
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ANNA MARIA BOLZERN, CRISTINA SOTGIA

**Effetti morfologici e biochimici dello shock termico
su embrioni di *Xenopus laevis***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 76 (1984), n.5, p. 305–310.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1984_8_76_5_305_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)

Biologia. — *Effetti morfologici e biochimici dello shock termico su embrioni di Xenopus laevis* (*). Nota di ANNA MARIA BOLZERN e CRISTINA SOTGIA, presentata (**) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — *Xenopus laevis* embryos were subjected to heat shock for one hour, at different temperatures, at different developmental stages, from cleavage to late neurula.

After the treatment all the embryos were recovered at the normal developmental temperature.

The total proteins extracted from whole embryos were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis.

Some embryos of all batches were allowed to develop for 2 or 3 days and used for histological analysis.

The results indicate that the heat shock at 28°C is the most efficient in inducing morphologic abnormalities and changes in protein patterns.

The morphologic abnormalities were principally due to an inhibition of development of the eyes, irregular arrangement of myoblasts or absence of intersomitic boundaries; inhibition of pigmented cells distribution.

Coomassie blue stained protein patterns of the embryos exposed to heat shock, showed increased synthesis of a protein of molecular weight of 100 kDa and of a protein of 30 kDa. When heat shock was delivered to embryos with actinomycin in the culture medium, no protein synthesis increase occurred.

Un improvviso e temporaneo aumento della temperatura di allevamento di cellule di ghiandole salivari di larve di *Drosophila* provoca un cambiamento caratteristico dell'aspetto dei puffs dei loro cromosomi politenici (Ritossa, 1962; Ashburner 1970), con l'apparizione di pochi nuovi puffs. Tissieres (1974), Lewis (1975) e McKenzie (1975) hanno dimostrato che a tale cambiamento corrisponde una modificazione della sintesi proteica: infatti la sintesi delle proteine normali risulta diminuita, mentre si osserva l'inizio o l'aumento di sintesi di alcune proteine specifiche, che questi autori hanno denominato proteine da shock termico (HSP). Risposte analoghe sono state riscontrate dopo

(*) Ricerche eseguite presso il Dipartimento di Biologia Sezione Zoologia Scienze Naturali dell'Università Statale di Milano, con contributo MPI e CNR (CT-820281904).

(**) Nella seduta del 12 maggio 1984.

shock termico anche in *Saccaromyces* (McAlister, 1980), in *Tetrahymena* (Fink, 1980), in *Dictyostelium* (Loomis, 1980), in *Polysphondilium* (Francis, 1980), in *Naegleria* (Walt, 1980), in culture di fibroblasti embrionali di pollo (Kelley, 1978), in culture di cellule di mammifero (Wang, 1981).

Il fenomeno è stato riscontrato anche in embrioni di *Drosophila* (Graziosi, 1980) e in embrioni di riccio di mare sottoposti, a diversi stadi di sviluppo, a brevi periodi di riscaldamento (Giudice *et al.*, 1980; Roccheri *et al.*, 1981).

Dal punto di vista morfologico i primi dati sugli effetti da shock termico nello sviluppo delle uova di anfibio (Hoadly, 1938) hanno messo in evidenza una maggiore resistenza degli embrioni al calore con il progredire dello sviluppo. Brachet (1949), su embrioni di axolotl, ha osservato un arresto irreversibile nello sviluppo in embrioni trattati allo stadio di blastula, mentre embrioni trattati alla gastrula, proseguono lo sviluppo, pur presentandosi malformati. Elsdale (1976) e Cooke (1978), hanno ottenuto anomalie dei somiti in embrioni di *Xenopus laevis* agli stadi di preneurula (dallo stadio 9 fino allo stadio 13 di N. e F.) sottoposti a shock termico di breve durata (4-8 minuti alla temperatura di 36-37°C). Entrambi hanno potuto dimostrare che le anomalie riscontrate nei somiti erano dovute ad una irregolare disposizione dei mioblasti e ad assenza o irregolarità dei confini intersomitici, mentre la differenziazione cellulare dei mioblasti era perfettamente regolare.

Nella nostra ricerca abbiamo voluto vedere quale fosse la risposta di embrioni di *Xenopus laevis* sottoposti a shock termico, sia da un punto di vista morfologico che biochimico.

MATERIALE E METODI

Embrioni di *Xenopus laevis* (Daudin), ottenuti mediante iniezione di gonadotropina corionica nel sacco linfatico dorsale, venivano suddivisi in lotti di 60 embrioni ciascuno, dallo stadio 6-7 (32-64 blastomeri) allo stadio 18 (neurula avanzata) di N. e F. e posti in soluzione di Holtfreter. La soluzione di Holtfreter veniva mantenuta per il lotto di controllo alla temperatura di 18°C, mentre veniva posta in termostato alle temperature di 24, 28, 33, 38°C prima di introdurre gli embrioni da trattare, in modo che lo shock a cui venivano sottoposti gli embrioni fosse istantaneo. In una seconda serie di esperimenti alla soluzione di Holtfreter è stata aggiunta actinomicina D alla concentrazione di 5 µg/ml. Dopo 60' di permanenza alle temperature indicate tutti i lotti di embrioni venivano riportati alla normale temperatura di allevamento di 18°C, dove rimanevano per altri 60', prima che si procedesse all'estrazione delle proteine totali in tampone Tris-HCl 10 mM pH 8. Gli estratti venivano quindi delipidati per aggiunta di etere e centrifugati; la fase acquosa veniva ripresa e ad essa si aggiungeva SDS e mercaptoetanolo fino alla concentrazione del 1%. La concentrazione proteica è stata determinata col metodo di Lowry.

Gli estratti così ottenuti venivano stratificati su gel di poliacrilamide al 10% preparato secondo il metodo di Laemmli (1970).

Soluzioni proteiche standard venivano stratificate come riferimento per la determinazione dei pesi molecolari. L'elettroforesi veniva condotta per i primi 30 minuti a voltaggio costante di 60 V e poi a 120 V per un totale di 7 ore.

Dopo l'elettroforesi la piastra veniva posta in un bagno di fissaggio e quindi co-

lorata con blue coomassie al 2% in alcool metilico 50% e acido acetico 10% e quindi decolorata mediante successivi passaggi in una soluzione di alcool metilico 50% ed acido acetico 10%.

Alcuni embrioni di ogni lotto allestito venivano lasciati sviluppare a 18°C per circa tre giorni (st. 34-38 di N. e F.); venivano poi fissati in liquido di Bouin ed inclusi in paraffina, tagliati in sezioni seriate dello spessore di 10% e colorati con ematossilina ed eosina.

RISULTATI

1) *Osservazioni morfologiche.*

Embrioni, sottoposti a shock termico a 38°C per 60' negli stadi precoci, precedenti la gastrulazione, presentano fenomeni di exogastrulazione e sopravvivono solo poche ore; mentre in embrioni trattati a questa stessa temperatura, dallo stadio di gastrula in poi, si ha una sopravvivenza di circa il 20%; tuttavia gli embrioni sopravvissuti presentano gravi malformazioni a carico di tutti gli organi e muoiono dopo non più di due giorni.

Embrioni sottoposti a shock termico per 60' alla temperatura di 33°C e di 28°C in stadi precedenti lo stadio di gastrula (dallo stadio 7 allo stadio 10 di N. e F.) non sembrano risentire del trattamento e si sviluppano normalmente (Tav. I, fig. 1 B e C). Embrioni sottoposti allo stesso shock termico allo stadio di gastrula iniziale (st. 10 di N. e F.) appaiono poco pigmentati e scarsi melanofori si possono ritrovare solo lungo una linea dorsale, sopra il sistema nervoso, o nel peritoneo dorsalmente ai visceri; gli occhi sono normalmente pigmentati. Qualora allo shock termico a 33° e 28°C vengano sottoposti embrioni dallo stadio di gastrula avanzata (st. 11 di N. e F.) in poi, fino allo stadio di tarda neurula (st. 18 di N. e F.) si possono osservare raccorciamento dell'asse embrionale, riduzione di calibro del sistema nervoso, occhi malformati, piccoli e spesso ectopici, in cui il tapetum nigrum appare come un epitelio continuo a volte non regolarmente pigmentato, ammassi di cellule pigmentate sono in alcuni casi in posizione abnorme, ad esempio anteriormente al cristallino (Tav. I, figg. 1 D e E, 2 e 3). Si osserva in generale una drastica diminuzione dei melanofori, come già descritto per lo shock in stadio precedente.

A volte i somiti appaiono disposti disordinatamente per il mancato sviluppo dei miofibrilli (Tav. II, figg. 4, 5, 6); le fibre muscolari, sebbene normalmente differenziate, risultano disordinate, non tutte tra loro parallele, conferendo al somite un aspetto spugnoso. Cooke (1978), con shock termici di minor durata a temperature più elevate, ha ottenuto risultati paragonabili, specie per quanto concerne i somiti.

2) *Osservazioni biochimiche.*

Il quadro elettroforetico delle proteine, estratte da embrioni sottoposti a shock termico a 33°C e 38°C allo stadio di segmentazione (32-64 blastomeri stadio 7 di N. e F.) per 60' e poi lasciati a sviluppare per un'ora a 18°C, non

fa notare differenze di rilievo rispetto al controllo. Si nota invece una intensificazione generalizzata dalle bande degli estratti ottenuti da embrioni trattati a 28°C (Tav. III, A).

Embrioni trattati alle temperature di 24°C e 28°C allo stadio di blastula (st. 9 di N. e F.), estratti immediatamente dopo uno shock di 60 minuti, presentano bande più colorabili rispetto al controllo. In particolare negli estratti proteici di embrioni così trattati risultano più evidenti le bande proteiche a peso molecolare intorno ai 100 kDa (chilodalton) e ai 30 kDa (Tav. III, B).

Se gli embrioni trattati allo stadio di blastula a 24°C e 28°C vengono riportati per un'ora dopo lo shock, alla normale temperatura di allevamento (18°C) l'intensificazione delle bande, in particolare la banda a peso molecolare 100 kDa, permane negli embrioni trattati a 28°C, mentre gli embrioni trattati a 24°C riacquistano un quadro proteico uguale a quello del controllo.

Gli embrioni trattati allo stadio di blastula a 38°C presentano, dopo un'ora di allevamento a 18°C, una riduzione notevole di quasi tutte le bande proteiche, mentre rimangono colorabili le due bande a 100 kDa e 30 kDa (Tav. III, C).

Anche negli embrioni trattati allo stadio di gastrula (st. 10 di N. e F.), il quadro proteico degli embrioni sottoposti a shock alla temperatura di 28°C presenta un incremento rispetto al controllo, mentre per le altre temperature sperimentate non si evidenziano particolari differenze (Tav. III, D).

Negli embrioni sottoposti a shock termico allo stadio di piastra neurale (st. 12½ di N. e F.) e poi mantenuti per un'ora a 18°C, la banda proteica a 100 kDa ben visibile nei controlli risulta notevolmente più intensa negli embrioni trattati a 28°C. In questi embrioni è ben colorabile anche la banda a 30 kDa (Tav. IV, E).

Allo stadio di neurula avanzata (st. 15 di N. e F.) e di pieghe neurali chiuse (st. 18 di N. e F.) è ancora evidente l'intensificazione delle bande negli embrioni trattati a 28°C; anche in questo caso l'aumento interessa le bande a peso molecolare 100 e 30 kDa (Tav. IV, F-G).

Dall'esame di questi dati, sembra che la temperatura di 28°C sia quella che maggiormente altera il quadro proteico degli embrioni a stadi precoci di sviluppo.

Si è voluto vedere se tale alterazione fosse dovuta a fenomeni di trascrizione e quindi si è aggiunto al liquido di coltura actinomicina D che inibisce la trascrizione.

A questo scopo sono stati allestiti lotti di embrioni, a diversi stadi, allevati per un'ora a 28°C, in presenza di actinomicina D alla concentrazione di 5 µg/ml e poi riportati per un'ora alla normale temperatura di 18°C, sempre in presenza di actinomicina D, prima di procedere all'estrazione delle proteine.

Dall'analisi dei quadri elettroforetici degli stadi presi in esame, si nota che negli embrioni sottoposti a shock termico a 28°C in presenza di actinomicina D, non si manifesta l'aumento di colorabilità delle bande a peso molecolare 100 e 30 kDa (Tav. IV, H).

Questo dato parla a favore di un aumento di sintesi di queste proteine, per effetto dello shock termico, realizzato grazie a trascrizione di RNA messaggeri,

che verrebbe bloccata dalla presenza dell'actinomicina D. Si parla di aumento di sintesi di proteine già esistenti e non di sintesi di nuove proteine, in quanto nella maggior parte degli stadi considerati, le due bande proteiche a 100 e 30 kDa sono presenti anche nei controlli sebbene in quantità decisamente inferiori.

CONCLUSIONI

Le proteine da shock termico messe in evidenza nello *Xenopus* sembrano essere polipeptidi sintetizzati in quantità minori anche da embrioni allevati alla normale temperatura di 18°C; non si tratta di nuove proteine per l'embrione, come già visto da Graziosi (1980) per la proteina a peso molecolare 84 kDa in embrioni di *Drosophila*.

Una proteina di peso molecolare 100 kDa caratterizzata come una glicoproteina, è stata identificata da Welch (1983) in culture cellulari di mammifero sottoposte a shock termici, e sebbene in quantità inferiore, anche in cellule allevate in condizioni normali.

L'aumento della quantità di proteine negli embrioni trattati a 28°C è evidenziabile anche a stadi di sviluppo precoci (segmentazione e blastula) stadi in cui non si è rilevata nessuna alterazione morfologica.

Dai dati presentati possiamo concludere che nello *Xenopus laevis* uno shock ad una temperatura di 10°C superiore alla normale di allevamento, è il più efficace sia nell'indurre alterazioni del quadro proteico, sia nell'indurre malformazioni.

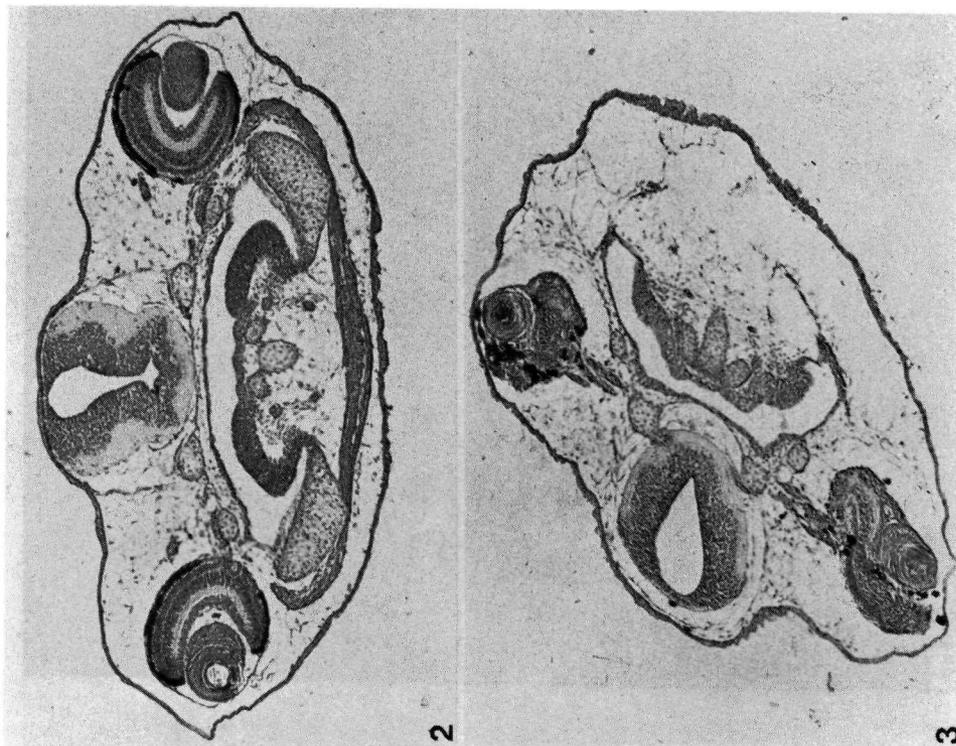
Un fenomeno simile è stato osservato da Giudice (1980) negli embrioni di riccio di mare, sottoposti a shock termico ad una temperatura di 10°C superiore alla normale di allevamento.

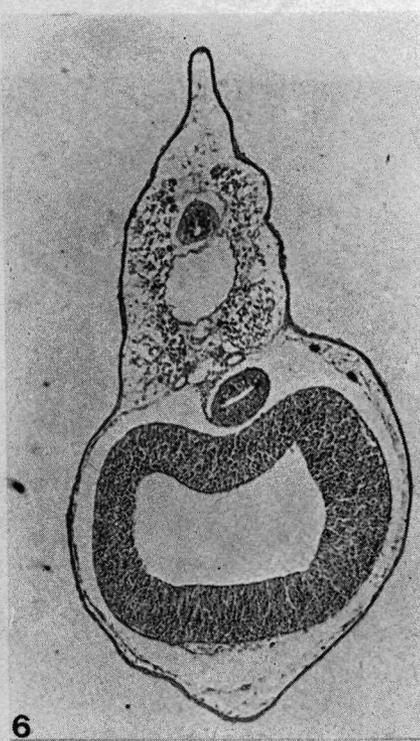
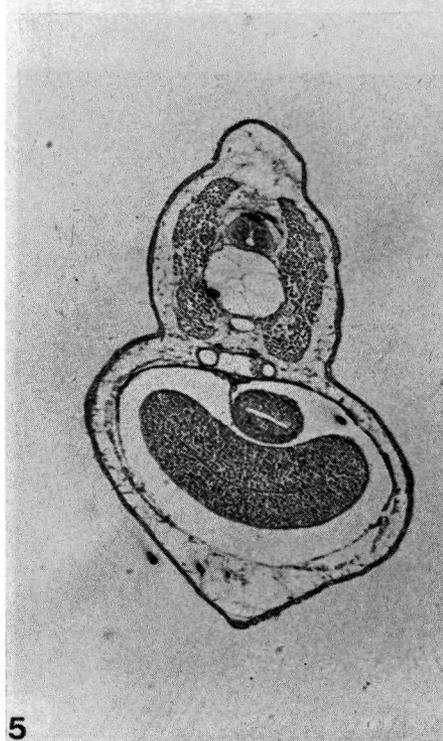
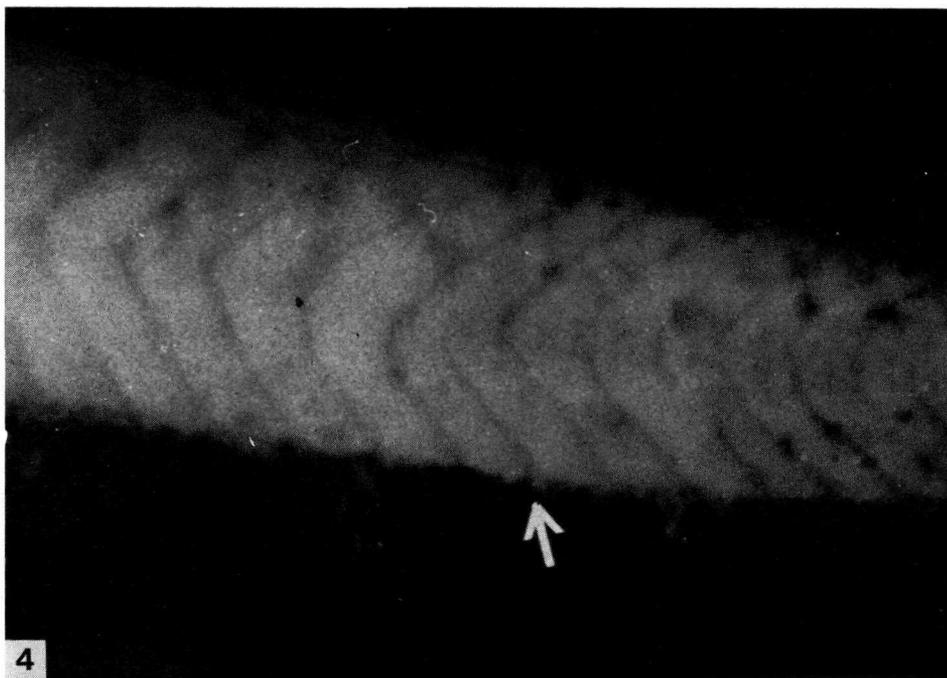
Gli autori ringraziano la Prof. M. Leonardi Cigada e il Prof. S. Ranzi per la revisione del manoscritto e il Dr. U. Fascio per la collaborazione fotografica.

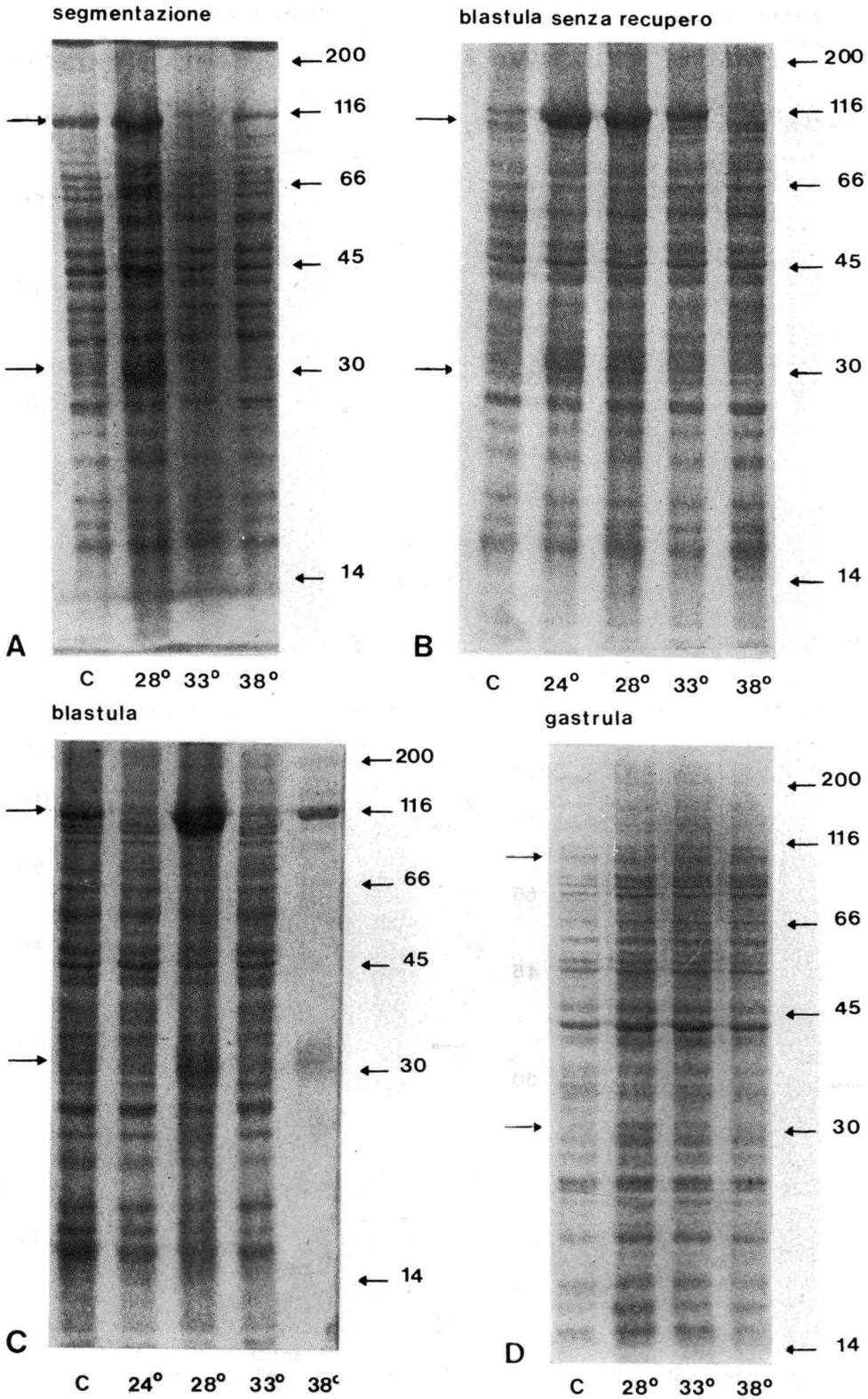
BIBLIOGRAFIA

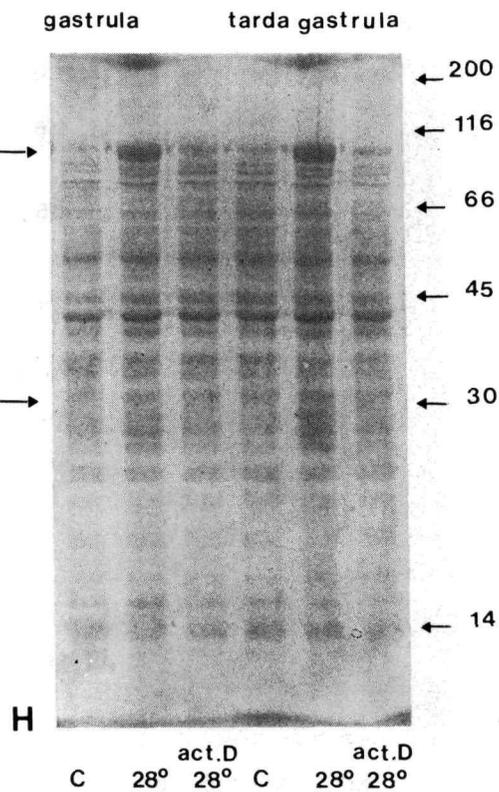
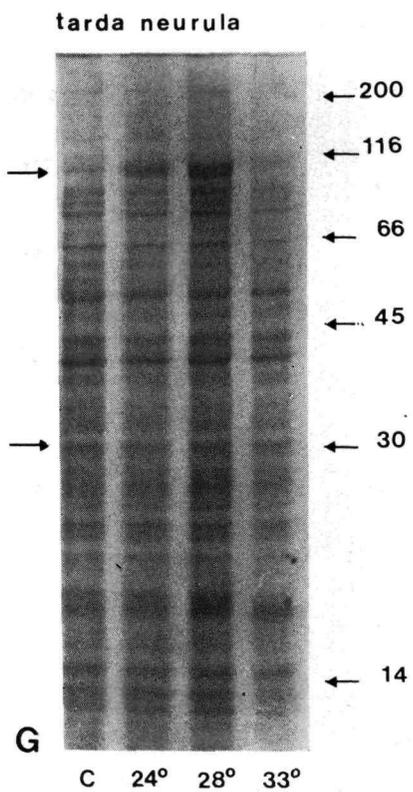
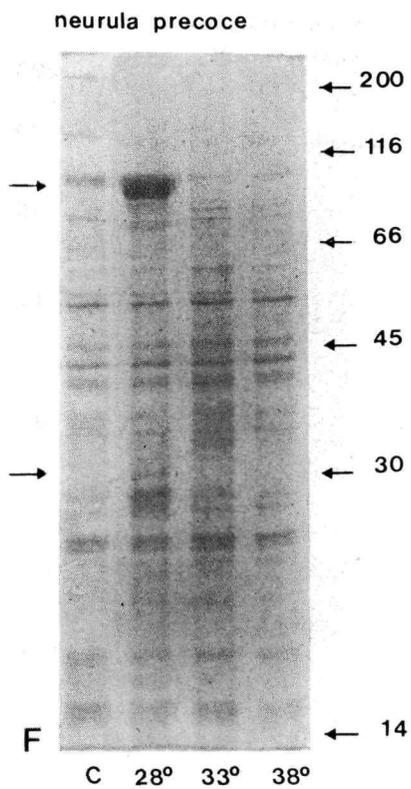
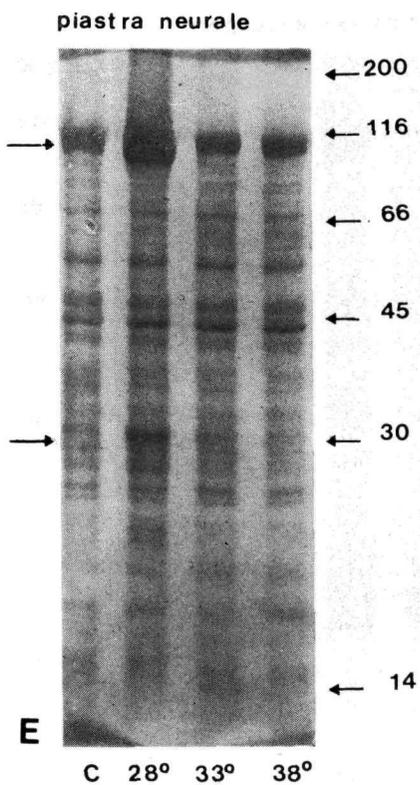
- ASHBURNER M. (1970) - *Patterns of puffing activity in salivary gland chromosomes of Drosophila*. V. *Response to environmental treatment*, « Chromosoma », 31, 356-376.
- BRACHET J. (1949) - *Les effets d'un choc thermique au stade gastrula sur la morphogénèse de l'axolotl*. *Comptes des séances de la Société de biologie*. Tome CXLIII, 1298-1300.
- COOKE J. (1978) - *Somite abnormalities caused by short heat shock to pre-neurula stages of Xenopus laevis*, « J. Embryol. exp. Morph. », 45, 283-294.
- ELSDALE T., PEARSON M. e WHITEHEAD M. (1976) - *Abnormalities in somite segmentation following heat shock to Xenopus embryos*, « J. Embryol. exp. Morph. », 35, 625-635.
- FINK K. e ZEUTHEN E. (1980) - *Heat shock proteins in Tetrahymena studied under growth conditions*, « Exp. Cell. Res. », 128, 23-30.
- FRANCIS D. e LIN L. (1980) - *Heat shock response in a cellular slime mold, Polysphondylium pallidum*, « Develop. Biol. », 79, 238-242.

- GIUDICE G., ROCCHERI M.C. e DI BERNARDO M.G. (1980) - *Synthesis of «heat shock» proteins in sea urchin embryos*, «Cell. Biol. Intern. Rep.», 4, 69-74.
- GRAZIOSI G., MICALI F., MARZARI R., DE CRISTINI F. e SAVOINI A. (1980) - *Variability of response of early Drosophila embryos to heat shock*, «J. Exp. Zool.», 214, 141-145.
- HOADLY L. (1938) - *The effect of supramaximum temperatures on the development of Rana pipiens*, «Growth», 2, 25-48.
- KELLEY P.M. e SCHLESINGER M.J. (1978) - *The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts*, «Cell», 15, 1277-1289.
- LAEMMLI U.K. (197) - *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄*, «Nature», 680-685.
- LEWIS M., HELSMING P.J. e ASHBURNER M. (1975) - *Parallel changes in puffing activity and patterns of protein synthesis in salivary glands of Drosophila*, «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 72, 3604-3608.
- LOOMIS W.F. e WHEELER S.A. (1980) - *Heat shock responses in Dictyostelium*, *Develop.*, «Biol.», 79, 399-408.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FAAR A.L. e RANDALL R.J. (1951) - *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, «J. Biol. Chem.», 193, 265-275.
- MCALISTER L. e FINKELSTEIN D.B. (1980) - *Heat shock proteins and thermal resistance in yeast*, «Bioch. Biophys. Res. Com.», 93, 819-824.
- McKENZIE S., HEMIKOFF S. e MESELSON M. (1975) - *Localization of RNA from heat induced polysomes at puff sites in Drosophila melanogaster*, «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 72, 1117-1121.
- NIEUWKOOP P.D. e FABER J. (1956) - *Normal table of Xenopus laevis*. North-Holland Publishing Company Amsterdam.
- RITOSSA F. (1962) - *A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in Drosophila*, «Exp.», 18, 571-573.
- ROCCHERI M.C., DI BERNARDO M.G. e GIUDICE G. (1981) - *Synthesis of heat-shock proteins in developing sea urchins*, «Develop. Biol.», 83, 173-177.
- TISSIERES A., MITCHELL H.K. e TRACY U.M. (1974) - *Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster. Relation to chromosome puffs*, «J. Mol. Biol.», 84, 389-398.
- WALSH C. (1980) - *Appearance of heat shock proteins during the induction of multiple flagella in Naegleria gruberi*, «J. Biol. Chem.», 255, 2629-2632.
- WANG C., GOMER R.H. e LAZARIDES E. (1981) - *Heat shock proteins are methylated in avian and mammalian cells*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 78, 3531-3535.
- WELCH W.J., GARRELS J.I., THOMAS G.P., LIN J.J.C. e FERAMISCO J.R. (1983) - *Biochemical characterization of the mammalian stress proteins and identification of two stress as glucose and Ca²⁺-ionophore regulated proteins*, «J. Biol. Chem.», 258, 7102-7111.









SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-IV

TAVOLA I

- Fig. 1. – A) Embrione allo stadio 35/36 di N. e F. allevato a 18°C (controllo).
B) Embrione sottoposto a shock termico a 33°C per un'ora allo stadio 10.
C) Embrione sottoposto a shock termico a 28°C per un'ora allo stadio 10.
D) Embrione sottoposto a shock termico a 28°C per un'ora allo stadio 12.
E) Embrione sottoposto a shock termico a 28°C per un'ora allo stadio 16.
F) Embrione sottoposto a shock termico a 38°C per un'ora allo stadio 16.
- Fig. 2. – Sezione trasversale a livello delle vescicole ottiche di embrione controllo allo stadio 35/36.
- Fig. 3. – Sezione trasversale a livello delle vescicole ottiche di embrione sottoposto a shock termico a 28°C per un'ora allo stadio 12.

TAVOLA II

- Fig. 4. – Somiti di embrione sottoposto a shock termico a 28°C per un'ora allo stadio 12. La freccia indica due somiti non completamente separati per il mancato sviluppo del miosetto nella porzione dorsale.
- Fig. 5. – Sezione trasversale a livello del tronco di embrione controllo allo stadio 35/36 allevato a 18°C.
- Fig. 6. – Sezione trasversale a livello del tronco di embrione sottoposto a shock termico a 28°C per un'ora allo stadio 12.

TAVOLE III e IV

Quadro elettroforetico dell'estratto proteico di embrioni di *Xenopus laevis* a diversi stadi di sviluppo sottoposti a shock termico (la temperatura di shock è indicata alla base di ogni colonna); C indica il controllo. Lo stadio a cui lo shock è stato effettuato è indicato sopra ogni piastra. I valori dei pesi molecolari degli standards, espressi in chiloDaltons, sono riportati a destra di ogni piastra. Le frecce a sinistra di ogni piastra indicano le posizioni delle proteine esaltate dallo shock termico.