

Passaggio di nucleoli attraverso la membrana nucleare negli ovociti in accrescimento di *Patella coerulea* L. (Moll. Gast. Pros.)

Il passaggio di nucleoli dal nucleo al citoplasma ha richiamato più volte l'attenzione dei ricercatori¹⁻¹¹, che hanno cercato di stabilire da un lato le modalità secondo cui avverrebbe detto passaggio, dall'altro le conseguenti relazioni funzionali che così si vengono a determinare fra tali costituenti fondamentali della cellula.

Negli ovociti di varie specie animali al microscopio ottico sono stati soprattutto descritti due modi di estrusione. In base al primo il nucleolo, o mantenendosi intero o dopo essersi frammentato, supera direttamente la membrana nucleare^{1,4}. In base al secondo il trasferimento nel citoplasma di frammenti nucleolari avviene in conseguenza della dissoluzione della membrana nucleare nei punti in cui essi aderiscono^{8,9}. Il materiale nucleolare, giunto nel citoplasma, contribuirebbe alla sintesi del vitello^{1,3,10}.

Sul passaggio di materiale nucleolare altre osservazioni sono state compiute al microscopio elettronico. Recentemente SZOLLOSI e RIS¹² hanno rinvenuto nel citoplasma corpicciuoli avvolti da due membrane, dati appunto da nucleoli. KESSEL e BEAMS¹³ hanno pure visto che nel citoplasma possono migrare nucleoli interi attraverso la membrana nucleare, che a tale scopo in punti determinati si dissolve.

Ora JÖRGENSEN¹⁴ negli ovociti di *Patella coerulea* aveva accertato la presenza di un nucleolo primario, il quale col metodo Zimmermann al verde iodio e fucsina assumeva una colorazione rossa, e di un numero più o meno elevato di anfinucleoli, i quali, dopo essere passati attraverso la fase iniziale in cui con lo stesso metodo si coloravano in rosso, successivamente accrescendosi si coloravano in azzurro. Secondo lo stesso autore, come pure secondo BOLOGNARI¹⁵, mentre il nucleolo primario si mantiene alquanto lontano dalla membrana nucleare, gli anfinucleoli accresciuti vi aderiscono, si riducono e quindi scompaiono.

Non prive di interesse potevano essere pertanto ricerche dirette a stabilire, negli ovociti di *Patella coerulea*, il passaggio di interi nucleoli dal nucleo al citoplasma.

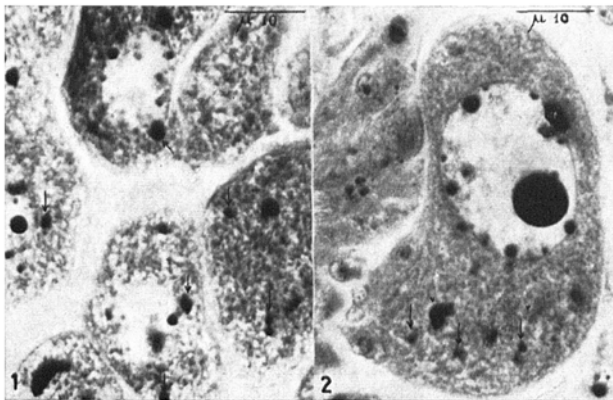


Fig. 1. Microfotografia di sezione di gonade femminile di *Patella coerulea*. Notare un nucleolo a cavallo della membrana nucleare (freccia dal basso in alto) e vari nucleoli (freccie dall'alto in basso) nel citoplasma. Fiss. Bouin-Hollande; coloraz. Galgano I.

Fig. 2. Altra sezione di gonade femminile di *Patella*. Nell'ovocita vitellogenetico si rilevano nel citoplasma vari nucleoli (freccie dall'alto in basso). Fiss. Bouin-Hollande; coloraz. Galgano I.

A tale scopo sono state effettuate osservazioni su preparati fissati in Bouin, Bouin-Hollande ed Helly e colorati coi metodi Galgano I, Dominici, Unna-Pappenheim. È stata effettuata anche la digestione con ribonucleasi cristallina in ragione di 1 mg/ml a 60° per 1 h.

Le osservazioni compiute hanno consentito di rilevare che il nucleolo primario si colora costantemente in rosso col Galgano I ed in azzurro col Dominici e che gli anfinucleoli inizialmente si comportano come il nucleolo primario e quindi si colorano con detti metodi rispettivamente in azzurro ed in rosso. Col metodo Unna-Pappenheim il nucleolo primario, come pure i più piccoli nucleoli, si dimostrano pironinofili, gli anfinucleoli più sviluppati risultano invece pironinofobi.

Negli ovociti poi è possibile notare, tanto nel periodo della previtellogenesi che in quello iniziale della vitellogenesi, la frequente esistenza, lungo la membrana nucleare, di piccoli nucleoli. Di questi altresì è dato rinvenirne, oltre che a cavallo della stessa membrana, anche in sede citoplasmatica, poco distanziati dalla stessa membrana (Figura 1). Si possono notare nuclei nei quali è possibile rilevare la contemporanea presenza di nucleoli a cavallo della membrana, come pure in due parti opposte di essa.

Si notano poi delle propaggini della membrana nucleare estese verso il citoplasma; in esse si rinvencono talora, più o meno profondamente inseriti, piccoli nucleoli. Talvolta si rinvencono nucleoli già in sede citoplasmatica, i quali appaiono ancora compresi in incavi della membrana. Entro il citoplasma, specialmente di ovociti all'inizio della vitellogenesi, si possono riscontrare parecchi nucleoli di dimensioni ridotte più o meno distanziati dalla membrana nucleare (Figura 2).

Negli ovociti a vitellogenesi avanzata non si riscontrano più gli aspetti avanti descritti; in particolare non è dato rinvenire elementi nel citoplasma che possano essere ascrivibili a nucleoli.

I nucleoli piccoli, di cui avanti si è detto, risultano sempre pironinofili; essi poi col metodo Galgano I si colorano in rosso e col metodo Dominici in azzurro. Il controllo con la ribonucleasi consente di accertare la perdita della pironinofilia, come pure dell'affinità per l'azzurro conferito dal Dominici; detti nucleoli pertanto contengono acido ribonucleico.

L'insieme delle osservazioni compiute consente di ammettere che negli ovociti della specie in esame avvenga, durante una fase del loro accrescimento, un passaggio di nucleoli dal nucleo al citoplasma. Si ha quindi che dei numerosi nucleoli, che via via compaiono in seno al nucleo, mentre alcuni sono destinati a trasformarsi precocemente, per cui si hanno gli anfinucleoli, altri si trasferiscono nel

¹ M. WITTEK, Arch. Biol. 63, 133 (1952).

² D. S. SRIVASTAVA, La Cellule 55, 131 (1952).

³ J. FAUTREZ e N. FAUTREZ-FIRLEFYN, C. R. Soc. Biol. 147, 351 (1953).

⁴ H. K. YOSUFZAI, La Cellule 55, 167 (1953).

⁵ R. LETTRÉ, Symp. fine struc. cells, Leiden 141 (1954).

⁶ E. SCHOLTYSECK, Naturwiss. 41, 1 (1954).

⁷ C. F. EHERET e E. L. POWERS, Exp. Cell Res. 9, 241 (1955).

⁸ K. YAMAMOTO, J. Fac. Science, Hokkaido Univ., ser. 6, Zool. 12, 375 (1956).

⁹ A. G. SATHYANESAN, Naturwiss. 46, 92 (1959).

¹⁰ B. TERIO, Atti Soc. Peloritana Sci. Fis. Mat. Nat. Messina 8, 177 (1962).

¹¹ V. BOTTE, Riv. Biologia 55, 321 (1962).

¹² D. SZOLLOSI e H. RIS, J. Cell. Biol. 19, N2 69 A (1963).

¹³ R. G. KESSEL e H. W. BEAMS, Exp. Cell Res. 32, 612 (1963).

¹⁴ M. JÖRGENSEN, Arch. Zellforsch. 10, 1 (1913).

¹⁵ A. BOLOGNARI, Acta histochem. 8, 504 (1959).

citoplasma, dove, con molta probabilità entrano nel gioco della formazione dei globuli di vitello.

I risultati rappresentano altresì una conferma di quelli ottenuti da vari altri autori, che hanno appunto rilevato, nel materiale più diverso, l'estruzione nucleolare.

Summary. The author has found in increasing ovocytes of *Patella coerulea*, particularly in the nuclear membrane,

a real passage of small nucleoli from the nucleus to the cytoplasm. Thus not all the nucleoli which appear little by little in the nucleus are amphinucleoli.

MARIA PIA ALBANESE

Istituto di Zoologia e di Anatomia comparata dell'Università di Messina (Italia), il 20 Aprile 1964.

Intracellular Phosphate Release by the Na^+ - K^+ -Activated Membrane ATPase

An ATPase activity associated with cell membranes has been shown to depend on the simultaneous presence of K^+ on the external and of Na^+ on the internal surface of the membrane^{1,2}, whereas the substrate (ATP) has to be present on the internal surface of the membrane in order to have access to the enzyme. The enzyme requires Mg^{++} in addition and is inhibited by Ca^{++} at low (intracellular) concentration and by cardiac glycosides such as ouabain³⁻⁵. There is good reason to assume that active transport of Na^+ and K^+ across the cell membrane and this ATPase are related. This connection has been tentatively described in terms of the mobile carrier hypothesis. It is assumed that in the presence of Na^+ the terminal phosphate group of ATP is transferred on the internal membrane surface to a compound situated in the membrane substance. The phosphorylated molecule passes the membrane in the outward direction owing to the chemical gradient and is hydrolysed in the presence of K^+ on the external surface. The phosphorylated form is thought to be the Na -carrier and the free form to be the K -carrier. This theory implies that inorganic phosphate (P_i) should be discharged directly into the external medium by this two-step enzymatic process.

This postulate has been tested in human red cells of high ATP- (and/or P_i) and Na^+ -content, using WHITTAM's⁶ method of reversal of haemolysis. Such cells containing P_i (which stemmed from some ATP-splitting during preparation), ATP (more than $4 \mu\text{-moles/ml cells}^6$), Mg^{++} ($4 \mu\text{-moles/ml cells}$) and Na^+ (approximately $70 \mu\text{-moles/ml cells}^6$) were suspended in about a tenfold external volume and incubated for 40 min with adequate shaking in Erlenmeyer flasks at 37°C . The external medium was free of phosphate and contained 140 mM Na^+ , 12 mM K^+ , $10 \text{ mM tris buffer pH 7.3}$, 2 mM Mg^{++} but no glucose. P_i was estimated by the method of BERENBLUM and CHAIN⁷ at the beginning and the end of the incubation period in the external medium and in the haemolysate of the cells from an aliquot of the suspension after deproteinization with an equal volume of 10% trichloroacetic acid. The initial cell to suspension volume ratio was determined by estimating the haemoglobin content of packed cells and suspension, and intracellular P_i was expressed as $\mu\text{-moles/ml initial cell volume}$, disregarding any possible volume change taking place during the experiment. This gives an estimate of the amount of P_i per cell rather than of intracellular concentration.

Under the given conditions it was found that the cellular P_i -content decreased or remained constant while a P_i -gradient was maintained from cells to medium up to

the end of the experiment thanks to the fairly large medium/cell volume ratio. The lowering of intracellular P_i content was markedly increased by adding 10^{-4} (w/v) ouabain (Merck, crystalline product DAB) to the suspension, a concentration known to inhibit the Na^+ - K^+ -activated ATPase completely (Figure B, Table). Omitting

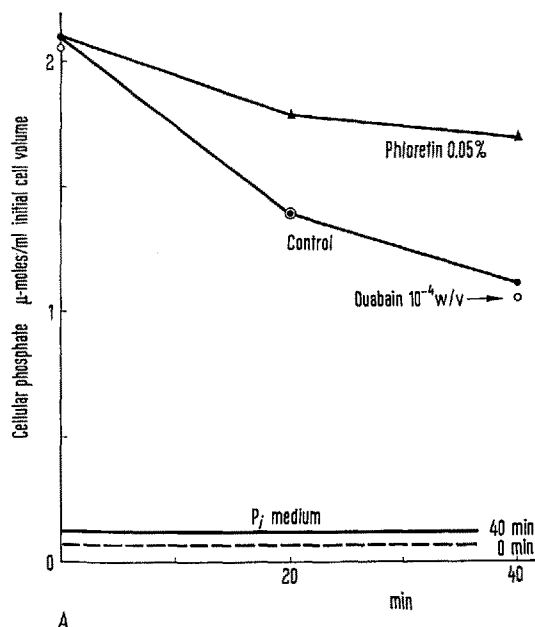


Figure A. Washed human red cells haemolysed in water in the presence of $4 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ of pH 7.25 and 4 mM MgCl_2 . Haemolysis reversed by adding NaCl . Incubated in a solution of 140 mM NaCl , $10 \text{ mM tris-buffer pH 7.3}$, 12 mM KCl , 2 mM MgCl_2 at 37°C . Cell dilution $1/7.7$. Inorganic phosphate (P_i) determined in packed cells of 4 ml suspension after TAA-precipitation. Upper part of graph: cellular P_i ; lower part of graph: P_i -concentration in external medium at beginning and end of experiment drawn as horizontal lines.

¹ I. M. GLYNN, *J. Physiol.* **160**, 18P (1962).

² R. WHITTAM and M. E. AGER, *Biochim. biophys. Acta* **65**, 383 (1962).

³ E. T. DUNHAM and I. M. GLYNN, *J. Physiol.* **156**, 274 (1961).

⁴ R. L. POST, C. R. MERRITT, C. R. KINSOLVING, and C. D. ALBRIGHT, *J. biol. Chem.* **235**, 1796 (1960).

⁵ H. J. SCHATZMANN, *Biochim. biophys. Acta*, in press.

⁶ R. WHITTAM, *Biochem. J.* **84**, 110 (1962).

⁷ J. BERENBLUM and E. CHAIN, *Biochem. J.* **32**, 286 (1938).