

On Protein Synthesis During the Development of Lithium-Treated Embryos

Lithium chloride (LiCl) induces in embryonic development peculiar malformations¹; to analyze LiCl action from a biomolecular point of view 2 kinds of experiments have been performed².

The action of LiCl, of 2 inhibitors of transcription process (actinomycin D and daunomycin) and of an inhibitor of the process of translation (puromycin) were studied.

Materials and method. The first series of experiments was carried out on chick embryos explanted at a primitive streak stage and cultured, according to NEW, on albumen and Pannet Compton solution containing LiCl (0.01 M) or actinomycin D (0.02 µg/ml) or daunomycin (2 µg/ml) or puromycin (2.5 µg/ml).

In a second series of experiments 550 embryos of *Xenopus laevis* were treated at stage 18 of NIEUWKOOP and FABER³ with daunomycin 5 µg/ml, or puromycin 5 µg/ml or lithium chloride 0.01 M for 12 h at 18°C (controls reared in spring-water). After having been washed for 24 h at 18°C with 50 ml of spring-water they

were labelled with 0.5 mc of C14 labelled protein hydrolysate. When the embryos were at stage 35–36 of NIEUWKOOP and FABER, the reaction was stopped with ice-cold spring-water before suspending them in 4 volumes of cold buffer (0.01 M Tris, pH 7.4; 0.001 M MgCl₂; 0.001 M mercaptoethanol). They were homogenized and sedimented at 12,000 g for 20 min. Sodium deoxycholate was added to the supernatant to give a concentration of 0.5%. The suspension was centrifugated for 10 min at 12,000 g before layering on a linear sucrose gradient (15–30% by weight) in the same buffer. Gradients were

¹ Bibliography in S. RANZI, in *The Beginnings of Embryonic Development* (Ed. A. TYLER, R. C. VON BORSTEL and C. B. METZ; AAAS, Washington 1957), p. 291.

² This investigation was supported by a grant from the Consiglio Nazionale delle Ricerche.

³ P. D. NIEUWKOOP and J. FABER, *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)* (North Holland Publ. Comp., Amsterdam 1956).

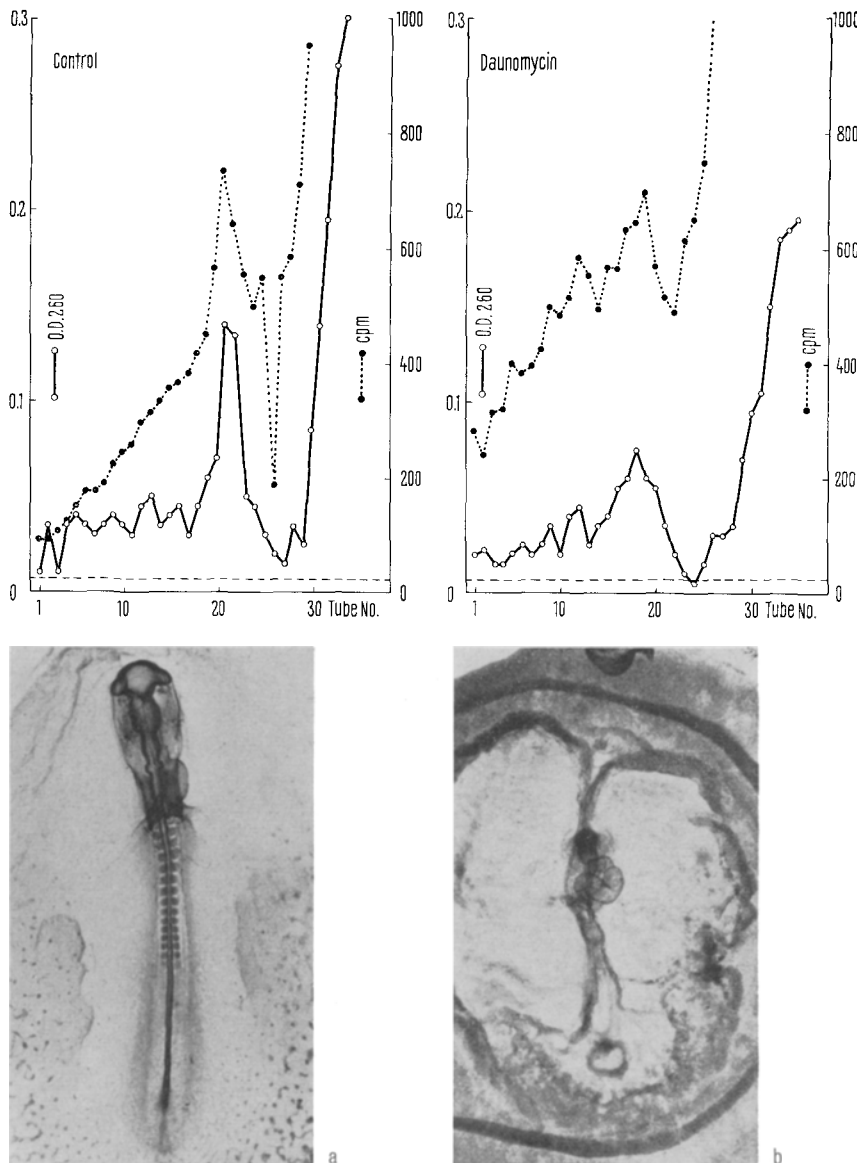


Fig. 1. Sedimentation pattern of control (a) and daunomycin-treated embryo (b) (*Xenopus*). Below the diagrams the corresponding chick embryos.

centrifuged at 25,000 rpm in an SW-25 rotor of a Spinco model L ultracentrifuge for $3\frac{1}{2}$ h at 0°C . The fractions were collected with a dropper needle and they were recorded at 260 nm on a Beckman spectrophotometer. Nucleic acids and proteins were precipitated from each fraction with trichloroacetic acid at a final concentration of 5% adding seroalbumin (final concentration of 3%). The precipitate was collected on Millipore filters HAWP 02500. The radioactivity was counted in a Tracerlab gas flow counter.

Results and discussion. Chick embryos treated with actinomycin D or daunomycin presented quite identical malformations, the more affected organs were neural tube and somites. The heart was always large and well developed; the hemoglobin was present in nearly all treated embryos (Figure 1).

Embryos treated with puromycin retarded their development. The nervous system appeared smaller in comparison with the controls and the heart was also inhibited. The hemoglobin was frequently absent (Figure 2).

Embryos treated with LiCl presented very different abnormalities, i.e. omphalocephalic, cyclopic (Figure 2) and platineuric embryos⁴.

In the second series of experiments, embryos were treated with the substances recorded above and sedimentation patterns in sucrose gradients of the ribosomal fractions were studied.

These experiments were carried out on chick, frog and *Xenopus* embryos, and for all these animals results seem to be the same. At the moment a complete set of diagrams is available on *Xenopus laevis* embryos, which is why the data on these embryos are reported here (Figures 1 and 2).

Actinomycin D and daunomycin action appear evident in the transcription process, but after treatment the incor-

⁴ The malformations are described by G. NICOLET, Acta Embryol. Morph. exp. 8, 32 (1965) and R. LEANI COLLINI and S. RANZI, Atti Accad. naz. Lincei Memorie 8, 47 (1967).

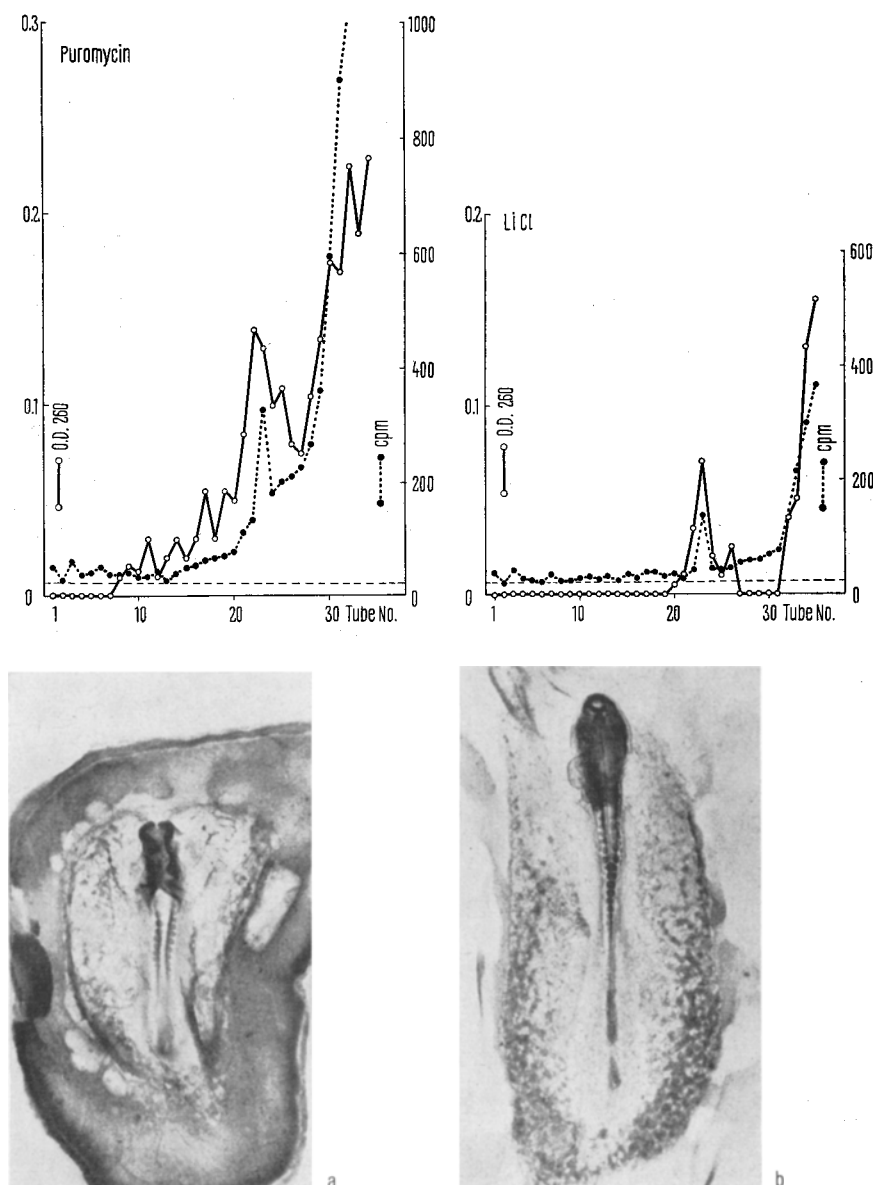


Fig. 2. Sedimentation pattern of puromycin- (a) and LiCl-treated embryo (b) (*Xenopus*). Below the diagrams are the malformations induced in chick embryo by the substances.

poration of protein hydrolysate-C14 does not differ greatly from the incorporation of the controls. Puromycin induces a marked inhibition of incorporation of protein hydrolysate-C14. Lithium chloride inhibits both processes: the ribosome synthesis and the protein hydrolysate incorporation.

To test the nature of LiCl action, which appears as non-specific on the gradient, a preparation of rabbit liver ribosomes was treated overnight with daunomycin or puromycin or LiCl at the same concentrations as those used to obtain developmental malformations. The suspension viscosity read on the Ostwald viscosimeter was: untreated ribosomes η_{sp} 0.082; daunomycin-treated ribosomes η_{sp} 0.093; puromycin-treated ribosomes η_{sp} 0.098; LiCl-treated ribosomes η_{sp} 0.107, that is an increase in viscosity of 30.5% induced by LiCl. This increase can be related to a large water coat of the Li bound to the ribosomes. Consequently LiCl action on protein synthesis seems to be the action discovered by RANZI⁵ on protein molecules treated with LiCl.

Riassunto. L'actinomicina D, la puromicina e il LiCl producono, agendo nei primi stadi dello sviluppo dell'embrione di pollo, malformazioni caratteristiche differenti nei 3 casi. I diagrammi di sedimentazione di preparati di ribosomi dimostrano l'azione dell'actinomicina D e della daunomicina sulla sintesi del RNA e della puromicina sulla sintesi proteica. Il LiCl agisce invece inibendo entrambi i processi con un meccanismo che sembra correlato all'alone di idratazione che i suoi ioni determinano intorno ai ribosomi.

F. DE BERNARDI, M. LEONARDI CIGADA,
R. MACI and S. RANZI

Laboratorio di Zoologia, Università statale,
20133 Milano (Italy), 20 June 1968.

⁵ S. RANZI, Adv. Morph. 2, 211 (1962).

Beeinflussung der Borstendifferenzierung und Musterbildung durch Mitomycin bei *Drosophila melanogaster*

Das Antibiotikum Mitomycin C blockiert die DNS-Synthese und damit die Zellteilung, während die RNS- und die Proteinsynthese zunächst unbeeinflusst bleiben¹. Da die Transdeterminationsfrequenz² in Imaginalscheibenblastemen von *Drosophila* mit der Proliferationsleistung positiv korreliert ist³, schien die Frage von Interesse, ob und wie das Mitomycin die Determinations- und Differenzierungsprozesse von Imaginalanlagen während der Metamorphose verändere.

Verpuppungsreifen *Drosophila*-Larven (ca. 100 h nach Eiablage bei 25°C) vom Wildstamm «Sevelen» wurde ca. 0,1 µl einer isotonischen Lösung von Mitomycin C injiziert. Die verschiedenen Konzentrationen variierten von 0,01–1 mg/ml, während in Kontrollversuchen eine gleiche Menge Ringerlösung in die Larven injiziert wurde. Wie die Tabelle zeigt, sinkt die Überlebensrate mitomycinbehandelter Tiere mit steigender Konzentration beträchtlich. Bei der höchsten verwendeten Konzentration von 1 mg/ml vermochte keine einzige Fliege ihr Puparium zu verlassen. Wie sich aber bei der Sektion der Puppen zeigte, überlebten die Tiere die Operation, und die verschiedenen Teile des Fliegenkörpers waren in den meisten Fällen völlig ausdifferenziert. Dabei machten wir die überraschende Feststellung, dass fast alle Borsten sockellos sind (Figuren 1a und 2a). Bei der stärksten verwendeten Konzentration von 1 mg/ml wird die Differenzierung von Borstensockeln mit Ausnahme weniger «Durchbrenner» vollständig unterdrückt. Das Mitomycin verhindert die Sockelbildung bei folgenden Integumentstrukturen: Kopf, Antennen, Thorax, Flügel, Beine und äussere Genitalien. Merkwürdigerweise jedoch wird die Normogenese von Abdominalborsten bei der gewählten Versuchsanordnung nicht beeinflusst. Alle Borstenorgane sind, sofern sich Abdominalstrukturen bei der hohen Mitomycinkonzentration überhaupt noch zu differenzieren vermögen, völlig normal ausgebildet. Die Differenzierung sockelloser Borsten beruht auf der spezifischen Wirkung des Mitomycins. Wie noch unveröffentlichte Befunde aus unserem Institut⁴ zeigen, führt ein anderes Experiment zum selben Resultat: Bein-Imaginalscheiben aus verpuppungsreifen Larven, die in Mitomycinlösung überführt und anschliessend in die Leibes-

höhle von Wirtslarven implantiert wurden, differenzieren ebenfalls sockellose Borsten.

Aristen, Tarsalklauen sowie Haare (Trichome) werden vollständig normal und anscheinend unbeeinflusst durch das verwendete Mitomycin ausgebildet. Dagegen fehlen mit den Sockeln auch die neben den Borsten der distalen Beinteile und der basalen Flügelcosta auftretenden Schuppen («bracts»). Da das Gen «multiple wing hairs» (mwh) ausser den Haaren der Flügelspreite und des übrigen Integumentes auch die «bracts» modifiziert, sind Trichome und «bracts» als homologe Strukturen zu deuten⁵. Zwischen der Ausbildung von Borstensockeln und «bracts» besteht aber, wie die Figur 3 belegt, eine sehr enge Beziehung. Bei der verwendeten Mitomycinkonzentration von 0,1 mg/ml sind ca. 70% der Beinborsten sockellos. Sämtlichen sockellosen Borsten fehlen aber auch die «bracts», während vollständig normal differenzierte Borsten distaler Beinteile in der Regel von

Einfluss verschiedener Mitomycinkonzentrationen auf die Schlüpf-rate von Imagines

Konzentration der injizierten Mitomycinlösung mg/ml	Anzahl injizierter Larven n	Anzahl geschlüpfter Fliegen %
0,01	23	43
0,1	26	19
1	34	0
Kontrolle: Ringerlösung	30	94

¹ Vgl. M. J. WARING, Nature 219, 1320 (1968).

² E. HADORN, Brookhaven Symp. Biol. 78, 148 (1965).

³ H. TOBLER, J. Embryol. exp. Morph. 16, 609 (1966).

⁴ H. TOBLER und M. PFLUGER, in Vorbereitung.

⁵ B. PEYER und E. HADORN, Arch. Julius-Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. 7, 19 (1965).