

PRODUZIONE DI PAF (1-0-ALCHIL-2-ACETIL-SN-GLICERO-3-FOSFOCOLINA) DA PARTE DELLA RETINA DI POLLO DURANTE L'EMBRIOGENESI *

F. BUSSOLINO

Dipartimento di Genetica, Biologia e Chimica Medica, Università degli Studi, Torino

Riassunto. - Durante l'embriogenesi e dopo la schiusa, la retina di pollo stimolata con acetilcolina (Ach) e dopamina (DA) produce il platelet activating factor (PAF), un potente mediatore lipidico della comunicazione tra cellula e cellula. La produzione di tale mediatore è accompagnata dall'attivazione dell'enzima specifico 1-0-achilacetilglicerolo: CDP-colina colinafosfotransferasi. L'Ach induce la sintesi di PAF sin dall'8° giorno di sviluppo, mentre la DA è attiva a partire dal 16° giorno. La sequenza temporale della capacità di produrre PAF quando sono impiegati i due diversi agonisti suggerisce che il PAF è prodotto da cellule nervose piuttosto che dalle cellule di Muller.

Summary (Developing chick retina produces PAF (1-0-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine). - Platelet activating factor (PAF), a potent lipid mediator of cell-to cell interaction, is produced by developing chick retina after neurotransmitter stimulation. Acetylcholine (Ach) and dopamine (DA) stimulate PAF production via a 1-0-alkylacetyl-glycerol:CDP-choline cholinephosphotransferase. Ach stimulated PAF synthesis starting from the 8th day of development. At later stages, also DA stimulated PAF production. The developmental sequence of PAF stimulation suggests that PAF is produced by neuronal, rather than Muller cells.

Introduzione

Il platelet activating factor (PAF, 1-0-achil-2-acetil-sn-glicerolo-3-fosfocolina) è un mediatore della comunicazione intercellulare, sintetizzato e liberato da diverse cellule opportunamente stimulate (quali neutrofili, monociti/macrofagi, piastrine, cellule endoteliali) e da tessuti quali il fegato, il cuore, il pancreas esocrino, la milza, il rene [1]. Nelle cellule che partecipano a processi flogistici quali i neutrofili, le piastrine o l'endotelio, il PAF è prodotto mediante l'attivazione di una specifica acetil-

transferasi che acetila il precursore biologicamente inattivo 1-0-achil-2-liso-glicerolo-3-fosfocolina. Una seconda via di sintesi è stata caratterizzata nella midollare del rene e nella milza ed è mediata da una specifica colinafosfotransferasi [1].

A concentrazioni nanomolari il PAF induce l'aggregazione piastrinica, attiva i neutrofili e i macrofagi provocando la liberazione di enzimi lisosomiali, la loro chemiotassi e chemiochinesi, e contrae la muscolatura liscia. Il meccanismo di azione del PAF prevede la sua interazione con un sito ad alta affinità sulla plasmamembrana, l'attivazione del ciclo del fosfatidilinositolo, la traslocazione della proteina chinasi C dal citoplasma alla membrana della cellula, il coinvolgimento di una *G protein* e la modificazione dell'omeostasi di calcio intracellulare [1].

Abbiamo recentemente osservato che una struttura del sistema nervoso centrale, la retina di pollo, produce ma non libera il PAF dopo stimolazione con acetilcolina (Ach) e con dopamina (DA) [2]. La retina di pollo rappresenta un buon modello di studio del sistema nervoso centrale in quanto contiene soltanto cellule nervose e le cellule di Muller. Tuttavia non siamo stati in grado di identificare quale cellula produca il PAF.

Per cercare di meglio identificare la cellula che produce il PAF nella retina di pollo, abbiamo studiato la sua produzione durante l'embriogenesi in cui è ben conosciuta la sequenza temporale di maturazione delle diverse popolazioni cellulari, e nell'animale dopo la schiusa.

Materiali e metodi

Per questo studio sono stati impiegati embrioni di pollo del ceppo White Leghorn, cresciuti a 38 °C con una umidità del 90%. Gli animali sono stati decapitati e la retina isolata è stata stimolata a 37 °C in tampone Tyrode contenente 0,25% di albumina bovina (Sigma). Sono stati impiegati i seguenti agonisti: Ach, DA, L-

* Lavoro presentato al 1° Convegno Nazionale "Giovani Cultori delle Neuroscienze" (Roma, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 11-12 dicembre 1987) su invito del Comitato scientifico del convegno.

glutammato, acido γ -amino-butyrico, L-glicina, istamina, epinefrina (Sigma). L'incubazione è stata bloccata aggiungendo EDTA (5 mM, concentrazione finale) e riponendo i tubi in ghiaccio.

Il PAF è stato estratto, caratterizzato e dosato come precedentemente descritto [2].

1-0-alchil-2-liso-glicerolo-3-fosfocolina:acetilCoA acetiltransferasi e 1-0-alchilacetilglicerolo:CDP-colina colinafosfotransferasi sono stati misurati nel lisato retinico in accordo alla tecnica precedentemente descritta [2].

La significatività dei dati è stata valutata mediante test *t* di Student.

Risultati

Sin dall'8° giorno di sviluppo (l'epoca più precoce studiata) è presente del PAF nella retina non stimolata e i livelli basali del mediatore non si modificano durante lo sviluppo e dopo la schiusa (Fig. 1). Come precedentemente dimostrato per l'animale dopo la schiusa [2], Ach e DA (Fig. 1), ma non L-glutammato, L-glicina, epinefrina, istamina e acido γ -amino-butyrico inducono la sintesi, ma non la liberazione di PAF durante lo sviluppo della retina. Tuttavia esistono alcune differenze tra la comparsa della risposta all'Ach e quella alla DA. Dopo 8 giorni di sviluppo Ach induce la sintesi di PAF, mentre non è quantificabile la risposta alla DA. Un aumento della risposta all'Ach statisticamente significativa ($p < 0,02$) è osservabile tra il 12° e il 18° giorno, dopo di che è raggiunto il *plateau*. La risposta alla dopamina compare dopo 16 giorni di vita embrionale ed è presente anche dopo la schiusa.

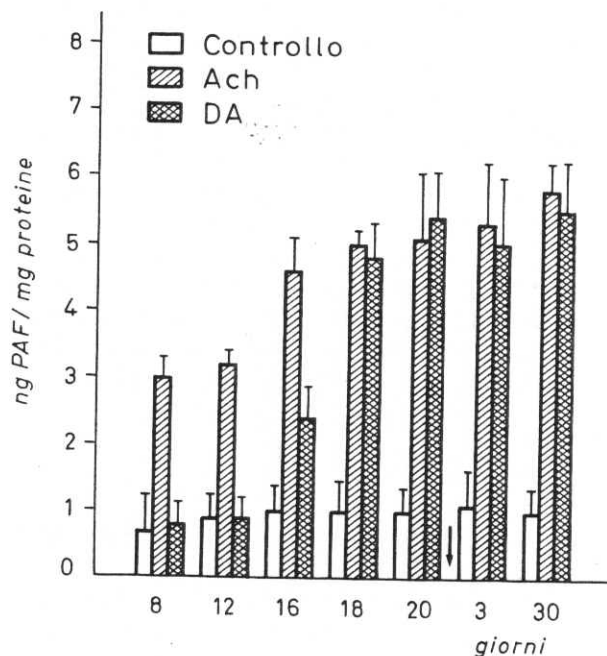


Fig. 1. - Produzione di PAF da parte della retina di pollo durante lo sviluppo e dopo la schiusa. La retina è stata stimolata a 37 °C per 20 minuti con Ach o DA (50 μ M). La freccia indica l'epoca della schiusa. Media $\pm$ DS di 5 esperimenti.

In tutti gli stadi studiati la minima concentrazione di agonista che dà la massima produzione di PAF è 50 μ M dopo 10-20 minuti di stimolazione (dati non mostrati).

La Fig. 2 illustra che nella retina di pollo la produzione di PAF è catalizzata dalla 1-0-alchilacetilglicerolo:CDP-colina colinafosfotransferasi. L'attività basale dell'enzima è aumentata di 3-6 volte dopo la stimolazione con Ach e DA. Nelle nostre condizioni sperimentali, Ach e DA non attivano la 1-0-alchil-2-liso-glicerolo-3-fosfocolina:acetilCoA acetiltransferasi.

E' osservabile un buon parallelismo temporale tra produzione di PAF ed attivazione dell'enzima dopo stimolazione con i due neurotrasmettitori. Infatti l'attivazione dell'enzima compare all'8° giorno di sviluppo dopo stimolazione con Ach e al 16° dopo stimolazione con DA (Fig. 2).

Discussione

Il lavoro dimostra che la retina di pollo produce PAF durante lo sviluppo, quando stimolata con appropriati neurotrasmettitori. Lo scopo del lavoro era quello di utilizzare le caratteristiche sequenziali dello sviluppo di tale struttura per individuare quale popolazione cellulare sia responsabile della produzione di PAF. Si propongono le seguenti osservazioni:

a) l'Ach inizia ad avere effetto già all'8° giorno di sviluppo quando la maggior parte delle cellule sono ancora in mitosi [3]. La presenza di recettori nicotinici e muscarinici in questa epoca di sviluppo [3, 4] suggerisce che l'Ach agisce mediante un recettore colinergico. La maturazione di sinapsi probabilmente ha un ruolo im-

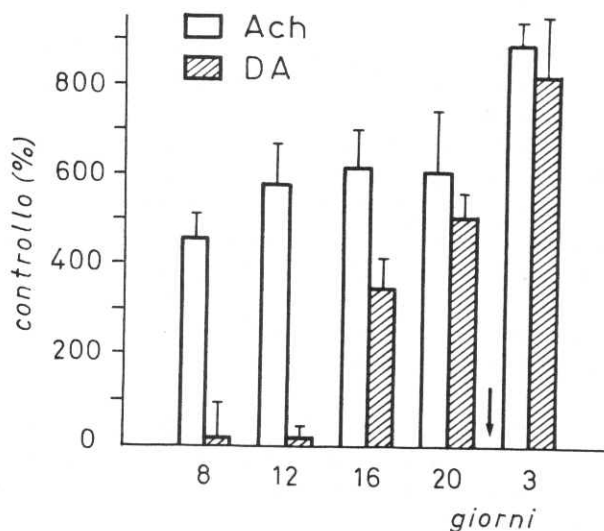


Fig. 2. - Stimolazione di 1-0-alchilacetilglicerolo: CDP-colina colinafosfotransferasi indotta da Ach e DA. La retina è stata stimolata nelle condizioni descritte nella Fig. 1. L'attività basale dell'enzima era: $0,2 \pm 0,07$, $0,25 \pm 0,04$, $0,4 \pm 0,06$, $0,49 \pm 0,02$, $0,5 \pm 0,05$, $0,5 \pm 0,07$, $0,45 \pm 0,08$ nmoli/min/mg proteina rispettivamente all'8°, 12°, 16°, 18°, 20° giorno di sviluppo e 3 e 30 giorni dopo la schiusa. La freccia indica l'epoca della schiusa. Media $\pm$ DS di 3 esperimenti.

portante, in quanto la massima produzione di PAF indotta da Ach si osserva dopo 12 giorni, epoca in cui le mitosi diminuiscono e si ha la prima formazione di sinapsi [5]. Recettori per l'Ach sono presenti sulle cellule ganglionari e sulle cellule amacrine [3, 4], mentre le cellule di Muller non presentano *in vitro* tali strutture [6], anche se evidenze indirette *in vivo* ne suggeriscono la presenza [3];

b) la DA non ha effetto fino al 16° giorno di sviluppo, dopo il quale la retina inizia a produrre considerevoli quantità di PAF. Tale dato suggerisce che la DA agisce mediante la stimolazione di un recettore D2, in quanto i recettori D1 sono presenti sin dal 7° giorno di sviluppo, mentre i recettori D2 compaiono al 17° giorno [7]. Attualmente non esistono evidenze sulla localizzazione dei

recettori per la DA durante lo sviluppo della retina di pollo, anche se dati indiretti suggeriscono la loro presenza sulle cellule ganglionari e su quelle amacrine [7].

Tali osservazioni permettono di supporre con maggior convincimento che il PAF sia prodotto da cellule di tipo nervoso piuttosto che dalle cellule di Muller o che esista una cooperazione tra i due tipi cellulari.

Ringraziamenti

Un vivo ringraziamento alla Prof.ssa Fulvia Gremo del Dipartimento di Citologia dell'Università di Cagliari per l'aiuto fornito nella discussione dei risultati.

Ricevuto il 22 febbraio 1988.

Accettato il 7 aprile 1988.

BIBLIOGRAFIA

1. HANAHAN, D.J. 1986. Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 483-509.
2. BUSSOLINO, F., GREMO, F., TETTA, C., PESCARMONA, G.P. & CAMUSSI, G. 1986. Platelet activating factor production by chick retina. *J. Biol. Chem.* **261**: 16502-16509.
3. SUGIYAMA, H., DANIELS, M.P. & NIREMBERG, N. 1977. Muscarinic acetylcholine receptors in the developing retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5524-5528.
4. VOGEL, Z. & NIREMBERG, N. 1976. Localization of acetylcholine receptors during synaptogenesis in retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 1806-1810.
5. DANIELS, M.P. & VOGEL, Z. 1980. Localization of bungarotoxin binding sites in synapses of the developing chick retina. *Brain Res.* **201**: 45-56.
6. LAREE, T.H., CHO, H.J., DE MELLO, F. & KLEIN, W.L. 1985. Molecular alteration of a muscarinic acetylcholine receptor system during synaptogenesis. *J. Biol. Chem.* **260**: 8873-8881.
7. VENTURA, A.L., KLEIN, W.L. & DE MELLO, F. 1984. Differential ontogenesis of D1 and D2 dopaminergic receptors in chick embryo retina. *Brain Res.* **314**: 217-223.