

Effetti precoci del siero anti-*Nerve Growth Factor* (anti-NGF) sulla cellula nervosa

MARIA T. SABATINI (*), RITA LEVI-MONTALCINI (**) e PIETRO U. ANGELETTI

Laboratori di Chimica Biologica, Centro di Neurobiologia

Riassunto. — È stata studiata l'azione del siero anti-NGF valutata mediante l'incorporazione di uridina-C¹⁴ in gangli cervicali superiori di topi neonati in prove *in vitro* e *in vivo*. I risultati (Tabella 1 e 2) dimostrano una rapida inibizione della sintesi di RNA nelle prove sperimentali cui corrisponde morfologicamente una alterazione primaria a livello nucleare precedentemente descritta. Viene inoltre discussa la specificità d'azione di tale siero anti-NGF quando paragonato ad altri sieri citotossici.

Summary. (*Early effects of NGF-antiserum on the nerve cells*). — Previous studies by COHEN (1960) and LEVI-MONTALCINI & ANGELETTI (1961) have shown that a specific antiserum to the Nerve Growth Factor (NGF) calls forth the near total destruction of the sympathetic ganglia when injected into newborn mammals. The early cytotoxic effects of this antiserum on the responsive nerve cells, *in vitro** (Table 1) as well as *in vivo* (Table 2), have now been investigated. Electron microscopic studies indicate that the first changes induced by the antiserum are in the nuclear compartment and consist of folding of the nuclear membrane and modification of the chromatin structure (Figs. 2, 3, 4). At the same time significant impairment of RNA synthesis is observed in the treated ganglia. The incorporation of uridine-C¹⁴ is significantly and consistently reduced in the ganglia treated with serum anti-NGF. The effect of serum anti-NGF on RNA synthesis is clearly evident already after 3 hours of incubation. The data are discussed in connection with the hypothesis that the NGF plays an essential role in the life of the responsive nerve cells.

Recenti ricerche (LEVI-MONTALCINI, 1964) hanno dimostrato che la crescita e la differenziazione della cellula nervosa simpatica sono sotto il controllo di una proteina specifica denominata *Nerve Growth Factor* (NGF).

(*) Borsista dei Laboratori di Chimica Biologica.

(**) Professore presso il *Department of Biology, Washington University, U.S.A.*

La somministrazione di questo fattore in animali neonati produce una marcata ipertrofia ed iperplasia dei gangli simpatici, cui fa seguito una imponente iperinnervazione dei visceri e del sistema vascolare (LEVI-MONTALCINI, 1962). L'effetto stimolante del NGF si verifica anche *in vitro* sui gangli embrionali trapiantati e coltivati in mezzi sintetici (LEVI-MONTALCINI, MEYER & HAMBURGER, 1954).

Data la natura proteica del NGF è stato possibile preparare un siero specifico capace di bloccare l'attività biologica di questo fattore (COHEN, 1960). L'iniezione di piccole quantità di siero anti-NGF in animali neonati causa la distruzione pressochè completa di tutto il sistema gangliare simpatico (LEVI-MONTALCINI & ANGELETTI, 1961). La distruzione del sistema simpatico è rapida, permanente e completa.

A livello morfologico, le prime lesioni prodotte dal siero sui neuroni simpatici sono osservabili al microscopico ottico a 12 ore di distanza dal trattamento e divengono via via più evidenti con il passare del tempo (LEVI-MONTALCINI & BOOKER, 1960).

Al microscopio elettronico (SABATINI, PELLEGRINO DE IRALDI & DE ROBERTIS, 1965) gli effetti nocivi del siero anti-NGF sono già rilevabili dopo 2-3 ore *in vitro* e *in vivo*. Queste alterazioni precoci dell'ultrastruttura del neurone simpatico consistono principalmente in un ripiegamento della membrana nucleare, modificazione della struttura cromatinica, comparsa di vescicole pinocitiche. Successivamente compaiono e si rendono più evidenti alterazioni citoplasmatiche.

Il rilievo di alterazioni così precoci a livello nucleare fa supporre che la reazione antigene-anticorpo avvenga in tale compartimento o comunque faccia risentire primariamente a tale livello il suo effetto nocivo. Allo scopo di meglio chiarire questo punto sono state eseguite una serie di esperienze volte a correlare le alterazioni ultrastrutturali, che si osservano appunto nei nuclei dei neuroni simpatici esposti all'azione dell'antisiero, con eventuali alterazioni di una attività metabolica tipicamente nucleare, quale la sintesi del RNA. I risultati ottenuti sono riportati nella presente nota.

MATERIALE E METODI

Gangli cervicali superiori di topi neonati erano rapidamente prelevati con l'aiuto del microscopio da dissezione. Gruppi di sei gangli cervicali della stessa nidia di topolini erano incubati per diverse ore in Eagle *Basal Medium* a 37°C in incubatore con flusso costante di CO₂ al 5%. Nelle colture di controllo si aggiungeva siero fresco di coniglio normale (0,2 ml per ogni ml di mezzo). Nelle colture sperimentali invece si aggiungeva la stessa quantità di siero anti-NGF prodotto nel coniglio secondo il metodo di COHEN (1960). L'attività dell'antisiero usato negli esperimenti era di 1:1000.

In esperimenti di incorporazione, uridina- C^{14} (Amersham LTD) è stata aggiunta ai mezzi di coltura nella quantità di $5 \mu\text{C}/\text{ml}$. I gangli prelevati a vari intervalli di tempo sono stati lavati tre volte in soluzione salina fredda contenente uridina 1 mM , precipitati in acido perclorico 7% con aggiunta di $2,5 \text{ mg}$ di albumina. I campioni erano trattati secondo FLEXNER *et al.* (1962), con l'omissione dei passaggi in acido perclorico caldo e etanolo caldo. Il precipitato finale era disciolto in 1 ml di formammide ($20 \text{ ore a } 120^\circ$), mescolato quindi con etanolo ($8,6 \text{ ml}$) e con $10,4 \text{ ml}$ di liquido di scintillazione (NE 213) (Nuclear Interprices GB-Ltd).

La radioattività era misurata quindi con un apparecchio a basso fondo (Liquid Scintillation Interprices System 725 Nuclear, Chicago).

Per la determinazione di proteine era usato il metodo di LOWRY *et al.* (1951).

Le procedure adottate per le osservazioni al microscopio elettronico, sono descritte in un lavoro precedente (SABATINI, PELLEGRINO DE IRALDI & DE ROBERTIS, 1965).

RISULTATI

Incorporazione di uridina- C^{14} . — Gangli cervicali immediatamente prelevati dal topino neonato e messi ad incubare *in vitro* in mezzo sintetico, con aggiunta di siero normale di coniglio, incorporano attivamente il precursore marcato e la velocità di incorporazione si mantiene pressochè lineare nel tempo fino a 6-8 ore. Nella Tabella 1 sono riportati i risultati de-

TABELLA 1.

Effetto « *in vitro* » del siero anti-NGF sull'incorporazione di uridina- C^{14} , in gangli cervicali superiori di topini neonati.

Esperimento (N°)	Incorporazione di uridina- C^{14}	
	In gangli incubati con siero controllo (cpm/ganglio)	In gangli incubati con siero anti-NGF (cpm/ganglio)
1	854	420
2	1180	635
3	1020	762
4	980	435
5	1235	776
	media 1053 \pm 69	media 605 \pm 75 *

* $P < 0,01$

Gruppi di 4 gangli preincubati 4 ore con e senza siero anti-NGF. Marcatura con uridina- C^{14} ($5 \mu\text{C}/\text{ml}$) per 3 ore. I topini usati in ogni esperimento appartengono alla stessa nidiata.

gli esperimenti di incorporazione con uridina- C^{14} di gangli preincubati 4 ore con e senza siero anti-NGF prima dell'aggiunta dell'isotopo. L'aggiunta di siero anti-NGF al mezzo di incubazione per un periodo di 4 ore prima della somministrazione dell'isotopo, determina in tutti i casi esaminati una marcata diminuzione dell'incorporazione di uridina. La velocità di incorporazione, inoltre, nei gangli trattati tende a diminuire con l'aumentare dei tempi di incorporazione. Assumendo i valori relativi alla velocità di incorporazione come un indice della sintesi di acido ribonucleico nei gangli coltivati in vitro, i dati ottenuti indicano chiaramente che la reazione antigene-anticorpo (NGF-siero anti-NGF) nelle cellule gangliari produce un effetto depressivo quasi immediato sulla sintesi di RNA. L'azione del siero appare altrettanto rapida *in vivo*, come si osserva nella Tabella 2, ove sono riportati i dati relativi all'incorporazione di uridina marcata in gangli di topolini controllo (iniettati con siero normale di coniglio) e in gangli sperimentali (di topolini iniettati con siero anti-NGF, tre ore prima del sacrificio).

TABELLA 2.

**Effetto « in vivo » del siero anti-NGF sull'incorporazione di uridina- C^{14} ,
in gangli cervicali superiori di topini neonati iniettati con siero
anti-NGF o con siero normale.**

Esperimento (N°)	Incorporazione di uridina- C^{14}	
	In topini trattati con siero controllo (cpm/ganglio)	In topini trattati con siero anti-NGF (cpm/ganglio)
1	480	215
2	562	235
3	520	315
	media 500 \pm 42	media 255 \pm 30 *

* $P < 0.01$.

Gruppi di 6 gangli incubati per due ore con uridina- C^{14} (5 μ c/ml). I topini usati in ogni esperimento appartengono alla stessa nidiata.

Sintesi proteica. — Dati i ben noti rapporti fra sintesi di RNA e sintesi proteica, in un'altra serie di esperimenti è stato studiato l'effetto del siero anti-NGF sulla sintesi netta di proteine nei gangli simpatici.

Topolini della stessa nidiata erano divisi in tre gruppi e un gruppo era iniettato con NGF (0,1 ml, cioè circa 30 μ g) due volte al giorno, un se-

condo gruppo con antisiero attivo 1:1000 (0,05 ml/ animale, due volte al giorno) ed un terzo con una soluzione fisiologica come controllo. A vari intervalli di tempo due animali per gruppo venivano sacrificati, i gangli cervicali superiori accuratamente dissezionati ed usati per la determinazione delle proteine totali. Come si osserva nella Fig. 1, mentre nei gangli trattati con NGF si verifica un rapido e marcato aumento del contenuto in proteine per ganglio (aumento dovuto all'effetto iperplastico ed ipertrofico del fattore di crescita), nei gangli esposti all'azione del siero anti-NGF il contenuto proteico del ganglio diminuisce gradatamente col tempo in parallelo agli imponenti fenomeni di necrosi e lisi dei neuroblasti che praticamente scompaiono dopo due o tre giorni di trattamento.

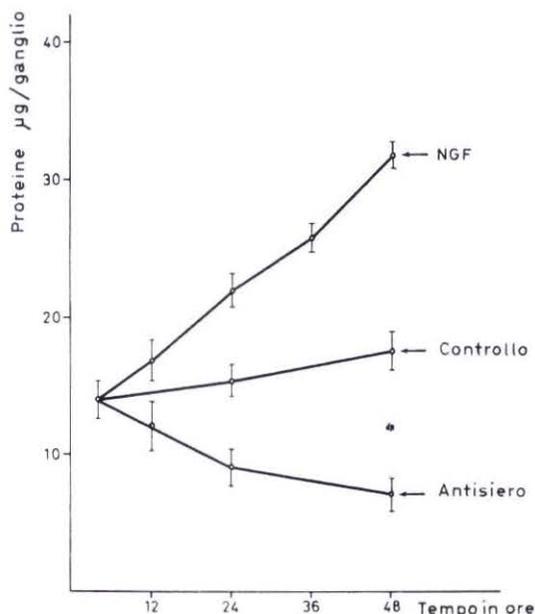


Fig. 1. — Variazioni nel tempo delle proteine totali dei gangli cervicali superiori di topini neonati, trattati con NGF e con siero anti-NGF.

Osservazioni all'ultramicroscopio. — Lo studio ultramicroscopico dei gangli trattati con siero anti-NGF (V. anche: SABATINI, PELLEGRINO DE IRALDI & DE ROBERTIS, 1965) dimostra che le prime alterazioni osservabili dopo esposizione *in vitro* e *in vivo* all'azione del siero anti-NGF sono a carico dell'apparato nucleare. Nella Fig. 2 si osserva una sezione di ganglio cervicale superiore di controllo, dopo 4 ore di incubazione, dove si nota l'organizzazione normale del tessuto; la membrana nucleare (m. n.) ha contorni regolari e la cromatina è distribuita in fini granuli (n. n.). Nella Fig. 3, già dopo due ore dall'iniezione del siero specifico anti-NGF sono evidenziabili caratteristiche lesioni ultrastrutturali a carico dei neuroblasti nei gangli

simpatici. In particolare si osservano deformazioni (p. n.) della membrana nucleare che presenta contorni irregolari, mentre la struttura cromatinica appare notevolmente alterata quando ancora le strutture citoplasmatiche (m.) appaiono sostanzialmente indenni. Alterazioni simili si osservano in gangli esposti all'azione dell'antisiero *in vitro* (Fig. 4).

DISCUSSIONE

L'azione citotossica di antisieri specifici è stata oggetto di numerosi studi, condotti sia *in vitro* che *in vivo*, a livello morfologico e biochimico. Le alterazioni osservate e descritte sono molteplici e variano in genere a seconda del sistema sperimentale in esame. In una serie dettagliata di ricerche, GOLDBERG & GREEN (1959) hanno messo a fuoco le alterazioni strutturali e le modificazioni chimiche di cellule tumorali esposte *in vitro* all'azione di un antisiero specifico. L'analisi ultramicroscopica dimostra che il primo punto d'attacco degli anticorpi è sulla membrana cellulare e solo in seguito all'aggiunta di complemento si rivelano lesioni caratteristiche della matrice citoplasmatica, dei mitocondri e del reticolo endoplasmico. Risultano praticamente assenti, almeno nelle fasi iniziali precedenti la lisi cellulare, alterazioni visibili a livello delle strutture nucleari. L'analisi chimica di vari componenti cellulari dimostra nello stesso sistema una rapida perdita di circa il 90 % del potassio, circa tre quarti del RNA e perdite di circa il 30-60 % delle proteine cellulari (GREEN *et al.*, 1959). Nessuna modificazione era osservata dagli stessi Autori per quanto riguarda il contenuto in DNA.

I risultati delle nostre ricerche sembrano invece indicare una sequenza di eventi sostanzialmente diversa per quanto riguarda l'effetto citotossico del siero anti-NGF sulla cellula nervosa simpatica. Le prime alterazioni osservabili all'ultramicroscopico sono infatti a carico dell'apparato nucleare.

Gli esperimenti di incorporazione di uridina dimostrano parallelamente una marcata diminuzione dell'attività sintetica del nucleo; tenendo infatti presente che nel sistema sperimentale da noi studiato (gangli cervicali *in toto*) la popolazione gliare rimane apparentemente indenne all'azione precoce del siero anti-NGF (LEVI-MONTALCINI & BOOKER, 1960), la diminuita incorporazione di uridina appare imputabile ad un blocco quasi totale della sintesi di RNA nei nuclei delle cellule nervose. Esperimenti autoradiografici tuttora in corso sembrano convalidare questa ipotesi.

La possibilità che l'azione lesiva del siero anti-NGF sulle cellule nervose simpatiche si svolga in modo diverso da quanto osservato nel caso di altri sieri citotossici, appare verosimile se si tiene conto della sostanziale differenza fra i due fenomeni. Per i sieri citotossici si tratta infatti della reazione tra una misura più o meno complessa di anticorpi prodotti da una

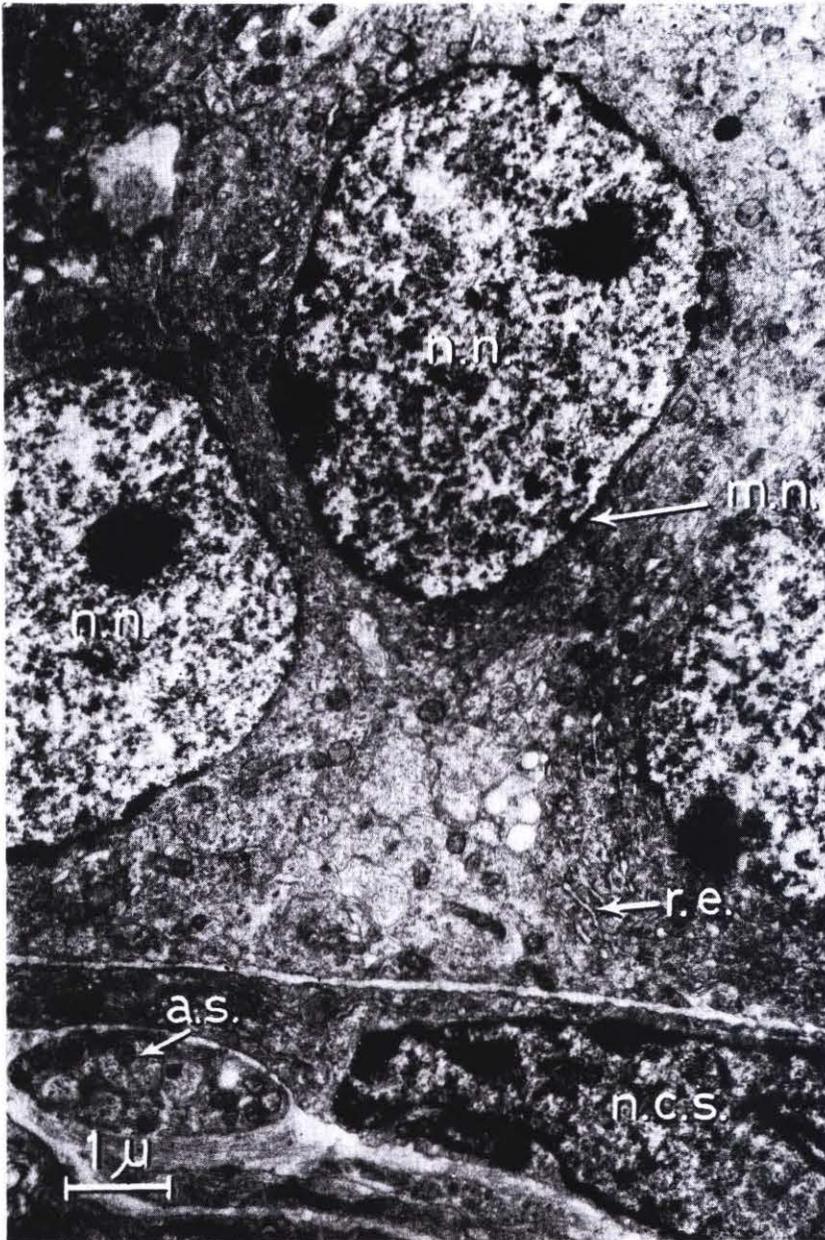


Fig. 2. — Fotografia al microscopio elettronico di un ganglio cervicale superiore di topino neonato. Controllo mantenuto 4 ore *in vitro* in mezzo di Eagle. Si possono osservare tre neuroblasti ed una cellula satellite in basso. Si nota l'organizzazione compatta del tessuto, con i processi cellulari (principalmente assoni), fra i neuroni. $\times 17.000$.

n. n. nucleo di neuroblasto; m. n. membrana nucleare; r.e. reticolo endoplasmico; n.c.s. nucleo di cellula satellite; a. s. assone

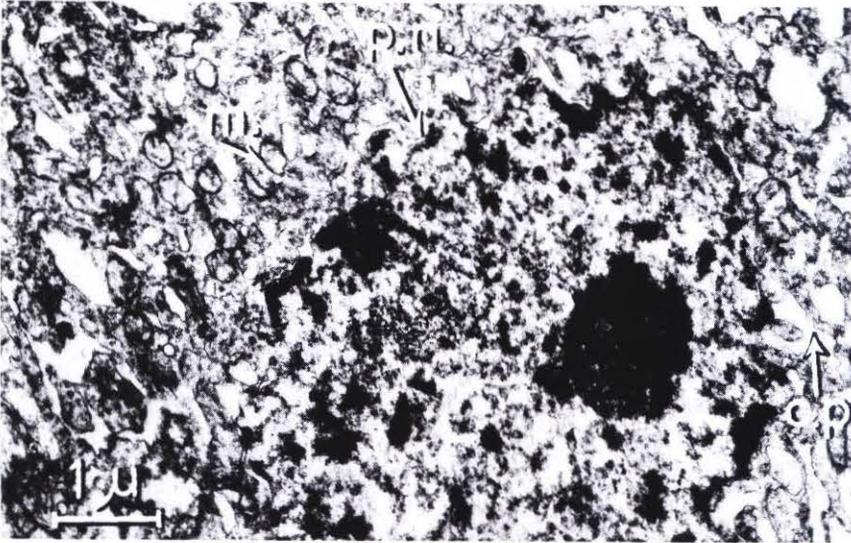


Fig. 3. — Neurone di un ganglio cervicale superiore a due ore di distanza dall'iniezione di siero anti-NGF (0.1 ml di antisiero 1:1000). Si osserva la membrana nucleare irregolarmente ripiegata (p. n.), la cromatina condensata in masse e le cisterne perinucleari (c. p.) molto dilatate. m. mitocondrio. $\times 17000$.

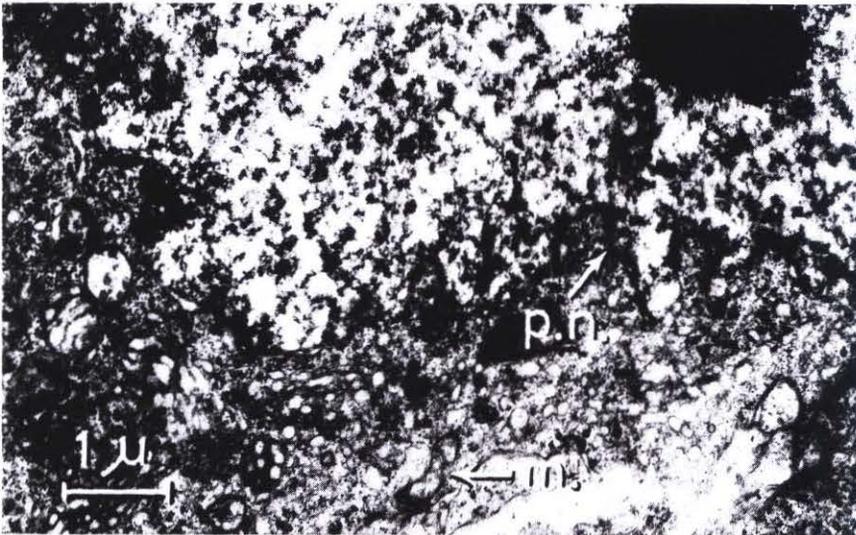


Fig. 4. — Neurone di un ganglio cervicale superiore mantenuto *in vitro* per 4 ore in presenza di siero anti-NGF (0,2 ml per ogni ml di mezzo). La membrana nucleare si presenta a contorni molto irregolari (p. n.). La cromatina ha un aspetto granulare, condensata in piccole masse irregolari. m. mitocondrio. $\times 17000$.

varietà di antigeni estratti dalle stesse cellule, mentre il siero anti-NGF è praticamente rappresentato da un unico tipo di anticorpo, determinato da una proteina purificata ed isolata da un organo completamente diverso e da animali di specie diverse. Esistono dunque nel caso del siero anti-NGF una specificità ed una selettività d'azione tali da renderne difficile una omologazione con i sieri citotossici, preparati con estratti d'organo o di popolazioni cellulari.

Questa ricerca è stata eseguita con un contributo del C.N.R.

1° aprile 1966.

BIBLIOGRAFIA

- COHEN, S., 1960 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **46**, 302.
FLEXNER, J. B., L. B. FLEXNER, G. DE LA HABA, R. B. ROBERTS & E. STELLAR, 1962. *J. Neurochem.*, **9**, 595.
GOLDBERG B. & H. GREEN, 1959. *J. Exptl. Med.*, **109**, 505.
GREEN, H., R. A. FLEISCHER, P. BARROW & B. GOLDBERG, 1959. *J. Exptl. Med.*, **109**, 511.
LEVI-MONTALCINI, R., 1962. *Sci. Repts. Ist. Super. Sanità*, **2**, 345.
LEVI-MONTALCINI, R., 1964. *Science*, **143**, 105.
LEVI-MONTALCINI, R. & P. U. ANGELETTI, 1961. *Quart. Rev. Biol.*, **36**, 99.
LEVI-MONTALCINI, R. & B. BOOKER, 1960. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **46**, 384.
LEVI-MONTALCINI, R., H. MEYER & V. HAMBURGER, 1954. *Cancer Res.*, **14**, 49.
LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, 1951. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
SABATINI, M. T., A. PELLEGRINO DE IRALDI & E. DE ROBERTIS, 1965. *Exptl. Neurol.*, **12**, 370.

Azione del testosterone sulla ghiandola sottomascellare del topo

MARIA L. SALVI(*) e PIETRO U. ANGELETTI

Laboratori di Chimica Biologica, Centro di Neurobiologia

Riassunto. — Esperimenti di incubazione di uridina e amminoacidi nella ghiandola sottomascellare, nel rene e nel fegato di topini femmina, dopo trattamento con testosterone, dimostrano una stimolazione evidente alla sintesi di RNA e proteine da parte dell'ormone. L'azione del testosterone sembra svolgersi a livello genetico, sulla sintesi di RNA messaggero.

Sono riportati i dati sull'effetto nel tempo dell'ormone su due proteine contenute nella ghiandola sottomascellare, con alcune considerazioni sulla cinetica delle due attività biologiche.

Summary. (*Action of testosterone on the submaxillary gland of mouse*). — We have previously shown that male hormones specifically stimulate the tubular portion of the mouse submaxillary glands. Injections of testosterone propionate into female mice call forth a striking increase of some enzyme and other biological activities endowed in the secretory tubuli of the glands.

The data reported herein demonstrate that testosterone greatly stimulates RNA synthesis and protein synthesis.

The protease and NGF (Nerve Growth Factor) activity of the gland are markedly increased by testosterone treatment; the results of kinetic studies are consistent with the hypothesis that the hormone stimulates the synthesis of new enzyme molecules. The rate of synthesis and the rate of degradation of both protease and NGF, under testosterone stimulation, have been calculated.

Fra i vari organi sensibili all'azione degli ormoni androgeni, la ghiandola sottomascellare di topo presenta un particolare interesse a causa del suo marcato dimorfismo sessuale, sia morfologico che biochimico (LA CAS-

(*) Ospite dei Laboratori di Chimica Biologica.

SAGNE, 1940; JUNGUERIA *et al.*, 1949; RAYNAUD & REBEYROTTE, 1949). In lavori precedenti nel nostro laboratorio è stato dimostrato che l'effetto anabolico dell'ormone maschile è ben localizzato in una sola componente della ghiandola (parte tubolare) e può essere facilmente evidenziato dalla marcata induzione di alcuni enzimi e di alcune proteine biologicamente attive (LEVI-MONTALCINI & ANGELETTI, 1962; CARAMIA, ANGELETTI & LEVI-MONTALCINI, 1962). È stato inoltre dimostrato che l'azione del testosterone sulla ghiandola femminile può essere bloccata dalla contemporanea somministrazione di Actinomicina-D (ANGELETTI, SALVI & TACCHINI, 1964). Nel presente lavoro sono riportati i risultati di altre esperienze condotte allo scopo di meglio chiarire la sequenza degli eventi metabolici che seguono l'azione del testosterone sulla ghiandola sottomascellare di topo femmina.

MATERIALE E METODI

In ogni esperimento si usavano topi femmina di ceppo Swiss, di 18-20 g. Mentre gli animali controllo venivano iniettati con soluzione fisiologica, gli sperimentali ricevevano 2 mg i. m. di testosterone-propionato. A vari intervalli di tempo (3, 6, 24 ore), i due gruppi di animali ricevevano uridina-C¹⁴ (5 μ c/animale) oppure DL-leucina-C¹⁴ (2,5 μ c/animale) i. p..

Dopo 90 min. gli animali venivano sacrificati e se ne prelevavano le ghiandole salivari, i reni e il fegato. Ogni organo veniva omogeneizzato in soluzione salina fredda ed un'aliquota veniva subito precipitata con acido tricloroacetico al 6 % e dopo successivi lavaggi, secondo lo schema di Flexner (FLEXNER *et al.*, 1962), usata per il conteggio della radioattività in uno scintillatore per liquidi della Nuclear Co. Sui campioni totali venivano inoltre misurate le proteine secondo il metodo di Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), e, negli esperimenti con uridina, si misurava l'RNA con il metodo all'orcinolo (VOLKIN & COHN, 1954).

In altri esperimenti, topi femmina di 25 giorni (circa 18 g) ricevevano 2 mg di testosterone-propionato e ogni giorno venivano sacrificati animali controllo e animali trattati, per il prelievo delle ghiandole salivari: negli estratti totali venivano quindi misurate le proteine, la proteasi [metodo di KUNITZ (1955)] e l'attività NGF (*Nerve-Growth-Factor*) (LEVI-MONTALCINI, MEYER & HAMBURGER, 1954).

RISULTATI

I nostri esperimenti tendevano a chiarire l'effetto del testosterone sulla ghiandola sottomascellare di topo femmina sotto tre aspetti diversi: l'incorporazione di uridina nell'RNA, l'incorporazione di ammino-acidi nelle proteine e la variazione di alcune attività enzimatiche della ghiandola stessa.

Nel caso dell'incorporazione di uridina nell'RNA, oltre alla ghiandola sottomascellare, erano presi in considerazione anche il rene e il fegato. A 24 ore di distanza dal trattamento con testosterone è possibile constatare un sensibile aumento della sintesi di RNA nella ghiandola sottomascellare e nel rene ed un aumento meno evidente (del 30 %) nel fegato (Fig. 1). In

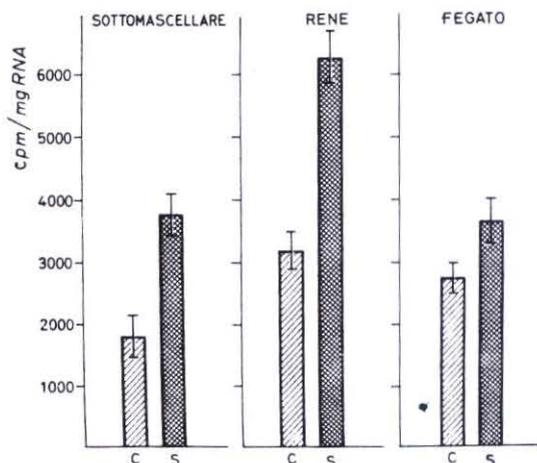


Fig. 1. — Effetto del testosterone (2mg i. m. - 24 ore) sull'incorporazione di uridina- C^{14} nella ghiandola sottomascellare, nel rene e nel fegato di topo femmina. Marcatura per 90 min' (5 μ c/animale). C = controllo, S = sperimentale.

esperimenti seguiti a distanza di tempo ravvicinata dal trattamento con testosterone era possibile osservare che la stimolazione della sintesi di RNA nella ghiandola sottomascellare e nel rene è già del 100 % a 3 ore di distanza dall'iniezione dell'ormone.

L'effetto del testosterone nella incorporazione di ammino-acidi marcati sia nella ghiandola sottomascellare come nel rene appariva invece più ritardato, tuttavia era ben evidente alla ventiquattresima ora (Fig. 2).

In una serie di esperimenti, l'Actinomicina-D era somministrata contemporaneamente al testosterone nella dose di 15 μ g/animale, 2 volte al giorno. Come appare nella Tabella 1, l'inibitore bloccava quasi completamente l'incorporazione di uridina nell'RNA, mentre aboliva l'effetto del testosterone sulla incorporazione di ammino-acidi.

Da tali risultati appare pertanto che l'azione dell'ormone sulla sintesi proteica nella ghiandola è in qualche modo mediata da un'azione primaria sul metabolismo dell'RNA, probabilmente risultante nella sintesi di RNA messaggero.

Nella Fig. 3 è illustrata l'azione nel tempo del testosterone sulla sintesi di due proteine specifiche presenti nella porzione tubolare della ghiandola.

Come si può osservare, le curve di attività delle due proteine sotto l'azione del testosterone sono molto simili. Per quanto non sia possibile una precisa valutazione dei dati riguardanti la cinetica delle due attività biologiche sotto lo stimolo ormonale a causa dei diversi metodi di misura (semiquantitativo nel caso dell'NGF), alcune considerazioni riguardanti la velocità di

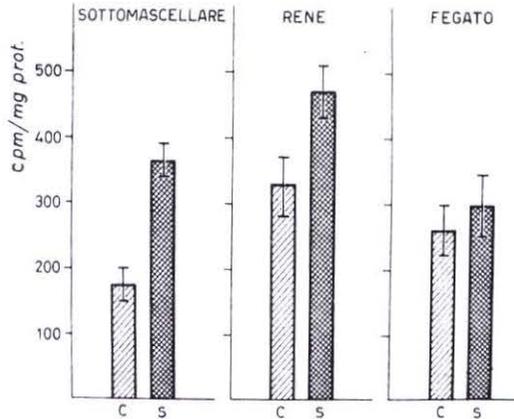


Fig. 2. — Effetto del testosterone (2 mg i. m. - 24 ore) sull'incorporazione di DL-leucina nella ghiandola sottomascellare, nel rene e nel fegato di topi femmina. Marcatura per 90 min'. (2,5 μ C/animale).
C = controllo, S = sperimentale.

sintesi dell'enzima possono anche essere estese all'NGF. Come si osserva nella figura, l'attività basale dell'enzima è notevolmente aumentata nel trattamento ormonale e la massima stimolazione viene osservata a circa 5 giorni

TABELLA I.

Effetto dell'Actinomicina-D sulla incorporazione di uridina-C¹⁴ e di DL-leucina-C¹⁴ nella ghiandola sottomascellare di topi femmina controllo e trattati con testosterone (24 ore prima del sacrificio). Actinomicina 5 μ g/animale (2 volte in 24 ore).

A g g i u n t e	Incorporazione di uridina-C ¹⁴ (cpm/mg RNA)	Incorporazione di DL-leucina-C ¹⁴ (cpm/mg proteine)
Nessuna	1.474	185
Testosterone (2 mg)	3.580	370
Actinomicina (5 μ g)	294	213
Actinomicina + Testosterone	320	190

dall'iniezione di testosterone. Supponendo che ogni variazione del livello dell'enzima risulti dalla somma algebrica di un processo di sintesi secondo un'equazione di ordine zero e un processo di degradazione, secondo un'equazione di I ordine, può essere usato il seguente calcolo:

$$\frac{d(E)}{dt} = K_1 - K_2(E)$$

e quindi quando l'enzima raggiunge il *plateau* si avrà:

$$K_1 = K_2(E).$$

Riportando quindi in ascisse il tempo t e in ordinate il $\ln(E_0) - (E)$, mentre l'attività della proteasi o del NGF aumenta verso il massimo di stimolazione ormonale, si può calcolare la costante di degradazione per le

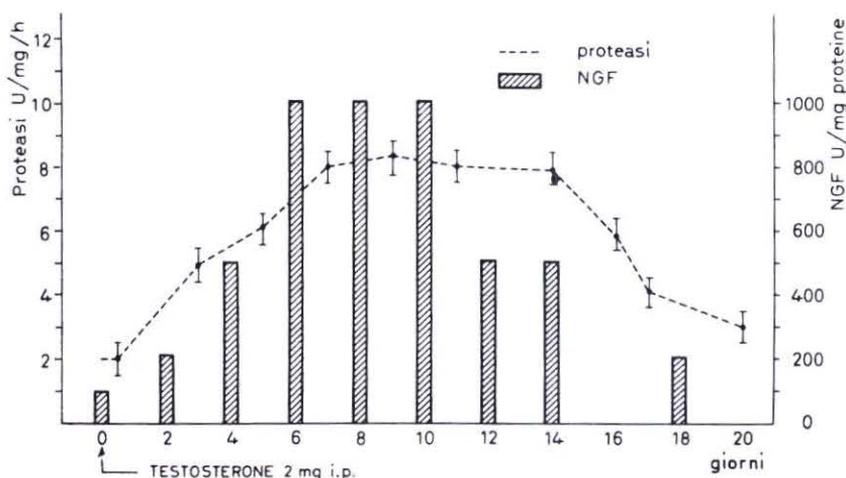


Fig. 3. — Azione nel tempo del testosterone sull'NGF e sulla proteasi della ghiandola sottomascellare di topo femmina.

due proteine e la loro velocità di sintesi sotto stimolo del testosterone. Da questi calcoli risulta che il tasso (K_2) di degradazione, sia per l'NGF come per la proteasi, si aggira intorno al 25 % per giorno, mentre il tasso di sintesi sotto stimolo ormonale appare essere per la proteasi di 2,29 U/mg/giorno e per l'NGF di circa 200 U/mg/giorno.

DISCUSSIONE

Da un esame anche sommario della più recente letteratura (KARLSON, 1965) appare evidente come l'attenzione degli studiosi di problemi inerenti al meccanismo d'azione degli ormoni sia stata accentrata sulle possibili

azioni dell'ormone al livello nucleare e particolarmente sui processi di trascrizione. Per quanto riguarda gli steroidi, la massima parte dei dati sperimentali raccolti suggerisce indubbiamente l'ipotesi di un'azione immediata se non diretta dell'ormone sulla sintesi di RNA messaggero, da cui secondariamente deriverebbero le altre modificazioni del metabolismo cellulare (WILLIAMS-ASHMAN, 1965; KARLSON, 1963; MUELLER, 1965). Anche i risultati delle nostre ricerche sugli effetti metabolici dovuti al testosterone sulla ghiandola sottomascellare del topo femmina sembrano deporre in favore di questa ipotesi.

L'incorporazione di uridina aumenta marcatamente già a poche ore di distanza del trattamento ormonale, quando ancora non è osservabile alcun effetto sulla sintesi proteica.

La somministrazione di Actinomicina, contemporanea al testosterone, blocca l'induzione di NGF della ghiandola (ANGELETTI, SALVI e TACCHINI, 1964), probabilmente inibendo la sintesi di RNA DNA-dipendente. Appare dunque verosimile che l'azione del testosterone sulla ghiandola si eserciti accelerando notevolmente i processi di trascrizione al livello genetico con il risultato di una aumentata sintesi di proteine specifiche. Il meccanismo attraverso il quale tale effetto si produce rimane ancora un problema da risolvere.

Per quanto riguarda la risposta sia delle proteasi come dell'NGF al testosterone, i presenti dati confermano ancora un marcato parallelismo nel comportamento di queste due proteine, dotate tuttavia di attività biologiche così diverse.

L'ipotesi che la produzione di NGF nella ghiandola sottomascellare possa essere in qualche modo correlata o dipendente dall'attività proteasica è tuttora oggetto di studio.

Questa ricerca è stata eseguita con un contributo del C.N.R.

1° aprile 1966.

BIBLIOGRAFIA

- ANGELETTI, P. U., M. L. SALVI & G. TACCHINI, 1964. *Experientia*, **20**, 612.
CARAMIA, F., P. U. ANGELETTI & R. LEVI-MONTALCINI, 1962. *Endocrinology*, **70**, 915.
FLEXNER, J. B., L. B. FLEXNER, E. STELLAR, G. DE LA HABA & R. B. ROBERTS, 1962. *J. Neurochem.*, **9**, 595.
JUNGUERIA, L. C. U., A. FAJER, M. RABINOVITCH & L. FRANKENTHAL, 1949. *J. Cellular Comp. Physiol.*, **34**, 129.
KARLSON, P., 1963. *Perspectives Biol. Med.* **6**, 203.
KARLSON, P., 1965. *Mechanisms of Hormone Action*, Academic Press, New York.

- KUNITZ, M., 1955. In: *Methods in Enzymology*, S. P. Colowick & N. O. Kaplan, Eds., Academic Press, New York, vol. II, p. 33.
- LA CASSAGNE, A., 1940. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **133**, 180.
- LEVI-MONTALCINI, R. & P. U. ANGELETTI, 1962. *Intern. Symposium on Salivary Glands*, Seattle.
- LEVI-MONTALCINI, R., R. H. MEYER & V. HAMBURGER, 1954. *Cancer Res.*, **14**, 49.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, 1951. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
- MUELLER, G. C., 1965. In: *Mechanism of Hormone Action*, P. Karlson, Ed. Academic Press, New York, p. 228.
- RAYNAUD, J. & P. REBEYROTTE, 1949. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **228**, 433.
- VOLKIN, E. & W. E. COHN, 1954. In: *Methods of Biochemical Analysis*, D. Glick, Ed., Interscience Publ. Inc., New York, vol. 1, p. 298.
- WILLIAMS-ASHMAN, H. G., 1965. In: *Mechanism of Hormone Action*, P. Karlson, Ed., Academic Press, New York, p. 215.