

Activitat transcripcional en el desenvolupament primerenc de *Physa acuta*

Joan A. Vela

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,  
Diagonal 645, Barcelona 08028.

Abstract

Transcriptional activity in early development of *Physa acuta*

The incorporation of  $^3\text{H}$ -Udr into acid-insoluble material in control embryos of *Physa acuta* and in experimental embryos treated with proflavin sulphate (25  $\mu\text{gr/ml}$ ) has been studied. Incorporation is plotted against developmental periods within the first 48 hours of development. Results suggest that there are three main transcriptional peaks: at 24-cell stage, early gastrula and early trochophore. These peaks fit very well with the three maxima of morphogenetic activity found by biological tests (Vela, 1983). Furthermore, it is shown that proflavin sulphate inhibits almost completely the RNA synthesis (50-95 % inhibition).

Introducció

En una comunicació prèvia (Vela, 1983) vam descriure els resultats d'un test biològic per a mesurar els efectes de la proflavina sobre el desenvolupament primerenc de *Physa acuta* (Gasteròpode Pulmonat). S'havia utilitzat la proflavina com a bloquejador de la transcripció en lloc de la actinomicina D (mètode més clàssic) perquè es va comprovar que, en aquest cargol, l'efecte de garbell de la seva membrana capsular impideix el pas de l'actinomicina D (Vela, 1981).

Els resultats d'aquests tests biològics indicaven que semblava haver-hi tres pics d'activitat morfogenètica en el desenvolupament primerenc de *Physa acuta*: al voltant de la fase de 24 cèl.lules, a la gàstrula primerenca i a la trocòfora molt jove. Aquests resultats eren bàsicament consistents amb el que es coneixia sobre l'activitat gènica embrionària en els Pulmonats (*Lymnaea stagnalis*; Verdonk, 1973). Malgrat tot, però, hi afegien nova informació força interessant. Per exemple, suggerien que hi havia activitat gènica lligada a la fase de 24 cèl.lules; moment del desenvolupament dels Pulmonats que representa una aturada del clivellament i quan s'estableix la polaritat dorso-ventral de l'embrió (van den Biggelaar, 1976).

Tanmateix, , malgrat que es coneix que la proflavina s'inserta en l'ADN

i inhibeix l'unió de l'ARN-polimerasa amb l'ADN (Polya, 1977), calia comprovar l'efecte d'aquesta acridina sobre la transcripció, així com els possibles efectes secundaris de la proflavina sobre la síntesi d'ADN i de proteïnes. També, era necessari estudiar l'activitat transcripcional durant els primers dies de desenvolupament de Physa acuta, per tal de comprovar si els pics d'activitat morfogènica trobats es corresponien realment amb moments d'una activitat gènica important.

Així doncs, hem estudiat la incorporació d'uridina tritiada ( $^3\text{H-Udr}$ ) durant els dos primers dies de desenvolupament de Physa acuta i l'efecte de la proflavina sobre aquesta incorporació. Els resultats demostren en primer lloc que els moments de màxima activitat morfogènica (24 cèl.lules, gàstrula primerenca i trocòfora jove) es corresponen a moments de màxima activitat transcripcional. D'altra banda, es comprova que la proflavina inhibeix quasi completament la transcripció (de 50 a 95 %).

#### Materials i metodologia

S'han utilitzat embrions de Physa acuta obtinguts de postes collides directament de l'aquari. Com que la fecundació en aquest cargol és interna, no es pot controlar el moment de fecundació de l'ou; per la qual cosa, hem considerat com a temps zero de desenvolupament la fase de dues cèl.lules, fàcilment identificable.

S'alliberaren les còpsules del moc fent-les rodolar sobre paper de filtre humit. És important d'eliminar completament el mucus perquè s'ha comprovat que aquest pot incorporar radiactivitat inespecífica, cosa que pot dur a contatges anormalment alts. Després es deixava una hora de preincubació amb proflavina 25  $\mu\text{gr/ml}$  (Serva) a la foscor, tot deixant els controls també una hora a la foscor en solució salina. Seguidament, s'incubaven els controls i els embrions tractats amb proflavina durant tres hores a temperatura ambient i a la foscor amb  $^3\text{H-Udr}$  25  $\mu\text{Ci/ml}$  (activitat específica = 108-110 mCi/mgr) (Amersham). La quantitat d'ous incubats va variar entre 20 i 40 i es matenien amb 1 ml de medi (solució salina pels controls o proflavina 25  $\mu\text{gr/ml}$  pels experimentals). Un cop passat el temps d'incubació es rentaven exhaustivament les càpsules amb un excés de solució salina per tal d'eliminar completament el precursor radioactiu i la proflavina. Tot seguit s'enmagatzemaven els embrions a  $-20^\circ\text{C}$  en 10-20  $\mu\text{l}$  de solució salina.

Per tal de mesurar la incorporació de  $^3\text{H-Udr}$  es van homogenitzar els embrions per sonicació en 300  $\mu\text{l}$  de tampó Tris HCl pH = 7.5. D'aquest sonicat es van treure 50  $\mu\text{l}$  que es van afegir a 5 ml de Supersolve (Koch - Light) i es van mesurar els dpm. Amb aquestes mesures es va calcular la incorporació a la fracció soluble ("uptake") (dpm experimental / dpm control). La resta del sonicat es va subdividir en dues alíquotes de 100  $\mu\text{l}$  que es van precipitar amb 1 ml d'àcid tricloracètic (TCA) 10 % en fred durant 4 hores. El material àcid insoluble es va recollir amb filtres Whatman GF/C prèviament rentats amb TCA 5 %. Els filtres es van rentar posteriorment amb TCA 5 %, etanol, etanol - eter (1:1) i eter. Després de deixar assecar els filtres es van posar en 5 ml de la barreja tolué - PPO - POPOP (1 l : 4 gr : 0.05 gr) i es van contar els cpm del filtrat. Amb aquestes mesures es va calcular la incorporació a la fracció insoluble ("incorporation") (cpm experimental / cpm control) i el percentatge d'inhibició. Tant els dpm com els cpm es van mesurar amb un contador de escintil·lació BETAmatic. Cada punt de la gràfica es correspon com a mínim a quatre mesures.

La resta de l'homogenat es va enmagatzemar a  $-20^\circ\text{C}$  i va servir per a mesurar el contingut de proteïna mitjançant un assaig BIO-RAD. Tant els dpm com els cpm es van normalitzar pel contingut de proteïna de la mostra.

### Resultats i discussió

Els resultats es donen a la Fig. 1. En ella es veu com la incorporació de  $^3\text{H-Udr}$  a la fracció insoluble (cpm /  $\mu\text{gr}$  proteïna) dels controls descriu tres pics: un al voltant de la fase de 24 cèl.lules, un altre a la gàstrula primerenca i altre a la trocòfora jove. D'altra banda, la incorporació de  $^3\text{H-Udr}$  a la fracció insoluble dels embrions tractats amb proflavina és sempre molt més baixa. Això permet de calcular valors d'inhibició de la transcripció que van de un 50 a un 95 %. És a dir, la proflavina, a les concentracions emprades per nosaltres, és un inhibidor efectiu de la transcripció.

Respecte la incorporació a la fracció soluble ("uptake") solament en un punt (trocòfora molt jove) s'apropa a l'unitat. Això ens fa pensar que la saturació del fons ("pool") de nucleòtids es fa molt ràpidament. Doncs no creiem que la proflavina pugui afectar la presa de nucleòtids a través de la membrana cel·lular en segons quins moments del desenvolupament.

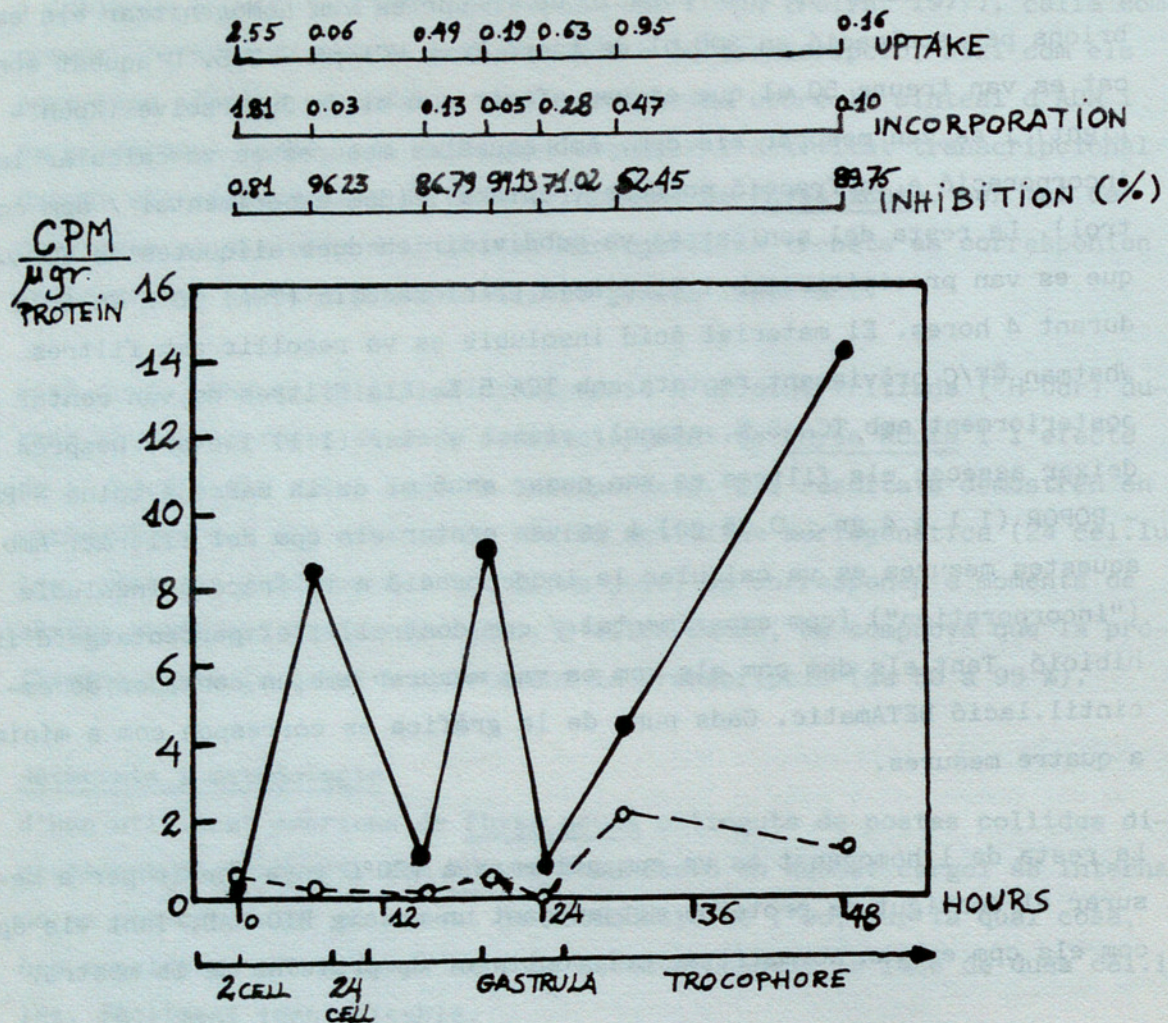


Fig. 1.- Incorporació de  $^3\text{H-Udr}$  a la fracció àcid insoluble dels controls (—●—) i dels embrions tractats amb proflavina (—○—). En les barres superiors estan indicats els valor d'"uptake", "incorporation" i percentatge d'inhibició. Per més detalls veure el text.

Fig. 1.-  $^3\text{H-Udr}$  incorporation into the acid-insoluble material from controls (—●—) and proflavin sulphate treated embryos (—○—). Bars at the top indicate uptake, incorporation and inhibition values. For further details see the text.

En definitiva, la incorporació a la fracció insoluble dels controls ens permet de dir que la activitat transcripcional dels embrions de Physa acuta descriu tres màxims durant les primeres 48 hores de desenvolupament.

Aquests tres pics d'activitat transcripcional es correlacionen perfectament amb els tres màxims d'activitat morfogenética trobats amb tests biològics (Vela, 1983), cosa que suggereix que durant la fase de 24 cèl.lules, la gàstrula primerenca i la trocòfora jove es transcriuen de fet gens importants pel desenvolupament.

Anteriorment, ja havien aparegut alguns treballs sobre la síntesi d'ARN durant el desenvolupament dels Pulmonats (Limnaea palustris, Morrill et al. 1976). Aquests autors, malgrat que afirmen que la síntesi d'ARN fluctua al llarg del desenvolupament, no van poder definir els pics de transcripció de la fase de 24 cèl.lules i de la gàstrula primerenca, segurament perquè van mesurar la incorporació d'uridina a temps fixos de desenvolupament i no respecte a fases concretes d'aquest tal com fem nosaltres.

Verdonk (1973) va mesurar el nombre de gens letals que actuen en cada moment del desenvolupament de Limnaea stagnalis i va trobar també un màxim d'activitat gènica en la fase de gàstrula i trocòfora jove. Així doncs, els nostres resultats concorden prou bé amb els d'aquest autor. Tanmateix, nosaltres detectem un període d'activitat gènica lligada a la fase de 24 cèl.lules. Aquest moment del desenvolupament és un període d'aturada del clivellament durant el qual s'estableix l'eix dorso-ventral de l'embrió probablement per interaccions cel.lulars entre els macròmers i els micròmers (van den Biggelaar, 1976 i 1977). A més a més, és el moment que assenyala el començament de l'asincronia en el clivellament (van den Biggelaar, 1971a).

Es a dir, ja que la primera activitat transcripcional en els Pulmonats sembla estar lligada a la fase de 24 cèl.lules (veure també, van den Biggelaar, 1971b), sembla haver-hi alguna relació entre aquests fets i l'encetament de la transcripció. Al respecte, cal dir que Newport i Kirschner (1982a i b) han descrit que l'inici de la transcripció a Xenopus, que té lloc a l'anomenada "transició de la blàstula mitjana", està lligat també a l'encetament de l'asincronia en el clivellament. Tanmateix, és encara prematur d'especular sobre la possible universalitat d'aquests fets.

---

Aquest treball ha estat possible gràcies a un Ajut pel Perfeccionament dels Professors i Investigadors de les Universitats i Centres de Recerca de Catalunya del Dpt. d'Ensenyament de la Generalitat de Catalunya. 1984.

Bibliografia

- MORRILL, J.B., RUBIN, R.W., i GRANDI, M. (1976) Protein synthesis and differentiation during Pulmonate development. Amer. Zool., 16: 547-561.
- NEWPORT, J. i KIRSCHNER, M. (1982). A major developmental transition in early Xenopus embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. Cell, 30: 675-686.
- NEWPORT, J. i KIRSCHNER, M. (1982b). A major developmental transition in early Xenopus embryos: II. Control of the onset of transcription. Cell, 30: 687-696.
- POLYA, G.M. (1977) Transcription; em "The ribonucleic acids", editat per Stewart, P.R. i Letham, D.S. Springer-Verlag. Berlin.
- VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. (1971a). Development of division asynchrony and bilateral symmetry in the first quartet of micromeres in eggs of Lymnaea. J. Embryol. exp. Morph. 26: 393-399.
- VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. (1971b). RNA synthesis during cleavage of the Lymnaea egg. Exptl. Cell Res. 67: 207-210.
- VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. (1976). Development of dorsoventral polarity preceding the formation of the mesentoblast in Lymnaea stagnalis. Kon. Nederl. Akad. Wet. (Ser. C) 79: 112-126.
- VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. (1977). Significance of cellular interactions for the differentiation of the macromeres prior to the formation of the mesentoblast in Lymnaea stagnalis. Kon. Nederl. Akad. Wet. (Ser. C) 80: 1-12.
- VELA, J.A. (1981). Estudis sobre reproducció i desenvolupament en gasteròpodes d'aigua dolça dels gèneres Physa i Lymnaea. Ph.D. Thesys. Univ. Barcelona.
- VELA, J.A. (1983). Activitat gènica en el desenvolupament primerenc de Physa acuta. Biol. Desenvol. 1: 121-126.
- VERDONK, N.H. (1973). Gene expression in early development of Lymnaea stagnalis. Develop. Biol., 35: 29-35.