
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

SILVIO RANZI, GIOVANNI VAILATI

**Azione del cloruro di litio sul metabolismo proteico
dell’embrione di *Xenopus***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 50 (1971), n.4, p. 473–476.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_4_473_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Zoologia. — *Azione del cloruro di litio sul metabolismo proteico dell'embrione di Xenopus.* Nota (*) di SILVIO RANZI e GIOVANNI VAILATI, presentata (**) dal Corrisp. S. RANZI.

SUMMARY. — The metabolism of tritiated leucin has been studied in normal and Li-treated embryos of *Xenopus laevis*.

The eggs were labelled by injecting tritiated leucin into the female toad during oogenesis.

A decrease of the radioactive protein-bound leucin was observed during gastrulation. This decrease was more evident in ectoderm and mesoderm but less evident in entoderm (Table I, fig. 2).

The loss of tritiated leucin from labelled proteins was greater in the control than in Li-treated embryos (Table I, figs. 1, 2).

È ben noto che il cloruro di litio è in grado di modificare la determinazione nello sviluppo di vari animali e in particolare, nei Vertebrati, fa formare una parte dei somiti a spese di cellule dell'abbozzo presuntivo della corda dorsale ⁽¹⁾. In una serie di ricerche intese a chiarire le basi fisiologiche di questo processo il LiCl è apparso preservare le strutture proteiche e così rappresentare un vero inibitore dello sviluppo ⁽²⁾. In altre ricerche abbiamo visto come questo sale inibisce e la trascrizione e la traduzione ⁽³⁾.

Nella presente nota intendiamo analizzare direttamente l'inibizione del metabolismo proteico prendendo in esame il metabolismo della leucina tritiata preventivamente incorporata nelle proteine dell'uovo.

Il metodo seguito è stato quello introdotto dalla Deuchar ⁽⁴⁾ per seguire nello sviluppo normale il metabolismo di questo aminoacido. La leucina veniva iniettata nel sacco dorsale della madre durante l'oogenesi in maniera che gli oociti risultassero marcati. Abbiamo preferito questo metodo che permette

(*) Ricerche eseguite nel Laboratorio di Zoologia dell'Università statale di Milano usufruendo di un contratto di ricerca del CNR.

(**) Nella seduta del 17 aprile 1971.

(1) RANZI S., *Early determination in development under normal and experimental conditions*, in «The Beginnings of Embryonic Development», AAAS, Washington, 291 (1957).

(2) RANZI S., *The proteins in embryonic and larval development*. «Adv. in Morphogenesis», 2, 211 (1962); *La determinazione embrionale nelle sue basi di biologia molecolare*. «Rend. Acc. Naz. Lincei (Sc. fis.)» (8), 45, 173 (1968).

(3) DE BERNARDI F., LEONARDI CIGADA M., MACI R. e RANZI S., *On protein synthesis during the development of Litium-treated embryos*. «Experientia», 25, 211 (1969).

(4) DEUCHAR E. M., *Tracing amino acids from yolk protein into tissue protein*. «Acta Embryol. et Morphol. Exp.», 6, 311 (1963).

di legare la leucina nelle proteine dell'uovo prima della fecondazione piuttosto dell'altro metodo seguito per esempio da Waddington e Sirlin⁽⁵⁾ che consiste nel far sviluppare le uova in acqua contenente la sostanza marcata e permette così solo di vedere i luoghi di maggiore sintesi.

Dopo aver fatto deporre le uova ad una femmina di *Xenopus laevis* (Daudin) in buone condizioni di nutrizione mediante iniezione di 600 U.I. di gonadotropina corionica (Ormonoterapia Richter), si iniettavano nel sacco linfatico dorsale quotidianamente per una settimana 100 microCurie di leucina tritiata (Radiochemical Centre, Amersham) sciolti in 0,5 ml di acqua distillata sterile. All'ottavo giorno, dopo una nuova iniezione di gonadotropina, la femmina veniva accoppiata con un maschio che aveva subito due iniezioni di gonadotropina (300 U.I.) a ventiquattro ore di distanza l'una dall'altra. Seguiva una deposizione di qualche centinaio di uova fecondate, uova che venivano raccolte e lasciate sviluppare in acqua di fonte.

Embrioni allo stadio di giovane blastula (stadio 6½-7 secondo Nieuwkoop e Faber⁽⁶⁾) venivano immersi per tre ore in LiCl 0,4% e poi fissati in liquido di Smith (Rugh⁽⁷⁾); embrioni allo stadio di giovane blastula venivano trattati come i precedenti e poi rimessi in acqua di fonte e fissati allo stadio di giovane gastrula (stadio 10). Embrioni allo stadio di tarda blastula (stadio 9), dopo il trattamento, venivano lasciati sviluppare in acqua e fissati allo stadio di media gastrula (stadio 11); infine alcuni embrioni di media gastrula, dopo il trattamento con LiCl, venivano lasciati sviluppare in acqua e fissati allo stadio di tarda gastrula (stadio 12). Corrispondentemente ad ogni lotto di embrioni trattati venivano fissati embrioni di controllo allo stesso stadio di sviluppo (che non avevano subito alcun trattamento con LiCl).

Liberati dagli involucri protettivi gli embrioni venivano disidratati con alcool, inclusi in paraffina e sezionati a 5 µ; le sezioni venivano sottoposte al procedimento autoradiografico secondo il metodo dello «stripping film» (Polvani e Silvestrini⁽⁸⁾, Ficq⁽⁹⁾). A tale scopo venivano usate lastre Kodak AR-10; l'esposizione ha la durata di giorni otto. Dopo colorazione delle sezioni con ematossilina di Mayer, si procedeva al conteggio dei grani d'argento ridotto dell'autoradiografia mediante un oculare a reticolo; i conteggi si riferiscono a superfici aventi l'area di 100 µ².

Allo stadio di blastula abbiamo contato separatamente i grani nella regione nucleare e quelli del citoplasma dei micromeri e dei macromeri (fig. 1). Negli stadi di gastrulazione venivano presi in considerazione i territori ectoderma, mesoderma dorsale e entoderma (fig. 2). Tutti i dati corrispondono alla media di circa 100 contate ± e.s.. Quelli della fig. 2 sono riportati nella Tabella I.

Poichè praticamente tutti gli amminoacidi liberi vengono asportati dai procedimenti di preparazione, i grani osservati nelle autoradiografie si presumono dovuti alla leucina legata alle proteine: a proteine dell'uovo o a pro-

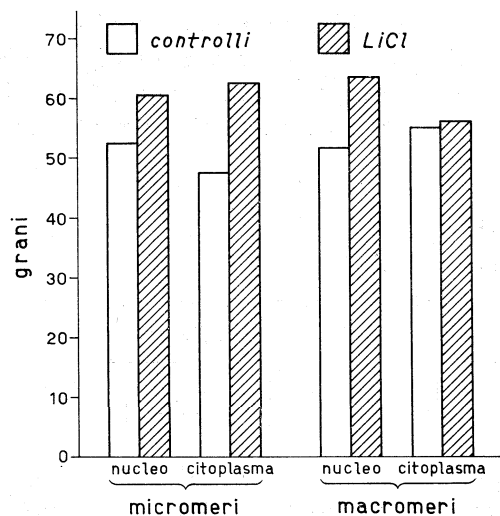
(5) WADDINGTON C. H. and SIRLIN J. L., *The incorporation of labelled amino acids into Amphibian embryos*. « J. Embryol. Exp. Morphol. », 2, 340 (1954).

(6) NIEUWKOOP P. and FABER J., *Normal table of Xenopus laevis*. North Holland Publ. Co. Amsterdam (1956).

(7) RUGH R., *Experimental Embryology*. Burgess Pub. Comp. Minneapolis, Min. (1952).

(8) POLVANI F. e SILVESTRINI R., *Note di tecniche autoradiografiche con pellicole «stripping»*, « Riv. Istoch. Norm. Patol. », 2, 239 (1956).

(9) FICQ A., *Autoradiography*, in « The Cell », Ed. J. Brachet and A. Mirsky, Academic Press N.Y., 1, 67 (1959).



teine neosintetizzate. La diminuzione quantitativa dei grani rilevabili può essere assunta come leucina perduta durante il metabolismo e cioè come indice del metabolismo proteico.

Esaminando secondo questa premessa i dati riportati nella Tabella e nelle figure, appare evidente come in tutti gli embrioni trattati con LiCl la radioattività è nettamente maggiore di quella degli embrioni controllo. È possibile

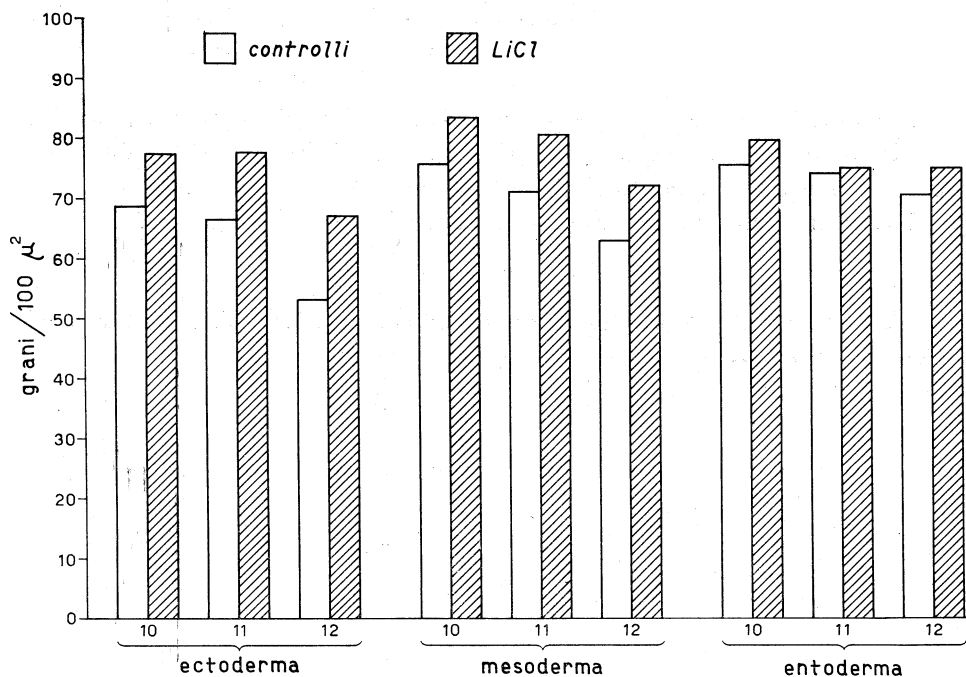


Fig. 2. — Numero dei grani di ectoderma, mesoderma dorsale ed entoderma allo stadio di gastrulazione (labbro dorsale del blastoporo accennato, 10; solco falciforme, 11; tappo vitellino, 12). Embrioni controllo ed embrioni trattati con LiCl.

quindi confermare direttamente in vivo che il LiCl preserva le proteine dalla demolizione. Questo dato ben si accorda con le osservazioni di Cigada ⁽¹⁰⁾ che, quando veniva studiata l'azione del LiCl sugli organuli cellulari isolati, aveva visto che i granuli vitellini dell'uovo di pollo sono più resistenti dopo trattamento di LiCl.

TABELLA I.
Granì per 100 μ^2 .

STADIO		CONTROLLI			TRATTATI			TRATTATI/CONTROLLI		
		IO	II	I2	IO	II	I2	IO	II	I2
<i>Ectoderma</i>	$\bar{x}$	68,6	66,5	53,2	77,4	77,6	67,2	1,12	1,16	1,26
	e.s.	$\pm 1,1$	$\pm 1,3$	$\pm 1,4$	$\pm 1,2$	$\pm 2,7$	$\pm 1,6$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
<i>Mesoderma dorsale</i>	$\bar{x}$	75,6	71,1	63,0	83,3	80,6	72,1	1,10	1,13	1,14
	e.s.	$\pm 1,1$	$\pm 1,1$	$\pm 1,4$	$\pm 1,2$	$\pm 3,3$	$\pm 1,6$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
<i>Entoderma</i>	$\bar{x}$	75,3	73,9	70,4	79,6	74,9	74,9	1,05	1,01	1,06
	e.s.	$\pm 1,1$	$\pm 1,3$	$\pm 1,2$	$\pm 1,3$	$\pm 1,8$	$\pm 1,7$	$0,01 < P < 0,02$	$0,6 < P < 0,7$	$0,02 < P < 0,05$

I numeri indicano gli stadi di gastrulazione secondo Nieuwkoop e Faber.

L'azione in vivo del LiCl è più marcata negli stadi di gastrulazione nell'ectoderma e nel mesoderma, territori nei quali più intenso è il metabolismo proteico e nei quali appunto si riscontra il più alto rapporto del numero dei granì d'argento ridotto tra trattati e controllo (Tabella I).

(10) CIGADA L., *Sulla stabilità dei granuli del tuorlo del pollo*. « Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. », 30, 104 (1954).