

Transport intercel·lular de peroxidasa de rave (HRP) en embrions de Patella (Molusc)

Serras, F.*, Kühtreiber, W.M.***, i van den Biggelaar, J.A.M.**

* Dpt. Genètica, Fac. Biologia, Univ. Barcelona. Diagonal 645.
08028 Barcelona. Spain.

** Zoological Laboratory, State University of Utrecht, Padualaan 8,
3584 CH Utrecht, Netherland.

Abstract

In this study we present evidence that HRP can be transported at a specific stage in the development of embryos of the marine Gastropod Patella. We have introduced HRP type VI (positive charge) and HRP type VIII (negative charge) into embryonic cells during various stages of development, using an iontophoretic injection technique. The difference in transport pattern between the positive HRP type VI and the negative HRP type VIII indicates that charge differences might play an important role in the mechanism of transport. Because of the specificity of the unidirectional transport of HRP type VI between 3D and the contacting micromeres, the transport mechanism utilised by HRP may be of importance as a signal transferring mechanism involved in the determination of cell lines in the Patella embryo.

Introducció

En embrions de Patella les cinc primeres segmentacions donen lloc a l'estadi de 32 cèl·lules, que consisteix en 28 micròmers i 4 macròmers en el pol vegetal. En l'interval entre la 5^a i 6^a segmentació, un dels quatre macròmers (designat 3D) estableix contacte amb els micròmers del pol animal i és induït a formar la cèl·lula soca de la línia cel·lular mesodèrmica (van den Biggelaar, 1977).

Experiments realitzats per van den Biggelaar i Guerrier (1979) mostren que quan s'inhibeix el contacte amb els micròmers del pol animal, cap dels macròmers és induït a formar el mesentoblast. Aquests resultats exclouen la possibilitat que un dels macròmers estigui predeterminat per a esdevenir 3D, i suggereixen que les interaccions cel·lulars estan implicades en la determinació de la cèl·lula soca del mesoderm.

La possibilitat de vies de comunicació cel·lular relacionades amb el mecanisme d'inducció ha motivat l'estudi del transport funcional de marcadors cel·lulars. Està generalment acceptat que pel bescanvi intercel·lular de

substàncies reguladores un dels millors candidats són les unions íntimes ("gap junctions") (Peracchia, 1980). En embrions de Patella, s'han descrit unions íntimes a partir de l'estadi de 4 cèl.lules (Dorresteiijn et al. 1982). En estudis previs s'injectaren aquests embrions amb el marcador fluorescent "Lucifer Yellow" (De Laat et al. 1980; van den Biggelaar et al. 1981; van den Biggelaar i Dorresteiijn, 1982). A causa del seu baix pes molecular (430 daltons), el "Lucifer Yellow" és un indicador de l'acoblament cel.lular per unions íntimes. Un resultat important va ser l'absència de transport de "Lucifer Yellow" abans de la 5^a segmentació, i l'aparició de transport entre la 5^a i 6^a segmentació. En el mateix període és quan un dels quatre macròmers és induït a mesentoblast.

Encara que en un principi s'associaren l'aparició de l'escampament de tinció i la inducció del 3D (De Laat et al. 1980), posteriorment s'ha demostrat que no hi ha relació aparent (Dorresteiijn et al. 1983). El "Lucifer Yellow" es detecta només entre la cèl.lula injectada i les cèl.lules veïnes, però mai traspassava la zona de contacte entre 3D i els micròmers animals. A nivell ultrastructural les unions íntimes són absents en aquesta zona. Així doncs, sembla ser que les unions íntimes no estan implicades en el bescanvi de senyals informacionals per a la inducció del mesentoblast.

Si els canals especialitzats en l'estadi de 32 cèl.lules són unions íntimes, molècules de pes molecular superior a 1,100 daltons no es transferririen d'una cèl.lula a l'altre. Per tant, com a experiment control varem injectar l'enzim peroxidasa de rave (HRP, pes molecular = 40,000 daltons) en els estadis primerencs de Patella. Al contrari del que cal esperar, la HRP pot ser transportada a partir de la 5^a segmentació amb un patró i direcció específics (van den Biggelaar et al. in press, Kühtreiber et al. submitted). En aquest treball presentem evidència del transport intercel.lular de HRP.

Resultats i discussió

Embrions en estadis compressos entre 4 cèl.lules i 32 cèl.lules varen ser injectats amb HRP (Sigma T. VI) per iontoforesi. En cap dels casos es trobà transport de HRP. Només la cèl.lula injectada estava marcada positivament després del tractament amb DAB/H₂O₂ (Fig. 1). Per a comprovar la qualitat de les injeccions i si la quantitat d'enzim afectava el patró de

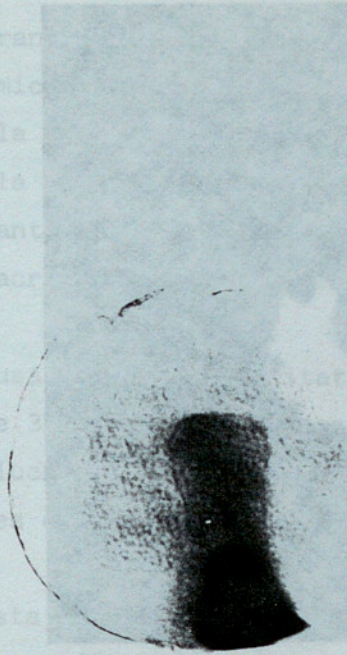


Fig. 1.- Embrió de Patella coerulea injectat amb HRP en l'estadi de 32 cèl.lules. Fixat just abans del contacte del macròmer 3D amb els micròmers, 25 min després de la 5^a segmentació. Secció òptica. La cèl.lula injectada és la 3D.

Fig. 1.- 32-cell embryo of Patella coerulea injected with HRP 25 min after 5th cleavage in the macromere 3D. Optical section: only 3D is marked by the DAB-staining.

segmentació, s'injectaren embrions en l'estadi de 4 cèl.lules i es varen deixar desenvolupar fins després de la 5^a segmentació. Només les cèl.lules filles de la cèl.lula injectada estaven marcades. No obstant això, si l'embrió injectat es deixava desenvolupar fins a l'estadi de 32 cèl.lules avançat, el marcatge es detectava en altres cèl.lules fora de les cèl.lules filles. En tots els experiments, l'aparició de marcatge fora de la progènie de la cèl.lula injectada era en el mateix moment: en l'estadi de 32 cèl.lules (45-50 minuts després de la 5^a segmentació) (Fig. 2).

Cabria la possibilitat que siguin els productes de la reacció DAB/H₂O₂ de fixació els que són transportats en lloc de la HRP. Per descartar aquesta possibilitat, embrions injectats a l'estadi de 32 cèl.lules es varen biseccionar "in vivo" i després fixar. Durant la reacció DAB/H₂O₂ si hi ha difusió de productes secundaris, només una de les meitats serà positiva a la reacció. Si la HRP es transporta específicament les dues meitats sran positives. Els resultats mostraren que ambdues meitats hi tenien marcatge, és a dir, el transport té lloc en l'embrió viu abans de fixat. En el mateix experiment per a embrions de 16 cèl.lules, només

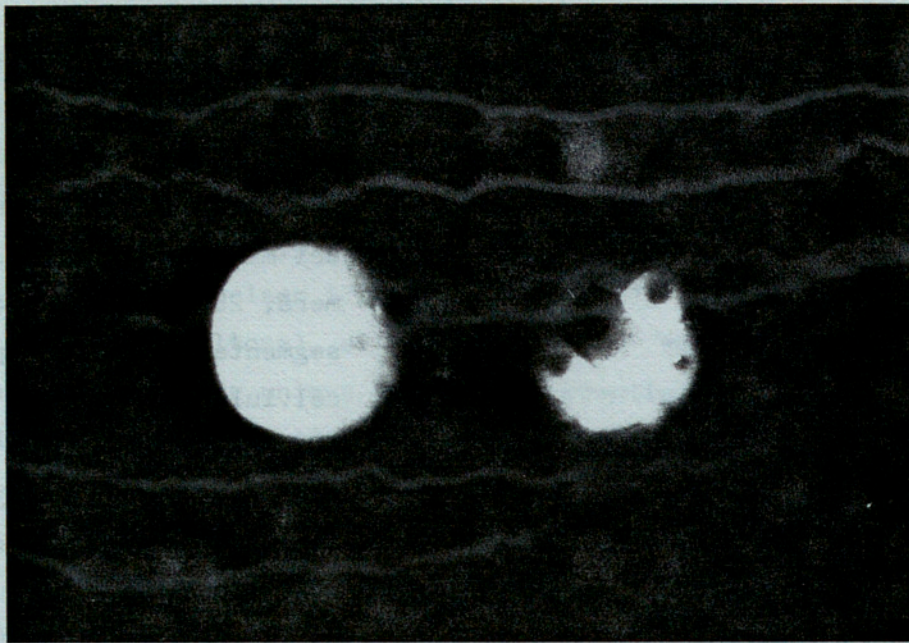


Fig. 2.- Embrió de Patella vulgata injectat al'estadi de 32 cèl.lules. Fixat després del contacte del macròmer 3D amb els micròmers, \pm 80 min després de la 5^a segmentació.(a la esquerra). Control (a la dreta) tractat amb DAB/H₂O₂ durant el mateix temps que l'experimental.

Fig. 2.- Patella vulgata. Control embryo (left) \pm 80 min after 5th cleavage. Negative. Experimental embryo (right): a number of blastomeres are stained dark. One cell has been injected with HRP. More than one cell labelled means transport.

una de les meitats és positiva a la reacció.

D'aquests experiments podem conclure que la HRP no pot utilitzar-se en embrions de Patella com a marcador cel.lular fidedigne, ja que pot ser transportada intercel.lularment. Una segona conclusió és que els mecanismes de transport del "Lucifer Yellow" i la HRP han de ser diferents, ja que hi ha una diferència significativa en el moment de ser transportats. Aquesta premisa es veu reforçada per la diferència en el patró de transport del marcador. En l'estadi de 32 cèl.lules, el "Lucifer Yellow" és transferit a totes les cèl.lules veïnes de la cèl.lula injectada, sense cap restricció. En canvi, la HRP no és transportada a totes les cèl.lules veïnes i tampoc en la mateixa intensitat.

Injeccions de HRP en el pol vegetal de l'embrió mostren que l'aparició

de transport concideix amb el moment del contacte cel.lular entre 3D i els micròmers del pol animal. Quan la cèl.lula injectada és 3D, s'observa que la HRP és transportada directament cap el pol animal, des de la cèl.lula injectada i atravesant la zona de contacte. Per altra banda, injectant un dels micròmers animals no es detecta transferència de HRP cap el micròmer 3D.

A causa de l'especificitat del transport unidireccional de HRP (T. VI) entre 3D i els micròmers animals, el mecanisme de transport podria estar involucrat en la transferència de senyals per a la determinació de les línies cel.lulars embrions de Patella.

Aquesta unidireccionalitat es veu revertida en injectar HRP amb càrrega negativa (T. VIII). Quan és injectada en 3D, es transfereix cap el pol animal per via de les cèl.lules perifèriques i no directament pel mateix 3D. Les diferents vies del patró de transport entre la HRP de càrrega positiva (T. VI) i la HRP de càrrega negativa (T. VIII) indiquen que les diferències de càrrega poden estar implicades en aquest fenomen.

Actualment estem estudiant l'acoblament elèctric entre aquestes cèl.lules després de la 5^a segmentació. La formació de gradients de voltatge entre el pol animal i el pol vegetal poden estar involucrats en la progressió de la segregació citoplasmàtica.

Material i mètodes

Animals adults de Patella vulgata i P. coerulea provenien de Roscoff (Bretanya) i Arenys de Mar (Catalunya) respectivament. Es mantenien en aquaris amb aigua de mar corrent, a 15°C. Els gàmetes madurs es poden obtenir obrint lateralment l'animal. La fecundació artificial i sincronització es realitzaren segons van den Biggelaar (1977). Per a facilitar la penetració dels microelectrodes, s'extreia la càpsula gelatinosa que cobreix l'embrió, amb aigua de mar acidificada (pH = 4.0) durant 1-2 min. Aquest tractament es feia 15 minuts abans de l'injecció i no afecta el desenvolupament normal.

Les injeccions es feien per iontoforesi, utilitzant microelectrodes de vidre amb filament (Clark, GC 150F-4), construïts amb un estirador MECA-EX BH-CC. La punta s'omplia amb HRP (10 mgr/ml 0.2M KCl) i la resta amb

0.2M KCl. La resistència dels electrodes era 80-150 m Ω . En cada injecció es controlava el potencial de membrana per a evaluar l'estabilitat de la membrana i les condicions de la cèl.lula. S'aplicaren pulsos hiperpolaritzants (duració: 4 seg amplitut: 9nA) en intervals de 30 seg durant 7 min, o bé per pulsos continus (amplitut: 9 nA, duració 10 seg) aplicant-ne quatre en 2 min.

Després de la iontoforesi, els embrions es fixaven amb glutaraldehyd 2 % (en 0.1M cacodilat buffer, pH = 7.4) durant 2 hores. Temps suficient per a inactivar la peroxidasa endògena. El procés de tinció es feia per la tècnica de la diaminobenzidina (Sigma) - H₂O₂ (DAB/H₂O₂), durant 5 minuts (Kühtreiber et al, 1985, submitted).

En els experiemnts de bisecció, els embrions injectats es partien en dues meitats utilitzant agulles de vidre d'un μ m aproximadament de diàmetre. L'operació es dirigia per micromanipuladors.

Bibliografia

- BIGGELAAR, J.A.M. VAN DEN (1977). Development of dorsoventral polarity and mesentoblast determination in Patella vulgata. J. Morphol. 154: 157-186.
- BIGGELAAR, J.A.M. VAN DEN , i GUERRIER, P. (1979). Dorsoventral polarity and mesentoblast determination as concomitant results of cellular interactions in the mollusc Patella vulgata. Dev. Biol. 68: 462-471.
- BIGGELAAR, J.A.M. VAN DEN, DORRESTEIJN, A.W.C. (1982). "Cellular organization in the early molluscan embryo". Pitts, J.D. i Finbow, M.E. eds. The functional integration of cells in animal tissues. British Society for Cell Biology, Symp. 5. Cambridge University Press, Cambridge, pp 181-193.
- BIGGELAAR, J.A.M. VAN DEN, DORRESTEIJN, A.W.C., DE LAAT, S.W. i BLUEMINK, J.G. (1981). "The role of topographical factors in cell interaction and determination of cell lines in molluscan development". A: Schweiger, H.G. ed. International Cell Biology 80/81. Springer, Berlin Heidelberg, New York, pp 526-638.
- DE LAAT, S.W. , TERTOOLEN, L.G.J. , DORRESTEIJN, A.W.C. VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. (1980). Intercellular communication patterns are involved in cell determination in early molluscan development. Nature 287: 546-548.
- DORRESTEIJN, A.W.C. BILINSKI, S.M. , VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. BLUEMINK, J.G. (1982). The presence of gap junctions during early Patella embryogenesis: An electron microscopical study. Dev. Biol. 91: 397-401.

DORRESTEIJN, A.W.C., WAGEMAKER, H.A., DE LAAT, S.W., VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. (1983). Dye coupling between blastomeres in early embryos of *Patella vulgata* (Mollusca, Gastropoda): Its relevance for cell determination. Roux's Arch. Dev. Biol. 192: 262 - 269.

PERACCHIA, C. (1980) Structural correlates of gap junctions permeation. Int. Rev. Cytol. 66: 81-146.

Departament de Ciències Bàsiques de Biologia, Universitat de Barcelona,
Diagonal 645, 08028 Barcelona.

Abstract

Pattern formation in the early stages of regeneration: a unified model

Since Morgan (1901), the problem of pattern formation has been considered under the main modalities of the regeneration process: either pattern is restored in the regenerated without any morphological or epimorphic change, or pattern is restored at the cost of a morphological change, or a blastema which undergoes the development of new structures. The latter modalities are considered as independent patterns formation, while the first one is considered to be a size-dependent pattern formation.

However, recent developments in several systems (mainly in *Hydra*, Jordan, 1981; *Planaria*, Bergs, 1977; *Amphibia*, Maden, 1974; regenerating vertebrates, see also Bergs, 1980) call for a revision of this rather traditional viewpoint. Now, it is considered that most of the so-called "morphological changes" were the size-dependent pattern formation, and that pattern is formed epimorphically (by re-specification of cells with a role of cell specification) during the early phases of regeneration, followed by a later epimorphic process of growth through cell proliferation.

What is passed now is to have led during the early phases of regeneration morphological cells change positional values to conceal the discontinuities created by cutting. Although models based on activator-inhibitor diffusion gradients (Gierer and Meinhardt, 1972; Meinhardt, 1982) have been applied in the past to explain these phenomena, later results fit better with models of gradients of cell-cell adhesivity or gradients of concentration of adhesive-bound elements, with epimorphs playing the role of stop signal boundary. This focus attention on the importance of molecular studies of blastema cell surfaces for the future understanding of regeneration and morphogenesis.

El model clàssic de formació de patró durant la regeneració

El problema central de la regeneració és com a partir del regenerant es reformi correctament el patró d'estructures perdut. D'ençà Morgan (1901), s'han proposat dos mecanismes principals, sovint excloents: 1) la morfalexi, en la qual les parts perdudes apareixen mitjançant la reorganització del regenerant, i en la que la proliferació i el creixement no són necessaris; i 2) l'epimorfal, que deu a la formació d'una estructura transitòria damunt del regenerant (l'anomenat blastema de regeneració), a partir del qual s'origina el patró d'estructures que manca. En aquest darrer cas, la proliferació i el creixement, a conseqüència del creixement, semblen fer-se imprescindibles.