

Efecte dels solubilitzadors de membrana a
la incorporació de timidina exògena a planària

Joan Collet.

Departament de Genètica, Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona, Diagonal, 645, Barna-28.

Introducció:

La incorporació de timidina (TdR) exògena en el DNA és una tècnica molt útil i emprada en estudis de llinatge cel·lular, cinètica cel·lular, metabolisme del DNA, ... En el cas de planària la seva aplicació podria ajudar a resoldre un contenciós llargament discutit: l'origen de les cèl·lules del blastema de regeneració.

Des ja fa temps, s'ha observat per tècniques autoradiogràfiques que les cèl·lules de planària practicament no incorporen ³H-TdR (Baguña i altres, dades no publicades), malgrat de tenir TdR kinasa, Coward et al. (1970).

S'han barallat una sèrie d'hipòtesis per explicar aquesta anòmala circumstància. L'existència d'un alt "pool" intracel·lular de TTP podria "diluir" el TTP format a partir de la TdR exògena alhora que faria un feed back sobre la TdR kinasa. Una altra possibilitat fora que la membrana cel·lular fos impermeable a la timidina exògena. Amb l'ús de solubilitzadors de membrana existiria la possibilitat de que aquest impediment fos superat.

La present comunicació es proposa discutir els efectes del dimetil sulfòxid (DMSO) en la taxa d'incorporació de ³H-TdR. Un estudi previ revelar al DMSO com el solubilitzador més eficient a unes concentracions no letals (dades personals). Aquest agent fusogenic s'usa com inductor de fusions cel·lulars, Moorwood i Zeigler (1982), com a facilitador del transport de substàncies exògenes a través de les membranes de les cèl·lules dels embrions de *Drosophila*, Arking i Parente (1980).

Com es discutirà més avall, malgrat que els efectes del DMSO són notables sobre tot a nivell del "pool" de nucleòtids, els resultats obtinguts no són tot a satisfactoris que seria de desitjar.

Material i Mètodes:

El nucleòtid radioactiu ³H-TdR (act. esp. 16.6 Ci/mmol) fou administrat per Amersham. El líquid de centelleig

usat era Supersolve (Koch Light Lab.). Tots els productes analítics eran Merck, mentre no s'especifica el contrari.

Tots els experiments es feren amb una mateixa espècie de planària asexualada Dugesia (G) tigrina, totes de similar llargada (10mm) i provinents de la mateixa població. Aquesta es va dividir en tres grups. El primer estava compost de planàries intactes. El segon era de planàries que havien sigut tellades en 6 trossos iguals i que portaven regenerant 9 hores; l'elecció d'aquest temps de regeneració obeeïa a que s'ha trobat el pic de síntesi de DNA, posat de manifest per marcatje amb ^{32}P , entre les 9-12 hores, Martelly et al. (1981). El tercer grup estava format per planàries intactes, les quals es dissociaven en tripsina (1%, Difco) en una solució lliure de Ca^{++} i Mg^{++} (CMF) durant 5 h. a 17° . Després d'aquests tractaments previs, els tres grups de planàries estaven en condicions per la incubació.

Els animals intactes i els regenerants de 9 h. es posaven en una solució salina en presència de 3% DMSO i $30\ \mu\text{Ci/ml}$ de $^3\text{HTdR}$. La incubació era a 17° durant 3 hores. Simultaneament es feia un control amb planàries tractades igual, però incubades en $^3\text{H-TdR}$ sense DMSO. Després els animals es rentaven abundantment en solució salina, per seguidament procedeix a l'extracció del DNA i del "pool" de nucleotids.

El sediment cel.lular, obtingut de la dissociació del tercer grup de planàries, es resuspensia en un mitjà de cultiu (55 mM, Schneider's Drosophila Medium, Gibco) amb fungicina (1.25 mcg/ml Gibco), suero fetal (10 %, Gibco) i kanamicina (0.001%, Sigma) a pH 7.4 en presència de DMSO (0.1%). Es fa un control sense DMSO. Després de 2 hores d'incubació en $5\ \mu\text{Ci/ml}$ $^3\text{H-TdR}$, les cèl.lules són rentades de 3-5 cops amb una solució isotònica de la manera com descriu Bray et Brent (1972). Amb el sediment cel.lular obtingut es procedeix a l'extracció dels nucleotids i del DNA.

Mesura de la radioactivitat en el DNA:

Tan el sediment cel.lular com les planàries homogeneitzades són tractades amb HClO_4 0.4M durant 30' a 0° . Un cop centrifugat, de la fracció àcida precipitable s'extreuen els àcids nucleics per el mètode de Schneider revisat per Hutchison et al. (1961).

Una alíquota del sobrenadant que conté els àcids nucleics hidrolitzats es fa servir per mesurar la radioactivitat i una altra s'usa per fer la determinació del DNA segons Burton (1956).

Mesura de la radioactivitat de la fracció àcida soluble:

La fracció àcida soluble obtinguda després de la precipitació de les macromolècules amb àcid perclòric fred és neutralitzada com descriu Bagnara and Finch (1972). Una alíquota es fa servir per mesurar la radiactivitat total del "pool" de nucleotids.

Per estudiar la distribució de la radiactivitat a nivell dels diferents timidín nucleotids, nucleòsid i base s'utilitza el mètode de separació cromatogràfica de capa fina en plaques de PEI cel.lulosa, Baudendistel et al. (1978). S'apliquen en l'origen 20 μ L. de la fracció soluble neutralitzada junt a 10 μ L. d'una barreja de TTP, TDP, TMP, TdR i T (2 mM) no radiactius. El solvent utilitzat era 0.1M LiCl/ 0.06M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Es fa córrer en una dimensió fins a una distància de 12 cm. de l'origen. Cada taca obtinguda es retallada i posada a contar en un líquid de centelleig basat en tolué.

Resultats:

Efecte del DMSO en la taxa d'incorporació de ^3H -TdR en el DNA:

Les dades obtingudes estan resumides en el quadre I. Es pot observar que practicament no hi ha variació en la radiactivitat incorporada en presència de DMSO respecte a un control sense ell.

	C.P.M. ^3H -DNA/ mcg. DNA		
	INTACTES	REGENERANTS	DISOCIATS CEL.LULARS
CONTROL	12 \pm 3.7	240 \pm 31.9	23 \pm 4.2
DMSO	52 \pm 10.1	350 \pm 40.0	25 \pm 4.2

CUADRE I

Cal destacar la diferència d'incorporació entre planàries intactes i planàries regenerant. Tot i l'ús de DMSO, en planàries intactes mai s'aconsegueixen marcatges similars als obtinguts en regenerants sense solubilitzador.

Efecte del DMSO en la taxa d'incorporació de TdR en la fracció àcida soluble:

L'efecte del DMSO en quant a la incorporació de radiactivitat a la fracció àcida soluble és molt més dràstic que en el cas de la incorporada al DNA (taula II).

	c.p.m. ^3H -Nucleotids/ mcg. DNA		
	INTACTES	REGENERANTS	DISOCIATS CEL.LULARS
CONTROL	750 \pm 52.1	2800 \pm 205.3	756 \pm 53.4
DMSO	1675 \pm 180.5	5000 \pm 270.8	857 \pm 60.2

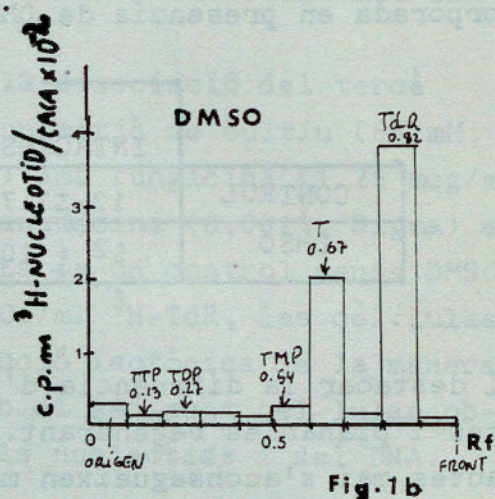
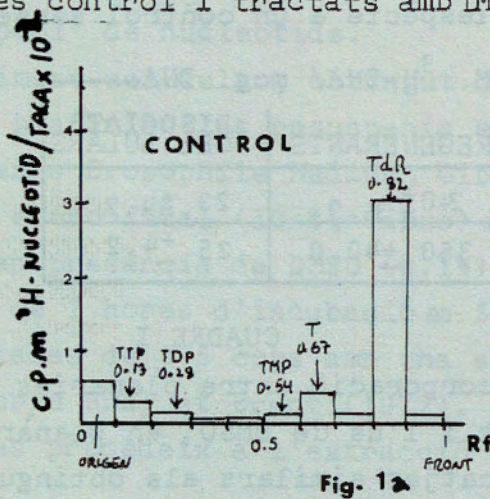
QUADRE II

Com anteriorment, la incorporació que provoca el fet de que una planaria estia regenerant és molt superior a qualsevol efecte del DMSO.

En dissociats cel.lulars no s'observa cap efecte del DMSO; cal posar èmfasi en la baixa concentració de DMSO (0.1%) a que es treballa en dissociats cel.lulars que podria explicar la manca de diferències respecte al control.

Compartimentalització de la radioactivitat a nivell de nucleotids:

Pel metode descrit de fraccionament del "pool" de nucleotids s'obtenen bones resolucions dels derivats fosfatats de timidina, d'ella mateixa i de llur base. Les figures 1a i 1b mostren tan els Rf com la distribució de la radioactivitat a animals intactes control i tractats amb DMSO.



Dos aspectes destaquen de sobremanera. El 80-90% de la radioactivitat total està incorporada a nivell de TdR en animals control. Pràcticament no existeix radioactivitat a nivell de TTP, al contrari de lo que succeeix en cèl.lules de mamífers on el 90% de la radioactivitat està situada a nivell de TTP, Hauschka(1973).

L'altre aspecte interessant es dona en el cas del DMSO. A nivell de timina apareix el 30% de la radioactivitat total i a ni-

vell de la TdR hi ha el 65%. Aquest resultat pot donar suport a la idea de que un tant per cent força alt de la TdR s'està catalitzant cap a T i posteriorment cap a CO_2 i H_2O , en lloc de seguir la ruta metabòlica cap a TTP com en la majoria de les cèl.lules que tenen TdR kinasa.

Discussió:

En planàries regenerant la incorporació de la TdR en el DNA mostra un increment brusc respecte a planàries intactes. Aquest augment es degut a la sincronització cel.lular que provoca la amputació d'una planària.

L'ús de detergents, en concret el DMSO a concentracions permissives, es revela com un mètode eficaç per incrementar l'entrada de TdR exògena, el que a la llarga provocara un increment de la radioactivitat incorporada en el DNA.

El fet de que el 85% de la radioactivitat de la fracció àcida soluble està a nivell de TdR dona peu a pensar que en realitat aquesta TdR exògena no arriba mai a entrar dins de la cèl.lula. Per veure aquest darrer punt, actualment s'esta treballant en el sentit de veure quin % d'aquesta radiactivitat és extracel.lular i quin és intracel.lular. Les planàries intactes, un cop incubades en ^3H -TdR durant 3 h., es treuen de la solució radioactiva i es disocian o bé en 1% tripsina (com s'esmenta més amunt) o bé per maceració durant 5-7 h. a 0° . Els resultats parcials obtinguts indiquen que el 96% de la radiactivitat és extracel.lular. Arabé nosaltres no excluim la possibilitat de que durant les 5-7 hores que dura la disociació, la membrana cel.lular no quedi afectada, produint-se així la sortida cap al fora de la cèl.lula de la TdR que havia entrat.

Per tal de verificar el possible rol del "pool" intracel.lular de TTP en la deficiència de ^3H -TdR incorporada al DNA de planària, estem abordant aquest aspecte des una doble vessant. Per una banda, mitjancat l'acció d'inhibidors de la síntesi de DNA (5'-Fluorouracil, 5'-Fluoro-2'-Deoxyuridine,...) que provoquen una devallada del "pool" de TTP. Així podrem fer desaparèixer els efectes negatius que te sobra l'entrada de TdR exògena dins de la cèl.lula un alt contingut de TTP. Des d'un altre costat, l'intent de quantificació de la TTP intracel.lular, mitjancat

HPLC, i veure els efectes del DMSO i dels inhibidors de la síntesi de DNA sobre el "pool" de TTP, ens pot donar molta informació respecte al problema. Creiem que amb l'enfoc esmentat, podrem donar una resposta satisfactoria a la baixa taxa d'incorporació de la TdR exògena en el DNA que presenten les planàries.

Bibliografia:

- ARKING R. & PARENTE A. (1980). Effects of RNA inhibitors on the Development of Drosophila Embryos Permeabilized by a New Technique. J. Exp. Zool. 212: 183-94.
- BAGNARA A.S. & FINCH LL.R. (1972). Quantitative extraction and estimation of Intracellular Nucleoside Triphosphates of Escherichia coli. Anal. Biochem. 45: 24-34.
- BAUDENDISTEL L.S. & RUH T.S. (1978). Thin Layer Chromatographic Separation of Thymine nucleoderivates using a one step, constant-concentration elution technique. J Chrom. 148: 500-3.
- BRAY G. & BRENT T.P. (1972). Deoxyribonucleoside 5' triphosphate pool fluctuations during the mammalian cell cycle. B.B.A. 269: 184-91.
- BURTON K. (1956). Estudy of the conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid. Biochem. J. 62: 315-23.
- COWARD S.J., HIRSH F.M. and TAYLOR J.H. (1970). Thymidine kinase Activity during Regeneration in Planarian Dugesia dorotocephala. J. Exp. Zool. 173: 269-78.
- HAUSCHKA P.V. (1973). Analysis of Nucleotide pools in animal cells. Methods in Cell Biology VII: 361-462.
- HUTCHISON & MUNRO H.N. (1961). The Determination of Nucleic Acids in Biological Materials. Analyst, 86: 768-813.
- MARTELLY I., REY C. and LEMOIGNE, A. (1981). Planarian regeneration: DNA metabolimin adults. Inter. J. Invert. Reprod., 4: 107-21.
- NORWOOD T.H. & ZEIGLER C.J. (1982). The Use of DMSO in Mammalian Cell Fussion. Techniques Somatic Cell Genetics.:35-45.