
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARISA LEONARDI CIGADA, FIORENZA LARIA DE
BERNARDI, ANNA MARIA BOLZERN

Sintesi di RNA in embrioni di *Xenopus* trattati con LiCl

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 52 (1972), n.1, p. 93–100.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_52_1_93_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. — *Sintesi di RNA in embrioni di Xenopus trattati con LiCl* (*). Nota di MARISA LEONARDI CIGADA, FIORENZA LARIA DE BERNARDI e ANNA MARIA BOLZERN, presentata (**) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — We studied RNA synthesis in *Xenopus laevis* embryos at the gastrula stage, using both 0.01 M LiCl concentration, which causes malformations, and lower concentrations to 0.0025 M that allow normal development.

A preliminary series of observations on $^{14}\text{CO}_2$ incorporation in treated *Xenopus* embryos revealed that LiCl concentrations below 0.01 M increase the labelled RNA to 38%. On the contrary, in embryos treated with LiCl concentrations above 0.01 M there is a lower incorporation than in the controls. Therefore the sucrose gradient technique was used to determine what RNA fractions cause this increase. Sedimentation patterns show the three RNA fractions 4, 18 and 28 S. There are no appreciable differences between optical density in treated and in control embryos. However, in embryos treated with 0.0025 M LiCl there is considerable incorporation in each RNA species. As the concentration is increased (up to LiCl 0.01 M), the incorporation decreases, although it is still greater than in the controls.

Moreover, embryos treated with 0.0025–0.01 M LiCl present a marked peak of labelled RNA between the two fractions identifiable as light ribosomal RNA (18 S) and heavy ribosomal RNA (28 S).

Experiments were carried out to discover whether the labelled RNA accumulation was due to reduced breakdown or to increased synthesis. For this purpose the effects of LiCl on RNA breakdown in presence of ribonuclease were studied. In all concentrations tested in these experiments, lithium inhibits RNA enzymatic hydrolysis.

INTRODUZIONE

Il trattamento con LiCl di embrioni di Anfibi a stadi precoci provoca malformazioni caratteristiche (vegetalizzazione, corda ridotta) che sono state ben studiate sotto il profilo morfologico (Lehmann, 1937; Hall, 1942; Tamini, 1943). Alcune implicazioni biochimiche di tali malformazioni sono state messe in evidenza (Ranzi, 1949, 1962; Lallier, 1954): aumento della viscosità delle soluzioni di proteine estratte da embrioni vegetalizzati e maggior resistenza agli agenti denaturanti quali urea e digerenti quali tripsina; queste proprietà sono state ricondotte alle modificazioni che la molecola proteica subisce per effetto del mantello di idratazione che riveste gli ioni Li^+ (Ranzi, 1962).

(*) Laboratorio di Zoologia dell'Università Statale di Milano.

(**) Nella seduta del 15 gennaio 1972.

Più recentemente, con l'aiuto dei precursori marcati, è stato possibile mettere in evidenza che il LiCl ha generalmente una azione depressiva sulla sintesi delle proteine sia nell'embrione di Anfibi (Leonardi Cigada e coll., 1968) sia nell'embrione di riccio di mare (Berg, 1968).

Nella presente Nota esaminiamo l'azione del LiCl sul processo di trascrizione, utilizzando anche, per il trattamento delle gastrule, concentrazioni di sale inferiori allo 0,01 M, che aveva dimostrato di inibire la sintesi delle proteine.

MATERIALE E METODI

Incubazione delle uova. Da *Xenopus laevis* (Daudin) allevati in laboratorio si ottengono uova mediante iniezione di ormone gonadotropo (Pregnyl Organon 600 U.I.). Queste uova sono liberate manualmente dagli involucri gelatinosi e lasciate a sviluppare in acqua di fonte fino allo stadio di solco falciforme (st. 10-11 di Nieuwkoop e Faber). A questo stadio vengono allestiti 6 lotti di 200 embrioni ognuno: 3 lotti (controllo) sono lasciati in acqua di fonte a 18° C, 3 lotti vengono messi in soluzione di LiCl (in acqua di fonte). Si sono usate le seguenti concentrazioni di litio: 0,0025-0,005-0,01-0,025-0,05-0,1 M. Nello stadio di placca neurale (st. 14 di Nieuwkoop) lotti di 150 embrioni selezionati sono messi a incubare in recipiente chiuso contenente 20 ml del liquido di allevamento con 100 μ c di $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (Radiochemical Centre, Amersham) attività specifica 42,4 mc/mmole, per 5 ore a 26° C (Cohen 1954). Alla fine del trattamento gli embrioni raggiungono lo stadio di bottone codale (st. 23 di Nieuwkoop). Dopo lavaggio in acqua di fonte e in soluzione tampone si procede alla estrazione dell'RNA totale. Una seconda serie di esperimenti è stata condotta trattando gli embrioni con la sostanza marcata un'ora dopo l'inizio del trattamento con LiCl. In questo caso alla fine della incubazione gli embrioni raggiungono lo stadio di giovane piega neurale (st. 15 di Nieuwkoop).

Estrazione di RNA. L'estrazione dell'RNA totale viene eseguita a 0-2° C secondo il metodo di Brown e Gurdon (1964) leggermente modificato. I lotti di 150 embrioni vengono omogenizzati in 10 ml di tampone acetato di Na 0,1 M a pH 5 contenente mercaptoetanolo 1 mM e sodiododecilsolfato alla concentrazione finale dello 0,5%. L'omogenato è agitato per 10 minuti con un ugual volume di fenolo saturo d'acqua, quindi centrifugato in centrifuga Servall per 10 minuti a 9000 g. Gli acidi nucleici sono precipitati dalla fase acquosa per aggiunta di 0,1 volumi di NaCl 1 M e 2 volumi di alcool etilico assoluto. Dopo almeno 2 ore di permanenza in camera refrigerata la sospensione è centrifugata in Servall per 10 minuti a 9000 g e il culotto ripreso in tampone acetato di Na 0,01 M contenente mercaptoetanolo 1 mM. La soluzione viene trattata con 5 μ g/ml di DNasi I (Sigma) e MgCl_2 1 mM per 10 minuti a 20° C. L'RNA viene ulteriormente purificato mediante due successive purificazioni con NaCl-etanolo di circa 2 ore ciascuna. Il culotto dell'ultima centrifugazione viene ripreso con alcool, centrifugato in Servall 9000 g per 10 minuti, asciugato con flusso di aria tiepida e infine sciolto in 0,6 ml di tampone acetato 0,01 M. L'estratto di RNA viene ancora brevemente purificato mediante una centrifugazione in Servall per 3 minuti a 1000 g.

Misura della attività. La soluzione di RNA totale, dopo lettura allo spettrofotometro a 260 nm, viene divisa in frazioni di 0,1 ml ciascuna delle quali viene adsorbita su filtri Millipore 0,45 μ . I filtri, asciugati all'aria, vengono poi lavati una volta con acido tricloroacetico (TCA) 10% e due volte con TCA 5% e poi essiccati a 40° C per 2 ore; infine vengono posti nei contenitori dello scintillatore in fase liquida Packard con 5 ml di soluzione scintillante (7 gr. PPO; 0,5 gr. dimetil-POPOP in 1000 ml di toluene).

Gradienti di saccarosio. 0,5 ml di soluzione di RNA (13,0 O.D.) vengono stratificati su gradiente lineare di saccarosio 5%-20% preparato con tampone acetato di Na 0,01 M contenente mercaptoetanolo 1 mM e 0,1 mM EDTA.

I gradienti vengono centrifugati in Spinco (rotore SW 25.1) per 14 ore e mezzo a 83.071 g e analizzati con il frazionatore di gradienti ISCO, munito di analizzatore ultravioletto a 254 nm. Da ogni frazione di 1,2 ml si precipita l'RNA con acido tricloroacetico alla concentrazione finale del 5%; il precipitato è raccolto su filtri Millipore 0,45 μ che, dopo lavaggio ed essiccamento, sono contati nello scintillatore.

Idrolisi enzimatica di RNA. L'idrolisi enzimatica è stata condotta su RNA di lievito (Schwartz) purificato secondo il metodo di Vischer e Chargaff (1948), sciolto in tampone acetato 0,1 M pH 5, come descritto da Humm e coll. (1971). La soluzione di RNA (1 mg/ml) viene trattata per una notte a 0°C con LiCl sciolto in tampone alle stesse concentrazioni usate per il trattamento degli embrioni. L'idrolisi enzimatica è poi condotta senza eliminare il LiCl a 25°C con ribonucleasi pancreatica (Sigma) 1,5 μ g/ml in tampone acetato 0,1 M. Dalla miscela di reazione si preleva 1 ml ogni 3 minuti, a partire dal momento in cui si aggiunge l'enzima (tempo 0). Da ogni frazione l'RNA non idrolizzato è precipitato per aggiunta di 0,25 ml di acetato di uranile 0,75% in acido perclorico 25%. Si lascia precipitare circa 4 ore a 0°C, quindi i tubi vengono centrifugati in Servall 5 minuti a 3000 r.p.m. e viene letto allo spettrofotometro a 260 nm l'assorbimento del supernatante diluito 1:25 con acqua distillata.

RISULTATI

Nella prima serie di ricerche abbiamo preso in esame l'incorporazione di $^{14}\text{CO}_2$ nell'RNA totale di embrioni di *Xenopus* trattati con concentrazioni crescenti di LiCl. I valori assoluti della lettura allo spettrofotometro e delle misure di radioattività incorporata sono stati espressi nel grafico (fig. 1) sotto forma di rapporto tra i valori ottenuti dai lotti di embrioni controllo e i valori ottenuti dai lotti di embrioni trattati con LiCl. Al controllo è stato attribuito il valore 100. La quantità di RNA dei trattati diminuisce leggermente con l'aumento della concentrazione del sale. Questo fenomeno si osserva sia negli embrioni trattati 6 ore con LiCl, sia negli embrioni trattati 20 ore. La quantità di RNA marcato negli embrioni trattati con basse concentrazioni di LiCl è notevolmente superiore al controllo. I valori più elevati si raggiungono alla concentrazione di 0,0025 M con un incremento di incorporazione del 38%. Aumentando la concentrazione del sale, la quantità di RNA marcato diminuisce fino a raggiungere valori inferiori al controllo alla concentrazione 0,025 M.

L'incremento di incorporazione, che si osserva alle basse concentrazioni di LiCl, è più marcato negli embrioni trattati per un tempo più lungo.

Un simile incremento di incorporazione si osserva studiando la quantità di proteine marcate con ^{14}C in embrioni trattati con basse concentrazioni di LiCl (ricerche in corso).

Si è fatto ricorso alla tecnica dei gradienti di saccarosio per precisare quanto emerso dalle misure di incorporazione. I profili di sedimentazione (fig. 2) mostrano le tre specie di RNA 4 S, 18 S, 28 S. Mentre non si osservano notevoli differenze tra i profili di densità ottica ottenuti da embrioni trattati e da embrioni controllo, l'incorporazione negli embrioni trattati con LiCl 0,0025 M è molto elevata a carico di tutte le specie di RNA; con l'aumentare della concentrazione i profili di incorporazione si abbassano pur mantenendosi

sempre più alti del controllo. Gli embrioni trattati con LiCl 0,0025 M presentano una grande quantità di RNA 4 S marcato (circa 3 volte rispetto al controllo) ed inoltre una punta di incorporazione assai alta fra le due frazioni riconoscibili come RNA ribosomale leggero (18 S) ed RNA ribosomale pesante

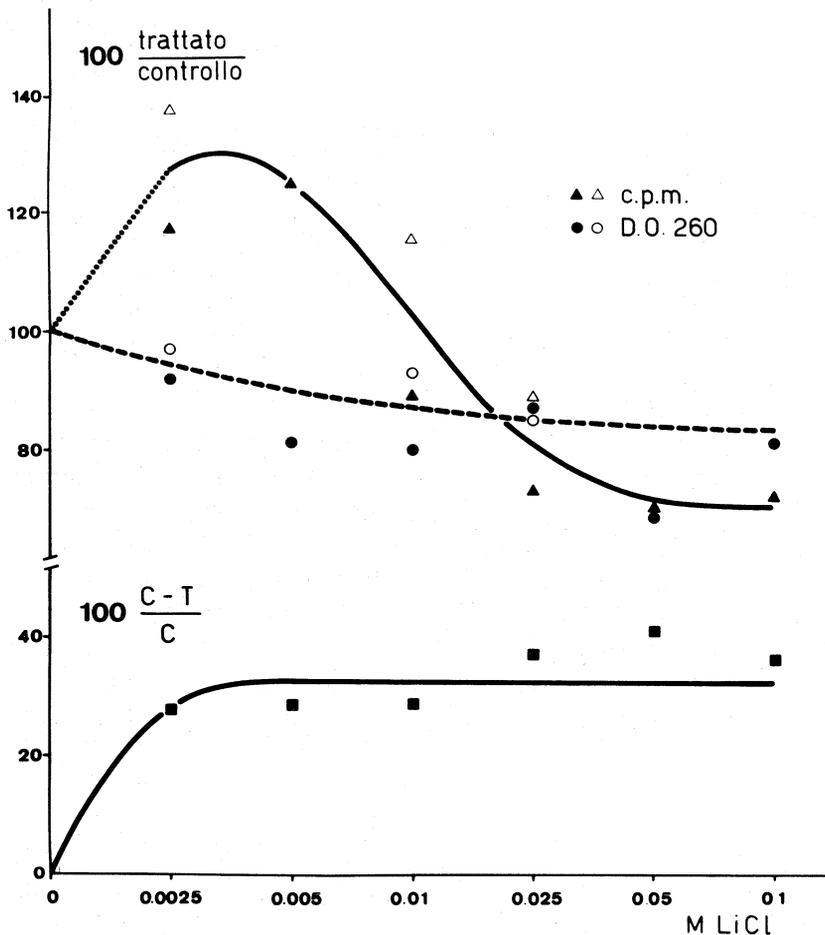


Fig. 1. — Lettura allo spettrofotometro (linea tratteggiata) e incorporazione di ^{14}C (linea continua) in estratti di RNA totale di embrioni di *Xenopus laevis* trattati con diverse concentrazioni di LiCl: i simboli pieni indicano un trattamento di 6 ore; i simboli vuoti indicano un trattamento di 20 ore. Al controllo è stato attribuito il valore 100. In basso: inibizione dell'idrolisi per effetto di ribonucleasi di RNA trattato con LiCl.

(28 S). Questa punta si osserva anche nei diagrammi corrispondenti a embrioni trattati con LiCl 0,005 M e 0,01 M; e va diminuendo in misura meno marcata delle frazioni 18 S e 28 S con l'aumentare della concentrazione del litio.

Per comprendere se l'eccesso di RNA marcato negli embrioni trattati con basse concentrazioni di LiCl venisse da aumento di sintesi o da diminuita demolizione abbiamo eseguito prove per vedere come la digestione di RNA

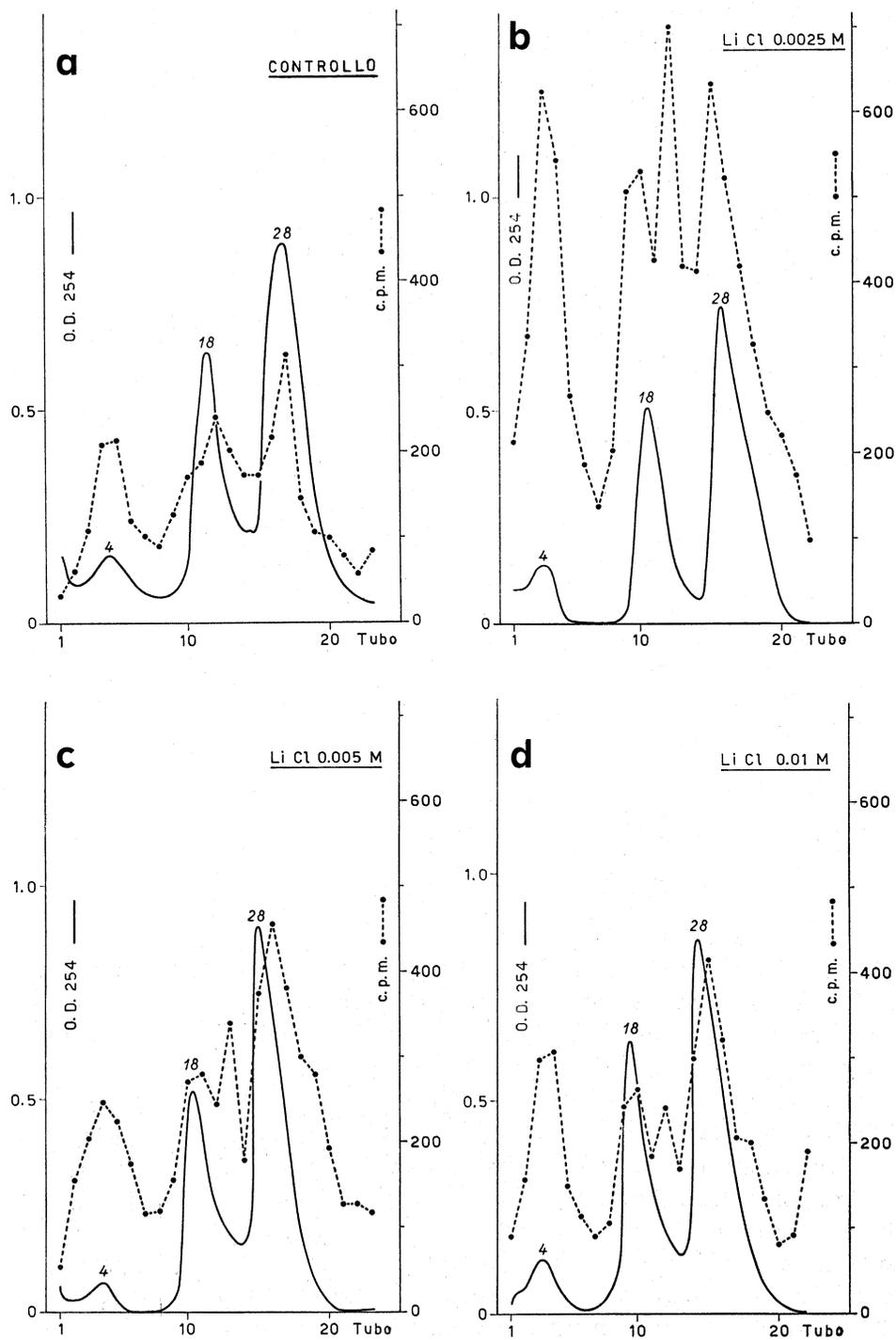


Fig. 2. - Diagrammi di sedimentazione su gradienti di saccarosio (5%-20%) di RNA estratto da embrioni di *Xenopus laevis*. a) controllo; b) LiCl 0,0025 M; c) LiCl 0,005 M; d) LiCl 0,01 M.

ad opera di ribonucleasi risentisse dell'effetto del LiCl. I risultati sono riportati nella fig. 3 che dimostra che a tutte le concentrazioni sperimentate il LiCl inibisce l'idrolisi enzimatica dell'acido ribonucleico.

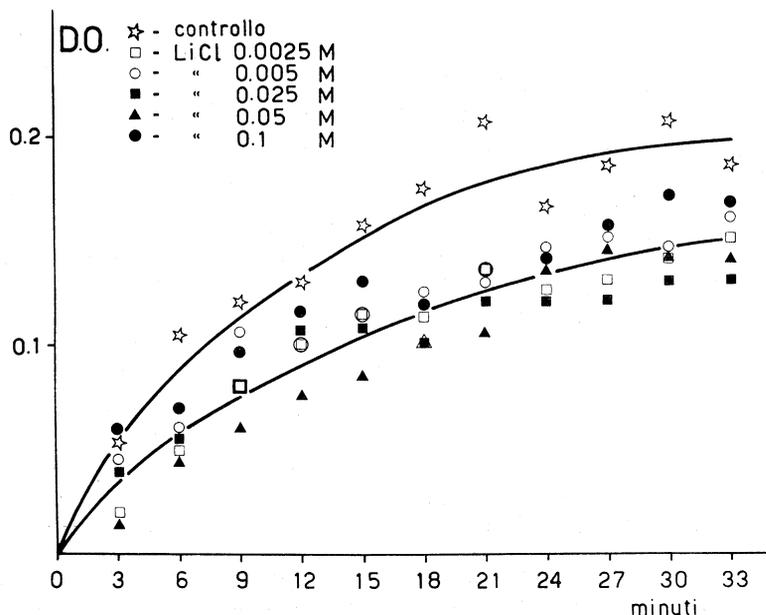


Fig. 3. - Idrolisi enzimatica di RNA di lievito trattato con diverse concentrazioni di LiCl. Linea superiore: controllo; linea inferiore: trattato.

DISCUSSIONE

Il risultato più interessante, che emerge dalle misure di incorporazione di $^{14}\text{CO}_2$ nell'RNA di embrioni di *Xenopus*, è il notevole aumento di RNA marcato negli embrioni che vengono fatti sviluppare in presenza di LiCl a basse concentrazioni (0,0025-0,01 M). Un tale aumento può essere spiegato in tre diversi modi: 1) aumento della permeabilità cellulare al precursore marcato; 2) aumento della quota di sintesi dell'RNA; 3) inibizione della demolizione dell'RNA marcato.

Un aumento della permeabilità cellulare negli embrioni trattati con litio sembra improbabile; se così fosse infatti si attenderebbe che l'incremento di incorporazione interessasse tutte le frazioni allo stesso modo; invece si osserva un forte incremento in una frazione di RNA con coefficiente di sedimentazione circa 22 S che nel gradiente di saccarosio spicca tra le frazioni 18 S e 28 S. Inoltre l'incremento nella frazione 4 S è sempre maggiore che nelle frazioni dell'RNA ribosomale. Questi dati sembrano incompatibili con l'ipotesi di una maggiore permeabilità che porterebbe ad una maggiore attività specifica di un pool comune a tutte le frazioni di RNA.

Una seconda alternativa che potrebbe rendere ragione delle differenze nell'incremento di RNA marcato nelle diverse frazioni è un aumento di sintesi. L'osservazione di De Angelis e Runnström (1970) secondo la quale l'actinomicina D inibisce il differenziamento di embrioni di ricci di mare trattati con LiCl, fa vedere che in questi embrioni vi è una trascrizione più attiva corrispondente a materiale entodermico.

La terza alternativa è che l'aumento di RNA marcato sia dovuto ad una inibizione della sua demolizione. Nei nostri esperimenti si è ottenuta una curva bifasica nella quale a basse concentrazioni di LiCl la quantità di RNA marcato è superiore al controllo, a concentrazioni di LiCl superiori a 0,01 M la quantità di RNA marcato è inferiore. L'osservazione di questi risultati fa supporre che il trattamento con LiCl, a concentrazioni inferiori allo 0,01 M, provochi un accumulo dell'RNA fabbricato dall'embrione nel periodo di incubazione. La maggior quantità di RNA accumulato dagli embrioni trattati per tempi lunghi è probabilmente dovuta alla elevata sintesi di RNA che si verifica negli embrioni a stadi avanzati (Brown e Littna, 1964). Un simile reperto, correlato con i dati sulla generale inibizione dovuta al LiCl (Ranzi, 1962; De Bernardi e coll., 1969) ha spinto a vedere se il litio avesse un'azione inibente sulla degradazione enzimatica dell'RNA. I dati ottenuti in questa serie di esperimenti sembrano suggerire che il LiCl a basse concentrazioni si limita ad inibire gli enzimi correlati alla degradazione dell'RNA, mentre a concentrazioni superiori, quando si evidenzia l'effetto morfogenetico, prevale l'azione inibente sulla sintesi dell'RNA (fig. 1).

Ci si dovrebbe inoltre chiedere se l'azione del litio sia diretta sulla RNA polimerasi oppure sia mediata da un fattore, forse una proteina, che controlla l'attività polimerasica. Esperimenti preliminari hanno dimostrato che preparazioni di cromatina, estratta da tessuti di embrioni di pollo, non mostrano mutamenti di attività polimerasica degni di nota in presenza delle concentrazioni di LiCl che alterano l'incorporazione dei precursori nell'RNA (A. Marchok, comunicazione personale). Se tali osservazioni valessero anche per gli embrioni di *Xenopus* si dovrebbe pensare all'esistenza di un meccanismo indiretto litio-sensibile che controlla il metabolismo dell'RNA.

Gli esperimenti condotti finora non permettono di definire la frazione a coefficiente circa 22 S che appare nei profili di sedimentazione. Una frazione di RNA 24 S è stata riscontrata da Mairy e Denis (1971) in oociti di *Xenopus* ed è stata riconosciuta avere composizione in basi DNA-simile. Una frazione 20 S è stata rinvenuta da Rogers (1968) negli oociti maturi di *Triturus viridescens* e interpretata quale precursore dell'RNA ribosomiale 18 S per analogia con frazioni descritte nelle cellule HeLa (Weinberg e coll., 1967) e nelle ghiandole salivari di *Chironomus* (Edström e Danholt, 1967). Il precursore 20 S sarebbe particolarmente abbondante negli oociti maturi a causa della loro elevata attività nella sintesi dei ribosomi. Weinberg e Penman (1970) hanno presentato uno schema secondo cui un RNA 20 S sarebbe il precursore diretto del 18 S nelle cellule dei Mammiferi; un accumulo di tale precursore si nota se le cellule sono infette da poliovirus.

Noi siamo indotti ad identificare la frazione 22 S con il precursore descritto da Weinberg e Penman. Il fatto che questa frazione non sia rilevabile nel controllo e sia particolarmente evidente nei trattati (fig. 2) potrebbe essere dovuto all'accumulo conseguente alla inibita degradazione enzimatica.

LAVORI CITATI

- BERG E. W. (1968). - *Effects of Li on the rate of protein synthesis in the sea urchin embryos*, « Exp. Cell Res. », 50, 133.
- BROWN D. D. e GURDON J. B. (1964). - *Absence of ribosomal synthesis in the anucleolate mutant of Xenopus laevis*, « Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. », 51, 139.
- BROWN D. D. e LITNA E. (1964). - *RNA synthesis during the development of Xenopus laevis, the south-african clawed toad*, « J. Mol. Biol. », 8, 669.
- COHEN S. (1954). - *The metabolism of $^{14}\text{CO}_2$ during Amphibian development*, « J. Biol. Chem. », 211, 337.
- DE ANGELIS E. e RUNNSTRÖM J. (1970). - *The effect of temporary treatment of animal half embryos with lithium and the modification of this effect by simultaneous exposure to Actinomycin D*, « Wilhelm Roux Arch. », 164, 236.
- DE BERNARDI F., LEONARDI CIGADA M., MACI R. e RANZI S. (1969). - *On protein synthesis during the development of Lithium treated Embryos*, « Experientia », 25, 211.
- HALL T. S. (1942). - *The mode of action of lithium salts in Amphibian development*, « J. Exp. Zool. », 89, 1.
- HUMM D., HUMM J. e SHOE L. (1971). - *The effect of the presence of RNA upon diethyl pirocarbonate inhibition of Ribonuclease*, « Bioch. Biophys. Acta », 246, 458.
- LALLIER R. (1954). - *Chlorure de lithium et biochimie du développement de l'oeuf d'Amphibien*, « J. Embr. Exp. Morph. », 2, 323.
- LEHMANN F. E. (1937). - *Mesodermieserung des präsumptiven chordamaterials durch einwirkung von lithiumchlorid auf die gastrula von Triton alpestris*. « Wilhelm Roux' Arch. », 136, 112.
- LEONARDI CIGADA M., MACI R. e DE BERNARDI F. (1968). - *Azione a livello molecolare di alcune sostanze che interferiscono nei processi di determinazione embrionale*, « Ist. I.cmb. (Rend. Sc.) B », 102, 213.
- MAIRY M. e DENIS H. (1971). - *Recherches biochimiques sur l'oogenèse. I. Synthèse et accumulation du RNA pendant l'oogenèse du crapaud sud-africain Xenopus laevis*. « Devel. Biol. », 24, 143.
- NIEUWKOOP P. D. e FABER J., *Normal table of Xenopus laevis*, North-Holland Publishing Company Amsterdam (1956).
- RANZI S. (1949). - *Proteine e sviluppo embrionale*, « C. R. XIII Congr. Intern. Zoologia Paris 1948 », 61.
- RANZI S. (1962). - *The proteins in embryonic and larval development*, « Adv. Morphogenesis », 2, 211.
- ROGERS M. E. (1968). - *Ribonucleoprotein particles in the amphibian oocyte nucleus*, « J. Cell. Biol. », 36, 421.
- TAMINI E. (1943). - *Gli agenti chimici che determinano la ciclopia negli Anfibi*, « Ist. Lomb. (Rend. Sc.) », 76, 115.
- VISCHER E. e CHARGAFF E. (1948). - *The composition of the pentose nucleic acids of yeast and pancreas*, « J. Biol. Chem. », 176, 715.
- WEINBERG R. A., LOENING U., WILLEMS M. e PENMAN S. (1967). - *Acrylamide gel electrophoresis of HeLa cell nucleolar RNA*, « Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. », 58, 1088.
- WEINBERG R. A. e PENMAN S. (1970). - *Processing of 45 S nucleolar RNA*. « J. Mol. Biol. », 47, 169.