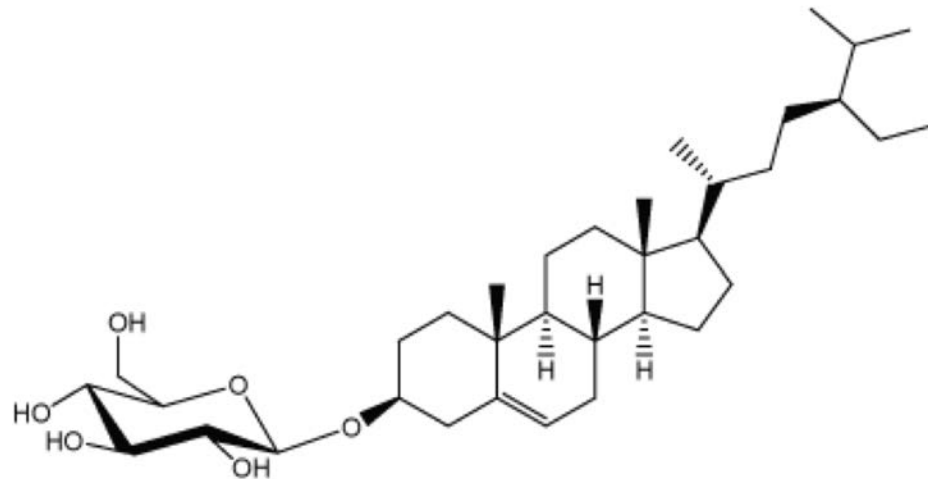


Metabolisme dels esterols conjugats: Implicació en el desenvolupament i la resposta a l'estrès de les plantes

Albert Ferrer

Seminaris de Recerca-Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
(Barcelona, 10 de desembre de 2019)



ConSORCI integrat per 4 institucions:

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(CSIC)

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
(IRTA)

Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Universitat de Barcelona (UB).

Xarxa CERCA (Generalitat de Catalunya).



Organitzat en 4 programes de recerca

Desenvolupament i Transducció de Senyals

Resposta a Estrès

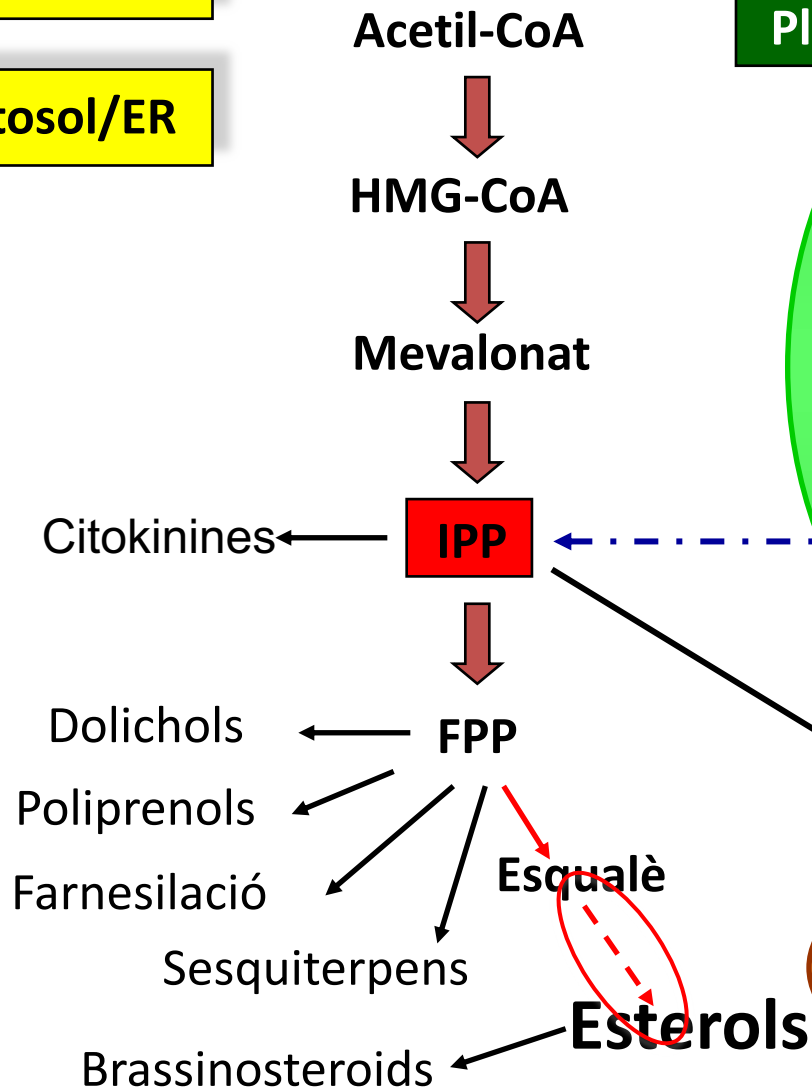
Metabolisme i Enginyeria Metabòlica

Genòmica d'Animals i Plantes

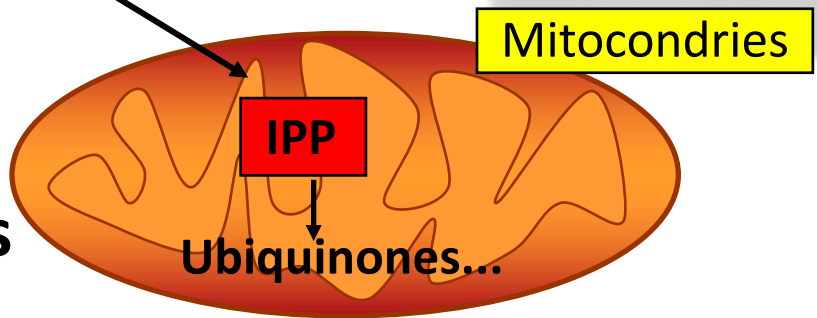
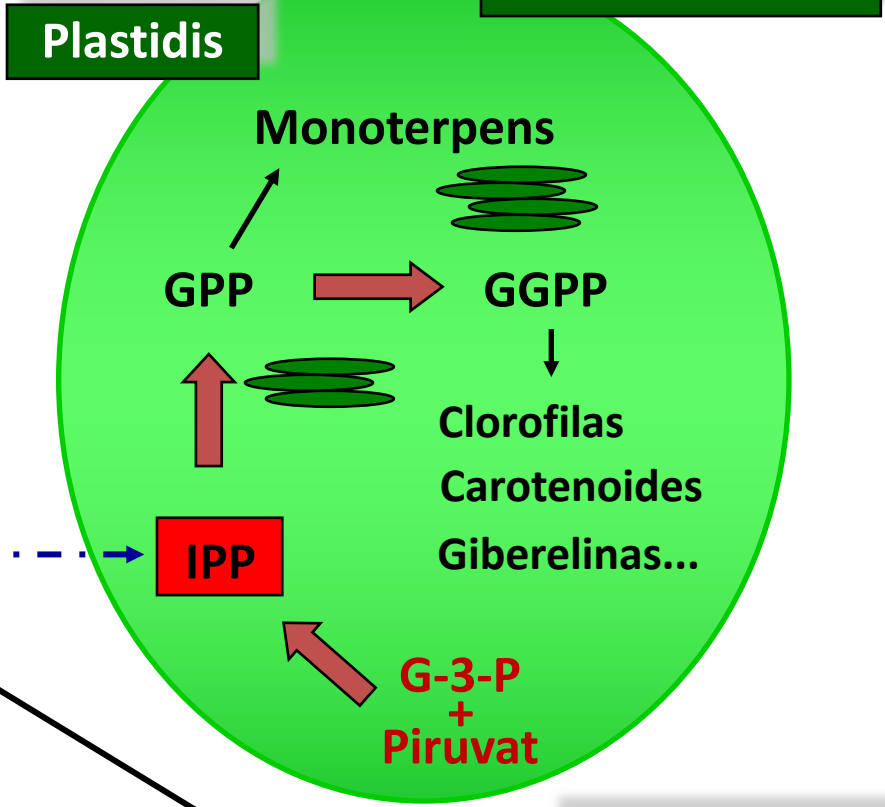
Dos vies de síntesi d'isoprenoides en plantes

Via del MVA

Citosol/ER

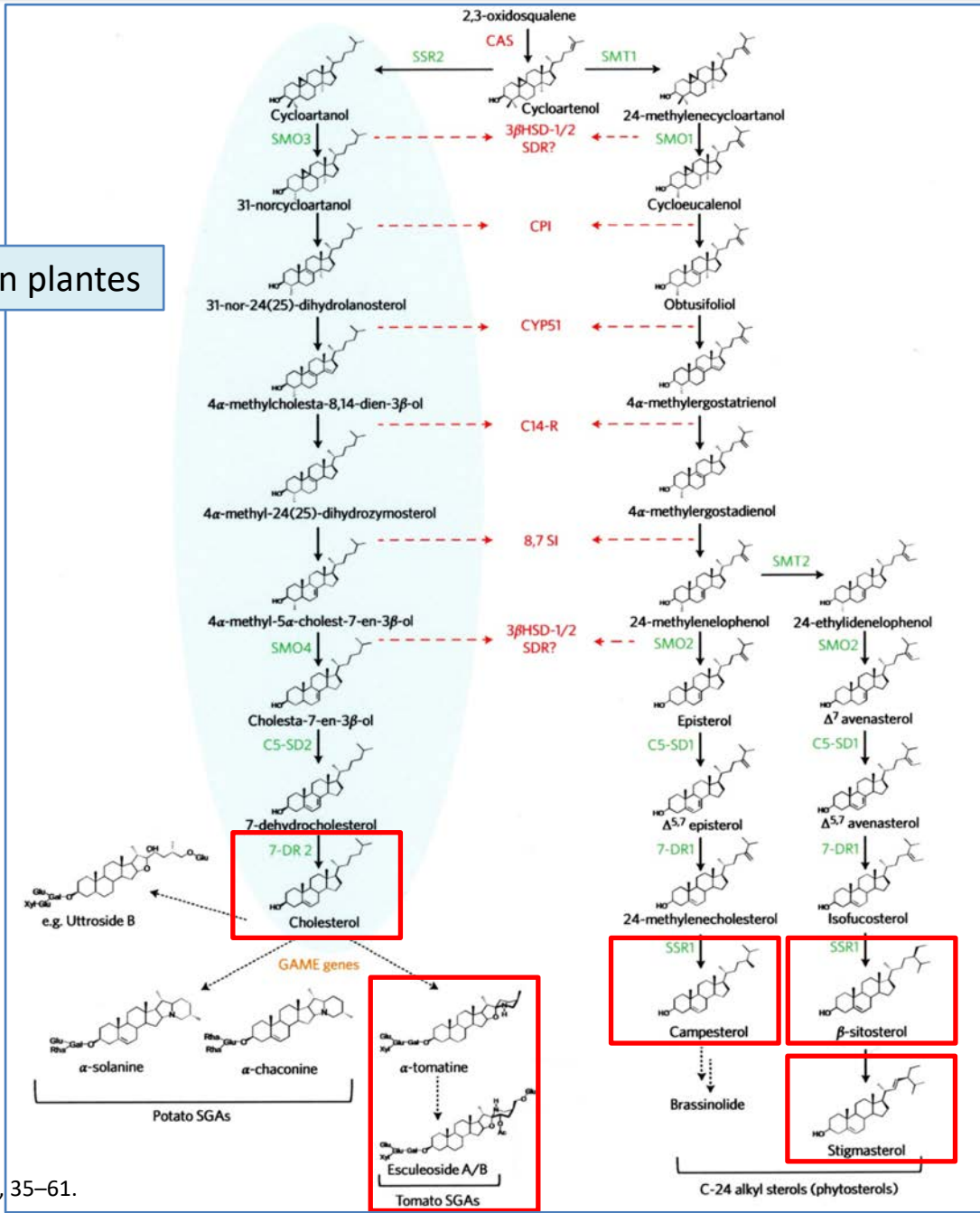


Via del MEP

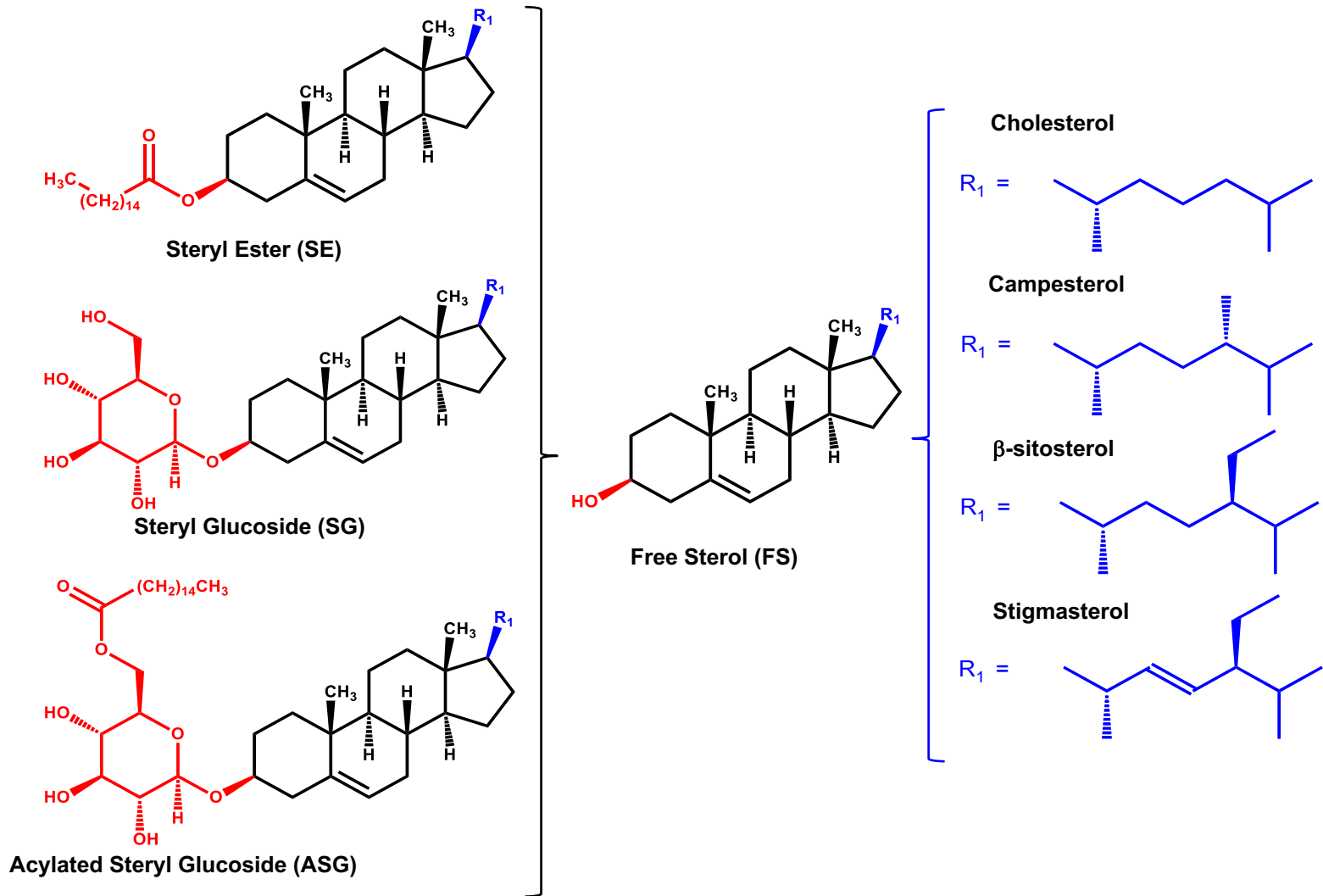


Etapas post-esqualè de la biosíntesi d'esterols en plantes

> 250 esterols diferents en plantes



Esterols lliures i conjugats en plantes

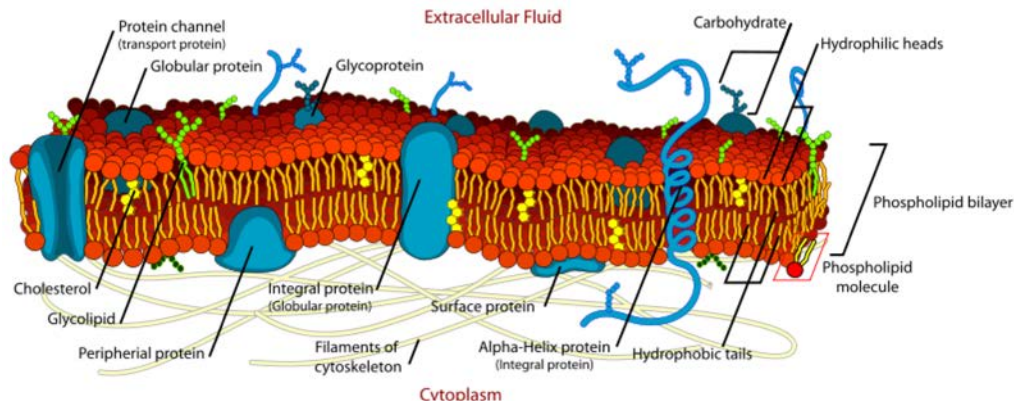


Esterols lliures i glucosilats: components estructurals de les membranes cel.lulars

Membranes cel.lulars

Modulen la fluidesa, la permeabilitat i, en definitiva, la funcionalitat de la membrana

- Activitat de proteïnes de membrana
- Resposta adaptativa a l'estrès

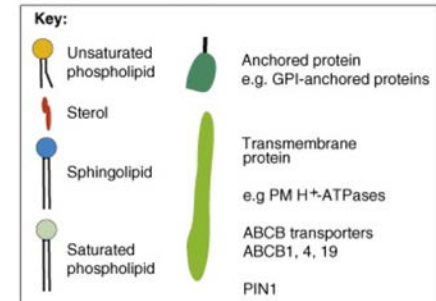
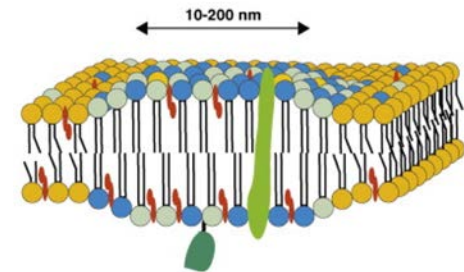


Altres funcions dels sterols

- Patró embrionari, vascular i estomàtic
- Divisió, expansió i polaritat cel.lular
- Regulació hormonal
- Formació de la paret cel.lular
- Desenvolupament dels plastidis

Lipid rafts

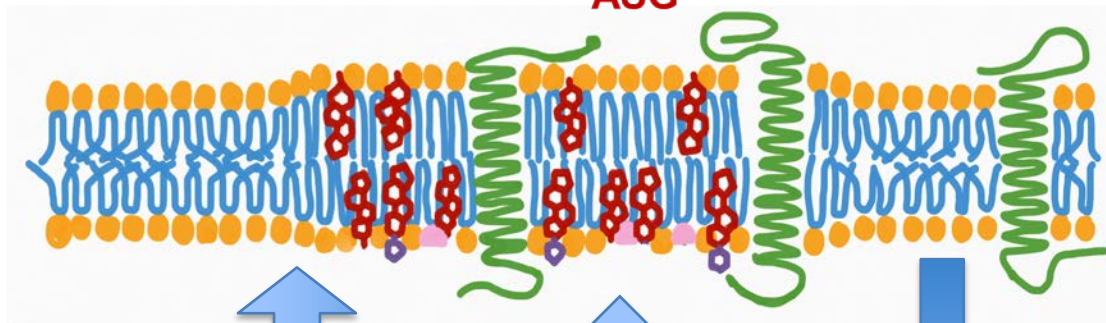
Senyalització
Polaritat
Trafic intracel.lular
Secreció



Esterols esterificats: una reserva d'esterols essencial per mantenir l'homeostasi dels esterols de membrana



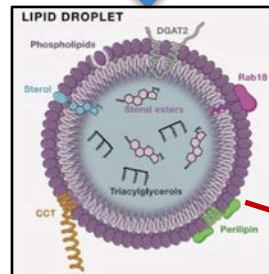
Membrana plasmàtica



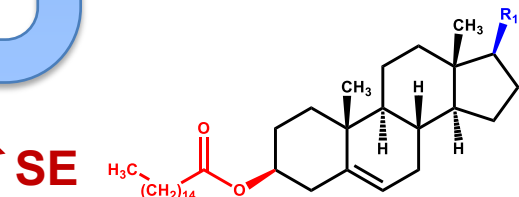
Suministrar esterols per la síntesi de membranes en els teixits en creixement i divisió actives.

Mantenir els nivells adequats d'esterols en les membranes durant el creixement i desenvolupament de les plantes.

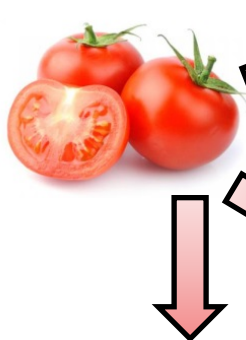
Reciclar esterols i àcids grassos lliberats de les membranes dels teixits senescents.



Cossos lipídics citosòlics



Per què estudiar el metabolisme d'esterols glucosilats en tomàquet?



Compostos minoritaris a la majoria de plantes, però en tomàquet i altres Solanaceas representen més del 80% del total d'esterols.

Estan involucrats en la resposta adaptativa a l'estrés biòtic i abiòtic.

Model per estudiar el desenvolupament i la maduració dels fruits carnosos.

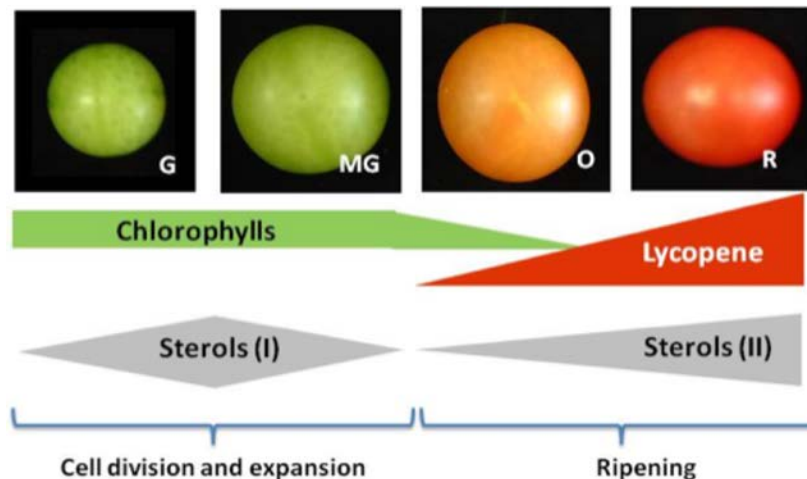
La hortalissa més cultivada a nivell mundial (més de 182 milions de Tm en el 2017). Espanya és el segon productor europeu i part del top 10 mundial de productors de tomàquet.

PRINCIPALES PRODUCTORES 2015



Esterols lliures
Esteril esters
Steril glucòsids
Acil esteril glucosids

74 %	10 %	> 80%
15 %	8 %	
8 %	26 %	
3 %	56 %	



Augment dels esterols totals

Canvis en la composició

En quina varietat de tomàquet?



- ✓ Cicle de vida relativament curt
- ✓ Fàcil propagació
- ✓ Diploide
- ✓ Genome: 950 Mb, 12 cromosomes
- ✓ Col.leccions de mutants

Genoma seqüenciat (2012)

Sol Genomics Network
<http://solgenomics.net/>

S. lycopersicum cv. **Micro-Tom**

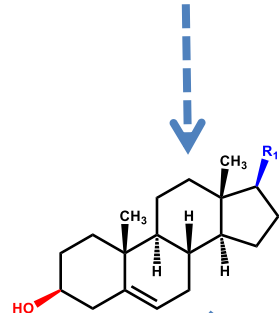
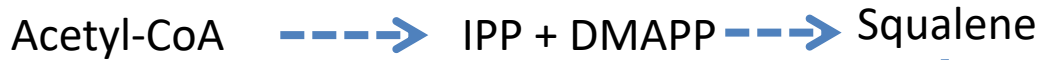
cv. Florida Basket X cv. Ohio 4013-3

Fenotip nan: mutacions recessives en els gens *dwarf (d)* i *miniature (mnt)*

- ✓ Mida petita (80 plantes/m²)
- ✓ Cicle de vida curt (70-90 dies des de la sembra de les llavors fins obtenir fruits madurs)
- ✓ Fàcil de transformar

Biosíntesi dels esteroles conjugats en plantes

Mevalonate pathway

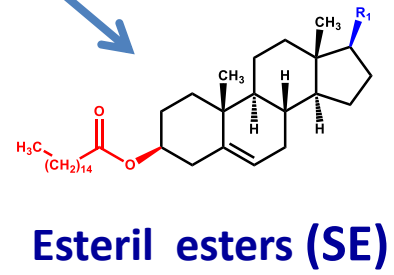


Esterols lliures (FS)

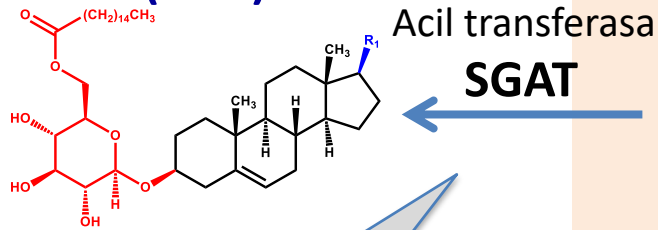
Esterol glucosil transferasa
SGT

Esteril glucòsids (SG)

Esterol acil transferasa
PSAT/ASAT



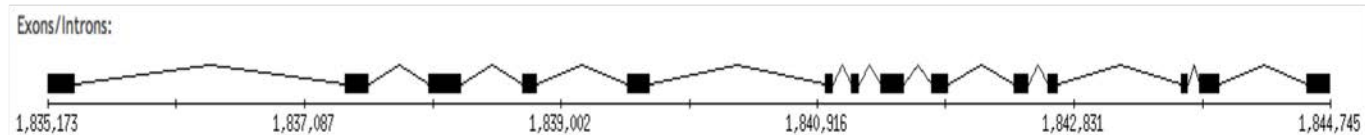
Acil esteril glucòsids
(ASG)



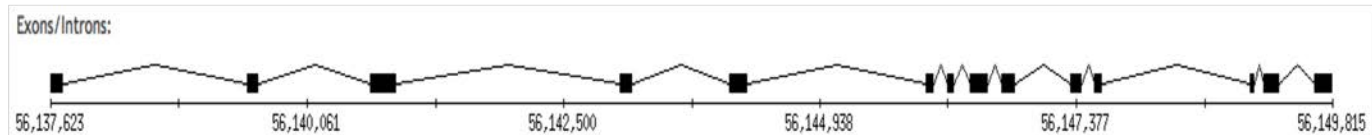
Encara no identificada

El genoma de tomàquet conté 4 gens que codifiquen UDP-glucosa:esterol glucosiltransferases (SGT).

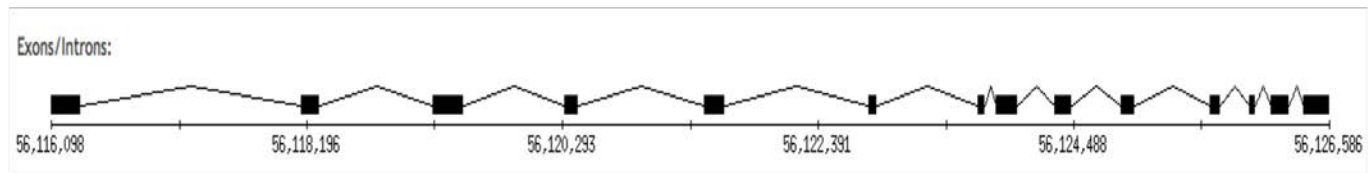
SISGT1



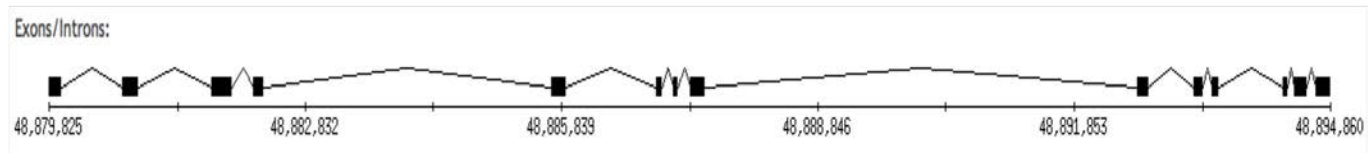
SISGT2



SISGT3



SISGT4



Les 4 UDP-glucosa:esterol glucosiltransferases són funcionals.

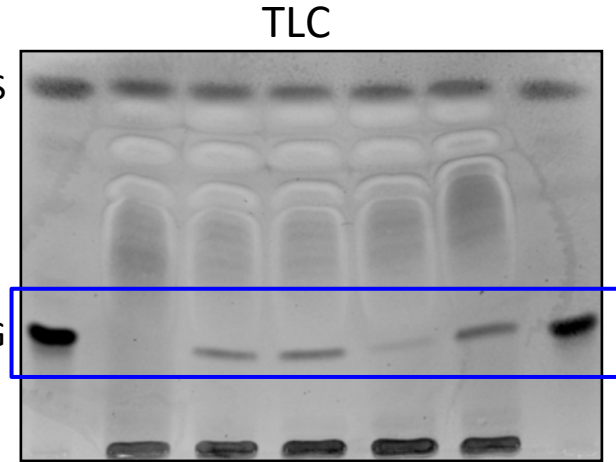
Expressió a *E. coli* i determinació d'activitat *in vitro*

Multiple sequence alignment of SGT1, SGT2, SGT3, and SGT4 protein sequences. Conserved motifs are highlighted with boxes and arrows: PSBD (residues 329-348), PSPG (residues 548-555), and a hydrophobic motif (residues 619-632). Asterisks indicate conserved positions across all four sequences.

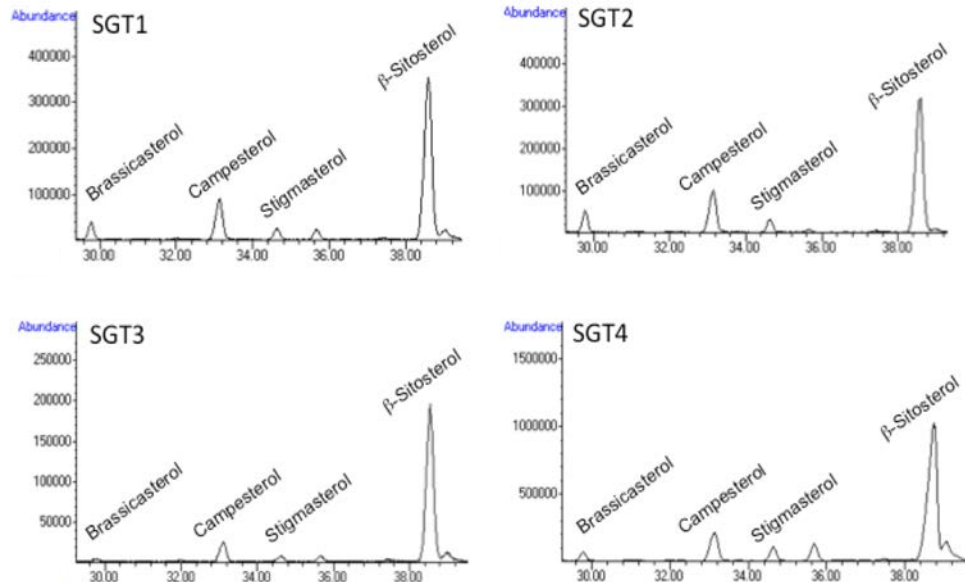
Free sterol (FS) mix + UDP-glucose

SGT activity

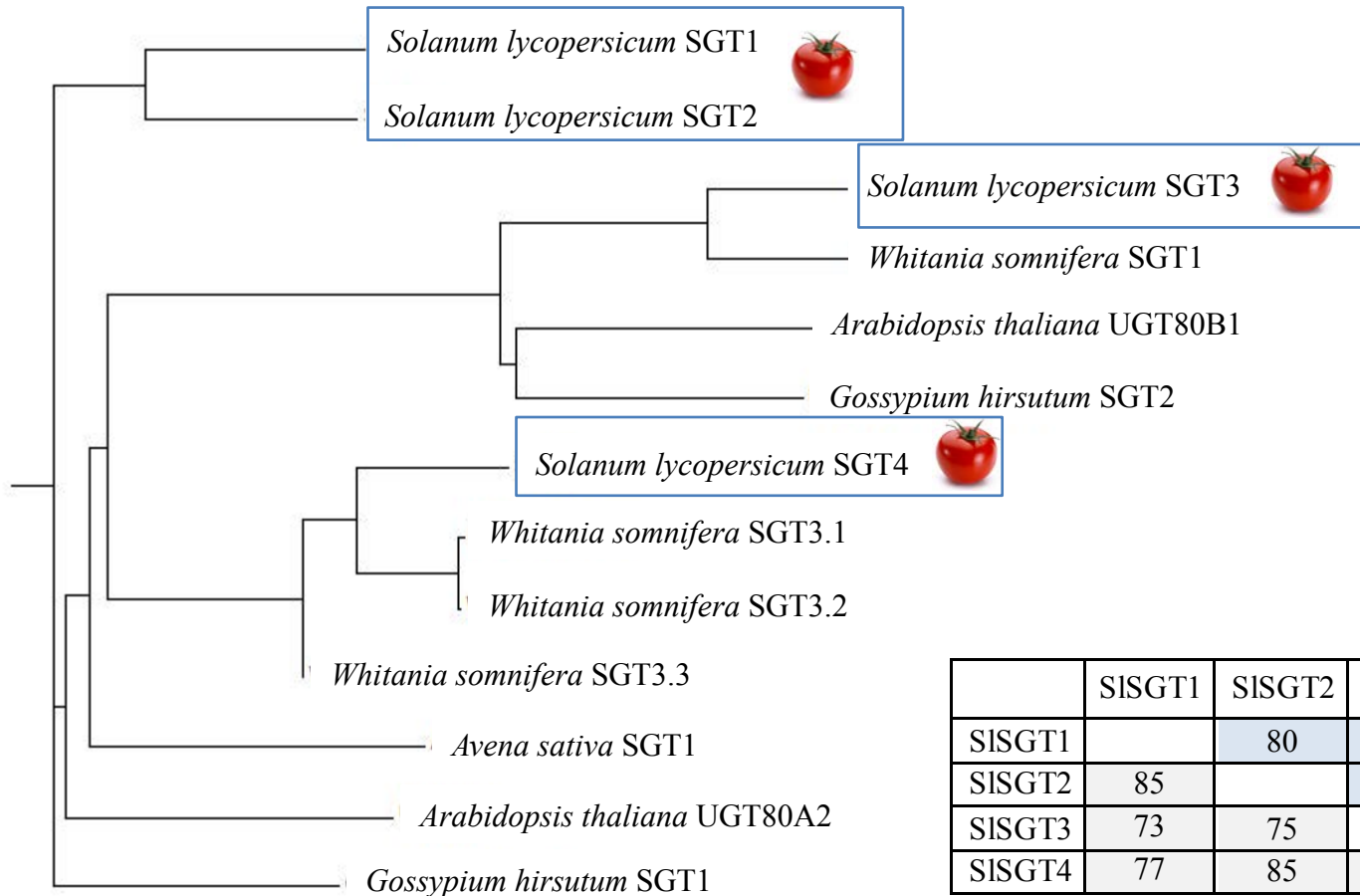
Sterol 3-β-D-glucoside + UDP



GC-MS



Relació evolutiva entre diferents esterol glucosiltransferases de plantes.



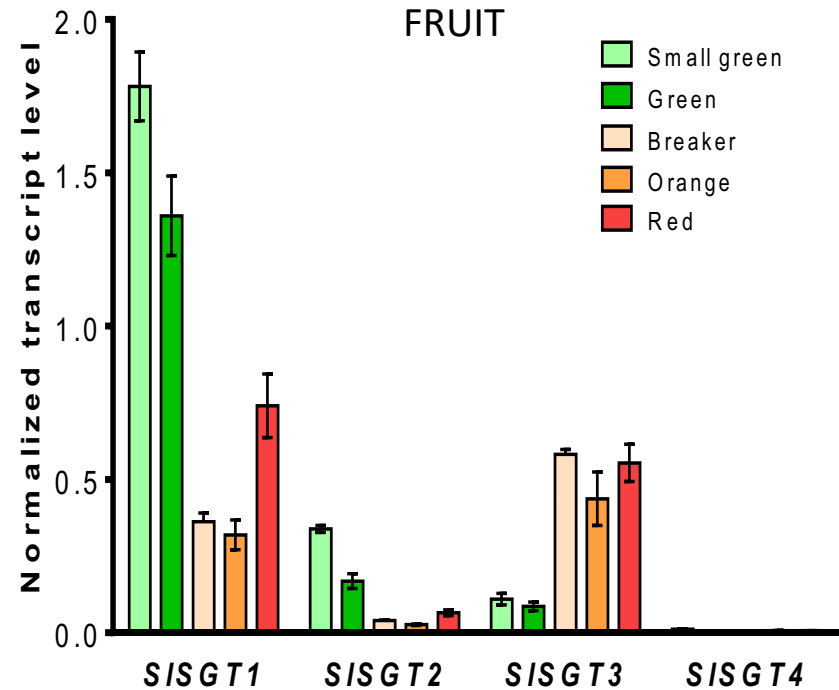
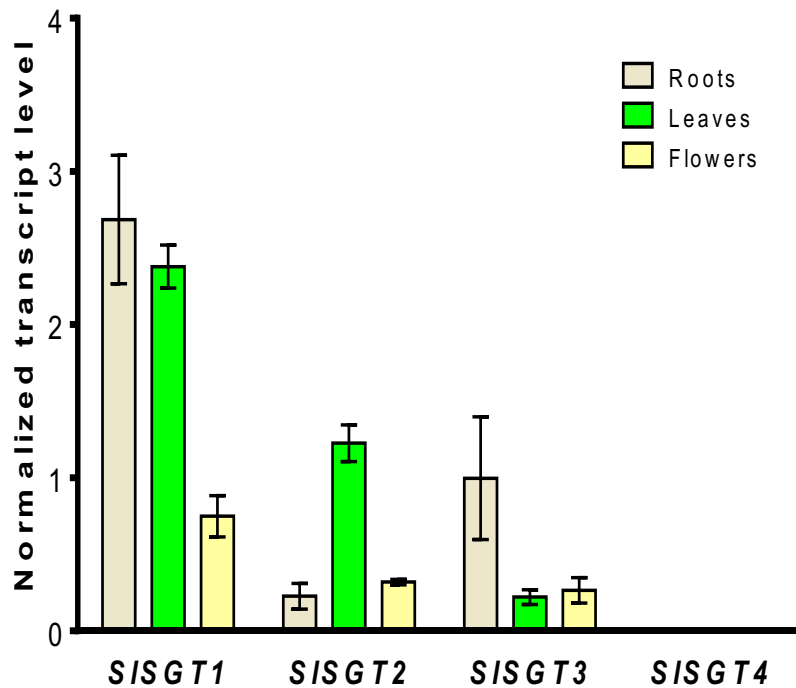
	SISGT1	SISGT2	SISGT3	SISGT4
SISGT1		80	59	65
SISGT2	85		59	74
SISGT3	73	75		50
SISGT4	77	85	64	

0.1

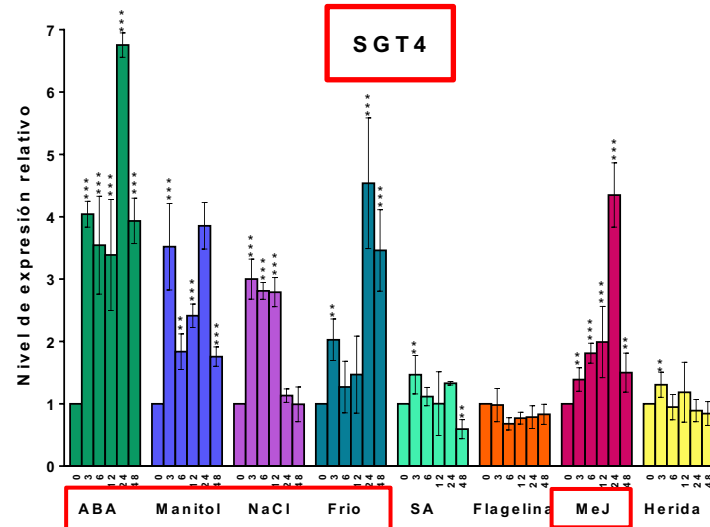
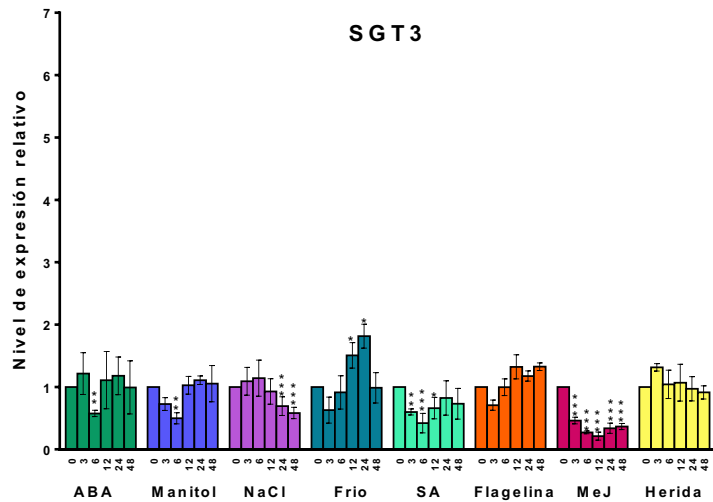
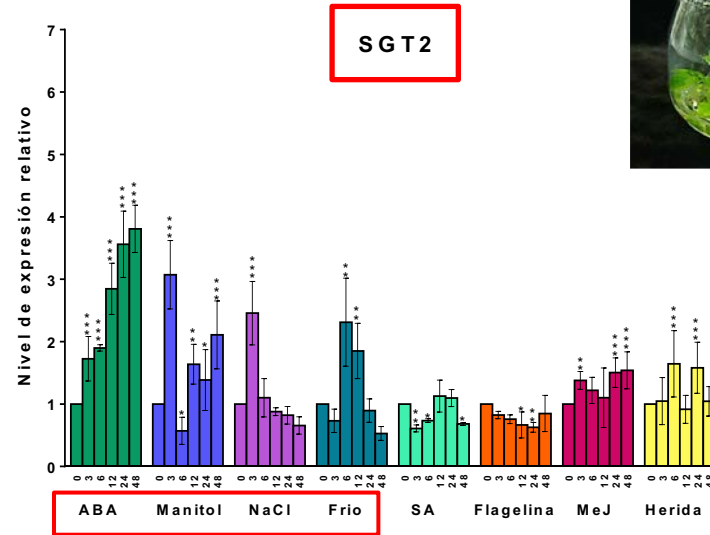
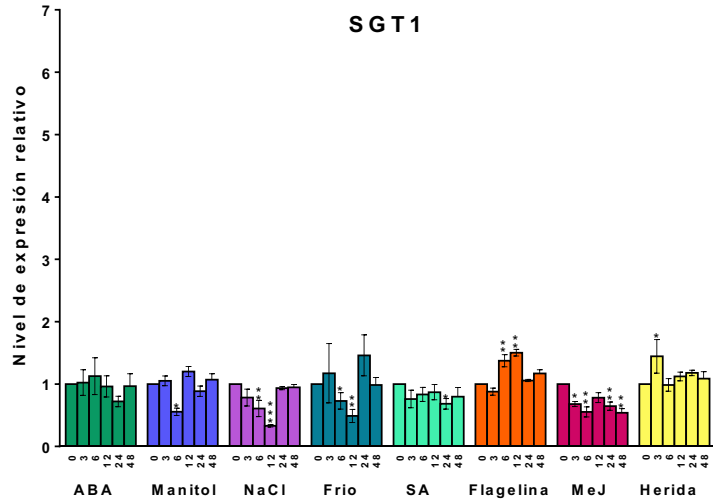
Els 4 gens *SISGT* (*SISGT1* a *4*) s'expressen diferencialment



Quantificació dels nivells de mRNA mitjançant RT-qPCR utilitzant RNA (cDNA) obtingut de diferents òrgans i fruits en diferents etapes de creixement i maduració



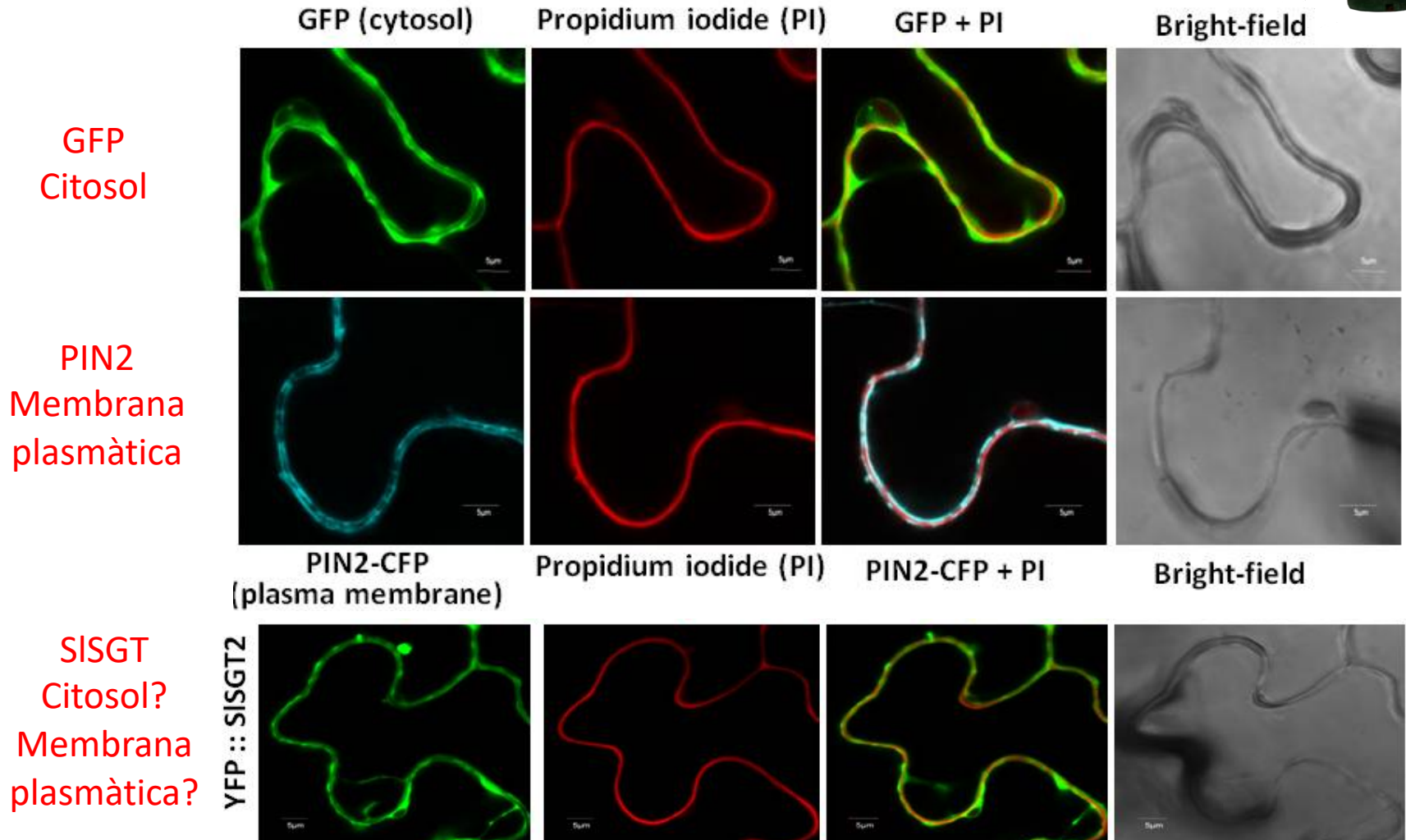
Els gens *SISGT* responen de forma different a l'estrès



Localització subcel.lular dels isoenzims SISGT



Expressió transitòria via *A. tumefaciens* en fulles de *N. benthamiana*



Els isoenzims SSGT es reparteixen en proporcions variables entre el citosol i la membrana plasmàtica

Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

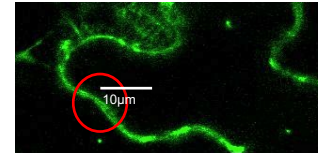
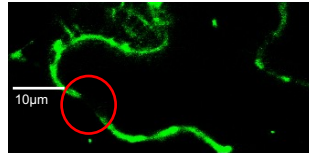
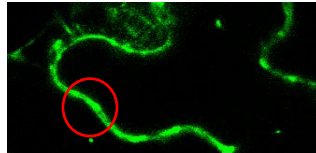
Blanqueig de la regió d'interès amb llum làser d'alta intensitat



Post-blanqueig

Al cap de 60 s

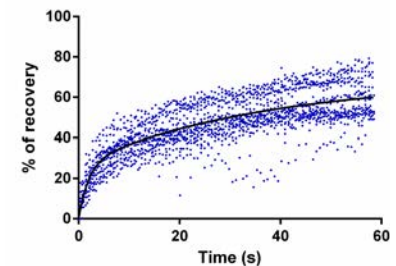
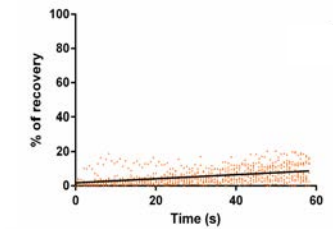
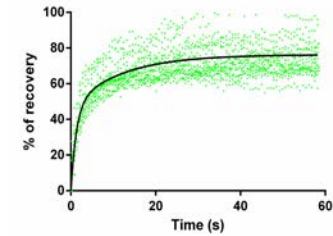
GFP



PIN2-YFP

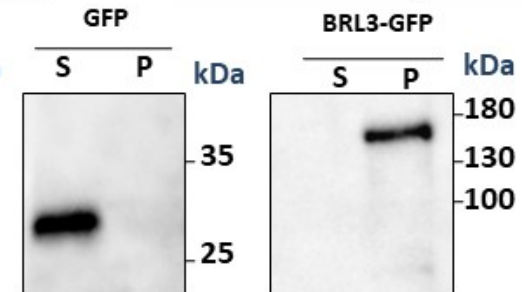
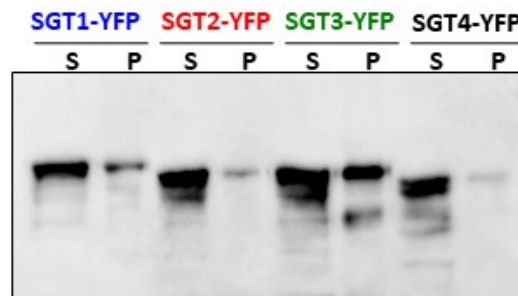
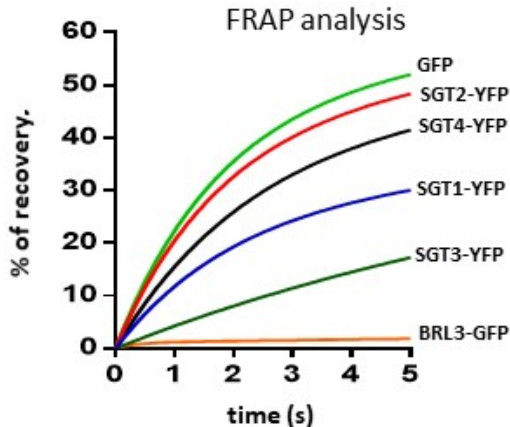


SISGT1-YFP

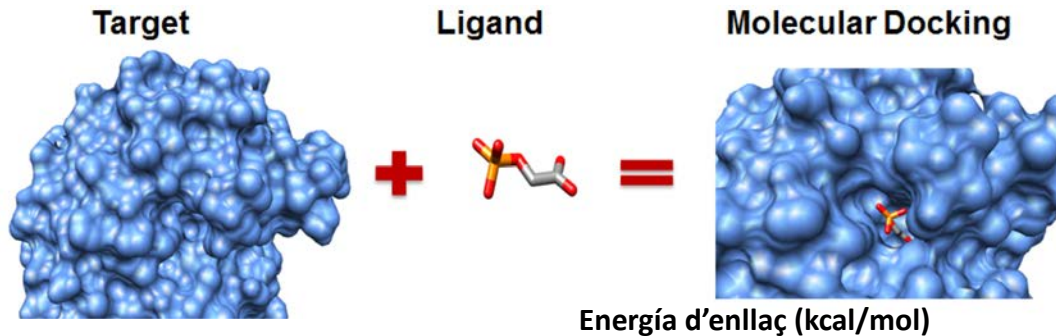


Western blot – Anticossos anti-GFP

Subcellular fractionation analysis



Estudi *in silico* de les preferències de sustrat dels isoenzims SISGT



Permet modelar interaccions entre molècules petites i proteïnes, i predir afinitats d'unió entre dos molècules.

Energia d'enllaç (kcal/mol)

Compound	SISGT1	SISGT2	SISGT3	SISGT4
Sterols				
24-Methylene-cholesterol	-8,3	-7,3	-6,8	-8,5
Campesterol	-8,3	-7,4	-6,9	-8,2
Brassicasterol	-8,9	-7,8	-7	-8,3
Beta-sitosterol	-8	-7,2	-6,9	-7,8
Stigmasterol	-8,6	-7,6	-7,4	-8,4
Cholesterol	-8,1	-7,1	-6,9	-7,9
Ergosterol	-8,8	-8,1	-6,7	-8,4
Steroidal alkaloids				
Tomatidine	-9,9	-8,2	-4,8	-9,6
Dihydrotomatidine	-9,3	-9	-7,3	-8,8
Solasodine	-9,8	-8,5	-4,3	-9,7

↑ Energia d'enllaç
Menys afinitat

↓ Més afinitat

Afinitats diferencials pels possibles sustrats esterols

Alta afinitat pels alcaloides esteroidals. Els glucoalcaloides esteroidals són compostos de defensa

- ✓ Suggereixen diferències d'afinitat pels potencials sustrats entre las 4 SISGTs
- ✓ SISGT3 sembla tenir menor afinitat per qualsevol dels sustrats assajats
- ✓ Falta confirmació experimental

En col.laboració amb:

Dr. M. Cristina Vega
Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC, Madrid).

Els gens SISGT s'indueixen de forma diferencial en resposta a estímuls d'estrès

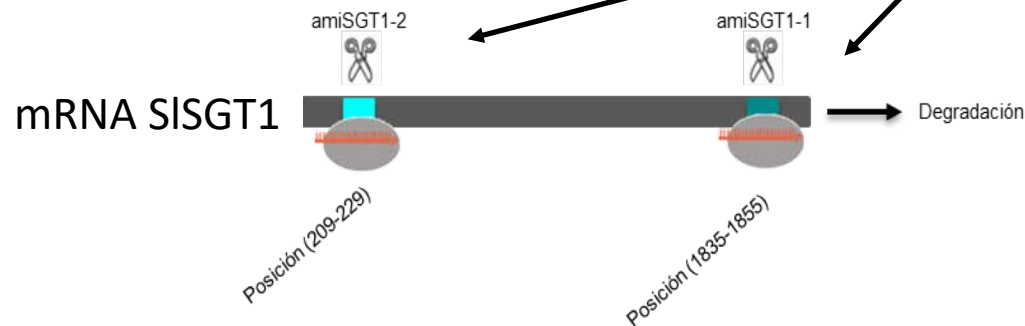
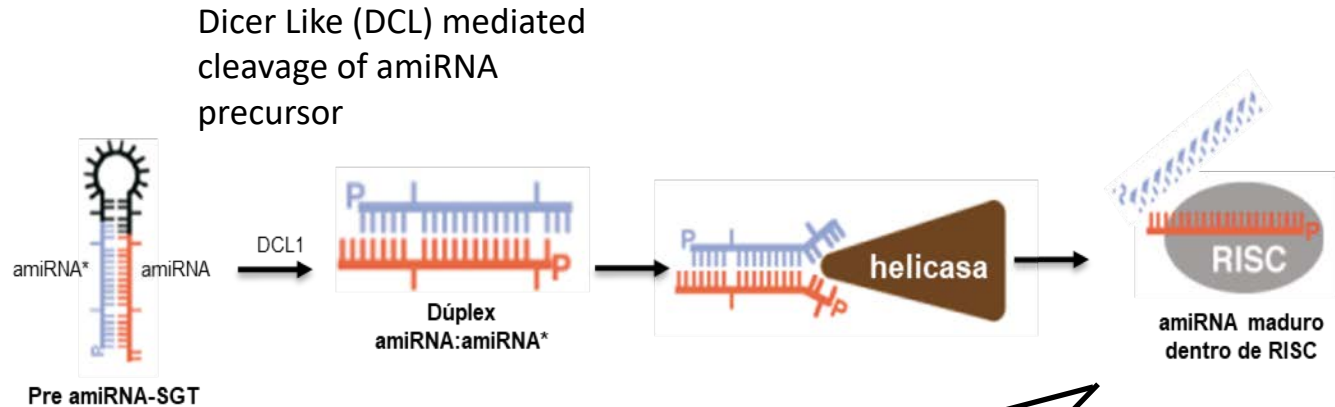
Els gens SISGT s'expressen de forma diferencial en la planta i durant el creixement i la maduració dels fruits

Tenen una funció especialitzada els isoenzims SISGT en el desenvolupament i la resposta a estrès de la planta i el fruit del tomàquet?

Estem generant i caracteritzant una col.lecció de mutants de tomàquet amb guany (sobreexpressió) o pèrdua (knock-out/down) de funció de gens SISGT específics.

Els isoenzims SISGT es distribueixen de manera diferencial entre la membrana plasmàtica i el citosol.

Obtenció de mutants knock-down *sgt1* de tomàquet mitjançant silenciament de l'expressió mediat per amiRNAs



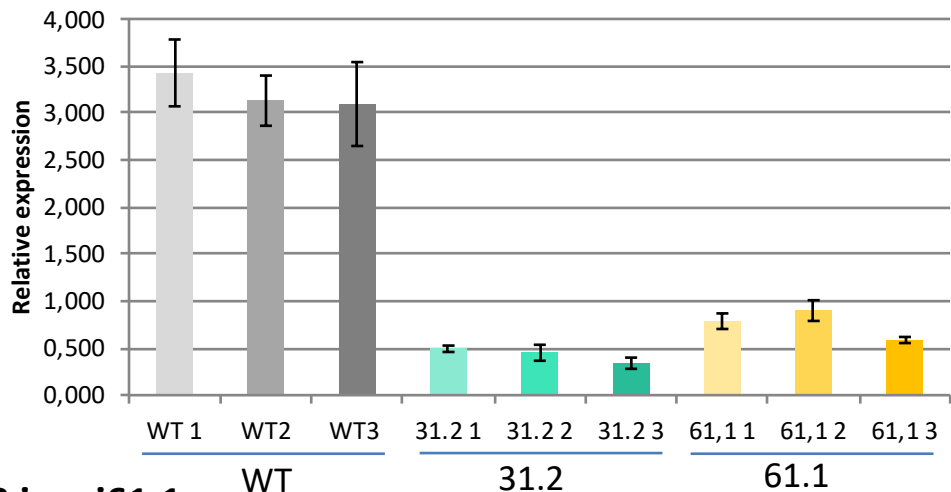
One strand of amiRNA gets incorporated into AGO/RISC and guides RISC (RNA-Induced Silencing Complex) to inhibit target mRNA expression either by mRNA translation inhibition or degradation of mRNA

Caracterització de mutants knock-down *sgt1* de tomàquet

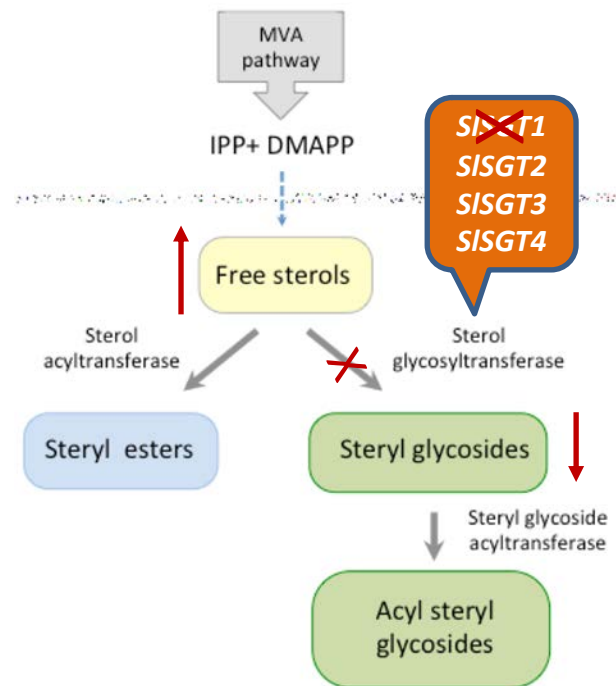
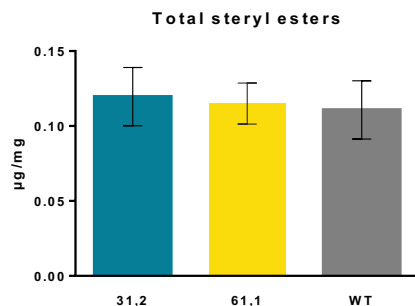
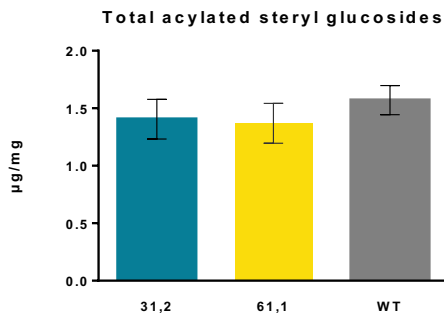
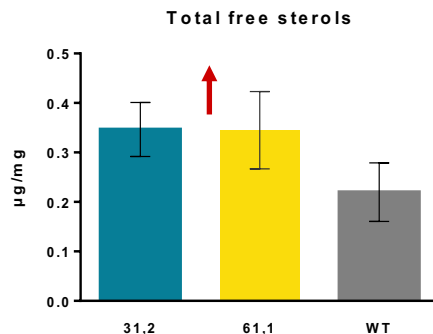
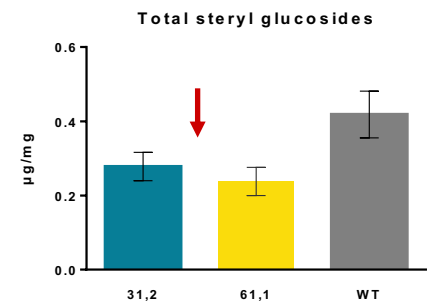
Línies de tomàquet ami31.2 i ami61.1

WT (x10)	31,2 (x10)	61,1 (x10)
WT (x10)	31,2 (x10)	61,1 (x10)
WT (x10)	31,2 (x10)	61,1 (x10)

Nivells de mRNA SISGT1 mesurats per RT-qPCR

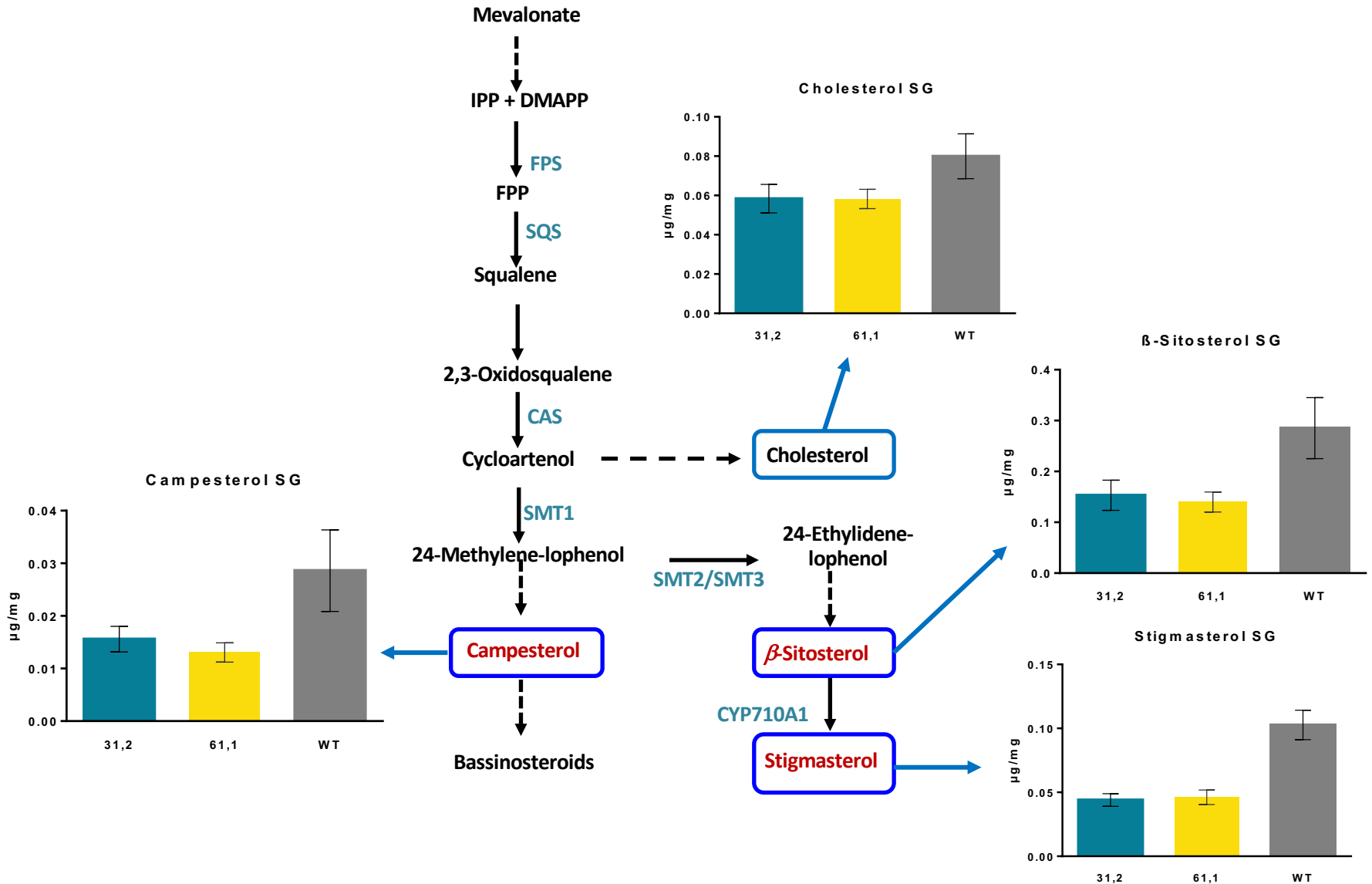


Nivells d'esterols en les línies ami31.2 i ami61.1

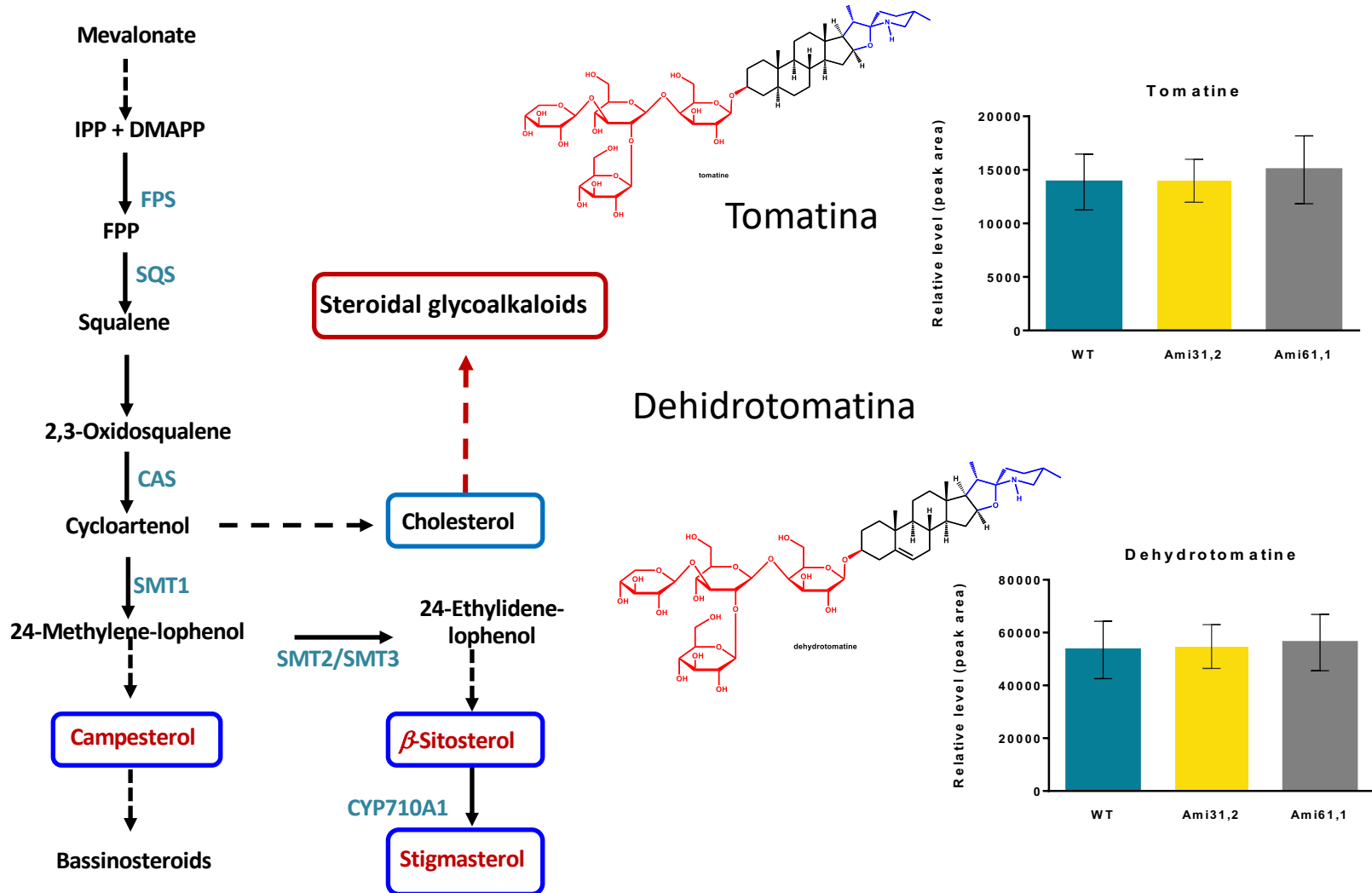


El silenciament de *S/SGT1* altera els nivells d'esterols glucosilats

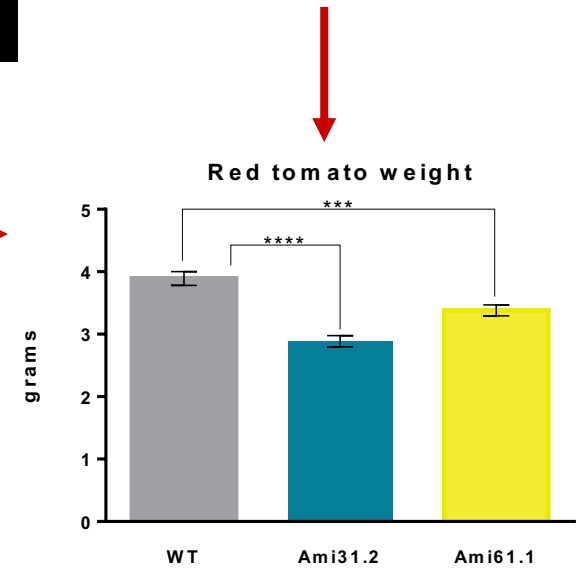
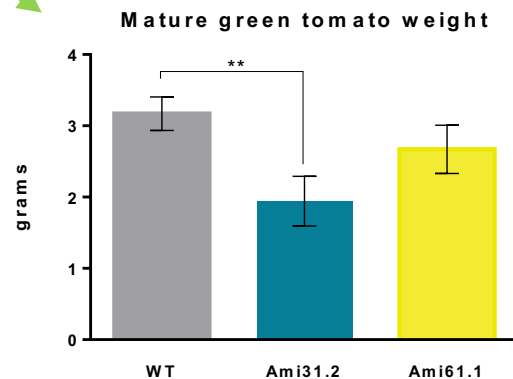
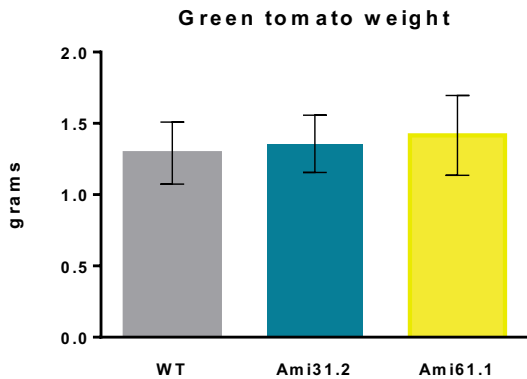
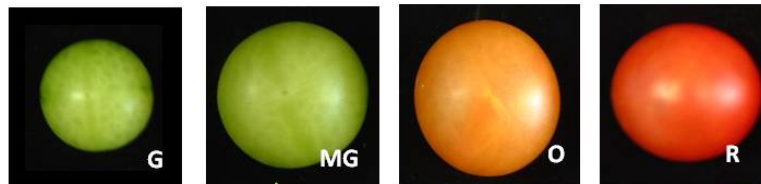
Estigmasterol > β -sitosterol/campesterol > colesterol



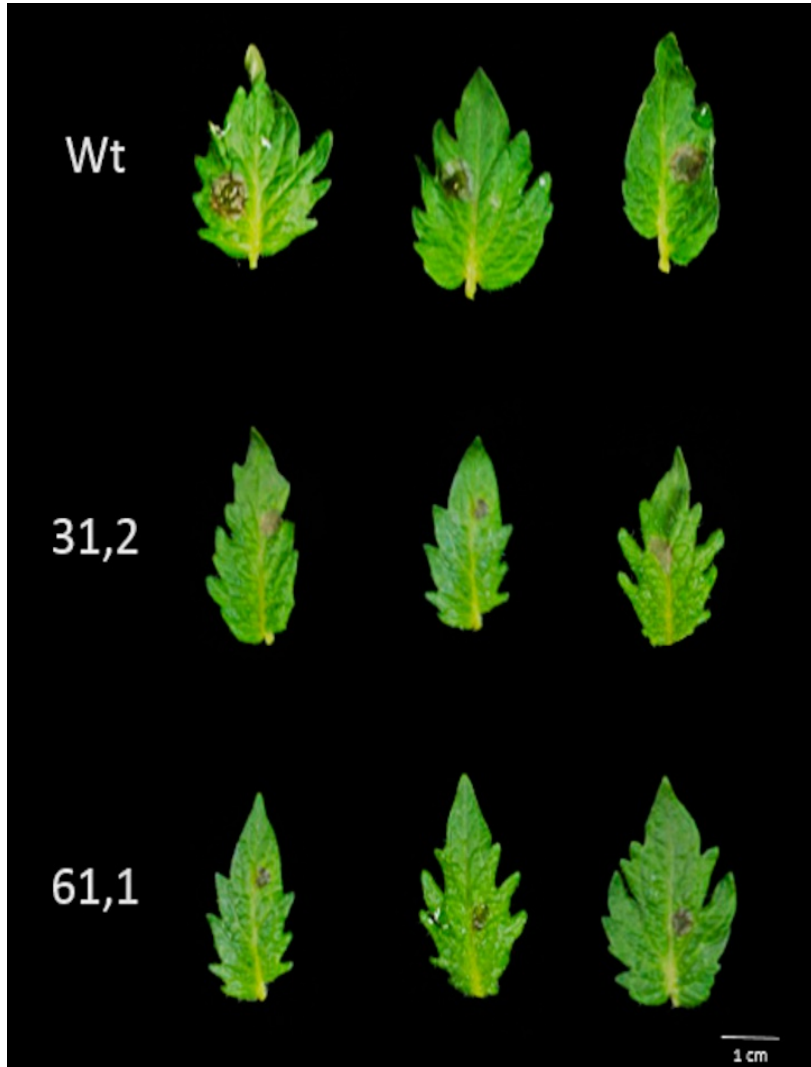
El silenciament de *SISGT1* no altera els nivells de glucoalcaloides esteroidals



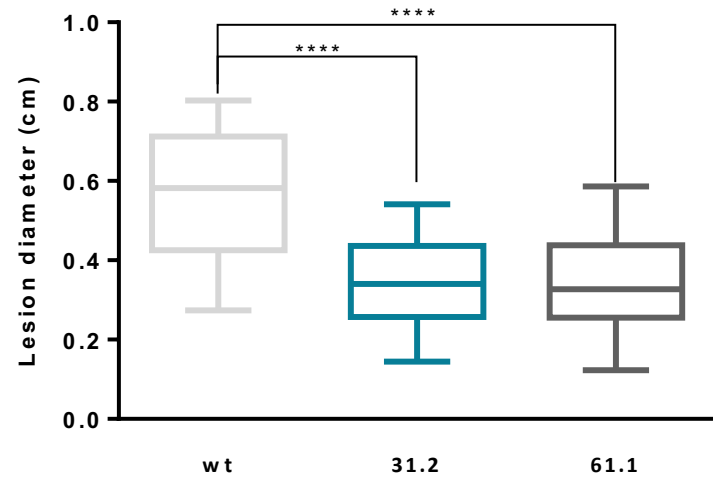
El silenciament de *SISGT1* provoca un fenotip d'enanisme i una disminució de la mida i el pes dels fruits...



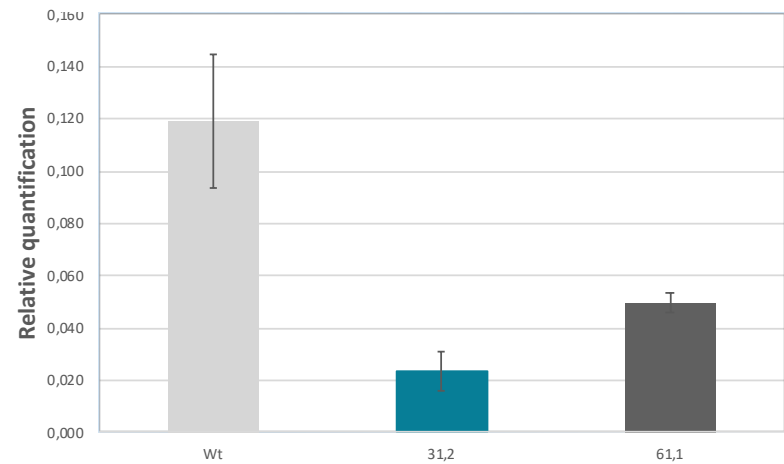
... però confereix tolerància a la infecció pel fong necròtrof *Botrytis cinerea*



Quantificació del diàmetre de les lesions



Quantificació del DNA del fong (qPCR)



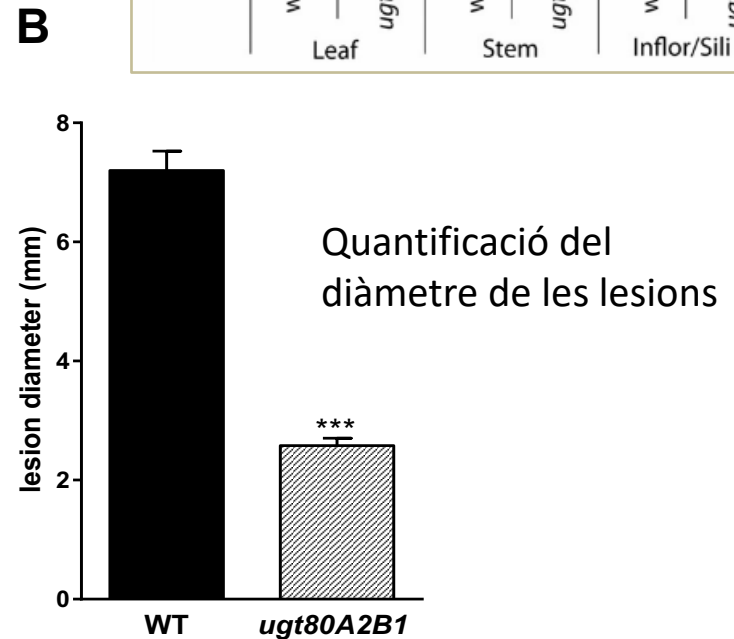
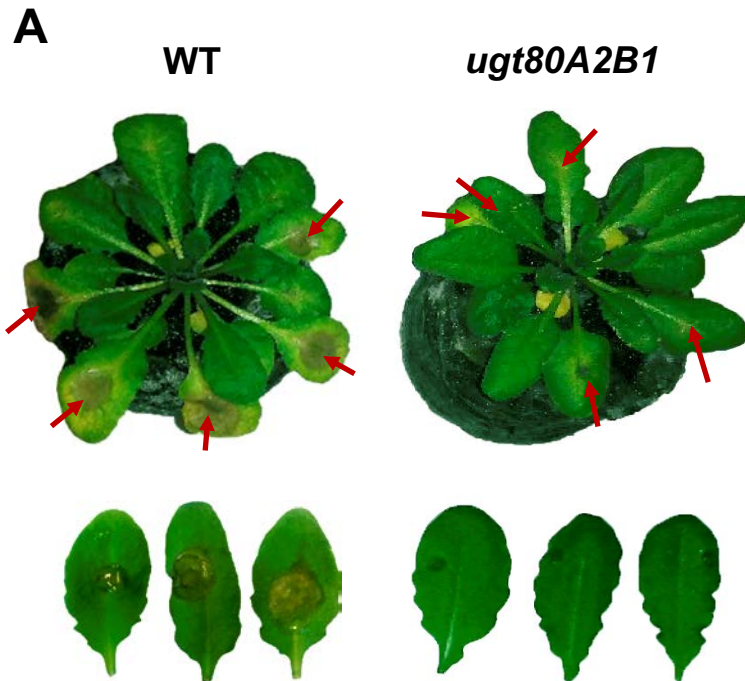
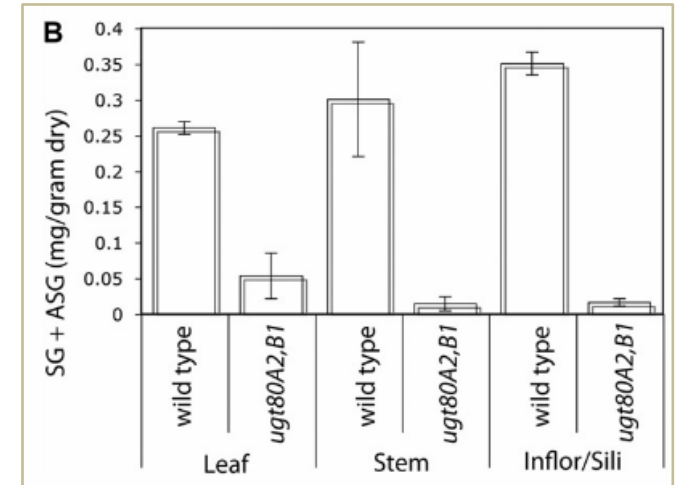
Nivells reduïts d'esterols glucosilats també fan que *Arabidopsis* sigui més tolerant a la infecció per *Botrytis cinerea*



Doble *sgt* knock-out mutant



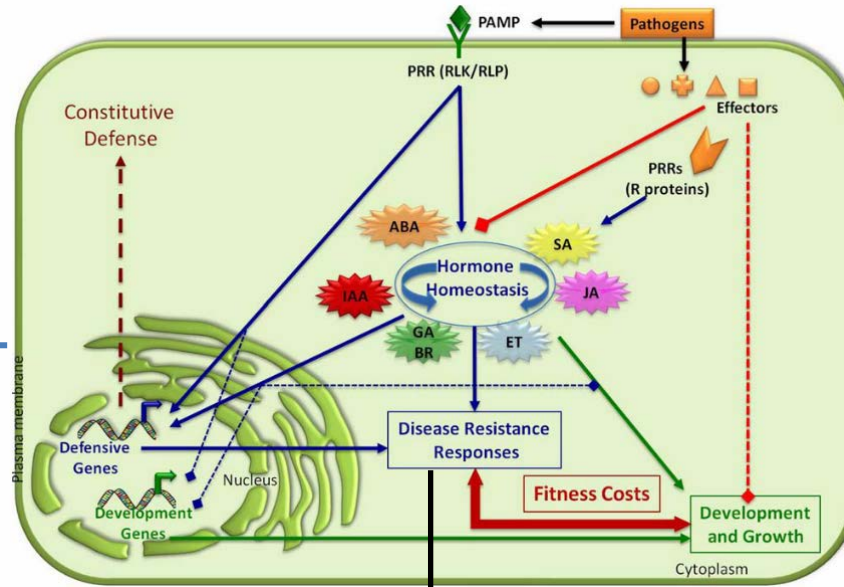
DeBolt et al. (2009) *Plant Physiol.* 151, 78-87.



Metabolòmica: els nivells d'àcid jasmònic i camalexina estàn augmentats en el doble mutant d'*Arabidopsis* infectat amb *Botrytis cinerea*

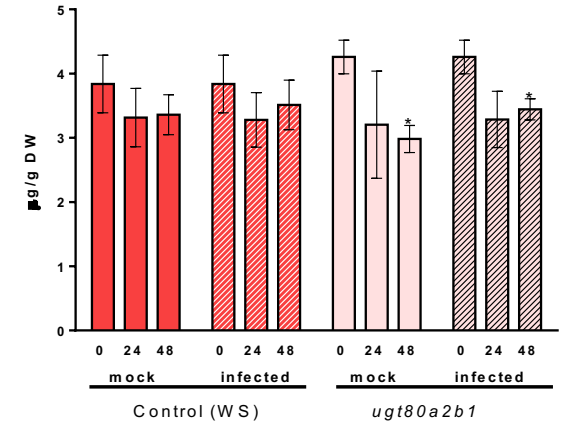
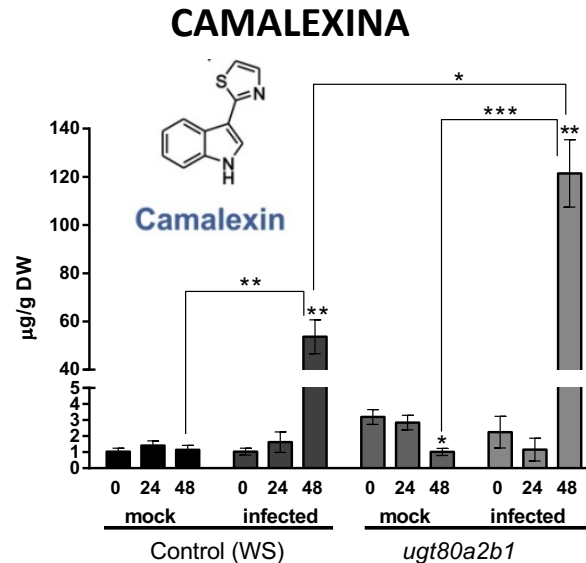
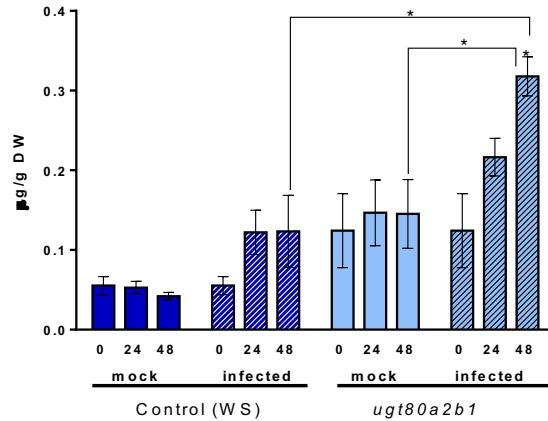
Àcid jasmònic (JA)
Resistència a patògens necrotròfics

Àcid salicílic (SA)
Resistència a patògens biotròfics

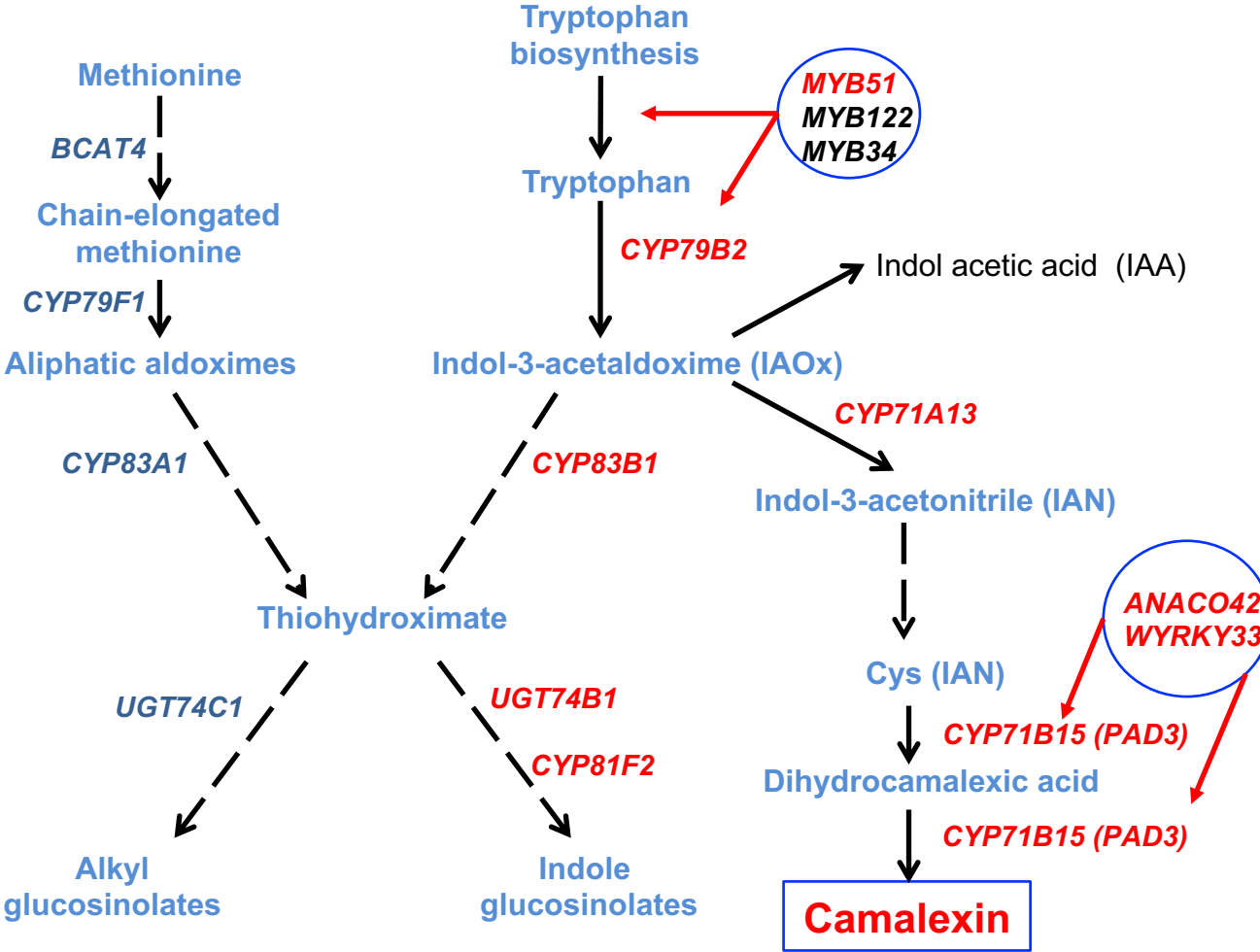
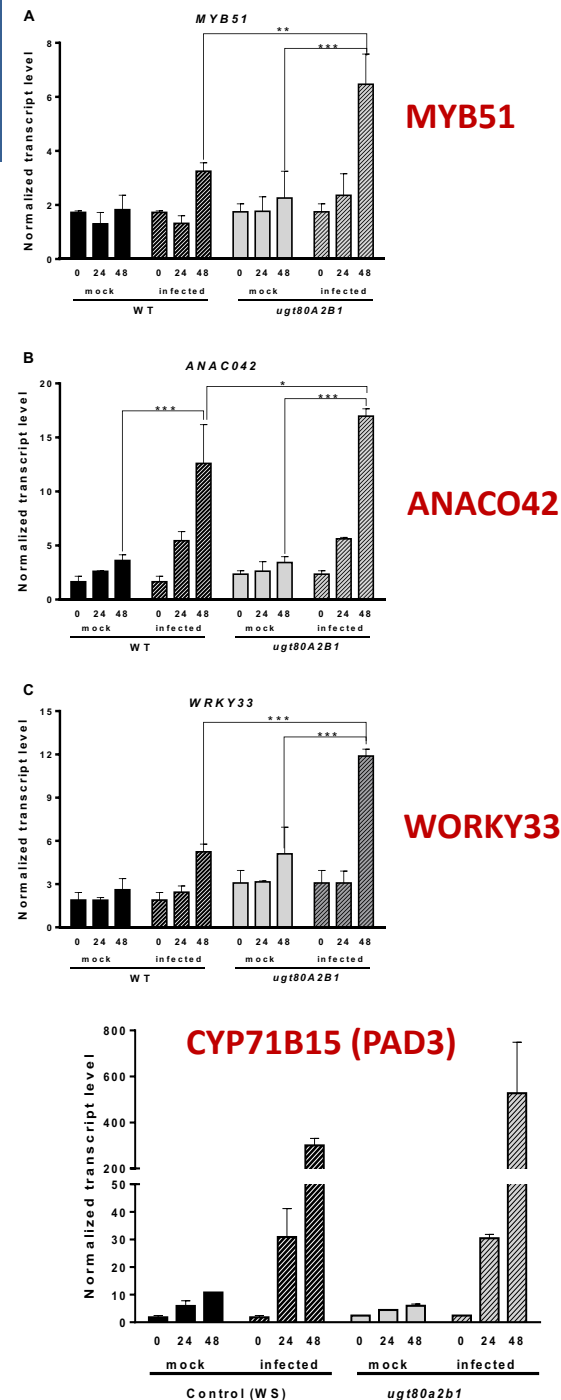


Àcid jasmònic

Àcid salicílic



Transcriptòmica: l'expressió de gens reguladors i biosintètics està sobreinduída en el doble mutant d'*Arabidopsis* infectat amb *Botrytis cinerea*



En síntesi...

Hem identificat i caracteritzat estructural i funcionalment els quatre gens/enzims (SGTs) responsables de la síntesi dels esterols glucosilats (SGs) en tomàquet.

Hem obtingut evidències experimentals del paper important que els esterols glucosilats tenen en la resposta de les plantes (*Arabidopsis* i tomàquet) a l'atac per patògens (*B. cinerea*).

Estem utilitzant les eines biològiques i els coneixements obtinguts per esbrinar els processos bioquímics i moleculars a través dels quals els SGs i les SGTs que els sintetitzen desenvolupen les seves funcions biològiques en:

- **El creixement i el desenvolupament de la planta de tomàquet**
- **La formació, el desenvolupament i la maduració del fruit**
- **La resposta adaptativa a l'estrès biòtic i abiòtic.**

Posar a punt mètodes eficients de transformació i regeneració de tipologies de tomàquet d'interès agronòmic i, eventualment, aplicar-los per introduir al·lels mutants d'interès relacionats amb el metabolisme d'esterols glucosilats.



Línies avançades del programa de millora de Semillas Fitó



Cherry

fruit petit i rodò, de 10 a 15 g, amb alt index Brix



Beef

Fruit gran i carnós, de fins a 600 g, amb diferents formes



Pera

fruit de mida mitjana i forma allargada



Larga vida

Fruits en branca, de maduració lenta, i llarga qualitat post-collita



- Transformació de cotiledons
- Transformació de segments de tija (entrenusos)



Actualment... (lab 203)



Alma Burciaga
Angel Chávez
Joan Manel López
Dr. Kostadin Atanasov

Dr. Alejandro Lara
Dra. Nidia Castillo
Dra. Karla Ramírez
Dra. Montserrat Arró
Dr. Albert Boronat

Dra. Teresa Altabella
Dr. Albert Ferrer

Col.laboracions:
Dr. Victor Flors
Dra. Cristina Vega
Dr. Asaph Aharoni
Dr. Torben Jahrmann



AGL2013-43522-R
AGL2017-88842-R



2014 SGR 1434
2017 SGR 0710



Ens podeu seguir a Twitter: [Crag phytosterolslab@LabCrag](https://twitter.com/Crag_phytosterolslab@LabCrag)

<https://www.cragenomica.es/research-groups/isoprenoid-metabolism-tomato-involvement-development-and-stress-response>