrato che le cisti di *Artemia salina* conservano, come per un preformismo enzimatico dipeptidasi e proteinasi al pari di altri enzimi; questo è un fatto che sembra escludere il significato di catepsine di questi fermenti proteolitici.

Nelle rigenerazioni le dipeptidasi e le proteinasi hanno un diverso comportamento e soprattutto le prime sembrano collegate con i processi di sintesi che si realizzano nei blastemi rigenerativi.

Anche in questo caso si può porre il problema di un preformismo o di una epigenesi enzimatica. Può essere cioè che nel blastema rigenerativo si abbia una «attivazione» di enzimi già esistenti nella cellula oppure una neo-formazione: in questo secondo caso si può pensare al richiamo da altre parti dell'organismo dei materiali necessari alla sintesi della molecola enzimatica.

Mentre nelle uova di *Artemia* i risultati ottenuti mostrano chiaramente che si tratta di una riserva enzimatica, nelle rigenerazioni rimane da decidere in quale misura ciascuno di questi due meccanismi contribuisca all'aumento della attività proteolitica.

Nelle cellule ghiandolari le dipeptidasi mostrano di intervenire nei fenomeni di sintesi del secreto.

In conclusione lo studio dei più differenti materiali biologici e l'indirizzo comparativo e zoologico che ha guidato le presenti ricerche mostrano di essere una metodica promettente per lo studio della funzione degli enzimi proteolitici nella cellula e nell'embrione.

Zusammenfassung

Die Rolle der intrazellulären proteolytischen Enzyme ist nicht eindeutig abgeklärt, insofern ihre Wirkung verschieden interpretiert werden kann. Die Ansicht, dass sie die Lyse des Protoplasmas nach dem Tode der Zelle bewirken (Kathepsine), berührt nur eine Seite des Problems, da sie wahrscheinlich direkt in die Stoffwechselprozesse eingreifen.

Die Tatsache, dass sie in allen wachsenden Geweben und in Zellen mit hohem synthetischem Vermögen vorkommen, lässt vermuten, dass sie am Aufbau der Proteine beteiligt sind. Die Beziehungen zwischen proteolytischen Enzymen und Pentosenukleinsäuren sind somit von grossem Interesse. Die Dipeptidasen, welche Verbindungen mit niedrigen, und die Proteininasen, welche solche mit hohem Molekulargewicht hydrolyseren, sind in der Zelle verschieden lokalisiert und unterscheiden sich außerdem in ihrem Verhalten unter physiologischen und experimentellen Bedingungen.

Bei den Amöben stehen die Dipeptidasen unter partieller Kernkontrolle, während die Proteininasen vom Kern nicht beeinflusst werden. Auch in den Erythrozyten der Wirbeltiere und in den Erythroblasten der Säuger findet man diese Kernabhängigkeit der im Cytoplasma lokalisierten Dipeptidasen, und bekanntlich wird die RNS des Cytoplasmas ebenfalls vom Kern kontrolliert.

In wachsenden Oocyten bestehen enge Beziehungen zwischen Dipeptidasen, RNS und Dottersynthese.

Bei der embryonalen und larvalen Entwicklung der Amphibien sind sowohl Dipeptidasen wie Proteininasen in den Zonen von Morphogenese und Wachstum stärker konzentriert und scheinen mit der zunehmenden Stoffwechselfähigkeit des Embryos in Verbindung zu stehen.

In Organismen im latenten Lebenszustand bleiben Dipeptidasen und Proteininasen durch eine enzymatische Präformation erhalten.

Das Problem von Präformation und enzymatischer Epigenese stellt sich neuerdings bei den Erscheinungen der Regeneration, wo die proteolytischen Enzyme in ganz bestimmter Weise beteiligt sind.

In den Drüsenzellen greifen sowohl Dipeptidasen wie RNS in die Sekretsynthese ein.

Das reichhaltige, unter normalen und experimentellen Bedingungen geprüfte Material und die vergleichende Methode, nach welcher die vorliegenden Untersuchungen durchgeführt wurden, ergaben vielversprechende Resultate für das Studium der Funktion der proteolytischen Enzyme in Zelle und Embryo.