### Stimolazione con RNA della latticodeidrogenasi in cervelletti di embrione di pollo

Recenti ricerche di alcuni autori 1-4 hanno dimostrata un'azione stimolante del RNA, aggiunto in vivo od in vitro, sulla sintesi di proteine enzimatiche e non, in varie popolazioni cellulari.

Nel quadro delle ricerche che si stanno effettuando nel nostro laboratorio sui meccanismi di azione che regolano lo sviluppo e la differenziazione di cellule nervose, abbiamo pertanto ritenuto utile lo studio dell'azione del RNA su tali popolazioni cellulari in fase di sviluppo. Come sistema rivelatore dell'eventuale azione di questo composto, è stato scelto l'enzima latticodeidrogenasi di cervelletto di embrione di pollo per le modificazioni cinetiche, elettroforetiche e di attività ottimale che tale enzima presenta col procedere dello sviluppo e della differenziazione cellulare.

L'aggiunta di RNA estratto da cervelletti di 14 giorni a colture del medesimo organo in fase più precoce di sviluppo potrebbe infatti « indurre » alcune modificazioni nell'enzima lattico-deidrogenasi che fisiologicamente si verificano in vivo. I risultati di una prima serie di indagini che qui brevemente riportiamo sembrano indicare la conferma di alcune ipotesi sopra esposte.

Materiali e metodi. — Per gli esperimenti sono stati usati cervelletti di embrione di pollo prelevati al decimo gierno di incubazione in stufa termostatata a 37° C.

L'RNA era estratto secondo la seguente metodica : 40 cervelletti di embrione di pollo al 14° giorno di incubazione erano prelevati rapidamente e posti in omogeneizzatore contenente 5 mM di MgCl<sub>2</sub>, e 10 γ di polivinil solfato in 5 ml di NaCl 0,9 %, e omogeneizzati in ghiaccio per 5′; quindi uniti a pari volume di fenolo saturo contenente bentonite al 2 % e posti in bagno a 65°C dove erano agitati manualmente per 10′. L'agitazione era poi continuata per altri 10′ a 0°C. Dopo tale procedimento si eseguiva una prima centrifugazione a 3000 gpm per 30′ a 2°C; il sopranatante ottenuto era nuovamente trattato con pari volume di fenolo a freddo e quindi centrifugato con le modalità sopra descritte. Il sopranatante era quindi unito a pari volume di etanolo contenente acetato di potassio al 2 % e lasciato per la tutta notte a — 15°C. Si procedeva quindi alla precipitazione del RNA estratto mediante centrifugazione a 10.000 gpm per 15′. L'RNA sedimentato era nuovamente trattato con etanolo con le modalità sopra descritte, e il materiale sedimentato risospeso in 1 ml di soluzione salina isotonica. Con tale metodica si ottenevano di solito preparazioni contenenti 6·7 mg di RNA soddisfacentemente puro.

La quantità e la purezza dell'RNA così estratto erano valutate in base alla densità ottica a 280 e 260 mM di un campione della preparazione ottenuta. Un'analisi su ultracentrifuga di tale preparato dimostra la presenza di tre picchi principali corrispondenti alle costanti di sedimentazione dell'RNA. Quantità variabili di RNA comprese tra 100 e 400 y erano aggiunte a colture di cervelletti in « Eagle basal medium » contenente antibiotici e poste ad incubare in stufa termostatata a 37° C con

flusso costante di CO<sub>1</sub> al 5 % in aria; a vari tempi dall'aggiunta dell'RNA si prelevavano uno o più cervelletti per il dosaggio dell'enzima e delle proteine che erano effettuati secondo la metodica di Lowry e coll. 6.7.

Risultati. — Come si vede nella Fig. 1, l'RNA estratto da cervelletti di 14 giorni ed aggiunto a colture del medesimo organo in fase più precoce di sviluppo provoca un aumento nell'attività specifica dell'enzima riferita a prove analoghe di controllo. Tale aumento di attività procede con la durata dell'incubazione essendo del 25 % dopo 24 ore, del 46 % dopo 48 ore e del 76 % dopo 62 ore. Sono state complessivamente usate 4 preparazioni diverse di RNA nei vari esperimenti eseguiti e in tutti i casi si è ottenuta una risposta positiva per quanto riguarda la stimolazione sull'attività latticodeidrogenasica.

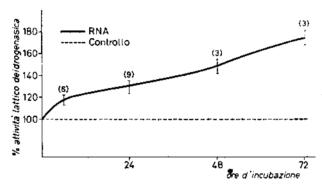


Fig. 1. — Attività intico-deidrogenasica in cervelletti di embrione di pollo trattati con RNA. L'attività enzimatica in presenza di RNA (c. 200 gamma per ml) è riferita percentualmente a prove analoghe di controllo. I numeri fra parentesi rappresentano il numero di esperienze condotte per ogni tempo indicato. Uno o più cervelletti delle colture di controllo e di quelle sperimentali erano prelevati, lavati con soluzione salina isotonica, omogeneizzati e centrifugati a 3000 gpm per 10°. Il sopranatante ottenuto era usato per la determinazione enzimatica e proteica. In ascisse: ore di incubazione dei cervelletti in « Eagle basal medium ».

In taluni esperimenti sono state anche effettuate valutazioni della costante di affinità dell'enzima per il substrato, della stabilità al calore e del pH ottimale. La Km dell'enzima di cervelletti trattati con RNA era paragonabile a quella delle prove di controllo che era dell'ordine di 5.10-4 M in presenza di piruvato e di 1,2.10-8 M quando valutata in presenza di lattato. Il pH ottimale di 7,8 valutato in presenza di tampone tris-HCl non presentava differenze sostanziali da quello delle prove di controllo in cui era di 7,6. L'enzima tenuto in bagno a 65° C per 5' dimostrava una perdita di attività del 50 %, inferiore a quella delle prove di controllo che era dell'80 %. È ancora da accertare tuttavia se questa differenza sia imputabile ad una maggiore concentrazione proteica nelle prove sperimentali, che potrebbe influire sulla stabilità del'enzima.

Conclusione. — I primi risultati da noi qui riportati dimostrano un aumento nell'attività lattico-deidrogenasica di cervelletti di embrioni di pollo di 10 giorni, trattati con RNA estratto dai medesimi organi in fase più avanzata di sviluppo. Questi dati pongono una serie di quesiti ai quali ci proponiamo di rispondere col proseguimento delle ricerche in corso. L'uso di inibitori della sintesi proteica potrà permettere di stabilire se si tratti di una attivazione o di una induzione enzimatica e

in questo caso se il fenomeno sia specifico per l'organo trattato e per l'RNA estratto; prove preliminari da noi condotte con RNA estratto da altri organi e unito a cervelletti sembrano dimostrare una certa specificità e selettività di azione del RNA. L'interpretazione di questi risultati richiede pertanto una indagine più approfondita fondata anche sull'impiego di tecniche elettroforetiche per individuare e caratterizzare i diversi isoenzimi caratteristici della lattico-deidrogenasi.

Riassunto. — È stata studiata l'attività lattico-deidrogenasica in colture di cervelletti di embrione di pollo trattati con RNA estratto dai medesimi organi. I risultati dimostrano una stimolazione nell'attività enzimatica studiata. Sono attualmente in corso studi allo scopo di valutare se tale fenomeno sia specifico per l'organo trattato e l'RNA estratto, e se si tratti di una attivazione o induzione enzimatica.

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

lo aprile 1966.

PIETRO CALISSANO, GIULIANA TACCHINI
e PIETRO U. ANGELETTI

Laboratori di Chimica Biologica,

Centro di Neurobiologia

- <sup>1</sup> NIU, M. C., C. CORDOVA & L. C. NIU, Proc. Natl. Acad. Sci., 47, 1689 (1961).
- NIU, M. C., C. CORDOVA & L. C. NIU, Proc. Natl. Acad. Soi., 48, 1964 (1962).
- <sup>3</sup> FRIEDMAN, H., Science, 146, 934 (1964).
- 4 COHEN, E. P. & J. P. PARKS, Science, 144, 1012 (1964).
- <sup>5</sup> Georgiev, G. P., O. P. Samarina, M. I. Lerman, M. N. Smirnov & A. M. Severtzov, *Nature*, **200**, 1291 (1963).
- <sup>4</sup> LOWRY, O., N. J. ROSEBROGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, J. Biol. Chem., 193, 215 (1951).
- FINE, I. H., N. O. KAPLAN & D. KUFTINEC, Biochemistry, 2, 116 (1963).

### Effetti dell'insulina sulla sintesi di RNA e di lipidi nei gangli sensitivi embrionali

È noto che l'insulina esercita un'attività stimolante sul metabolismo dei vari organi e tessuti sia in vitro che in vivo. L'azione in vitro è stata anche studiata su cellule tripsinizzate e coltivate in mezzi sintetici con il risultato pressochè costante che l'insulina favorisce in queste condizioni il mantenimento e la crescita delle cellule coltivate <sup>1, 2</sup>. Recentemente nel nostro laboratorio è stata studiata l'azione dell'insulina su gangli sensitivi di embrione di pollo coltivati in mezzi sintetici. Lo scopo principale di queste ricerche era di comparare gli eventuali effetti metabolici dell'insulina a quelli di uno specifico fattore di crescita della cellula nervosa sensitiva e simpatica (Nerve-Growth-Factor)<sup>2</sup>. Nella presente nota sono riportati i risultati delle ricerche sull'effetto dell'insulina sulla sintesi di acidi ribonucleici e di lipidi in gangli sensitivi embrionali.

Parte sperimentale. — Da embrioni di pollo di 8 giorni venivano rapidamente prelevati i gangli sensitivi. Gruppi di 20 e 30 gangli erano posti in vaschette Maximow, contenenti 1 ml di mezzo di Eagle (Microbiological Associates, Bethesda, Md. cat. No. 12-105) a cui era aggiunto il precursore radioattivo. Precisamente uridina H  $^{\circ}$  (T) (Amersham) 15 µc/ml o acetato 1,2 Cl4 1,2 µc/ml (Amersham). L'insulina (Sigma) era aggiunta nella dose di 0,1-1 U/ml. I campioni così preparati venivano poi incubati a 37° C per 4-6 ore. Il pH del mezzo era mantenuto costante da un'atmosfera contenente CO<sub>2</sub> in dose adeguata. Alla fine dell'incubazione i gangli erano prelevati dalle vaschette e sciacquati per tre volte in NaCl al 0,9 % freddo.

Due diverse procedure sono state usate per il lavaggio dell'isotopo libero. Per l'uridina: i gangli venivano posti in acido perclorico al 6 % + uridina fredda 1 mM e successivamente centrifugati e lavati ancora in acido perclorico al 6 % + uridina 1 mM per due volte, in acido tricloroacetico al 4 % + uridina 1 mM una volta, in etanolo 67 % + NaCl 0,5M + uridina 1 mM una volta. Infine i gangli venivano raccolti in 1 ml di formammide e posti in stufa a 130°C per 12 h circa. Il residuo così ottenuto veniva preparato per il conteggio della radioattività mediante l'aggiunta di 8,6 ml di etanolo assoluto e 10,4 ml di liquidi di scintillazione (N. E. 213 Nuclear Ent. G.B.).

Per l'acetato : i gangli venivano omogeneizzati in 0,5 ml di cloroformio-etanolo  $(2:1\ v/v)^4$ . L'acetato libero veniva rimosso dalla miscela di lipidi mediante estrazione con un egual volume di  $H_1O$  distillata, successiva centrifugazione e recupero della fase metanolo-cloroformica. Questa procedura veniva ripetuta tre volte.

L'estratto così purificato era apprestato per il conteggio della radioattività incorporata nei liquidi totali mediante aggiunta di etanolo e liquido di scintillazione come sopra. Il conteggio della radioattività era effettuato in uno scintillatore a basso fondo (Liquid Scintillation System 724 and 725. Nuclear Chicago, con efficienza 70 %).

Risultati. — Gangli sensitivi embrionali coltivati in mezzi puramente sintetici (Eagle basal medium) vanno incontro a rapidi processi degenerativi già chiaramente evidenti all'osservazione istologica dopo 24 ore di coltura. L'aggiunta di insulina al mezzo di coltura in concentrazioni variabili da 0,1 U a 1 U/ml migliora nettamente le condizioni di sopravvivenza dei gangli che possono così essere mantenuti in coltura per periodi anche lunghi di tempo senza andare incontro a lesioni degenerative. Poichè uno dei primi segni di sofferenza delle cellule gangliari dopo qualche ora di incubazione in mezzo di Eagle semplice appare essere la perdita della colorabilità citoplasmatica, per impoverimento del contenuto di RNA, in una prima serie di esperimenti è stata indagata l'azione dell'insulina sulla sintesi di RNA da parte dei gangli coltivati.

Come appare nella Tab. 1 l'aggiunta di insulina al mezzo di incubazione provoca un netto aumento nell'incorporazione di uridina  $H^a$  negli acidi ribonucleici di gangli. Tale aumento, sempre presente nei vari esperimenti seguiti, variava tuttavia dal + 30 % al + 70 % rispetto ai valori ottenuti nei gangli normali.

Tabella 1.

Aumento della incorporazione di uridina H<sup>i</sup> negli acidi ribonucleici dei gangli, incubati in presenza di insulina.

	Ore	Uridina H* inco	rporata nell'RNA
	di incubazione	(c.p.m.)	(Δ)
Controllo	5	194	·
Insulina	. 5	321	+ 60 %
Controllo	5	191	
Insulina	5	253	+ 32 %
Controllo	5	119	
Insulina	5	230	+ 48 %
Controllo	5	213	]
Insulina	5	366	+ 72 %

Gruppi di 30 gangli sensitivi incubati in terreno di Eagle con uridina H<sup>2</sup> (15 μc/ml). Insulina aggiunta alla concentrazione di 0.1 U/ml.

Per quanto questi dati relativi all'incorporazione di uridina non permettano di distinguere tra sintesi netta e turnover, appare evidente comunque che l'aggiunta dell'ormone stimola marcatamente il metabolismo del RNA.

Nella Tab. 2 sono riportati i dati relativi all'incorporazione di acetato 1,2 C<sup>14</sup> nella frazione lipidica di gangli incubati in presenza e in assenza di insulina. Come appare dalla tabella l'incorporazione di acetato viene notevolmente stimolata dall'insulina. L'effetto stimolante, statisticamente significativo in tutti gli esperimenti eseguiti, ha oscillazioni da + 30 % a + 80 %.

TABELLA 2.

Aumento della incorporazione di acetato 1,2 C<sup>14</sup> nei lipidi del gangli, incubati in presenza di insulina

	Ore	Acetato C14 inco	rporato nei lipid
	di incubazione	(c.p.m.)	(Δ)
Controllo	4	5162	
Insulina	4	8556	+ 64 %
Controllo	4	5377	
Insulina	4	7359	+ 36 %
Controlle	6	5326	
Insulina	6	9341	+ 76%

Gruppi di 30 gangli incubati in Eagle con acetato  $C^{14}$  (1,2  $\mu$ c/ml). Al termine dell'incubazione i gangli erano prelevati, lavati e infine omogeneizzati in cloroformio-metanolo (2:1 v/v). Insulina aggiunta alia concentrazione di 0,1 U/ml.

Commento. — Dai risultati di queste ricerche preliminari appare evidente che l'insulina esercita un'azione stimolante sul metabolismo dei gangli sensitivi embrionali. Poichè i gangli stessi rappresentano un'agglomerato di tipi cellulari diversi (cellule nervose e cellule satelliti), esperimenti autoradiografici sono in corso onde chiarire se l'effetto dell'insulina si esercita prevalentemente sui neuroni o sulle cellule satelliti o su entrambe le popolazioni cellulari.

È interessante osservare come l'insulina, pur svolgendo un'azione trofica di mantenimento sui gangli sensitivi embrionali, a differenza del fattore specifico di crescita (NGF), non appare stimolare affatto la crescita delle fibre nervose. Lo studio comparato di questi due fattori (insulina e NGF) appare pertanto interessante allo scopo di meglio intendere il loro meccanismo di azione.

Si ringrazia il dott. Fabrizio Corti dei Servizio di Radiosotopi dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità per il valido aiuto nel conteggio dei campioni radioattivi.

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

1º aprile 1966.

PIETRO U. ANGELETTI, ANTONIA LIUZZI
e RITA LEVI-MONTALCINI

Laboratori di Chimica Biologica,
Centro di Neurobiologia

- <sup>1</sup> LASNITZKI, J., in: Cell and Tiesue Culture Methods, Biology and Physiology, E. N. Willmer, Ed., 1965, p. 591.
- LESLIE, I., H. C. FULTON & R. SINCLAIR, Biochim. Biophys. Acta, 24, 365 (1957).
- <sup>3</sup> LEVI-MONTALCINI, R., Sci. Repts. Ist. Super. Sanità, 2, 345 (1962).
- LIUZZI, A., P. U. ANGELETTI & R. LEVI-MONTALCINI, J. Neurochem., 12, 705 (1965).

### Indagini sul meccanismo di azione del testosterone : analisi dell'RNA indotto nella ghiandola sottomascellare del topo

Precedenti ricerche del nostro laboratorio hanno mostrato che il testosterone, iniettato in topi femmine, stimola selettivamente la sintesi di alcuni enzimi e proteine biologicamente attive nella ghiandola sottomascellare <sup>1, 2</sup>. Nella presente nota sono riportati i risultati di esperimenti eseguiti per analizzare la natura dell'RNA sintetizzato nella ghiandola sotto lo stimolo del testosterone.

Parte sperimentale. — Topi femmine (25 g) erano iniettati intramuscolo con una dose di 2 mg di testosterone propionato. A 24 ore da tale trattamento, gruppi di cinque animali venivano iniettati direttamente nel parenchima della ghiandola sottomascellare con 5 microcurie ciascuno di uridina C<sup>16</sup> (Amershan Ltd). Passate due ore, le ghiandole erano rapidamente prelevate ed omogeneizzate in tubi di Potter in 5 ml di una soluzione fredda di NaCl 0,9 % + MgCl<sub>1</sub> 0,001 M + polivinil-solfato 2 γ/ml. L'RNA era estratto e purificato secondo il metodo di Scherrera & Darnell <sup>2</sup>.

Al termine di tale procedura, il grado di purezza dell'RNA estratto era determinato spettrofotometricamente calcolando il rapporto D.O. 280 mµ / D. O. 260 mµ del campione in esame.

L'RNA così ottenuto veniva frazionato su gradiente lineare di saccarosio in NaCl 0.9 % + MgCl<sub>1</sub> 0.001 M + polivinileolfato 2  $\gamma$ /ml.

Il gradiente era preparato in tubi di plastica da 5 ml del Rotore 8 W 39 (Spinco) nei quali, per mezzo di una semplice apparecchiatura, era possibile stratificare linearmente la soluzione di saccarosio dal 30 % al 5 %. Su tale gradiente veniva posta una aliquota di RNA pari a circa 200-300 µg. Alla fine della centrifugazione (4 ore a 37000 gpm) le frazioni di RNA, disposte lungo il gradiente in accordo alla costante di sedimentazione, erano raccolte, forando il tubo da centrifuga alla base, o in provette per la discriminazione del profilo all'ultravioletto, o negli appositi contenitori per il conteggio della radioattività. In tal caso in ogni contenitore eran posti 15 ml di liquido di scintillazione di Bray ed i campioni venivano letti al contatore per liquidi a basso fondo (Nuclear Chicago).

Risultati. — Come già riportato altrove in dettaglio 4, l'iniezione di testosterone in topi femmine provoca un notevole aumento nell'incorporazione di precursori marcati nell'acido ribonucleico della ghiandola sottomascellare. Negli esperimenti qui riportati l'uridina C<sup>14</sup> era somministrata in gruppi di animali controllo e in gruppi di animali pretrattati con testosterone 2 h prima. Le ghiandole erano prelevate a 2 h di distanza dall'iniezione dell'isotopo.

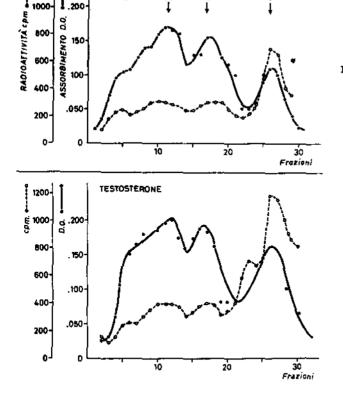
Come risulta dalla Tab. 1, in tutti gli esperimenti eseguiti l'incorporazione di uridina era aumentata di circa due volte negli sperimentali rispetto ai relativi controlli.

	Incorporazione di u	ridina C <sup>14</sup> (cpm/mg RNA)
Nº esperimento	Controlli	Topine trattate
1	20.600	54.000
2	15.300	27.200
3	18.750	32.400

<sup>\* 2</sup> mg, 24 h prima della somministrazione dell'uridina C14.

CONTROLLO

La Fig. 1 dimostra che il profilo U. V. dell'RNA frazionato su gradiente di saccarosio era molto simile nei campioni sperimentali e nei controlli.



Analisi su gradiente di saccarosio del RNA cetratto dalla ghiandola sottomascellare di topo femmina normale o trattato con testesterone. Gradienti lineari di saccarosio (6 a 30%) contrifugati per h a 87000 gpm. - Svedberg. La massime parte del RNA marcato è associata alla frazione con costante di sedimentazione 4S, la cui radioattività è doppia nel RNA dei topi trattati con testosterone.

In entrambi i casi infatti erano chiaramente distinguibili tre massimi di assorbimento corrispondenti rispettivamente a 28, 18 e 4 S.

Era presente inoltre una notevole componente piuttosto eterogenea con costante di sedimentazione compresa tra 45 e 28 S. Il profilo radioattivo mostrava invece delle differenze significative tra gli sperimentali e i controlli. Come risulta dalla Fig. 1, la massima parte dell'RNA marcato era associato alla frazione con costante di sedimentazione 4 S. Tale frazione, corrispondente al transfer RNA, presentava nei campioni sperimentali una radioattività doppia rispetto ai controlli.

Inoltre sempre negli sperimentali era possibile osservare una frazione di RNA ad alta attività specifica piuttosto eterogenea compresa tra 12 e 4 S.

Per quanto riguarda le frazioni di RNA a più alto peso molecolare, negli esperimenti eseguiti non erano rilevate differenze significative tra controlli e sperimentali relativamente alla radioattività incorporata.

Commento. — I risultati delle ricerche qui riportate sembrano indicare che la stimolazione del testosterone nella sintesi di RNA nella ghiandola sottomascellare si eserciti prevalentemente su alcune categorie di RNA. In particolare il RNA a basso peso molecolare compreso tra costanti di sedimentazione di 4 S e 12 S mostra un profilo nettamente diverso nei campioni sperimentali rispetto ai controlli. Tali risultati naturalmente sono limitati dalle condizioni sperimentali usate, in particolare dal tempo di esposizione della ghiandola al precursore marcato e dal metodo di estrazione e purificazione dell'RNA dalla ghiandola stessa.

Entro questi limiti tuttavia, i risultati ottenuti suggeriscono che il testosterone stimola selettivamente la sintesi di alcune specie molecolari di RNA nella ghiandola sottomascellare.

Esperimenti sono ora in corso allo scopo di confrontare tra loro i profili di RNA marcato per vari periodi di tempo, a distanze varie dal trattamento ormonale e infine estratto a temperature diverse secondo la procedura elaborata da Georgiev et al. <sup>5</sup>.

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

1º aprile 1966.

Antonia Liuzzi, Pietro U. Angeletti
e Giuliana Tacchini

Laboratori di Chimica Biologica,
Centro di Neurobiologia

- <sup>1</sup> LEVI-MONTALCINI, R. & P. U. ANGELETTI, Salivary Glands and their Secretion. Pergamon Press, 1964, p. 129.
- <sup>2</sup> Angeletti, P. U., M. L. Salvi & G. Tacchini, Experientia, 20, 612 (1964).
- <sup>3</sup> Scherrer, K. & J. E. Darnell, Biochem. Biophys. Res. Commun., 7, 486 (1962),
- <sup>4</sup> Salvi, M. L. & P. U. Angeletti, Ann. Ist. Super. Sanità, 2, 356 (1966).
- <sup>5</sup> GEORGIEV, G. P., O. P. SAMARINA, M. I. LERMAN, M. N. SMIRNOV & A. N. SEVERT-ZOV, Nature, 200, 1291 (1963).

## Fine analysis of mitotic intracistronic crossing-over in Aspergillus nidulans

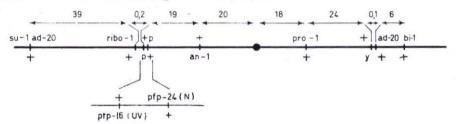
The mechanism of crossing-over is an old and unsolved problem and the nature of the process leading to the genetic recombination remains one of the big mysteries of the genetics. In particular, the discussion is still open on the following important points:

- 1) if, in the process of genetic recombination, a physical exchange is or is not involved:
- 2) if the intercistronic and the intracistronic recombination can be due to the same mechanism. Intercistronic recombination is in general a reciprocal process, intracistronic can be reciprocal or not (in the latter case it is generally called « gene conversion »).

In the present note some results on intracistronic crossing-over in Aspergillus nidulans are reported. Full data will be published elsewhere.

This research has been carried out on a diploid, heteroallelic for two mutations [(pfp-16(UV) and pfp-24(N)], which determine para-fluoro-phenylalanine (PFP) resistance.

The genetic constitution of the first chromosome of the diploid (other chromosomes are not relevant for the present analysis) is:



Distances have been determined by meiotic analysis 2.

pfp-24(N) was induced by HNO<sub>2</sub> <sup>3</sup> and pfp-16(UV) by U.V. rays <sup>3</sup>. Spontaneous rate of back-mutation is less than  $1 \times 10^{-8}$  for both alleles. Relative position of the two markers has been established mitotically, since the meiotic crosses were sterile.

The diploid is PFP-resistant and recombinants can be selected by plating diploid conidia on a minimal medium (MM) supplemented with aminotyrosin and phenylanthranilic acid (AT + PA) and riboflavin  $^{3,4}$ . Mitotic recombinants able to grow on such a medium and no longer on PFP-supplemented media arise with a frequency of  $0.75 \times 10^{-6}$  (average of 12 experiments). Such clones are very likely due to a recombination process, mutational events leading to wild type reversion being at least one hundred times less frequent. Recombination is expected to have produced diploids heterozygous for PFP-resistance.

Following a simple hypothetical model of crossing-over at four strand stage, diploids selected on MM supplemented with AT + PA and riboflavine, have the genotypes summarized in Table 1: genotypes 1 and 2 refer to cases in which non-reciprocal recombination (gene conversion) has occurred; genotypes 3 and 4 refer to cases in which reciprocal recombination has occurred.

TABLE 1.

### Expected genotypes of PFP-sensitive diploid segregants from a PFP resistant heteroallelic diploid of «Aspergillus nidulans».

$$\frac{\text{su-lad-20 ribo-1 pfp-16+ pfp-24-} + \text{pro-1} + \text{ad-20 bi-1}}{+ + \text{pfp-16- pfp-24+ an-1} + \text{y} + +}$$

Assumed mechanism of segregation	Genotype of segregants
Gene conversion $pfp-16 (UV)$ to wild type	1) $\frac{\text{su-lad-20 ribo-1 pfp-16+ pfp-24-}}{+} + \text{pro-1 + ad-20 bi-} + \text{pfp-16+ pfp-24+ an-1 + y +} +$
Gene conversion  p/p-24 (N) to wild type	2) $\frac{\text{su-lad-20 ribo-1 pfp-16+ pfp-24+} + \text{pro-1 + ad-20 bi-}}{+ \text{pfp-16 pfp-24+ an-1} + \text{y}} + + \frac{\text{su-lad-20 ribo-1 pfp-16 pfp-24+}}{+ \text{pro-1 + ad-20 bi-}}$
Crossing-over and segregation with a parental strand	3) $\frac{\text{su-lad-20 ribo-1 pfp-16+ pfp-24-}}{\text{su-lad-20 ribo-1 pfp-16+ pfp-24+ an-1}} + \text{pro-1 + ad-20 bi-}$
Crossing-over and segregation of the reciprocal strands	4) + pfp-16-pfp-24- + pro-1 + ad-20 bi- su-lad-20 ribo-1 pfp-16+ pfp-24+ an-1 + y + +

 $\label{eq:Table 2} Table \ \ 2.$  Segregant types, sensitive to PFP, obtained from the heteroallelic  $\text{ $\tt w$ pfp-16 (UV)/pfp-24 (N) $\tt w$ diploid.}$ 

Assumed mechanism of segregation	Code of genotype of segregants (see Table 1)	Total segregants
Gene conversion $p/p-16$ (UV) to wild type	1	12
Gene conversion  pfp-24 (N) to wild type	2	16
Crossing-over and segregation with a parental strand	3	11*
Crossing-over and segregation of the reciprocal strands	4	10**
More complex events	others	9
More complex events		58

<sup>\*</sup> In 13 cases the assumed  $pfp-16(UV)^+$   $pfp-24(N)^+$  strand was partially resistant to PFP (although resistant to AT + PA).

<sup>\*\*</sup> The su-lad-20 mutant allele remains in coupling with ad-20.

In order to know the genetic constitution of chromosome I in each one of the resulting diploids it has been necessary to analyze the single homologous strands. A small number of conidia from each diploid were seeded on a complete medium (CM); after 24 hours microcolonies arose and a second layer of CM + PFP at the concentration of 1.5 mM was poured on the dishes. On such «sandwich» plates the original colonies were no longer capable of growth, but each diploid should be able to give two types of sectors resistant to PFP: one haploid, which is selected and also induced by PFP. and the other diploid simply selected by the medium.

By analysing the second-order segregant sectors, it is possible to distinguish the two types of cross-over recombinants and the two types of gene convertants. Moreover analysis of internal and external markers can give information on possible negative interference and polarity during the process of recombination. The examination of different sectoring colonies can be utilized to find out if the intracistronic crossing-over really occurs at a four strand stage and if it is a single step process. Fifty-eight recombinants have been examined and the results can be summarized as shown in Table 2.

Discussion and conclusions. — The results reported have clearly shown the following facts. By selecting for intracistronic mitotic recombination in pfp cistron, two main classes of recombinants were obtained:

- 1) Recombinants in which there is no segregation for distal markers. In this case we always found one strand fully resistant to PFP and one fully sensitive. About one half of the recombinants in the particular strain used, belong to this class, which we call « gene conversion ».
- 2) Recombinants in which it is possible to show segregation for the external marker *ribo-1*. In this class two important peculiarities are very evident.

In the ten cases in which the position of su-1 ad-20 can be determined, the segregation of ribo-1 is never followed by the segregation of su-1 ad-20, which is external to ribo-1. This fact, whatever might be the structure of chromosome and the molecular mechanism of crossing-over, clearly suggests the presence of a linker  $^6$  distal to ribo-1.

Another feature is that among 21 recombinants of the crossing-over class, 13 also produce a strand which is segregant for *ribo-1*, but is, surprisingly, partially resistant to PFP. This fact strongly suggests that intracistronic crossing-over is very frequently, and possibly always, unequal, determining the production of modifications in the structure of the cistron implied in the crossing-over process <sup>7</sup>.

The nature and the possible interpretation of more complex cases will be analysed elsewhere when full data will be given.

14 maggio 1966.

GIORGIO MORPURGO e LAURA VOLTERRA

Laboratori di Chimica Biologica,

Centro Internazionale di Chimica Microbiologica

- WESTERGAARD, M., Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, 34, 359-405 (1964).
- <sup>2</sup> Käfer, E., Advanc. Genet., 5, 105-145 (1953).
- <sup>3</sup> CALVORI, C. & G. MORPURGO, Mutation Res., 3, 145-151 (1966).
- <sup>4</sup> Petrelli, M. G. & R. Ricci, Ann. Ist. Super. Sanità, 2, 379-392 (1966).
- <sup>5</sup> Morpurgo, G., Aspergillus News Letter, 4, 8 (1963).
- 6 LISSOUBA, P., J. MOUSSEAU, G. RIZET & J. L. ROSSIGNOL, Advanc. Genet., 11, 343-380 (1962).
- <sup>7</sup> Magni, G. E., Proc. Natl. Acad. Sci., 50, 975-980 (1963).

#### Variable frequency of back-mutation in different genotypes

In a previous paper  $^1$  two strains of  $Aspergillus\ nidulans$ , 16N and 12N, mutant for para-fluorophenylalanine (PFP) resistance (pfp), induced by  $HNO_2$  treatment, showed an abnormally high frequency of back-mutation. Back-mutation frequency was in effect  $6.32\times 10^{-6}$  plated conidia, namely about 20 times higher than forward-mutation frequency in the whole pfp cistron. Moreover, frequency of back-mutation could not be enhanced by any appreciable factor by treatment with U.V. rays, X rays,  $HNO_2$ , methyl-bis- $\beta$ -chloroethylamine or diepoxybutane. Conditions of plating and systems to avoid formation of revertant clones have been previously described  $^1$ , but here we want to emphasize the fact that our conditions give an underestimate of the back-mutation frequency.

The present note summarizes some data on the genetical analysis of crosses involving strain 16N, whose genetic constitution is: su-1 ad-20, ribo-1, pfp, pro-1, ad-20, bi-1, pyro-4. The first problem is obviously to show that revertants from 16N are true back-mutants and not suppressor mutants, either extra- or intra-cistronic. Ten independent back-mutants for pfp were crossed with strain 35 whose genetic constitution is: paba-1, an-1, y, meth-1, nic-2, nic-8, s-12. Some millions of resulting ascospores were plated on selective complete medium supplemented by PFP to score pfp strains. The number of resultant pfp colonies was so low that it could be attributed entirely to the forward-mutation frequency so showing that the site of back-mutation is identical with the site of the mutation. Back-mutants can also be distinguished from suppressor mutants by their phenotype with a technique described in 1. 4922 revertants were phenotypically examined and all of them turned out to be back-mutants. High frequency of back-mutation cannot be due to the presence of a mutator gene, as forward-mutation rate tested in the back-mutants is normal.

Strains 16N was crossed with strain 35, which is sensitive to PFP, and the resulting ascospores seeded on complete medium supplemented by PFP. 118 recombinant colonies resistant to PFP were chosen at random and back-mutation frequencies were tested. Results are given in Fig. 1. Back-mutation frequency can vary by a factor of about 40 simply by changing the genetic background.

Back-mutation frequency was also tested in six heteroallelic diploids comprising strain 16N, whose genetic constitution relative to the *pfp* locus is:

$$\frac{\text{pfp (16N)} + }{+ \text{pfp (X)}}$$

Diploids were built with six different pfp-(X) strains in which the back-mutation frequencies were less than  $1 \times 10^{-8}$ . Back-mutation frequency of pfp-(16N) decreases in all the diploids tested: on an average back-mutation frequency in the diploids was  $2.12 \times 10^{-6}$  which is about 1/3 of the original frequency in 16N strain.

Analogous results on the decrease of back-mutation frequencies in diploids have been obtained in diploids comprising strain 12N. These results again strongly support the hypothesis that frequency of back-mutation depends not only on the gene structure but also on the whole genetic constitution of the strain. Full data will be published elsewhere.

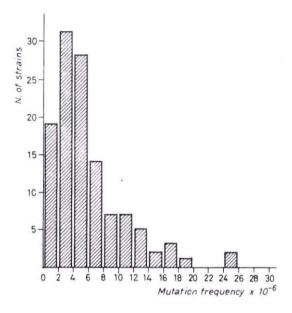


Fig. 1. — Back-mutation frequencies of pfp mutation in recombinants derived from cross 16N × 35.

Cases of abnormally high frequencies of back-mutation have often been found in very different organisms <sup>2, 3, 4</sup>. However, except in cases thoroughly analysed by Yanofsky <sup>4</sup>, for which a specific mutator gene is responsible (such an explanation does not apply to the present case), there is no satisfactory explanation of such phenomena. The mutationists have a strong tendency not to take into account such cases as they are rather in disagreement with a certain kind of beautiful molecular model of the mutation, and introduce disagreeable confusion and unwished for complications. However the Authors believe that it is also necessary to study such complicated things in order to avoid the building up of a very nice, but very dogmatic model of gene mutation.

14 maggio 1966.

Giorgio Morpurgo e Clara Calvori Laboratori di Chimica Biologica, Centro Internazionale di Chimica Microbiologica

CALVORI, C. & G. MORPURGO, Mutation Research, 3, 145-151 (1966).

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Benzer, S., Mutations. In: 2nd Conf. on Genetics, Josiah Macy Jr. Foundation, October 16-19, 1960. W. Shull, Ed., Princeton, N.J., The University of Michigan Press, 1962, p. 141.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Malling, H. V., Mutation Research, 2, 320-327 (1965).

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> YANOFSKY, C., C. COX & V. HORN, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 55, 274-281 (1966).

# Effetto dell'anaerobiosi sulla composizione in acidi grassi di cellule di Saccharomyces cerevisiae

Andreasen & Steir <sup>1</sup> hanno dimostrato che il lievito è incapace di crescere in anaerobiosi a meno che si aggiunga al terreno dell'ergosterolo. È inoltre noto dai lavori di Slonimski <sup>2</sup> che il lievito cresciuto in anaerobiosi in presenza di ergosterolo non è capace di respirare.

In un precedente lavoro <sup>3</sup> è stato mostrato che in anaerobiosi in assenza di ergosterolo il lievito è capace di fare qualche divisione, ma che la crescita si ferma dopo 5-7 generazioni. Le cellule così ottenute sono prive di membrane, e non mostrano nessuna struttura interna. L'areazione di tali cellule nelle condizioni usate per l'adattamento respiratorio <sup>2</sup> provoca la ricomparsa dei mitocondri e delle strutture interne, pur non avendo influenza sulla respirazione <sup>4</sup>. Nelle cellule cresciute in anaerobiosi in presenza di ergosterolo, invece, le strutture interne sono presenti e l'adattamento respiratorio provoca solo la ripresa funzionale dei mitocondri.

Poichè le membrane che costituiscono le strutture interne della cellula sono costituite in gran parte di composti lipidici, è sembrato interessante vedere l'influenza dell'ergosterolo e dell'ossigeno sulla composizione in acidi grassi delle cellule di lievito.

Il ceppo di Saccharomyces cerevisiae usato nella presente ricerca ed il terreno di coltura erano gli stessi usati nei precedenti lavori <sup>3,4</sup>. Le cellule venivano prelevate in fase stazionaria, dopo raffreddamento a 0°C di tutta la coltura, centrifugate e lavate con acqua raffreddata a 0°C. L'adattamento respiratorio veniva eseguito come precedentemente descritto <sup>4</sup>.

La parte lipidica veniva estratta dalla massa cellulare per ripetute estrazioni con un miscuglio di metanolo-cloroformio nel rapporto di 1:2. Il residuo lipidico era sottoposto a saponificazione ed esterificazione in un'unica operazione facendo bollire a ricadere in metanolo contenente il 2,8 % di acido solforico. Gli esteri metilici degli acidi grassi erano estratti dalla soluzione metanolica precedentemente diluita 5 volte con acqua. Le analisi gas-cromatografiche degli esteri metilici degli acidi grassi erano eseguite con un gas-cromatografo della C. Erba (FRACTOVAP Modello C) equipaggiato con rivelatore a ionizzazione di fiamma. Veniva utilizzata una colonna capillare in acciaio lunga 50 m dal diametro interno di 0,5 mm. Come fase liquida si usava Apiezon L.

La quantità di grassi estraibili contenuta nelle cellule ammontava al 20-30 % del peso secco e non differiva in maniera significativa nelle cellule aerobiche o anaerobiche, sia cresciute in presenza che in assenza di ergosterolo. Nella Tabella 1 è riportata la composizione in acidi grassi espressa come percento del totale, della frazione lipidica di un ceppo normale e di un mutante respiratorio di Saccharomyces cerevisiae cresciuto nelle diverse condizioni. I dati riportati sono presi da un solo esperimento ma questo è stato ripetuto più volte con gli stessi risultati.

Dall'esame della tabella si può vedere che la differenza più sostanziale fra le cellule cresciute in aerobiosi ed in anaerobiosi è costituita dal diverso rapporto fra acidi grassi saturi ed insaturi. Infatti nelle cellule cresciute in anaerobiosi tale rapporto è pari a 11,3, indicando che più del 90 % degli acidi grassi è saturo, mentre nelle cellule cresciute in aerobiosi tale rapporto è di 0,73, cioè solo il 40 % degli acidi grassi è saturo.

L'aerobiosi provoca inoltre una diminuzione degli acidi grassi a dodici e quattordici atomi di carbonio ed un aumento di quelli a diciotto atomi di carbonio dal 17 al 28 % circa. TABELLA 1.

Composizione percentuale in acidi grassi della frazione lipidica di due ceppi «Saccharomyces cerevisiae» in differenti condizioni di coltura.

CONTRACTOR	senza ergost.         con ergost.           poi areato         0,14           4,24         0,11           12,58         1,62           1,13         0,63           13,85         2,11           0         0,49           6,50         10,36           44,50         23,55           13,82         53,50           1,70         1,70           3,82         53,50           13,29         4,30           13,29         4,30	e erobic
		6,50 44,50 113,29 113,29

\*\* Il totale non è cento in quanto non si è tenuto conto dei composti XI, XII ed XIII di cui non si conosce la struttura. \* Tutti gli acidi grassi trovati, esclusi XI, XII ed XIII, erano del tipo normale.

Da notare infine nei cromatogrammi nelle cellule aerobiche la presenza di alcuni picchi  $X_I$ ,  $X_{II}$ ,  $X_{III}$  fra  $C_{16}$  e  $C_{17}$  dovuti probabilmente a piccole quantità di acidi grassi a 17 atomi di carbonio contenenti più doppi legami. Tali acidi grassi spariscono in anaerobiosi, comportandosi come gli altri acidi grassi insaturi.

L'aggiunta di ergosterolo al terreno di coltura fa si che la composizione in acidi grassi delle cellule cresciute in anaerobiosi sia simile a quella delle cellule cresciute in aerobiosi, anzi la percentuale di saturazione è addirittura più bassa (32 %) e la quantità di acidi grassi a diciotto atomi di carbonio è 1,7 volte quella degli acidi grassi a diciassette atomi di carbonio, mentre nelle cellule aerobiche è circa la metà e in quelle anaerobiche circa un terzo.

Come si può vedere nelle colonne 2ª e 4ª della Tabella 1, l'adattamento respiratorio nelle condizioni in cui si ha la completa risintesi degli enzimi respiratori, non provoca variazioni sensibili nella composizione degli acidi grassi.

Nelle ultime tre colonne è riportata la composizione in acidi grassi di cellule di mutanti respiratori (petite colonie) cresciute nelle stesse condizioni di coltura indicate. Questo ceppo, pur essendo privo di gran parte degli enzimi respiratori <sup>2</sup> si comporta dal punto di vista della composizione in acidi grassi esattamente nello stesso modo del ceppo normale.

I presenti risultati confermano le conclusioni dei precedenti lavori <sup>3,4</sup> che la mancata crescita in anaerobiosi ed il conseguente effetto dell'ergosterolo siano legati al metabolismo dei lipidi ed alla sintesi delle membrane, piuttosto che alla mancanza degli enzimi respiratori.

Inoltre i presenti dati sembrano indicare che nella cellula l'ossigeno ha la funzione di mantenere un certo equilibrio tra acidi grassi saturi ed insaturi, prevenendo la riduzione dei doppi legami. Il trasferimento di elettroni dal substrato all'ossigeno in questo caso deve seguire una via diversa da quella dei citocromi in quanto è funzionante anche nel mutante « petite colonie », il quale pur essendo privo di citocromo-ossidasi richiede ossigeno o ergosterolo per la crescita.

Poichè evidentemente una certa quantità di acidi grassi insaturi è necessaria alla crescita della cellula, questa si ferma quando in ambiente anaerobico fortemente riducente tutti gli acidi grassi sono saturi. La funzione dell'ergosterolo potrebbe essere quella di inibire in qualche modo la riduzione dei doppi legami, per esempio intrappolando il nicotinammide-di-nucleotide-fosfato ridotto e favorendo in questo modo il mantenimento del giusto rapporto fra acidi grassi saturi ed insaturi, e la sintesi di quelli a più alto numero di atomi di carbonio.

Si ringrazia il sig. Gianni Lanzi per l'assistenza tecnica.

Questo lavoro è stato parzialmente finanziato da un contributo del CNR. Gruppo diretto dal Prof. G. Tecce.

31 maggio 1966. Giovanni Serlupi Crescenzi e Salvatore Barcellona

Laboratori di Chimica Biologica,

Centro Internazionale di Chimica Microbiologica

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Andreasen, A. A., & T. J. B. Steir, J. Cellular Comp. Physiol., 41, 23 (1953).

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Slonimski, P., La formation des enzymes respiratoires chez la lévure, Masson, Paris, 1953.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Morpurgo, G., G. Serlupi Crescenzi, G. Tecce, F. Valente & D. Venettacci, Nature, 201, 897 (1964).

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Morpurgo, G., G. Serlupi Crescenzi, G. Tecce, F. Valente & D. Venettacci, Ric. Sci., 34 (IIB), 169 (1964).