

PAPER DELS DOMINIS ESTRUCTURALS DE LA γ -ZEINA EN LA SEVA RETENCIÓ EN EL
RETICUL ENDOPLÀSMIC

Maribel Geli, M.Dolors Ludevid, Margarita Torrent

Departament de Genètica Molecular. C.I.D. (CSIC)
Jordi Girona 18-26. 08034 BARCELONA

RESUMEN

La γ -zeina es una proteïna de reserva del maiz que se acumula en las cèlulas del endopermo de semilla, en unos orgànulos subcelulares denominados cuerpos proteicos (PBs) derivados directamente del retículo endoplasmàtico (RE). No se conocen los mecanismos de retención de ésta proteïna en el RE ni el proceso que lleva a la formación de PBs. En este trabajo se han construido tres mutantes a partir del gen de la γ -zeina, por delección de una serie de dominios estructurales, y se han introducido estos genes en Arabidopsis thaliana a fin de poder estudiar la relevancia que pueden tener dichos dominios en la retención de la γ -zeina en el RE y en la formación de los PBs.

INTRODUCCION

La γ -zeina es una proteïna de reserva del maiz. La presencia de un péptido señal en su extremo N-terminal determina que se sintetize en polisomas unidos a membrana del RE y se internalize cotraduccionalmente en su lumen. Una vez en su interior el péptido señal es eliminado por una peptidasa específica. La γ -zeina se inmunolocaliza en unos organulos globulares denominados cuerpos proteicos (1) que en el maiz se forman directamente por evaginación de la membrana del RE. En estos orgànulos, la γ -zeina se localiza en la periferia rodeando al resto de proteïnas de reserva, de caracter más hidrofóbico, que forman un agregado compacto en el interior del PB (2).

La γ -zeina es una proteïna de 204 aminácidos muy rica en Cys y soluble en un medio acuoso en presencia de agentes reductores, sin embargo carece de la señal de retención carboxiterminal KDEL descrita para las proteïnas luminales del residentes del RE. Presenta una estructura en dominios muy clara (3): un péptido señal que es eliminado en la proteïna traslocada, un dominio repetitivo constituido por la repetición 8 veces y media del hexapéptido PPPVHL (dominio repeat), una zona de unión de 23 aminoácidos caracterizada por la alternancia de la prolina con cualquier otro AA (dominio PX), y una zona de 94 AA muy rica en cisteïnas (dominio CR). A fin de estudiar el papel que pudieran jugar estos diferentes dominios en la retención de la γ -zeina en el RE y el la formación de PBs se construyeron sobre el clon genómico, diferentes mutantes por delección de diferentes dominios: mutante HbP, por delección del dominio PX; el mutante RcP por delección de los dominio repeat y PX; y el mutante DC por delección del dominio CR. El gen de la γ -zeina y los genes codificantes para dichas proteïnas se clonaron en un vector

binario (pBin 19) bajo el control del promotor 35S del CaMV y se introdujeron en Arabidopsis thaliana par su expresión. Estudios inmunocitoquímicos y experimentos de pulso y caza indican que el dominio repeat N-terminal podría ser esencial para la retención de la γ -zeina en cuerpos proteicos derivados del RE.

MATERIALES Y METODOS / RESULTADOS

Detección de la γ -zeina y de los mutantes por delección (RcP, HbP y DC) en las plantas transgénicas.

Tanto la γ -zeina como los diferentes mutantes por delección se detectaron en cantidades significativas por western blot en las en las hojas y raíces de las diferentes plantas transgénicas no así en las semillas. Los extractos proteicos se corrieron en un gel de acrilamida del 5% (SDS PAGE) y después de ser transferidos a un filtro de nitrocelulosa se analizaron por immunoblot utilizando un suero contra la γ -zeina y fosfatasa acomplejada a anticuerpos contra IgGs de conejo.

Detección de la γ -zeina y de los mutantes por delección en la fracción microsomal.

Mediante un protocolo estandar se preparó una fracción microsomal cruda a partir de las diferentes plantas transgénicas, encontrándose la γ zeina y los diferentes mutantes en esta fracción.

Localización Subcelular

A. Inmunocitoquímica realizada sobre protoplastos de las diferentes plantas transgénicas

A partir de hojas se prepararon protoplastos por flotación en un medio conteniendo 0,4M de sacarosa y 10 mM de CaCl_2 . Estos protoplastos se fijaron sobre portaobjetos preparados con poli-L-Lys, con paraformaldehido al 4 % y se realizó la inmunocitoquímica utilizando una dilución 1/500 del suero contra la γ -zeina y fluoresceina conjugada con anticuerpos contra IgGs de conejo. Para todas las incubaciones se hicieron por duplicado utilizando un medio con y sin detergente a fin de permeabilizar o no las membranas de los protoplastos. En los protoplastos de las plantas transgénicas γ -Z, HbP, y DC se observaron puntos fluorescentes de acumulación al permeabilizar los protoplastos, pero en los protoplastos de plantas RcP y en los no transformados.

B. Inmunocitoquímica realizada sobre cortes ultrafinos de hojas de las diferentes plantas transgénicas.

Se fijaron hojas de las diferentes plantas transgénicas y de plantas no transformadas en paraformaldehido al 3% y glutaraldehido al 2%. Después de un tratamiento con HCl 0,1N para romper los entrecruzamientos de los grupos aldehidos, las muestras se incluyeron en Lowcryl. Se incubaron cortes ultrafinos de cada una de las muestras con una dilución 1/1000 del suero contra la γ -Zeina y proteína A unida a oro coloidal de 20 nm de diámetro. En las muestras correspondientes a las

plants transgénicas γ -Z, HbP y DC la marca se encontró en el interior de la célula mayoritariamente en unas estructuras reticulares en el caso de la DC ó en orgánulos globulares en el caso de la γ -Z y la HbP. El marcaje en las plantas RcP se encontró acumulado en el espacio intercelular.

Experimento de pulso y caza realizado en protoplastos de plantas transgénicas RcP.

Se prepararon protoplastos por flotación a partir de hojas de plantas transgénicas expresando la proteína RcP. Estos protoplastos se marcaron "in vivo" utilizando una mezcla de ^{35}S -Met y ^{35}S -Cys durante 45 min. al cabo de los cuales se añadió Met y Cys frías. Después de 30 min de "recruitment" se tomaron muestras a 30 min, 1 h. 30 min, 3 h., 6 h., 9h., y 12 h.. Después de separar el medio de cultivos de los protoplastos, las muestras se sometieron a inmunoprecipitación y se analizaron en un gel de acrilamida del 16 % y autorradiografía. Se observa como progresivamente desaparece la proteína RcP del interior celular y aparece en el medio de cultivo. La proteína extracelular parece tener un peso molecular inferior al de la proteína intracelular, indicando que posiblemente sufre algún tipo de modificación postraducciona.

DISCUSION

La γ -zeina y los mutantes por delección se expresan en hojas y raices de Arabidopsis thaliana. Todas ellas entran en el sistema endomembranoso ya que se recobran en la fracción microsomal de las plantas transgénicas. Las proteínas que tienen el dominio repeat N-terminal (γ -zeina, HbP y DC) se acumulan en el interior de la células dentro de vesículas que recuerdan a los cuerpos proteicos del endosperma de maíz tal y como se demuestra en la inmunocitoquímica. La delección de los domidios PX y repeat hace que la proteína RcP sea secretada tal y como lo demuestran los experimentos de inmunocitoquímica y de pulso y caza. El dominio CR puede desempeñar un papel importante en la agregación de la proteína entre sí o en la interacción con el resto de proteínas de reserva presentes en el PB del maíz pero no parece que sea importante para su acumulación en los cuerpos proteicos.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Torrent et al. Plant Mol Biol. (1986), 7, 393-403.
- 2 Lending et al. Protoplasma (1988) 143, 51-62.
- 3 Ludevid et al. Plant Mol. Biol (1984) 3, 227-234.
- 3 Prat et al Nucl. Acids Res. (1985) 13, 1493-1504.