

Marcadors proteics específics per a neoblasts i cèl.lules diferenciades de la planària *Dugesia(G)tigrina*

M.C. Auladell, J. Collet i J. Baguñà
Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,
Diagonal 645, Barcelona-28.

Abstract

Specific protein markers of neoblasts and differentiated cells in the planarian *Dugesia(G)tigrina*

The understanding of pattern formation and cell differentiation during planarian regeneration would be greatly enhanced if specific cell markers were known. This would allow to follow specific cell lineages, to trace the origin of blastema cells, to assess the role of undifferentiated stem-cells (neoblasts), and to characterize specific gene products of interest.

As a first step aimed to this goal, we have isolated and purified undifferentiated cells (neoblasts) and differentiated cells by serial filtration through nylon meshes and discontinuous Ficoll density gradients respectively (purity 95%). Soluble (30.000g supernatant) and particulate proteins solubilized by NP-40 (from 30.000g pellet) from both kind of cells were studied by two-dimensional electrophoresis (O'Farrell, 1975).

The pattern obtained show several (12 %) polypeptides limited to one or another kind of cells. We have detected 11 specific soluble proteins of neoblasts and 8 of differentiated cells. Also, 13 particulate proteins were found specific to neoblasts and 9 were found only in differentiated cells. Moreover, differences between soluble and particulate fractions within each population were also evident.

All together, this opens the way to characterize specific markers for each population of cells in planarians and, eventually, to isolate them.

Introducció

A planària ha sigut ben establerta l'existència de dues poblacions cel·lulars de d'un punt de vista funcional: cèl.lules indiferenciades (neoblastes) i cèl.lules diferenciades.

Nombroses dades indirectes han suggerit que els neoblastes actuarien com a cèl.lules-soca dels 12-15 tipus cel·lulars diferenciats en el turnover cel·lular diari (Baguñà, 76). Al temps, s'ha suggerit també, que el neoblast tindria un paper clau en la formació del blastema de regeneració (Pedersen, 72). Per altre banda, hi ha dades però que fan pensar que les cèl.lules diferenciades, sobretot durant la regeneració, podrien sofrir processos de desdiferenciació transformant-se en cèl.lules indiferenciades (Gremigni i Miceli, 80). Un primer pas per arribar a discernir entre les dues hipòtesis seria trobar marcadors específics per a cada població cel·lular. Per això, s'ha analitzat per electroforesi bidimensional (O'Farrell, 75; i modificat posteriorment per Tollaksen i col, 81; i Garrels, 83), el contingut proteic dels neo

blastos enfront al de les cèl.lules diferenciades separades per gradients discontinuus de Ficoll i per filtració, tenint en compte dues fraccions sub cel.lulars: fracció soluble (sobrenadant 30.000g) i fracció solubilitzada per Nonidet P-40 (sediment 30.000g).

Material i mètodes:

Les planàries utilitzades foren de l'espècie Dugesia (G) tigrina. Una setmana abans de ser utilitzades es mantenien en dejuni en una solució salina filtrada en Millipore 0.22 μ m que contenia 50 μ gr./ml. gentamicina.

Purificació cel.lular:

La suspensió cel.lular s'aconseguia a partir de la dissociació de stocks de 100 planàries (de totes mides) en solució lliure de Ca^{++} i Mg^{++} (CMF) durant tota la nit a 12°C. La suspensió final (CT:cèl.lules totals) contenia de 1.5 a 2.5 x 10⁷ cèl.lules.

(a) Separació de les fraccions cel.lulars en gradients discontinuus de Ficoll per centrifugació: Els tipus cel.lulars varen ser aïllats bàsicament segons DeSutter i Buscema (77). Les fraccions del gradient eran de 10 ml. del 20, 15, 12, 9, 6 i 3% de Ficoll (Pharmacia Fine Chemicals) en CMF i es centrifugaven durant 45' a 2.000g. S'obtenien fraccions enriquides de cèl.lules diferenciades i neoblastes (Auladell, 83).

(b) Filtració successiva a través de malles de Nylon: Per aconseguir un més alt enriquiment i rendiment de la fracció de neoblastes es va fer servir el mètode de filtració successiva a través de malles de Nylon de diàmetre de 180, 52 i 5 μ m. (Auladell, 83).

Preparació de la mostra:

Poblacions de cèl.lules purificades (indiferenciades i diferenciades) es tractaren segons Kramer i Erikson (82). De cada població cel.lular s'obtenien dues fraccions proteiques lliures d'àcids nucleics: fracció soluble (FS: sobrenadant d'una centrifugació a 30.000g 60') i fracció particulada soluble al NP-40 (FI: sediment 30.000 resonicat en presència de Nonidet P-40 (Sigma) i centrifugat). Cada fracció era liofilitzada en un volum adequat del tampó de lisi O'Farrell (1975).

El contingut proteic de FS es determinà pel mètode de Lowry i col (1951) i el de FI pel de Wang i Smith (1975).

Electroforesi bidimensional:

Les proteïnes àcides es resolien per isoelectroenfoc (IEF) d'acord a Tøllaksen i col (1981) amb un marge d' Ampholyte (LKB), pH 5-8 (80%) i 3.5-10 (20%). Les proteïnes bàsiques es fraccionaven en un electroenfoc no equili-

brat com com descriu O'Farrell i col. (1977) amb el següent contingut d'Ampholyte pH 3.5-10 (66%), 7-9 (20%) i 9-11 (14%).

La 2^a dimensió (SDS-poliacrilamida) es feia segons O'Farrell (1975) amb un gradient del 12-18%.

Els gels eran tenyits amb nitrat de plata segons Wray i col (1981). A cada gel s'hi colocava una mostra que contenia 50 μ gr. de proteïna.

Resultats:

Purificació cel.lular:

Per gradients discontinuus de Ficoll s'obtenen tres bandes de cèl.lules (figura 1). Una en la interfase 3-6% que correspond a cèl.lules diferenciades amb una puressa del 95% (figura 2c). Les cèl.lules indiferenciades es troben en la interfase 9-12% amb una puressa del no superior al 75-80% pel que es refusen. La interfase intermitja (6-9%) és una barreja de cèl.lules diferenciades i neoblastes pel que també es refusa.



Fig. 1. Patrons de distribució de les cèl.lules a lo llarg de gradient de Ficoll. (CD: cèl.lules diferenciades; NB: neoblast)

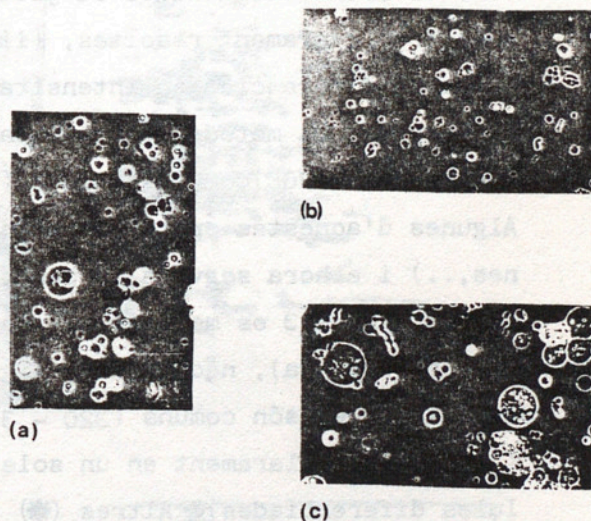


Fig. 2. Contrast de fase de (a) cèl.lules totals, (b) neoblastes obtinguts per filtració en malles de Nylon, i (c) cèl.lules diferenciades de la interfase 3-6% del gradient de Ficoll de la fig.1.

Per tal d'incrementar la puressa de les cèl.lules indiferenciades es feren filtracions successives a partir d'una suspensió de cèl.lules totals, obtenint-se una població homogènea de neoblastes (figura 2b).

La taula 1 mostra la viabilitat, rendiment i puressa de les diferents fraccions cel.lulars. Es de destacar el baix rendiment que s'aconsegueix en la separació de les cèl.lules diferenciades (17-20%).

Comparació dels patrons dels gels:

Per fer una comparació rigurosa dels polipèptids de les diferents frac-

	puressa ^(a)	viabilitat ^(b)	rendiment
cèl. totals	nb: 30% \pm 5 cd: 70% \pm 5	\leq 95%	100%
neoblastes	92% \pm 3	\leq 95%	55% \pm 4
cèl. diferenciades	90% \pm 2	\leq 95%	18% \pm 2

Taula 1. Puressa, viabilitat i rendiment de cèl.lules totals, neoblastes aïllats per filtració en malles de Nylon i cèl.lules diferenciades provinents de la interfase 3-6% del Ficoll. (a) determinada seguint els criteris establerts per Baguñà i Romero (1981); (b) segons el mètode d'exclusió del blau de tripà.

acions cel.lulars es feia una anàlisi semiquantitativa de la següent manera: es preparava 4 electroforesi, que contenien inicialment la mateixa quantitat de proteïna, provinents de 4 purificacions diferents. Aleshores les diferències eren determinades subjectivament com significatives si (i) les taques eren clarament resoltes, (ii) reproduïbles a través dels gels i (iii) hi havia diferències en intensitat, absolutes o quantitativament molt diferents. Amb el mètode desenvolupat es conseguí tant analitzar les proteïnes bàsiques (NEPHGE) com les àcides (IEF) amb pesos moleculars entre 12-120 kD. Algunes d'aquestes proteïnes eren identificades (histones, actines, tubulines, ...) i alhora servien de punts de referència.

En la figura 3 es mostren algunes electroforesi representatives de cèl.lules totals (fig. 3a), neoblastes (fig. 3b) i diferenciades (fig. 3c). La majoria de les taques són comuns (320 - 350 taques, 90 %). Una sèrie de vint taques (10%) estan clarament en un sol tipus cel.lular (\blacktriangle 12 neoblastes, \blacktriangleup 8 cèl.lules diferenciades). Altres (*) varien clarament de forma quantitativa.

Els patrons de proteïnes solubles al NP-40 (FI) difereixen substancialment dels de proteïnes del sobrenadant (FS), encara que hi ha proteïnes comuns (\blackdagger) de la figura 4). L'anàlisi de les FI de les diferents poblacions (gels no mostrats) també revelava tota una sèrie de diferències. El gel (NEPHGE + IEF) de la figura 4 és el patró de les proteïnes insolubles de la fracció de les cèl.lules totals (CT) on hi ha senyalades alguns polipèptids específics de neoblastes (\blacktriangleleft) i de cèl.lules diferenciades (\blacktriangleleft); malgrat aquestes diferències la majoria són comuns als neoblastes i cèl.lules diferenciades (85%).

Discussió:

Els neoblastes i les cèl.lules diferenciades difereixen substancialment respecte a la síntesi de proteïnes específiques.

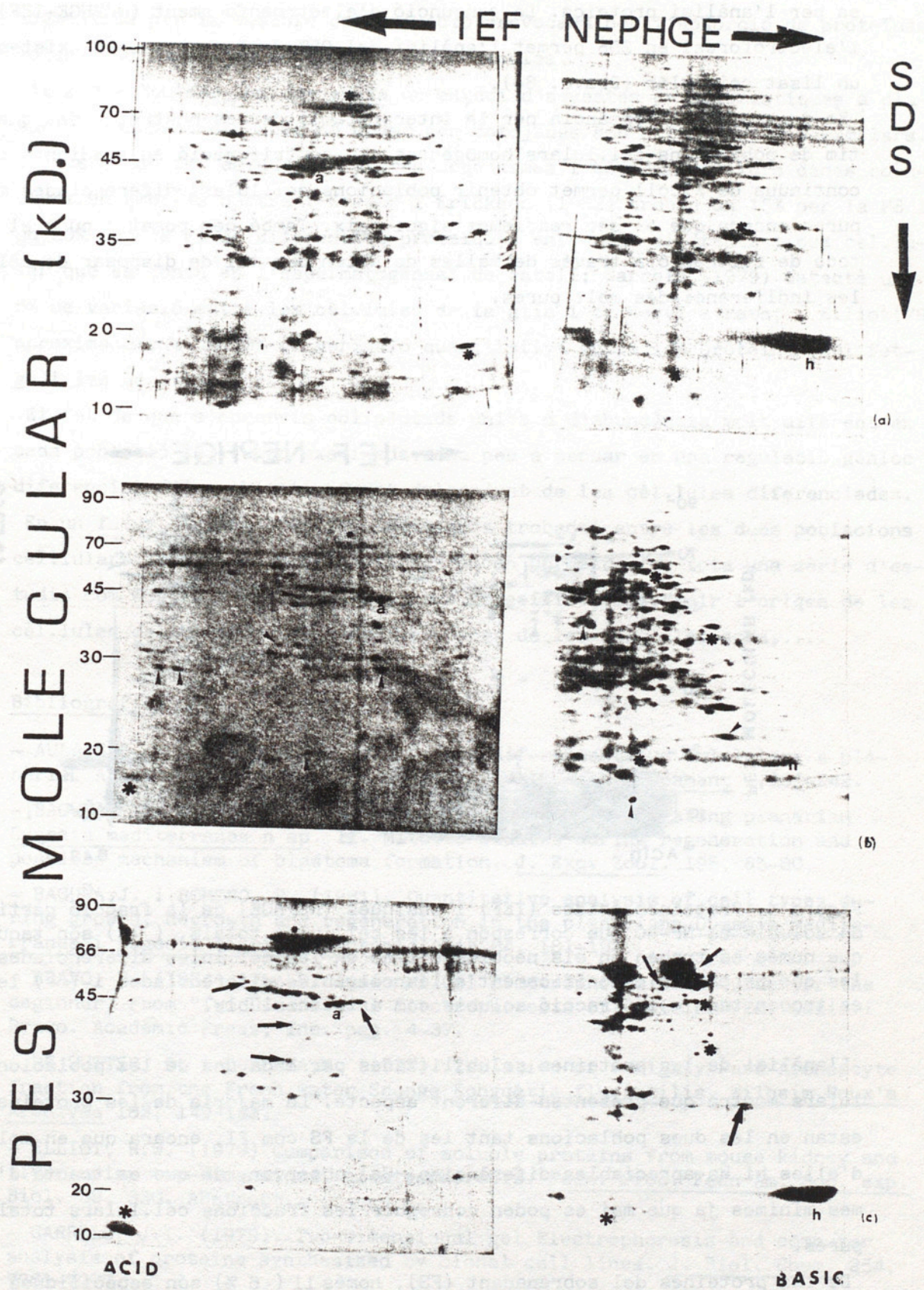


Fig. 3. Patrons proteics de la fracció soluble de les cèl.lules totals (a), neoblastes (b) i cèl.lules diferenciades (c). \blacktriangleright representa polipeptids que només es detectan en neoblastes, \blacktriangleright només en cèl.lules diferenciades, i (*) totes dues poblacions.

La tècnica d'electroforesi bidimensional ha esdevingut una eina molt poderosa per l'anàlisi proteica. La conjunció d'electroenfocament (NEPHGE+IEF) amb l'electroforesi en SDS permet l'anàlisi del 95% de les proteïnes existents en un lisat cel.lular (Bravo, 84).

És de crucial importància per la interpretació de les nostres dades que parlim de poblacions cel.lulars homogènies. La centrifugació en gradients discontinuus de Ficoll permet obtenir poblacions cel.lulars diferenciades molt pures encara que el seu rendiment sigui baix. També hem posat a punt el mètode de filtració a través de malles de Nylon per tal de disposar de cèl.lules indiferenciades molt pures.

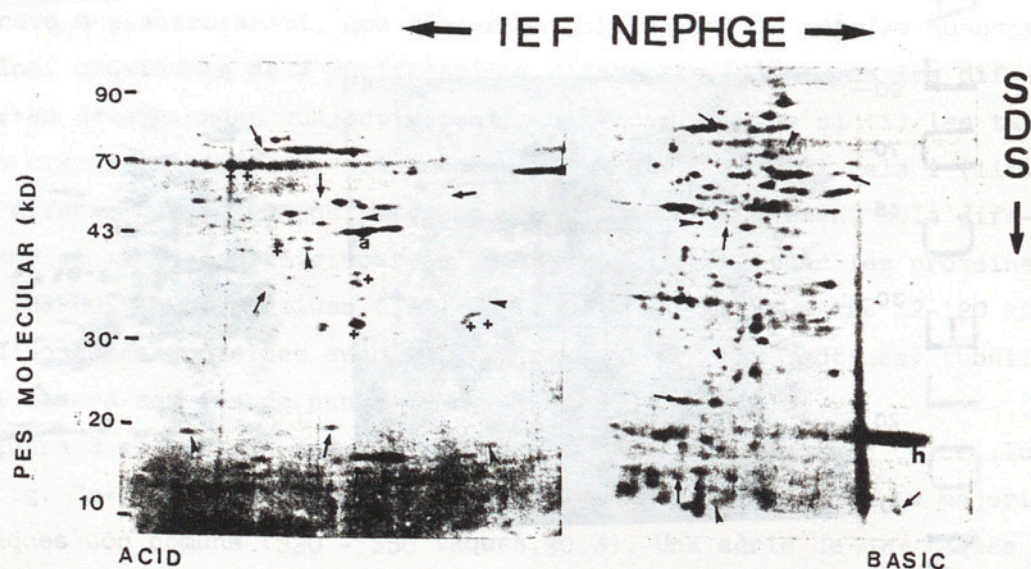


Figura 4. Proteïnes àcides (IEF) i bàsiques (NEPHGE) de la fracció particula soluble al NP-40 que correspon a les cèl.lules totals. (▲) són taques que només es troben en els neoblasts i no en les cèl.lules diferenciades, (↔) les que pertanyen específicament a les cèl.lules diferenciades i (++) les que es troben tant a la fracció soluble com a la insoluble.

L'anàlisi de les proteïnes solubilitzades per cada una de les poblacions cel.lulars mostra que presenten diferent aspecte. La majoria de les proteïnes (88%) estan en les dues poblacions tant les de la FS com FI, encara que en moltes d'elles hi ha apreciables diferències. Cal observar, de que es tracta d'estimes mínimes ja que mai es poden aconseguir les fraccions cel.lulars totalment pures.

De les proteïnes del sobrenadant (FS), només 11 (6%) són específiques dels neoblastes, i 8 (6%) de les cèl.lules diferenciades. En la fracció de les proteïnes insolubles es troba unes dades similars (9% específiques de neoblast i 10% de cèl.lules diferenciades. Els patrons de FS i FI d'una mateixa

població cel.lular tenen una apariència bastant semblant (62 %); similitut augmentada per la possible contaminació provocada per l'absorció de proteïnes solubles dins de les partícules sedimentables.

Al ser el primer cop que es fa un estudi d'aquestes característiques a planària, les nostres dades no poden ser cotejades amb altres estudis similars. Si que s'han fet estudis en altres organismes i bàsicament llurs dades coincideixen amb les nostres. Kramer i Erickson (1982) troben un 15% per la FS i un 20% per la FI de diferències proteïques entre els diferents tipus cel.lular que es donen en l'espermatogènesi de ratolí; Garrels (1979) detectà un 5% de variació entre les cèl.lules de la glia i de nervi a rata; i Elliot (79) aproximadament un 10% de variació quantitativa entre les proteïnes del fetge i les de ronyó a ratolí.

El fet de que s'observin polipèptids únics o d'abundància molt diferent en cada població cel.lular examinada, dona peu a pensar en una regulació gènica diferencial del neoblast enfront del conjunt de les cèl.lules diferenciades.

En un futur, les diferències proteïques trobades entre les dues poblacions cel.lulars funcionals a planària ens poden permetre fer tota una sèrie d'estudis com seguir llinatges cel.lulars específics, discernir l'origen de les cèl.lules del blastema, estudiar el paper de les cèl.lules soca,....

Bibliografia:

- AULADELL, M.C. (1983). Separació dels diferents tipus cel.lulars a planària. Aïllament de neoblastes. Biologia del Desenvolupament 1, 235-242.
- BAGUÑA, J. (1976b). Mitosis in the intact and regenerating planarian Dugesia mediterranea n sp. II. Mitotic studies during regeneration and a possible mechanism of blastema formation. J. Exp. Zool. 195, 65-80.
- BAGUÑA, J. i ROMERO, R. (1981). Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians Dugesia mediterranea i Dugesia tigrina. Hydrobiologia 84, 181-194.
- BRAVO, R. (1984). Two-Dimensional Gel Electrophoresis: A Guide for the beginner. From "Two Dimensional Electrophoresis of Proteins" Ed. Celis i Bravo. Academic Press, Inc. pag. 4-37.
- DE SUTTER, D. i BUSCEMA, M. (1977). Isolation of a Highly Pure Archeocyte fraction from the Fresh water Sponge Ephydatia fluviatilis. Wilhelm Roux's Archives 183, 149-153.
- ELLIOT, R.W. (1979) Comparison of soluble proteins from mouse kidney and liver using two-dimensional electrophoresis. Fedn. Proc. Fedn Am. Soc. exp. Biol. 38, 330. Abstract.
- GARRELS, J.I. (1979). Two-Dimensional gel Electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. J. Biol. Chem. 254, 7961-7977.
- GARRELS, J.I. (1983). Quantitative Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins. Methods of Enzymology 100, 411-423.

- GREMIGNI, V. i MICELI, C. (1980). Cytophotometric Evidence for cell "Trans-differentiation in Planarians Regeneration. Wilhelm Roux's Archives 188, 107-113.
- KRAMER, J.M. i ERICKSON, R.P. (1982). Analysis of stage-specific protein synthesis during spermatogenesis of the mouse by two-dimensional gel electrophoresis. J. Reproduct. Fert. 64, 139-144.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A. L. i RANDALL, R.S. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- O'FARRELL, P.H. (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021.
- O'FARRELL, P. Z., GOODMAN, H.M. i O'FARRELL, P.H. (1977). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Basic as Well as Acidic Proteins. Cell 12, 1133-1141.
- PEDERSEN, K.S. (1972) Studies on regeneration blastemas of the planarian Dugesia tigrina with special reference to differentiation of the muscle-connective tissue filament system. Wilhelm Roux's Archives 169, 134-169.
- TOLLAKSEN, S.L., ANDERSON, N.L. i ANDERSON, N.G. (1981). Operation of the ISO-DALT SYSTEM. Sixth Edition. Anl.-Bim-81-1.
- WANG, Ch.S. i SMITH, R. L. (1975). Lowry Determination of Protein in the Presence of Triton X100. Anal. Biochem. 63, 414-417.