

Absència d'expressió de proteïnes de reserva a l'embrió de Zea mays

D. Sánchez-Martínez, J. Gómez, P. Puigdomènech i M. Pagès

Departament de Genètica Molecular, C.I.D. (C.S.I.C.), Jorge Girona Salgado, nº 18-26, 08034 Barcelona.

Abstract

In the present work we have identified in the total protein complement extracted from isolated maize embryos, polypeptides having m. w. and pI similar to that of endosperm zeins and glutelins. This was done by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting probing with antiserum raised against endosperm zeins + glutelins fraction. However in the Northern analysis of poly A⁺RNA, or total RNA extracted from embryos at different developmental stages no positive hybridization was obtained with the cloned zein and glutelin cDNA labeled by nick-translation.

No positive result was obtained for the "in vitro" translation products immunoprecipitated with anti Z + G antibody.

Immunocytochemical studies were also performed using an specific antibody against G, the results show that fluorescence is localized in the endosperm while embryo tissues lack positive staining.

The results obtained are in agreement with the absence of transcription and translation of glutelin and zein genes in the embryonary tissues.

Introducció

Les proteïnes de l'embrió de Zea mays estan constituïdes de forma majoritària per proteïnes del tipus albúmines i globulines, Paulis i Wall (1969). La possibilitat de que les proteïnes de reserva de l'endosperm (zeïnes i glutelins) siguin també biosintetitzades en els teixits embrionaris ha estat motiu d'estudi, en els darrers anys per part de diferents grups, Tsai (1979), Landry i Moureaux (1980).

Els valors ressenyats a la literatura per la fracció de proteïnes solubles en alcohol, de l'embrió, identificades com a proteïnes del tipus zeïnes, oscil·la entre un 2 % a un 10% depenent dels autors Tsai (1979), Landry i Moureaux (1980), encara que tant el patró electroforètic com la composició en aminoàcids d'aquestes zeïnes embrionàries difereix lleugerament de les pròpies de l'endosperm, Tsai (1979).

Per altra banda l'addició d'un caràcter mutant (com per exemple Opac2) va acompanyat per una marcada alteració en la síntesi de zeïnes en l'endosperm, mentre que no es detecten diferències en la distribució d'aquest grup de proteïnes a l'embrió Lee i Tsai (1984).

Tot aquest tipus de dades quantitatives fa difícil discernir si realment aquestes proteïnes tipus zeïnes d'embrió poden ésser considerades com constituents específics, o bé són contaminacions a les preparacions dels embrions, que provenen de l'endosperm. Per poder distingir clarament entre aquestes dues possibilitats s'ha realitzat l'estudi a nivell molecular de l'expressió dels gens de les zeïnes i glutelines als teixits embrionaris tant determinant la presència dels seus mRNA s transcrits, com la dels seus productes de traducció, identificats mitjançant anticossos específics.

Mitjançant electroforesi de doble dimensió de proteïnes totals d'embrions a diferents moments del desenvolupament i "immunoblotting" hem identificat zeïnes i glutelines que reaccionen específicament amb el seu anticòs que no es diferencien ni en pes molecular ni en punt isoelèctric de les de l'endosperm. La identificació dels RNAs missatgers s'ha fet utilitzant com a sonda els gens clonats de zeïnes i glutelines marcats radioactivament sobre "Northern blots" de RNA poli A⁺ o RNA total extret d'embrions a diferents estadis i de RNA extret de l'endosperm. S'ha realitzat la immunoprecipitació dels productes de la traducció "in vitro" dirigida per aquesta població de RNAs missatgers embrionaris utilitzant l'anticòs Z + G i finalment amb l'anticòs altament específic contra glutelines (anti G) s'ha realitzat la localització immunocitoquímica de les glutelines en seccions histològiques del grà.

Material i Mètodes

Embrions de *Zea mays* (W-64A) han estat aïllats manualment de l'endosperm. Els estadis embrionaris triats per aquest estudi han estat, 1: Embrions de 20 dies després de la polinització (E20) i 2: embrions madurs i secs (Do).

La separació electroforètica de les proteïnes en doble dimensió es fa segons el mètode de O'Farrell (1975). Embrions de E20, o de Do es pulveritzen en un morter en presència de N₂ líquid, la pols resultant es dissol en el tampó de lisi O'Farrell (1975) i es manté durant 1 h. en un bany d'ultrasons a 4°C. Les proteïnes són traspassades al paper de nitrocel.lulosa incubades durant la nit amb l'anticòs (anti Z + G) i revelades amb proteïna A-¹²⁵I.

El RNA poly A⁺ de E20 o de Do obtingut segons Aviv i Leder (1972) és traduït "in vitro" en el sistema del lisat de reticulòcit, els productes d'aquesta traducció són immunoprecipitats amb l'anticòs (anti Z + G),

els productes de la immunoprecipitació es separen per cromatografia en proteïna A sefarosa, i s'elueixen amb el tampó d'electroforesi. Per l'anàlisi del RNA el mètode utilitzat és el de "Northern blot", Maniatis et al (1982) i la hibridació es fa amb el clon de zeïnes (pME 119) i el clon de glutelïnes (A20) marcats radioactivament amb dCTP-³²P per "nick translation", Maniatis et al (1982). Per a la preparació del material pels experiments d'immunocitoquímica s'ha seguit el mètode descrit per Baumgärther et al (1978), seccions de criostat de 10 µm s'han incubat en presència de l'anticòs específic per G, segons el protocol descrit anteriorment Pagés et al (1983).

Resultats i discussió

Les proteïnes totals obtingudes d'embrions joves (E20) i madurs (Do) són analitzades per electroforesi en doble dimensió utilitzant electroforesis (pH 4,5 a 10) a la primera i electroforesi amb SDS a la segona. L'immunoblot d'aquests gels de doble dimensió mostra que l'antisèrum Z +G té reacció positiva amb proteïnes embrionàries que presenten Pm i pI similar a aquells determinats per les zeïnes i glutelïnes de l'endosperm (Fig.1)

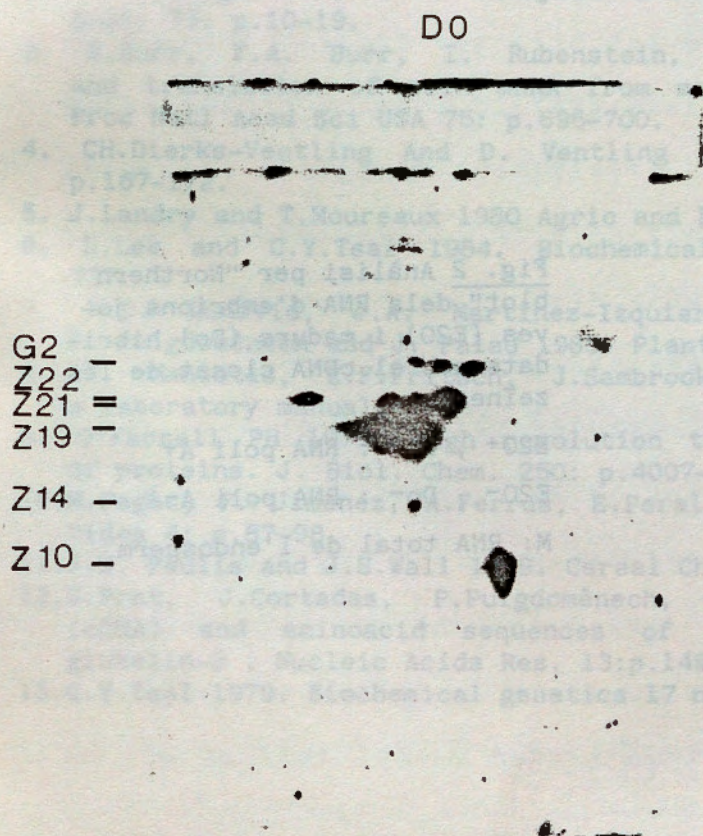


Fig. 1. Immunoblot de les proteïnes totals d'embrions madurs (Do) separades per electroforesi en doble dimensió i incubades amb un anti-sèrum que reacciona contra zeïnes i glutelïnes. S'han utilitzat com marcadors de pes molecular zeïnes i glutelïnes.

El poli A⁺ RNA de E20 i Do preparat per cromatografia amb oligo dT-cel.lulosa es traduït "in vitro" en un sistema lliure de cèl.lules (rabbit reticulocyte lysate system Amersham) en presència de 35S-metionina.

Els productes de la traducció son precipitats mitjançant l'anticòs Z + G i les fluorografies obtingudes no mostren la presència de cap banda coincident amb les obtingudes quan el RNA de l'endosperm és immunoprecipitat amb el mateix anticòs Ludevid et al (1985).

Utilitzant el cDNA clonat de glutelinas Prat et al (1985) i Zeïnes Burr et al (1978) hem determinat si als mRNA s dels teixits embrionaris a diferents temps del desenvolupament s'hi podien detectar seqüències similars.

Els resultats es mostren a la Fig. 2 on es pot veure una forta hibridació al RNA extret de l'endosperm, però absència total de resposta tant a la fracció poli A⁺ com a la poli A⁻ del RNA aïllat dels diferents estadis de l'embrió.

Tots aquests resultats suggereixen que els missatgers codificants per zeïnes o glutelinas no es troben representats a la població de RNA's present a les diferents fases embrionàries.

E20⁺ Do⁺ M E20⁻ Do⁻



Fig. 2 Anàlisi per "Northern blot" dels RNA d'embrions joves (E20) i madurs (Do) hibridats amb el cDNA clonat de les zeïnes.

E20⁺ , Do⁺ : RNA poli A⁺

E20⁻ , Do⁻ : RNA poli A⁻

M: RNA total de l'endosperm

Pels estudis d'immunocitoquímica s'ha utilitzat un anticòs altament específic contra G , i que no mostra reacció creuada amb les zeïnes Ludevid et al (1985).

La incubació es va realitzar a 4°C durant 24 h. i la detecció es va fer pel mètode de la fluoresceïna.

Els resultats indiquen que ^{la} fluorescència es troba confinada a l'endosperm mentre a l'embrió és negativa, resultat similar al trobat per Dierks-Ventling i Ventling (1982) quan utilitza un anticòs altament específic per zeïnes. Aquests resultats semblen indicar que en els teixits de l'embrió manca l'expressió dels gens de les proteïnes de reserva zeïnes i glutelines. Els percentatges determinats a la literatura per aquestes proteïnes dins d'embrions aïllats, així com els nostres resultats positius d'immunoblotting poden ésser deguts o bé a un transport des del seu lloc de síntesi (l'endosperm) o bé a una contaminació mínima (1 %), no detectable, en els controls d'aïllament dels embrions.

Referències

1. H. Aviv and P. Leder 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidilic acid-cellulose. Proc Natl Acad Sci USA 69: p.1408-1412.
2. B. Baumgarther, K.T. Tokuyasu and M.J.Chrispeels 1978. J. Cell Biol. 79: p.10-19.
3. B.Burr, F.A. Burr, I. Rubenstein, M.N.Simon 1978. Purification and translation of zein mRNA from maize endosperm protein bodies. Proc Natl Acad Sci USA 75: p.696-700.
4. CH.Dierks-Ventling And D. Ventling 1982. Febs Letters 144 n° 1: p.167-172.
5. J.Landry and T.Moureaux 1980 Agric and Food Chem, 28: p.1186-1191.
6. L.Lee and C.Y.Tsai 1984. Biochemical genetics 22 n° 7/8: p.729-737.
7. M.D. Ludevid, J.A. Martínez-Izquierdo, M. Armengol, M.Torrent, P. Puigdomènech and J. Palau 1985. Plant Science 41: p.41-48.
8. T. Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sambrook 1982 in Molecular Cloning a laboratory manual.
9. O'Farrell PH 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250: p.4007-4021.
10. M.Pagès, F. Jimenez, A.Ferrus, E.Peralta and E. Gelpí 1983. Neuropeptides 4: p.87-98.
11. J.W. Paulis and J.S.Wall 1969. Cereal Chem. 46: p.263-273.
12. S.Prat, J.Cortadas, P.Puigdomènech, J.Palau 1985. Nucleic acid (cDNA) and aminoacid sequences of the maize endosperm protein glutelin-2. Nucleic Acids Res. 13: p.1493-1504.
13. C.Y.Tsai 1979. Biochemical genetics 17 n° 11/12: p.1109-1119.

La incubación se va realizando a 4°C durante 24 h. La detección se va
 realizando por métodos de inmunofluorescencia. Los resultados se expresan
 en porcentaje de células positivas. Los datos se expresan en la tabla
 correspondiente.

Los resultados indican que la fluorescencia es toda confinada a los
 ventrículos de las células. Los resultados indican que el tipo de
 fluorescencia que se observa en las células de embriones de pollo
 es idéntica a la que se observa en las células de la retina de
 pollo.

Referencias

- H. Aviv and P. Leder 1972. Purification of biologically active
 globin messenger RNA by chromatography on oligothymidic acid-
 cellulose. Proc Natl Acad Sci USA 69: p.1408-1412.
- B. Baumgartner, K.T. Tokuyasu and M.J. Crispell 1978. J. Cell
 Biol. 79: p.10-13.
- B. Burt, F.A. Burt, I. Rubenstein, M.N. Simons 1978. Purification
 and translation of rat HBM from mRNA. J. Embryol. Exp. Morphol.
 Proc Natl Acad Sci USA 75: p.696-700.
- C.H. Dieker-Ventling and G. Ventling 1982. Folia Letters 144 N° 1:
 p.167-172.
- J. Landry and T. Morneau 1980. Agric and Food Chem. 28: p.1188-1191.
- J. Lee and C.Y. Tsai 1984. Biochemical Genetics 22 N° 2: p.729-739.
- M.D. Anderson, A.A. Martinez-Izquierdo, M. Arredondo, M. Toranzo,
 J. Pineda and J. Pineda 1985. Plant Science 41: p.41-48.
- J. Pineda, M. Arredondo, J. Pineda and J. Pineda 1988. In Molecular Cloning
 a laboratory manual.
- O. Farrell 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis
 of proteins. V. Biol. Chem. 250: p.4004-4011.
- M. Pagan, J. Pineda, J. Pineda and E. Gelpi 1982. Transp-
 ort of RNA from the yolk to the embryo in the chicken.
 J. Cell Physiol. 131: p.179-187.
- J.W. Paulin and J.S. Wall 1986. J. Cell Physiol. 128: p.263-272.
- S. Pina, J. Pineda, J. Pineda and J. Pineda 1985. Nucleic acid
 (DNA) and amino acid sequences of the naive endoderm protein
 glutein-5. Nucleic Acids Res. 13: p.1493-1504.
- C.Y. Tsai 1979. Biochemical Genetics 17 N° 1: p.119-1119.