

Efecto de mutaciones genéticas puntuales en la actividad enzimática de FAD3, una enzima implicada en la producción de ácidos grasos ω 3



Pedro Pastor Andreu

2015

Estación experimental de Aula Dei
Consejo superior de investigaciones científicas
(CSIC)

Trabajo de Fin de Grado

**Análisis de residuos implicados en el
plegamiento y función de ω 3 desaturasa
reticular FAD3 en *Arabidopsis thaliana***

Memoria presentada por Pedro Pastor Andreu,
estudiante del grado en Biotecnología de la
Universidad de Zaragoza

Directores del Trabajo Fin de Grado:

Dr. Miguel Alfonso Lozano y Dra. Sara López Gomollón

Zaragoza 2015

INDICE

RESUMEN/SUMMARY.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. ÁCIDOS GRASOS COMO CONSTITUYENTES DE LOS LÍPIDOS.....	2
1.2. LÍPIDOS DE MEMBRANA EN PLANTAS.....	3
1.3. BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS.....	5
1.4. DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS.....	7
1.5. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS ω -3 DESATURASAS.....	7
1.6. <i>Arabidopsis thaliana</i> COMO PLANTA MODELO EN LA INVESTIGACIÓN FITOBiolÓGICA.....	11
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1. ESPECIE VEGETAL UTILIZADA Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	12
3.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	12
3.2.1. Extracción de RNA.....	12
3.2.2. Determinación de la concentración y pureza del RNA.....	13
3.2.3. Tratamiento del RNA con DNAsa.....	13
3.2.4. Síntesis de cDNA.....	13
3.2.5. Amplificación del gen <i>FAD3</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>AtFAD3</i>) mediante PCR.....	13
3.2.6. Electroforesis en gel de agarosa.....	14
3.2.7. Ligación de productos de PCR al vector pGEM-T Easy.....	15
3.2.8. Ligación de fragmentos de DNA al vector pYES2.....	15
3.2.9. Transformación de células termocompetentes de <i>Escherichia coli</i>	16
3.2.10. Extracción de DNA plasmídico y detección del gen clonado.....	16
3.2.11. Secuenciación de ácidos nucleicos.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LAS DISTINTAS LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS.....	18
4.2. INTEGRIDAD, CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL RNA.....	19
4.3. RTPCR DEL GEN DE LA ACTINA Y DE <i>AtFAD3</i>	20
4.4. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES Y DETECCIÓN DE CLONES QUE INCORPORAN EL PLÁSMIDO CON <i>AtFAD3</i>	21
4.5. SECUENCIACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO.....	22
5. CONCLUSIONES.....	25
6. BIBLIOGRAFÍA.....	26
ANEXOS.....	28

RESUMEN

Las desaturasas de ácidos grasos son enzimas que introducen un enlace doble o insaturado en la cadena alquílica de un ácido graso. La mayoría de estas enzimas son proteínas de membrana con fuerte carácter hidrofóbico lo que complica su purificación y cristalización por lo que se desconoce su estructura y los residuos que constituyen su centro activo. Se sabe que presentan 3 cajas de histidinas que están muy conservadas entre las distintas desaturasas y entre diferentes especies vegetales y se cree que estas cajas de histidinas podrían participar coordinando átomos de hierro para la reacción de insaturación, en un mecanismo básicamente desconocido.

Existen mutantes de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* deficientes en la insaturación de ácidos grasos cuyo estudio permitirá identificar residuos implicados en la función de las ω 3 desaturasas.

En este trabajo se clonó el gen *FAD3* (que codifica para una ω 3 desaturasa reticular) de tres líneas vegetales (*Arabidopsis thaliana* silvestre, mutante *fad3* y mutante *fad378*) en el vector pGEM-T Easy y se llevaron a cabo reacciones de secuenciación detectando una mutación puntual en el aminoácido 103 del mutante *fad378* y otra mutación puntual en el aminoácido 292 del mutante *fad3*. Puesto que estas mutaciones puntuales anulan la actividad desaturasa de *FAD3* se puede decir que los aminoácidos de las posiciones citadas son imprescindibles para la actividad enzimática, ya sea porque forman parte de su centro activo o porque están implicados en el correcto plegamiento de la enzima.

SUMMARY

Fatty acid desaturases are enzymes that introduce a single bond between two carbon atoms in a double or unsaturated bond in the alkyl chain of the fatty acids. Most of these enzymes are membrane proteins with high hydrophobic character which complicates their purification and crystallization. Accordingly, their structure and the residues of their active site are unknown. It is known that these kind of proteins have three histidine boxes that are highly conserved between different desaturases and between species of plants and it is believed that these histidine boxes could participate in the reaction of unsaturation by binding iron atoms to the protein through a mechanism that is completely unknown. There are *Arabidopsis thaliana* mutants deficient in fatty acid unsaturation that could be used to identify residues involved in the function of ω 3 desaturases.

In this project, the *FAD3* gene (that encodes a ω 3 reticular desaturase) of three plant lines (wild type *Arabidopsis thaliana*, *fad3* mutant and *fad378* mutant) was cloned into the plasmid pGEMT-T Easy. Then, the genes were sequenced and two punctual mutations were detected. One was located in the residue 103 of the *fad378* mutant and the other was in the residue 292 of the *fad3* mutant. Because these punctual mutations inhibit the *FAD3* desaturase activity it is possible that the amino acids of described positions are essential for protein function, either because they are part of the active site or are involved in the correct folding of the enzyme.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ÁCIDOS GRASOS COMO CONSTITUYENTES DE LOS LÍPIDOS

Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas compuestas principalmente por carbono, hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener nitrógeno, fósforo y azufre. Son hidrofóbicos y solubles en disolventes orgánicos. Desempeñan numerosas e importantes funciones biológicas en las células, tales como *función estructural* (son los principales constituyentes de las membranas celulares), *función de reserva energética* (triacilglicéridos) y *función reguladora* ya que algunos de ellos pueden actuar como segundos mensajeros y como hormonas participando en la transducción de señales celulares (inositol trifosfato o derivados jasmónicos).

Los principales constituyentes de los lípidos son los ácidos grasos. Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas alifáticas compuestas por un número par de átomos de carbono y en cuyo extremo se encuentra un grupo carboxilo. Los átomos de carbono pueden estar unidos entre sí mediante enlaces covalentes simples o dobles. En caso de que el ácido graso no contenga dobles enlaces se denominará ácido graso saturado y si presenta uno o varios dobles enlaces será insaturado. Los ácidos grasos insaturados son importantes ya que permiten que las membranas tengan una fluidez adecuada y mantengan sus propiedades físico-químicas. Los dobles enlaces pueden estar en configuración *cis* (en el mismo plano espacial) formando ángulos o codos en su estructura o en posición *trans* (en distinto plano) cuya estructura es similar a la de los ácidos grasos saturados. En el caso de los vegetales la mayoría de los ácidos grasos insaturados presentan la configuración *cis*.

Los ácidos grasos se pueden denominar según su nombre común (ej. ácido oleico), según su nombre sistemático de la IUPAC (ej. ácido *cis*-9-octadecenoico) o según la notación abreviada (ej. 18:1^{Δ9}). Según esta notación, la primera cifra representa el número de átomos de carbono (18), la segunda el número de dobles enlaces (1) y el superíndice (Δ9) la posición del doble enlace, contando desde el carbono del grupo carboxilo (carbono Δ1, ver *Figura 1.1*). Como la mayoría de los ácidos grasos son isómeros *cis*, no se especifica la conformación en su nomenclatura, excepto si son *trans* (ej. 16:1^{Δ3t}). Otra alternativa es indicar la posición de los dobles enlaces desde el grupo metilo terminal o carbono ω o n (ej. el 18:3^{Δ9,12,15} es un ácido graso de la familia ω3 o n-3).

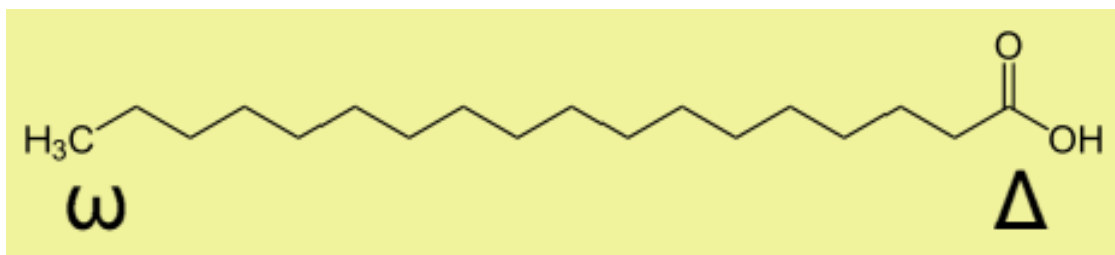


Figura 1.1. Carbonos Δ y ω en la estructura de un ácido graso.

Los principales ácidos grasos presentes en las plantas, así como aquellos que constituyen las membranas aparecen en la *Tabla 1.1*.

Nombre común	Estructura	Abreviatura
Ácido laúrico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12:0
Ácido palmítico*	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16:0
Ácido esteárico*	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	18:0
Ácido araquidónico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	20:0
Ácido behénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	22:0
Ácido lignocérico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	24:0
Ácido oleico*	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:1 ^{Δ9}
Ácido petroselinico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	18:1 ^{Δ6}
Ácido linoleico*	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:2 ^{Δ9,12}
Ácido α-linoénico*	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:3 ^{Δ9,12,15}
Ácido γ-linolénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	18:3 ^{Δ6,9,12}
Ácido ruginico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	16:3 ^{Δ7,10,13}
Ácido erúcido	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	22:1 ^{Δ13}

Tabla 1.1. Principales ácidos grasos presentes en los tejidos vegetales. En rojo ácidos grasos saturados y en morado los insaturados. Los ácidos grasos marcados con * son de membrana mientras que el resto tienen función de reserva. Tabla adaptada por Raquel Collados a partir de Somerville et al. (2000).

La composición de ácidos grasos difiere de unas plantas a otras como se puede ver en la Tabla 1.2. donde se muestra una comparativa entre los ácidos grasos totales que aparecen en hojas de Arabidopsis y de soja.

Ácido graso	Composición de ácidos grasos (%)							
	16:0	16:1	16:2	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3
Arabidopsis	17.5	0.6	3.7	11.8	1.5	2.6	14.4	47.7
Soja	12.5	3.2	-	-	4.1	5.1	12.4	61.7

Tabla 1.2. Composición de ácidos grasos totales de hojas de Arabidopsis (Bonaventure et al., 2003) y de soja (Andreu et al., 2010).

Por ejemplo, 16:2 y 16:3 están presentes en Arabidopsis pero no en soja; u otros ácidos grasos, como el 18:3, (mayoritario) son mucho más abundantes en Soja que en Arabidopsis. Además la composición de ácidos grasos varía de unas hojas a otras de las plantas.

1.2. LÍPIDOS DE MEMBRANA EN PLANTAS

Los lípidos se pueden clasificar en función de si presentan ácidos grasos en su composición o no. Así mismo los lípidos con ácidos grasos se pueden dividir en simples y complejos, siendo estos últimos los que, además de contener en su estructura carbono, hidrógeno y oxígeno, contienen otros elementos como nitrógeno, fósforo, azufre u otra biomolécula como un glúcido.

Las membranas biológicas están constituidas principalmente por mezclas de lípidos complejos, es decir aquellos constituidos por una molécula de glicerol a la que se unen dos ácidos grasos y un grupo polar. Para designar la posición en la que el ácido graso se esterifica en la molécula de glicerol se utiliza la abreviatura sn (de sus siglas en inglés stereospecific nomenclature). Sn-3 denota el grupo hidroxilo terminal del glicerol

que es fosforilado o al que se une el grupo polar, sn-2 se refiere al hidroxilo central y sn-1 al hidroxilo terminal no fosforilado (*Figura 1.2.*)

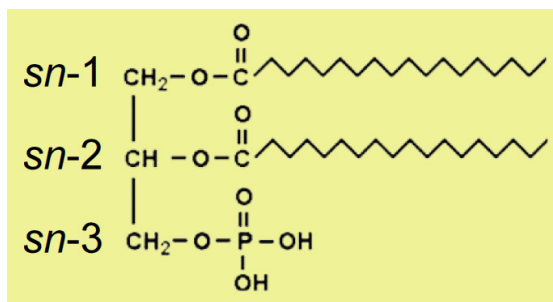


Figura 1.2. Nomenclatura de los lípidos complejos.

Los lípidos complejos son glucolípidos y fosfolípidos. Los fosfolípidos son mayoritarios en membranas extraplastidiales, siendo los esfingolípidos exclusivos de este tipo de membranas, mientras que en membranas cloroplásticas destaca la presencia de galactolípidos y sulfolípidos.

- **Galactolípidos:** presentan un ácido graso (que suele ser poliinsaturado) esterificado al glicerol en posición sn-1 y otro en posición sn-2. En posición sn-3 se encuentran unidas de forma covalente una o dos moléculas de galactosa dando lugar al monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y al digalactosildiacilglicerol (DGDG), respectivamente. Se encuentran en su mayoría en membranas plastidiales. Se han encontrado formando parte de los fotosistemas I (Jones *et al.*, 2007) y II (Guskov *et al.*, 2009) lo que denota su importancia en el mantenimiento de la estructura de los mismos.
- **Fosfolípidos:** lípidos que presentan ácidos grasos esterificados al glicerol en las posiciones sn-1 y sn-2. Los ácidos grasos de los fosfolípidos son principalmente 16:0, 18:2, 18:3, 18:0 y 18:1 pero no contienen 16:2 ni 16:3. En posición sn-3 presentan un grupo polar que se une al glicerol a través de un grupo fosfato. El grupo polar puede ser ácido fosfatídico (PA), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) o fosfatidilinositol (PI). Los más numerosos son PA, PG y PC. EL PA se produce tanto en el cloroplasto como en el retículo endoplasmático (RE). Es el intermediario a partir del cual se generan el resto de fosfolípidos. El PG se sintetiza en la membrana interna del cloroplasto, en la membrana interna mitocondrial y en el RE (Fretzen, 2004). Es el fosfolípido mayoritario en las membranas tilacoidales, en las que establece interacciones con los complejos fotosintéticos (Jones, 2007). PC es el más abundante de las membranas vegetales. Se encuentra en el RE, en la envuelta externa del cloroplasto y en menor medida en membranas tilacoidales (Andersson *et al.*, 2008). PE, PS y PI (importante en la señalización celular) son minoritarios.
- **Sulfolípidos:** el único que se ha encontrado en plantas recibe el nombre de sulfoquinovosildiacilglicerol (SQ). Se trata de dos ácidos grasos esterificados en el glicerol en las posiciones sn-1 y sn-2 que tiene un grupo sulfoquinovosil en posición sn-3. Se encuentra únicamente en el cloroplasto y en pequeñas cantidades.

En la *Tabla 1.4.* se aprecia que los galactolípidos (MGDG y DGDG) son los más abundantes en las diferentes membranas biológicas de los cloroplastos, apareciendo en menor cantidad los fosfolípidos PC, PG, siendo minoritarios PI y los sulfolípidos (SQ).

Membrana	Lípidos complejos del cloroplasto (% molar)					
	MGDG	DGDG	SQ	PC	PG	PI
Envuelta externa	17	29	6	32	10	5
Envuelta interna	49	30	5	6	8	1
Envuelta	36	29	6	18	9	2
Membrana tilacoidal	52	26	6.5	4.5	9.5	1.5

Tabla 1.4. Composición de clases de lípidos individuales en cloroplastos de hojas de espinaca, expresados en porcentaje molar. Tabla adaptada de Block et al. (1983).

1.3. BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS

La síntesis de novo de ácidos grasos en plantas (*Figura 1.3.*) comienza en el plastidio donde se sintetizan ácidos grasos de hasta 16 o 18 átomos de carbono. En este proceso participan la enzima acetil CoA carboxilasa (ACC) y el complejo enzimático ácido graso sintasa (FAS). Para comprender mejor el mecanismo ver Anexo I.

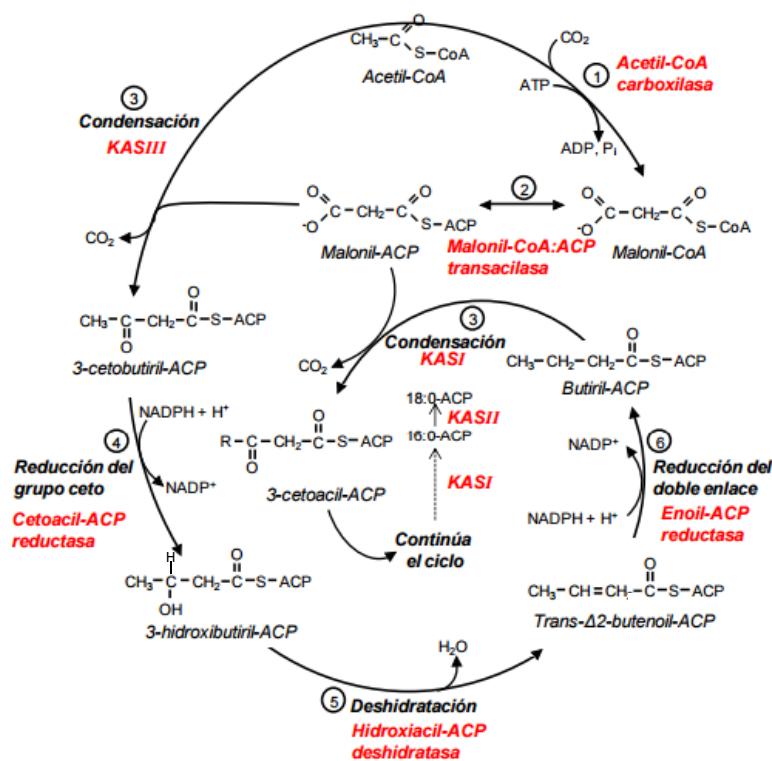


Figura 1.3. Síntesis de novo de ácidos grasos en plantas. En rojo aparecen los nombres de las enzimas responsables de llevar a cabo cada reacción. Figura adaptada por Raquel Collados a partir de Ohlrogge y Browse (1995).

La síntesis de ácidos grasos de cadena larga se hace a partir del 16:0 y del 18:0 gracias a la participación de enzimas elongasas de ácidos grasos (FAE) situadas en el citosol (Somerville y Browse, 1991). Además de la elongación, los ácidos grasos también pueden sufrir insaturaciones.

Una vez que los ácidos grasos han sido sintetizados pueden esterificarse a glicerol para formar lípidos de membrana. Estos lípidos de membrana pueden ser sintetizados siguiendo la *ruta procariota* o bien la *ruta eucariota* (Figura 1.4.).

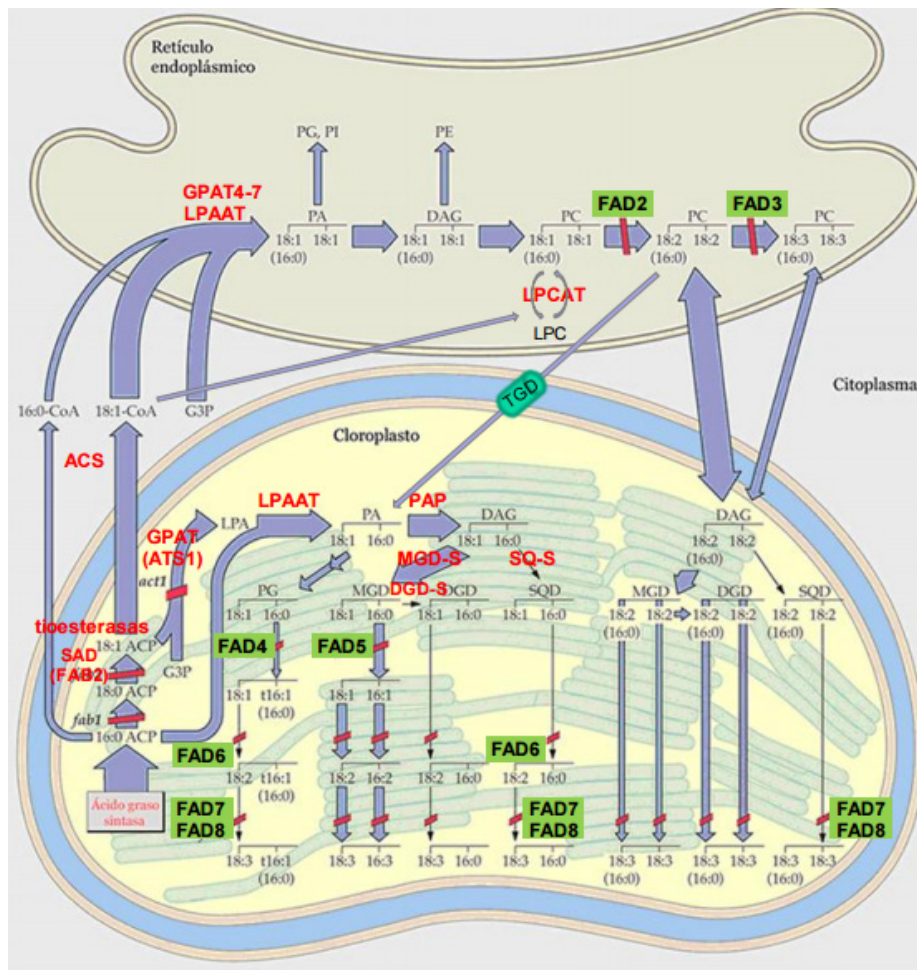


Figura 1.4. Ruta procariota y eucariota de la síntesis de lípidos en las hojas de *Arabidopsis*. En rojo aparecen las enzimas implicadas en la síntesis de glicerolípidos y sobre fondo verde las desaturasas. Las barras rojas indican los mutantes deficientes en la función desaturasa. Imagen adaptada de Somerville et al. (2000).

- Ruta procariota

Se lleva a cabo en su totalidad en el cloroplasto. Los ácidos grasos sintetizados en este orgánulo y unidos a la proteína transportadora de acilos (ACP) se incorporan a una molécula de glicerol-3-fosfato (G3P), mediante la enzima plastidial sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), denominada ATS1 en *Arabidopsis* (Chen et al., 2011). Esta enzima es citosólica y presenta especificidad por el 18:1, que es el que incorpora en la posición sn-1 del glicerol dando lugar a ácido lisofosfatídico (LPA), que posteriormente se incorpora a las membranas donde es convertido en ácido fosfatídico (PA) por la enzima lisofosfatidil aciltransferasa (LPAAT) que incorpora un 16:0 en la posición sn-2. Esta enzima se encuentra en la envuelta interna del cloroplasto y en *Arabidopsis* se denomina ATS2 (Li-Beisson et al., 2013).

Finalmente el PA puede ser transformado en PG o en diacilglicerol (DAG). El DAG, que es obtenido gracias a la acción de la enzima ácido fosfatídico fosfatasa, puede dar

lugar a MGDG o SQ, mediante las enzimas MGDG y SQ sintasas respectivamente, que adicionan UDP-galactosa o UDP sulfoquinovosa al DAG. Así mismo se puede obtener DGDG a partir de MGDG por acción de la DGDG sintasa (transfiere UDP galactosa al MGDG) o de la galactosil transferasa (transfiere una galactosa desde un MGDG a otro MGDG). Todas estas enzimas se localizan en la membrana del cloroplasto (Froehlich *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2005; Benning, 2008).

- Ruta eucariota

Los ácidos grasos sintetizados en el cloroplasto pueden entrar a la ruta procariota o ser exportados del cloroplasto y mediante un mecanismo desconocido migrar al RE donde dichos ácidos grasos, en forma de acil-CoA, se incorporan a una molécula de G3P mediante un proceso similar al que tiene lugar en la ruta procariota. En este caso la GPAT reticular esterifica el ácido graso 18:0 o el 16:0 a la posición sn-1 del glicerol. A continuación la LPAAT esterifica 18:0 o 18:1 en la posición sn-2 del LPA para dar PA, que es transformado en DAG, el cual puede actuar como precursor de PC y PE. Así mismo el PA también se puede transformar en citidina difosfato diacilglicerol, precursor de PG, PI y PS. Además una parte de la fracción del DAG del PC puede retornar al cloroplasto y participar en la síntesis de galactolípidos (Browse y Somerville, 1991).

1.4. DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS

Las desaturasas de ácidos grasos (FAD) catalizan reacciones de deshidrogenación altamente estereoselectivas, regioselectivas y quimioselectivas. Son las enzimas que transforman un enlace simple entre dos átomos de carbono en un enlace doble (enlace insaturado) en la cadena alquílica de los ácidos grasos. En *Arabidopsis* se han descrito 8 genes que codifican 8 proteínas desaturasas: FAB2, FAD2, FAD3, FAD4, FAD5, FAD6, FAD7 y FAD8. Todas las desaturasas están codificadas por genes nucleares y luego son trasladadas a diferentes localizaciones, en función de las cuales usarán diferentes donadores de electrones y actuarán sobre distintos sustratos.

La mayoría de estas enzimas son proteínas que se localizan en las membranas plastidiales o en la membrana del RE (desaturasas reticulares). Existe una desaturasa soluble (FAB2) que se localiza en el estroma del cloroplasto y es la única que ha podido ser purificada y cristalizada.

1.5. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS ω -3 DESATURASAS

Las ω -3 desaturasas son acil-lípido desaturasas que introducen dobles enlaces en posición ω -3 de ácidos grasos esterificados en lípidos. No se conoce con detalle el mecanismo enzimático de la desaturación. Se trata de una reacción de oxidación que requiere el concurso de dos electrones y de una molécula de oxígeno (revisado en Behrouzian y Buist, 2002).

El mecanismo propuesto (*Figura 1.5.*) parte de un estado basal en el que un centro dihierro se encuentra en estado oxidado $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$. El citocromo b5 actúa como donador de electrones en las desaturasas reticulares reduciendo al centro dihierro $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O-Fe}^{\text{II}}$, al que posteriormente se une una molécula de oxígeno generando un intermediario peroxo (2Fe-2O). A continuación el enlace entre los átomos de oxígeno

se rompe dando lugar a un centro dihierro activado que es capaz de actuar como oxidante y puede atraer de forma sucesiva dos átomos de hidrógeno de dos grupos metileno dando lugar primero a un intermediario alquilo y después a una especie con dos electrones desapareados que se combinan para constituir el doble enlace. En esta reacción se libera una molécula de agua y se regenera el centro dihierro oxidado $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$. La recuperación del citocromo b_5 se debe a la acción de la enzima NADH-citocromob₅oxidorreductasa. En el caso de las desaturasas plastidiales el donador de electrones es la ferredoxina y el NADPH_2 aporta el poder reductor necesario para la reacción.

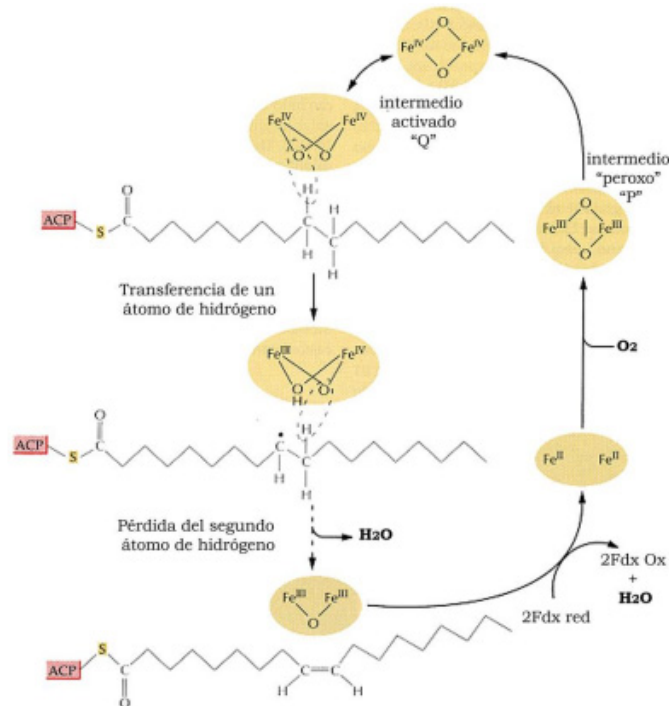


Figura 1.5. Mecanismo propuesto para la reacción de desaturación de ácidos grasos en plantas. Imagen adaptada de Somerville et al., 2000.

Como ya se ha mencionado, la única desaturasa de plantas que ha sido purificada y cristalizada es la $\Delta 9$ estearoil-ACP desaturasa (FAB2). Se trata de una proteína soluble que se está constituida por un homodímero en el que cada uno de los monómeros consta de 11 hélices α (Figura 1.6.) y que presenta un dominio de unión a hierro -D/EX₂H- (Shanklin y Cahoon, 1998).

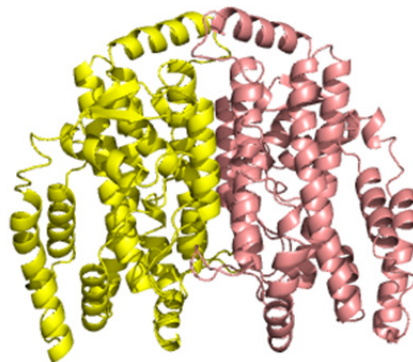
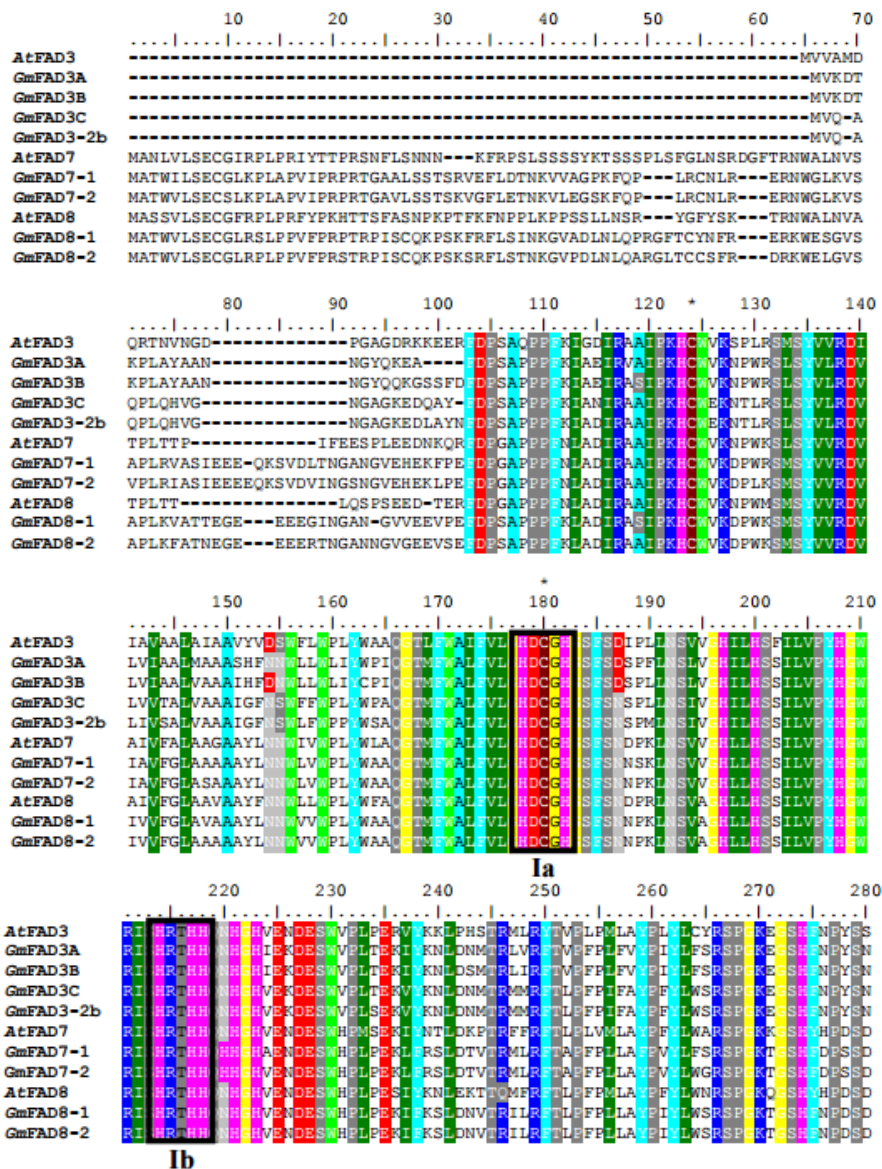


Figura 1.6. Estructura del homodímero FAB2 de *Ricinus communis* (1AFR).

Por otro lado las desaturasas de membrana no han podido ser cristalizadas ya que son proteínas con alto carácter hidrofóbico, lo que dificulta su purificación, y por tanto, el desarrollo de anticuerpos dirigidos contra ellas y la determinación de sus propiedades enzimáticas. Así mismo, se desconoce su estructura secundaria y terciaria y los residuos que forman parte de su centro activo. Mediante el alineamiento de secuencias de diferentes desaturasas de distintas especies vegetales (*Figura 1.7.*) se ha visto que no presentan el dominio de unión a hierro que posee la desaturasa FAB2 pero si se han identificado 8 residuos de histidinas muy conservados en todas las desaturasas de membrana cuya estructura es $-HX_{(3-4)}HX_{(7-41)}HX_{(2-3)}HHX_{(61-189)}(H/Q)X_{(2-3)}HH-$ (Shanklin et al., 1994; Shanklin y Cahoon 1998). Así mismo, los residuos que acompañan a las histidinas también están muy conservados, constituyendo unas cajas de histidinas que podrían ser esenciales para el correcto funcionamiento de las desaturasas (Román et al., 2012), participando en la coordinación de los átomos de hierro que catalizan la reacción de desaturación (Los y Murata, 1998; Somerville et al 2000). Se sabe que la eliminación específica de residuos de las cajas de histidinas produce la pérdida de la actividad desaturasa. Existen tres cajas de histidinas denominadas caja Ia (HDCGH), Ib (HRTHH) y II (HVIHH).



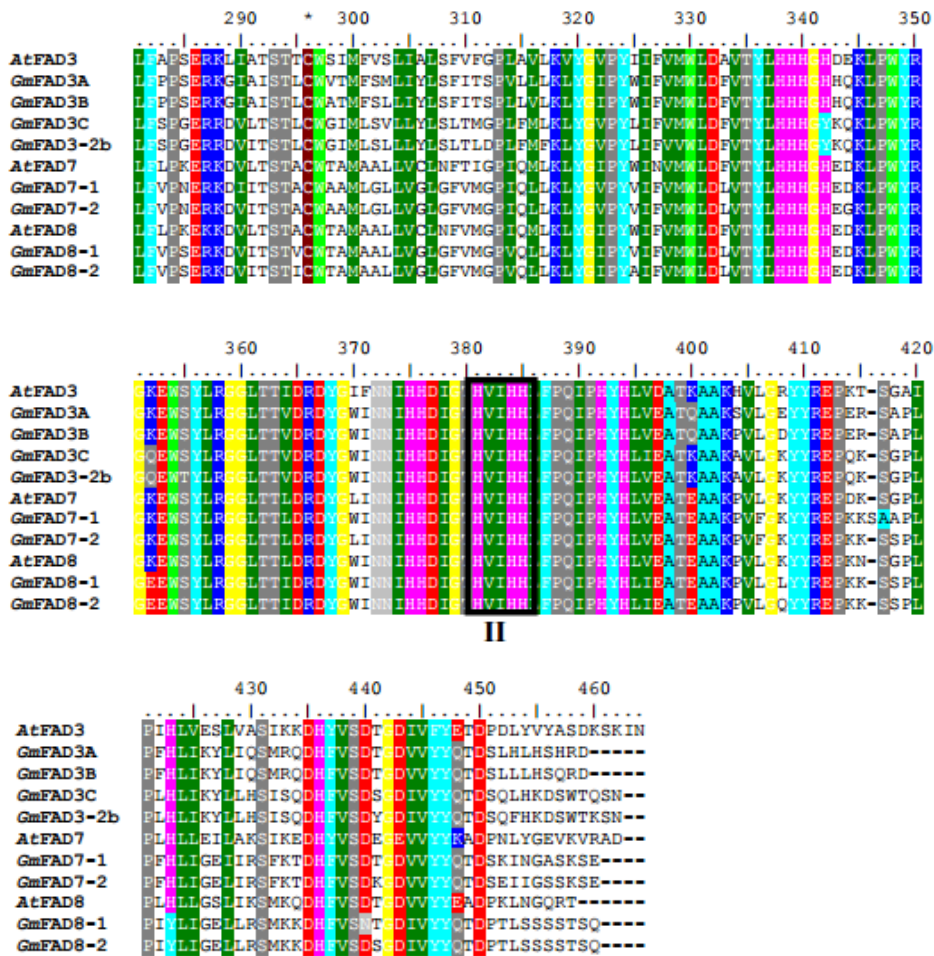


Figura 1.7. Alineamiento de ω -3 desaturasas de Arabidopsis y soja. Los recuadros negros señalan las cajas de histidinas conservadas y con * se destacan las cisteínas conservadas que podrían participar en la formación de puentes disulfuro, contribuyendo al correcto plegamiento de las enzimas. Figura adaptada de Roman A. (2014).

Al no tener modo de saber la estructura de las desaturasas reticulares se han construido modelos mediante programas informáticos predictivos, que establecen que estas enzimas presentan 4 hélices transmembrana, quedando los extremos N-terminal y C-terminal, así como las cajas de histidinas en el lado citoplasmático, coordinando estas cajas un átomo de hierro (Figura 1.8.)

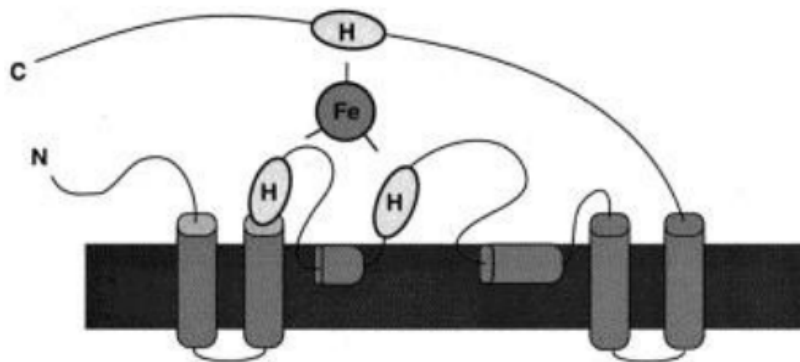


Figura 1.8. Modelo predictivo de la ω 3 desaturasa de membrana (Los y Murata, 1998).

1.6. *Arabidopsis thaliana* COMO PLANTA MODELO EN LA INVESTIGACIÓN FITOBIOLÓGICA

Arabidopsis thaliana es una planta de la familia de las crucíferas (Brassicaceae) nativa de Europa, Asia y África (ver Anexo II). Se trata de una planta herbácea con una altura comprendida normalmente entre los 1 y 3 dm, es autógama y presenta un ciclo vital corto inferior a 5 meses (8-10 semanas en condiciones experimentales). Es una especie diploide con sólo 5 cromosomas y un genoma relativamente pequeño (135Mb) que está secuenciado. Además es fácil de transformar utilizando para ello *Agrobacterium tumefaciens*. Por todo ello es una planta muy útil para la investigación fitobiológica.

Existen, entre otros, dos mutantes de *Arabidopsis* creados por acción de EMS (un agente mutágeno que crea mutaciones al azar) que presentan anomalías en el grado de insaturación de las membranas y por tanto son útiles en el estudio de las desaturasas. Estos mutantes son un mutante simple *fad3* que presenta una mutación puntual en el gen *FAD3*; y un triple mutante *fad3-2 fad7-2 fad8-1* que además de presentar una mutación puntual en *FAD3*, también presenta mutaciones puntuales en los genes que codifican para *FAD7* y *FAD8*. Estos dos últimos genes tienen un codón stop prematuro antes de la tercera caja de histidinas que produce una forma truncada no funcional de las proteínas. Sin embargo, las mutaciones en *FAD3*, tanto para *fad3* como *fad378*, no producen una proteína truncada, por lo que los residuos mutados podrían formar parte del centro activo del enzima o participar en el correcto plegamiento de la misma.

2. OBJETIVOS

Como se ha mencionado anteriormente, la estructura tridimensional de las desaturasas de membrana es desconocida. Las dificultades para purificar estas enzimas y poder estudiar su actividad *in vitro* complican enormemente el desarrollo de estudios estructura-función clásicos. Sin embargo se dispone, en el caso de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, de una serie de mutantes que presentan deficiencias en el grado de insaturación de la membrana.

El objetivo principal de este trabajo es tomar ventaja de las colecciones de mutantes deficientes en la insaturación de ácidos grasos de *Arabidopsis thaliana* para identificar residuos implicados en la función de las omega-3 desaturasas de plantas. Para ello se va a:

- Caracterizar las mutaciones que presentan los mutantes *fad3* y *fad3-2 fad7-2 fad8-1* de *Arabidopsis thaliana*.
- Analizar la funcionalidad de las enzimas *FAD3* mutadas frente a la enzima silvestre y relacionar dicha actividad con la importancia de los aminoácidos mutados en los modelos estructurales de la proteína.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESPECIE VEGETAL UTILIZADA Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se han utilizado plantas de *Arabidopsis thaliana* (ver descripción en el Anexo II), una planta silvestre (Col-0) y dos líneas vegetales (*fad3* y *fad378*) con mutaciones puntuales en el gen *AtFAD3* que codifica para una $\omega 3$ desaturasa.

La tierra empleada para el cultivo de *Arabidopsis* presentaba la siguiente composición:

- Vermiculita projar: 1 saco (100L/saco)
- Sustrato projar: 3 sacos (70L/saco).
- Osmocote (abono): 420g.

Además se añadió insecticida clorpirifos 5%

Las plantas se crecieron en cámaras de cultivo con condiciones controladas de humedad, luz y temperatura. Dichas condiciones fueron temperatura de 22°C, humedad del 60%, con una intensidad de luz de 120-150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de día corto (8 horas de luz y 16 de oscuridad) para favorecer el crecimiento de la roseta y retrasar la floración de la planta. De esta forma el desarrollo es más lento, con más cantidad de hojas y cloroplastos por lo que es más fácil extraer mayor cantidad posible de RNA.

3.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.2.1. Extracción de RNA

Para la obtención de RNA se utilizó la parte aérea de las plantas de *Arabidopsis* (entre 90 y 200 mg). En primer lugar se trituró el material biológico con nitrógeno líquido en mortero. A partir del material biológico homogeneizado se procedió a la extracción de RNA utilizando el método de extracción con Trizol de la casa comercial Life technologies (un reactivo que ayuda a mantener la integridad del RNA al mismo tiempo que provoca rotura celular y disolución de compuestos celulares).

Se añadió 1.5 ml de trizol a cada muestra y se vortió. A continuación se centrifugó 10 min a 10000 rpm a 4°C y se cambió el sobrenadante a un nuevo tubo (se consigue así obtener la fase en la que se encuentra el RNA y eliminar compuestos celulares no deseados). Seguidamente se incubaron las muestras 5 min a temperatura ambiente para romper completamente la unión de los complejos nucleoproteicos a los ácidos nucleicos. Después se añadieron 300 μl de cloroformo para generar una bifase con una fase orgánica y otra acuosa, se vortió durante 15 segundos, se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 rpm a 4°C. Se pasó la fase acuosa a un nuevo eppendorf al que también se añadieron 750 μl de isopropanol y se incubó un mínimo de 2 horas a -20°C para precipitar el RNA.

Finalmente se centrifugaron las muestras 10 min a 10000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se lavó con 1 ml de etanol 75% para eliminar sales que hubiesen podido precipitar por la acción del isopropanol. Se centrifugó 5 min a 10000 rpm a 4°C

y se eliminó el sobrenadante. Este paso se hizo dos veces. Se secó el pellet durante 5-10 min a temperatura ambiente y se resuspendió el RNA en ddH₂O.

3.3.2. Determinación de la concentración y pureza del RNA

Se empleó un microespectrofotómetro (Nanodrop) para determinar la concentración de RNA de cada muestra. Para ello se tuvo en cuenta la absorbancia a 260 nm y para determinar la pureza se analizaron los coeficientes $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$.

Además la integridad del RNA se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa habiendo desnaturalizado previamente el RNA a 65°C en tampón de carga (EDTA 5mM, formamida 95%v/v, azul de bromofenol 0.1% y xilencianol 0.1% p/v).

3.3.3. Tratamiento de las muestras con DNAsa

Se trataron 3-4 µg de RNA con 0.2µl de DNAsal recombinante RNase free (Roche), 1 µl de Tampón 10xDNAsa en un volumen final de 10 µl. Se incubaron las muestras a 37°C durante 15 min. Se añadieron 0.5 ml de EDTA 0.2M y se incubaron a 75°C durante 10 min para inactivar a la DNAsal. Este paso permite eliminar cualquier traza de DNA cromosómico que pudiese contaminar las muestras.

3.3.4. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA) o retrotranscripción se utilizó la enzima retrotranscriptasa M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). A las muestras de RNA se añadieron 0.68 µl de Oligo dT 50 µM por cada µg de RNA y se añadió H₂O hasta un volumen final de 15 µl. Se incubaron a 70°C durante 5 min y después se pasaron al baño de hielo. A la mezcla se añadió M-MLV buffer 5X, dNTPs 10mM, RNAsa OUT y M-MLV Reverse Transcriptase 200U/µl (Promega). Finalmente se incubaron las muestras a 42°C durante 1h. El cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.3.5. Amplificación del gen *FAD3* de *Arabidopsis thaliana* (*AtFAD3*) mediante PCR

Para amplificar el gen de *AtFAD3* se usó un cebador en el extremo 5' del gen que incluía el codón de iniciación ATG así como una diana de restricción para BamHI; y un cebador en el extremo 3' del gen que incluía una diana de restricción para XhoI y el codón Stop (*Tabla 3.1.*)

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Contenido de GC	Tm (°C)
Forward	GAGGATCCGCGATGGTTGTTGCTATGGACCAA	53.1%	57
Reverse	GAACTCGAGATTGATTGATTTAGATTTGTCAG	30.3%	62

Tabla 3.1. Cebadores para amplificar el gen AtFAD3. Resaltadas en rojo aparecen las dianas de restricción para BamHI y XhoI. En morado se puede ver el codón de inicio y en verde el codón Stop.

En la *Figura 3.1.* se aprecia el lugar donde hibridan los cebadores en la secuencia del cDNA de FAD3.

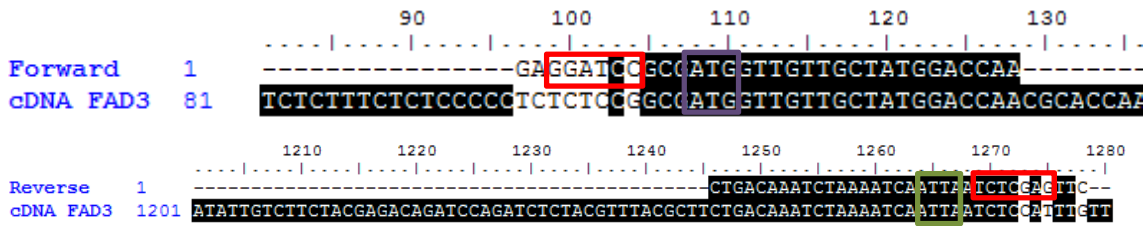


Figura 3.1. Alineamiento del cdNA de FAD3 con los cebadores en ambos extremos del gen. En rojo aparecen las dianas de restricción para BamHI y XhoI. En morado se ve el codón de iniciación y en verde el codón Stop.

Para la reacción de amplificación se usó la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase 2U/μl (Life Technologies), una enzima “proofreading”, es decir, con capacidad de corrección de errores. Para la reacción de amplificación se partió de 1 μl de cdNA y de 1 μl de cdNA diluido 1/10. La reacción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 3.2.).

5X Phusion HF Buffer	10mM dNTPs	Cebador A	Cebador B	Template DNA	Phusion DNA polymerase	H ₂ O
4 μl	0.4 μl	0.5 ml	0.5 μl	1 μl	0.4 μl	Hasta 20 μl

Tabla 3.2. Mezcla de reacción para la amplificación del gen FAD3

Las temperaturas y los tiempos de la PCR fueron los recomendados por el fabricante (Figura 3.2.) fijándose la temperatura de anealing a 57°C.

98°C	98°C	57°C	72°C		72°C
1 min	15 seg	30 seg	45 seg	34X	10 min

Figura 3.2. Temperaturas y tiempos para la amplificación de FAD3.

Finalmente se llevó a cabo una reacción de “tailing” (Tabla 3.3.) para añadir nucleótidos de adenina a los extremos 3’ de los fragmentos amplificados. La reacción se llevó a cabo a 72°C durante 2 horas. Este tratamiento permite el clonaje del producto de PCR en el vector pGEM-T Easy de forma que por digestión se puede extraer de nuevo el fragmento para un clonaje direccional en un vector de expresión en levaduras.

Buffer	MgCl ₂	10 mM dATP	Taq polimerasa1	Producto de PCR
1 μl	1 μl	0.3 μl	1 μl	6.7 μl

Tabla 3.3. Mezcla de reacción para el Tailing del producto de PCR.

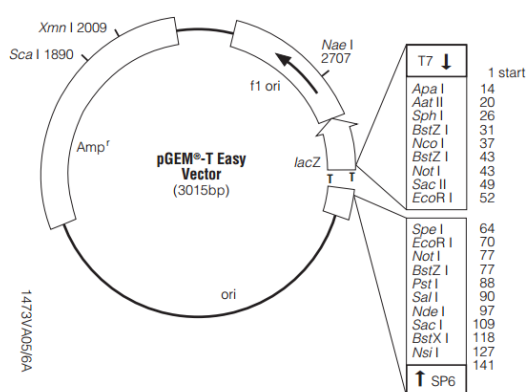
3.3.6. Electroforesis de agarosa.

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en tampón TBE (Tris-HCl 90 mM, pH 8, H₃BO₃ 90 mM y EDTA 2 mM). Para la visualización de los ácidos nucleicos se utilizó Syber Safe DNA Gel Stain (Life Technologies). Antes de cargar las muestras en los pocillos se les añadió tampón de carga (6X DNA Loading Dye de Fermentas). La electroforesis se desarrolló en una

cubeta (BioRad) con tampón TBE, a 100 V (voltaje constante) durante 30 min. Las imágenes de los geles se obtuvieron con un equipo de captura de imagen Gel Doc (BioRad) utilizando el programa de análisis de imagen Quantity One (BioRad). La masa molecular de los fragmentos amplificados fue estimada por comparación con el marcador de masa molecular comercial Gen Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific).

3.3.7. Ligación de productos de PCR al vector pGEM-T Easy.

El vector pGEM-T Easy de Promega (Figura 3.3.) presenta dos nucleótidos de timina en sus extremos de forma que es muy útil para ligar productos de PCR con extremos cohesivos, con un nucleótido de adenina en su extremo 3'. Este vector presenta un gen de resistencia a Ampicilina como marcador de selección y los promotores T7 y SP6 que permiten la secuenciación del fragmento de DNA clonado. Para la reacción de ligación (Tabla 3.4.) se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen).



pGEM[®]-T Easy Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–128
SP6 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	139–158
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176–197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200–216
β-lactamase coding region	1337–2197
phage f1 region	2380–2835
<i>lac</i> operon sequences	2836–2996, 166–395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949–2972
T7 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	2999–3

Figura 3.3. Vector pGEM-T Easy (Promega). Además de un sitio de clonaje múltiple, y un marcador de selección presenta un promotor T7 y SP6 que son útiles para secuenciar el producto génico clonado.

T4 DNA ligasa (5U/μl)	5X T4 DNA Ligase Buffer (Invitrogen)	Vector pGEM-T Easy	Producto de PCR
1 μl	2 μl	1 μl	6 μl

Tabla 3.4. Mezcla de reacción para la ligación del producto de PCR al vector pGEM-T Easy.

3.3.8. Ligación de fragmentos de DNA al vector pYES2.

El vector pYES2 es un vector de expresión para levaduras (Figura 3.4.). Presenta un origen de replicación para *E. coli*, un sitio de clonaje múltiple, y un gen de resistencia a ampicilina, lo que permite clonar fragmentos de DNA que luego se detectarán en bacterias *E. coli* transformadas y crecidas en medio LB con dicho antibiótico. El sitio de clonaje múltiple está flanqueado por un promotor fuerte e inducible por galactosa (Pgal) y un terminador (CYC1 TT) de forma que se garantiza un alto nivel de expresión de la proteína en el momento deseado. Por otro lado presenta un origen de replicación para levaduras y un marcador de selección con el gen Ura3. Es decir que usando una levadura auxótrofa para uracilo, se puede detectar la presencia del pYES2 en dicha levadura transformada. Finalmente presenta un promotor T7 delante del sitio de clonaje para la secuenciación del producto clonado.

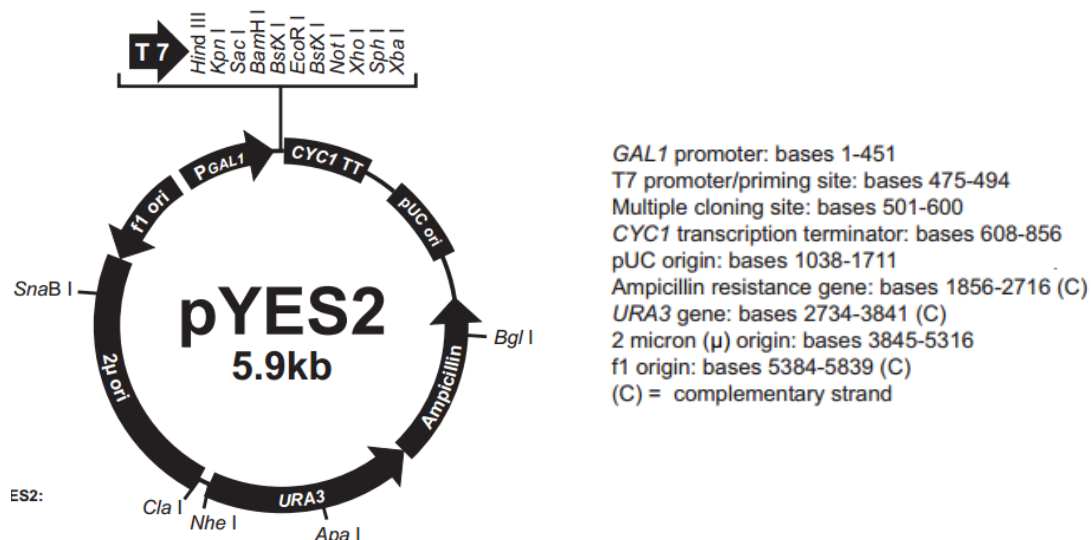


Figura 3.4. Vector pYES2 (Life Technologies).

Para la reacción de ligación se utilizó DNA previamente digerido con las enzimas BamHI y XhoI, con las cuales también se cortó el vector. La enzima usada para la ligación fue la T4 DNA ligasa.

3.3.9. Transformación de células termocompetentes de *Escherichia coli*.

Se utilizaron células termocompetentes de *E. coli*: One Shot® TOP10 Competent Cells (Life Technologies). Se trata de un tipo celular que puede ser transformado por choque térmico a 42°C durante 30 segundos. Para la transformación se siguieron las instrucciones del fabricante y finalmente se sembraron las células transformadas en placas de LB con ampicilina (0.05mg/ml), que se incubaron overnight.

3.3.10. Extracción de DNA plasmídico y detección del gen clonado.

Para extraer DNA plasmídico se tomaron colonias individuales que habían crecido en medio LB sólido y se cultivaron en 3 ml de medio LB líquido con marcador selectivo (Ampicilina 0.1 mg/ml). Se cultivaron a 37°C overnight y con agitación (200 rpm). Al día siguiente, los 3 ml de cultivo fueron centrifugados a 10000g para recoger las bacterias y extraer el DNA plasmídico. La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo utilizando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QUIAGEN) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la detección del gen clonado se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando para ello los cebadores citados en el apartado 3.3.5 así como el programa de PCR explicado en ese mismo apartado. También se llevaron a cabo digestiones enzimáticas con BamHI, HindIII y XhoI (Tabla 3.5.) después de lo cual, se separaron los fragmentos cortados mediante electroforesis en gel de agarosa para comprobar si dichos fragmentos tenían el tamaño esperado.

BamHI 10 U/μl	HindIII/XhoI 10 U/μl	Buffer R 10X	Molde de DNA plasmídico	ddH ₂ O
0.5 μl	0.5 μl	1 μl	5 μl	3 μl

Tabla 3.5. Mezcla de reacción para la digestión de DNA plasmídico. Las enzimas y el buffer utilizados eran de la casa comercial Life Technologies.

3.3.11. Secuenciación de ácidos nucleicos.

Para comprobar la identidad e integridad de los genes o fragmentos de interés, éstos fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Se enviaron las muestras de DNA plasmídico y se secuenciaron utilizando los primers T7 y SP6.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LAS DISTINTAS LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS

Se crecieron tres líneas vegetales de *Arabidopsis thaliana* (Figura 4.1.): un ecotipo Col-0 (WT), un mutante simple *fad3* y un triple mutante *fad3-2, fad7-2, fad8-1* (TM), los dos últimos con deficiencia en la síntesis de ácidos grasos insaturados por mutaciones en ω -3 desaturasas.



Figura 4.1. Plantas de *Arabidopsis thaliana* de las 3 líneas vegetales utilizadas en este trabajo.

Estas líneas vegetales se diferencian en la composición de ácidos grasos en sus hojas (Figura 4.2.).

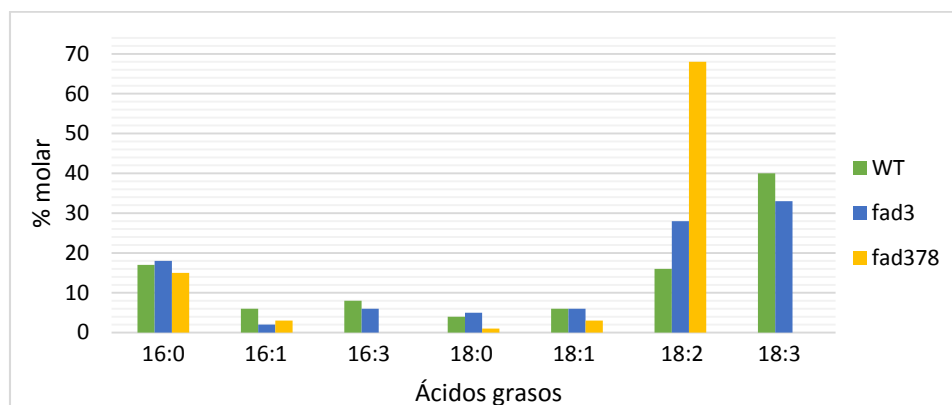


Figura 4.2. Composición de ácidos grasos en las diferentes líneas vegetales de *Arabidopsis thaliana*

La composición de los ácidos grasos saturados 16:0 y el 18:0 y de los insaturados 18:1 y 16:1 no varía de forma significativa ya que en su síntesis no participan ω -3 desaturasas. Sin embargo sí que hay variación en el resto de los insaturados.

16:3 es sintetizado por las ω -3 desaturasas FAD7 y FAD8, por lo que en el triple mutante no aparece este ácido graso ya que presenta pérdida de función para dichas enzimas. En la síntesis de 18:3 participan las ω -3 desaturasas FAD3, FAD7 y FAD8

por lo que su presencia disminuye en el mutante *fad3* (sin actividad FAD3 desaturasa) y está ausente en *fad378*, el cual presenta mutaciones en las tres enzimas que provocan pérdida de función.

Por otro lado el 18:2 es sintetizado por ω -6 desaturasas y es más abundante en los mutantes que en la planta silvestre. 18:2 es el precursor del 18:3 y tiende a acumularse puesto que en los mutantes no es posible la síntesis de ácidos grasos trienoicos (ver Anexo III en el que se explican los diferentes tipos de ácidos grasos insaturados y las enzimas implicadas en su síntesis).

4.2. INTEGRIDAD, CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL RNA DE *Arabidopsis*

Se procedió a la extracción de RNA de tres líneas vegetales de *Arabidopsis thaliana* después de lo cual se comprobó la integridad del mismo mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa.

En la *Figura 4.3*. se puede comprobar que el RNA de las muestras estaba en perfectas condiciones. Se ven dos bandas superiores en las muestras de RNA que corresponden a RNA ribosómico citoplasmático, unas bandas de tamaño intermedio que corresponden a RNA ribosómico del cloroplasto y una banda inferior que corresponde a diferentes tRNAs. En caso de que el RNA no estuviese intacto no se verían esas bandas aisladas.

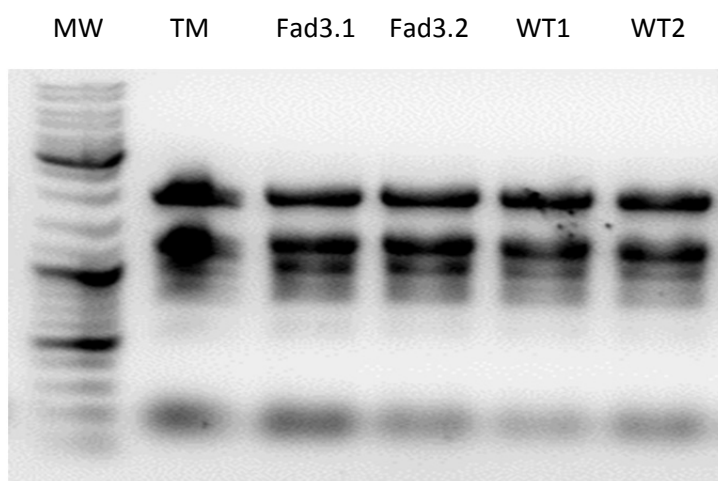


Figura 4.3. Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de RNA extraídas de Arabidopsis thaliana. De izquierda a derecha se ve el marcador de peso molecular, (que permite determinar el tamaño de las bandas de las muestras), el RNA del triple mutante de Arabidopsis, el RNA del mutante fad3, el RNA de un mutante fad3 crecido en un lugar diferente al anterior, y en los dos últimos carriles los RNA de Arabidopsis silvestre pero extraídos en diferentes tiempos.

La cantidad de RNA extraído así como la pureza del mismo se refleja en la *Tabla 4.1*.

	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	260/280	260/230
TM	5,51	2,02	1,93
Fad3.1	1,95	2,01	1,82
Fad3.2	4,92	2,04	1,98
WT1	2,36	1,99	0,92
WT2	1,26	1,86	0,44

Tabla 4.1. concentraciones y pureza de las muestras de RNA extraídas del triple mutante, el mutante fad3 y del Arabidopsis silvestre

Se obtuvo RNA de las diferentes líneas vegetales a una concentración adecuada para poder continuar con el experimento.

Los valores 260/280 y 260/230 permiten determinar la pureza de muestras de ácidos nucleicos. Si el ratio 260/280 está en torno a 2 se considera que una muestra de RNA está pura. El ratio 260/230 es una medida secundaria para determinar la pureza de una muestra de ácido nucleicos y se considera adecuado un valor entre 2 y 2.2 para RNA.

4.3. RTPCR DE GEN DE LA ACTINA Y DE *AtFAD3*

Se sometió a las muestras a RTPCR. Se amplificó el gen de la actina en cada línea vegetal como control positivo que determinase que la síntesis de cDNA se había llevado a cabo con éxito (*Figura 4.4.*).

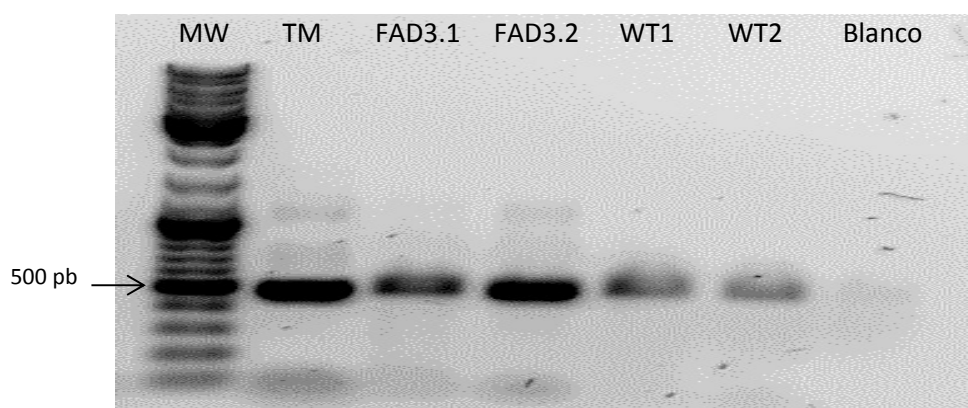
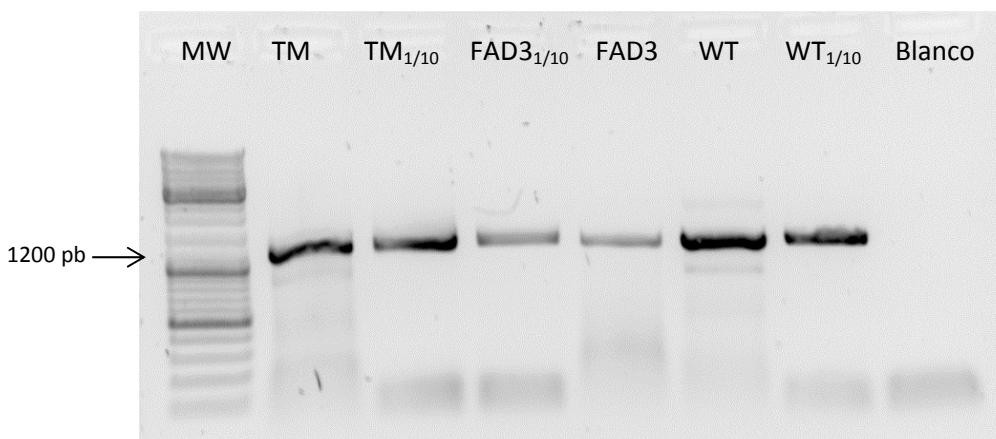


Figura 4.4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR del gen de la actina para cada una de las líneas vegetales.

El tamaño esperado del gen de la actina era de 500pb, que es lo que se obtuvo, de forma que el cDNA se sintetizó con éxito y se pudo proceder a la amplificación por PCR el gen *AtFAD3*. Únicamente se llevó a cabo la amplificación a partir de los RNAs de TM, FAD3.1 y WT2. El tamaño esperado del gen FAD3 era de 1200 pb de forma que, como se observa en la *Figura 4.5.*, la amplificación tuvo lugar con éxito en todas las muestras.



*Figura 4.5. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR del gen *AtFAD3*. Los subíndices 1/10 indican que el cDNA fue diluido 1/10 antes de su amplificación.*

4.4. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES Y DETECCIÓN DE CLONES QUE INCORPORAN EL PLÁSMIDO CON *AtFAD3*

Se clonaron los genes amplificados de cada línea vegetal en el plásmido pGEM-T Easy y se transformaron células de *E. coli* que se sembraron en placas de LB con ampicilina como marcador de resistencia. Tras cultivo de las colonias aisladas en medio líquido y extracción del DNA plasmídico de las mismas se llevó a cabo una digestión con las enzimas BamHI y HindIII. Cada una de estas enzimas presenta un sitio de corte único en el plásmido donde se ha insertado FAD3. Estos cortes se producen al inicio del gen FAD3 y en la mitad del mismo produciendo un fragmento de unas 600 pb y otro de unas 3500 pb (ver Anexo IV). Para el triple mutante y mutante *fad3* se obtuvieron resultados positivos (Figura 4.6.), sin embargo la banda de 600 pb se veía como una banda doble, por lo que para salir de dudas se realizó una PCR del DNA plasmídico de estas colonias usando para ello los cebadores descritos en el apartado 3.3.5. Al realizar la PCR se obtuvo el fragmento deseado de 1200 pb (Figura 4.7.), tanto para TM como para *fad3* por lo que se enviaron las muestras a secuenciar con el objetivo de confirmar definitivamente el clonaje de *AtFAD3* en el pGEM-T Easy.

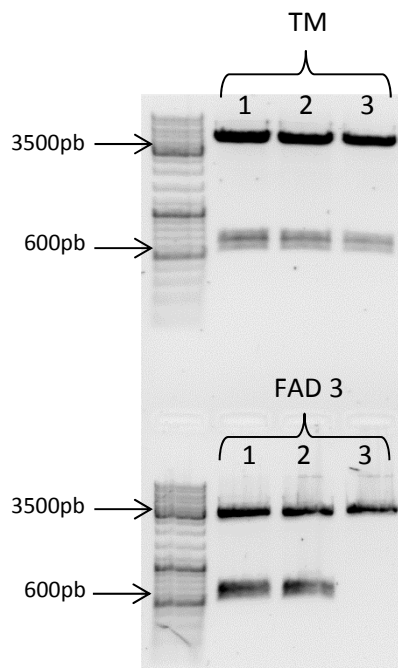


Figura 4.6. Digestión del DNA plasmídico de las colonias TM y FAD3 con enzimas BamHI y HindIII. Como resultado positivo se espera una banda de 600 pb y otra de 3500 pb

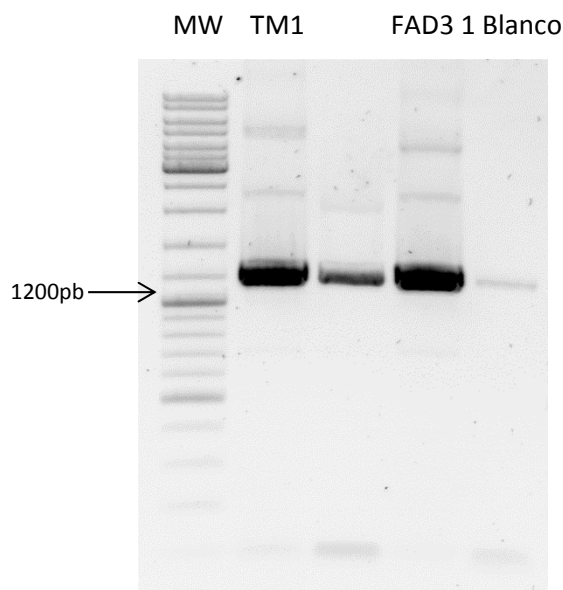


Figura 4.7. PCR del gen FAD3 de las colonias FAD3 y TM. En el carril del blanco se ve una pequeña banda por lo que quizá los reactivos podrían haberse contaminado.

No se obtuvieron colonias positivas para el FAD3 silvestre. Por si el cDNA de dicha línea vegetal hubiera sufrido algún daño, se decidió repetir el procedimiento de RTPCR, ligación y transformación y se obtuvieron colonias, cuyo DNA plasmídico se analizó por PCR y digestión (Figura 4.8.), pero esta vez con BamHI y con XhoI, que cortan justo en los extremos del fragmento insertado, produciendo bandas de unas 1200 pb y 3000 pb (ver anexo V).

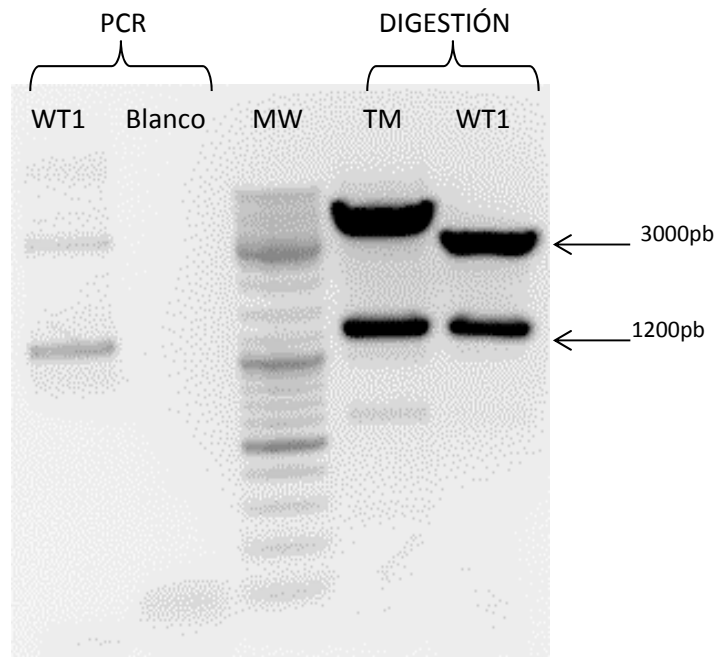


Figura 4.8. A la izquierda del marcador de peso molecular, PCR del gen *FAD3* de una colonia de la línea vegetal silvestre. Se ve la banda del tamaño deseado y no aparecen bandas en el carril del blanco. A la derecha del marcador de peso molecular una digestión del DNA plasmídico de la colonia WT con *Bam*HI y *Xho*I dando las bandas deseadas de 1200 pb y 3000 pb. Además también aparece la digestión de una colonia TM como control positivo (su DNA plasmídico ya se había secuenciado y contenía *FAD 3*)

Finalmente se secuenció el DNA de la muestra para verificar que se había conseguido clonar el gen *AtFAD3*.

4.5. SECUENCIACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO DE CADA GENOTIPO TRANSFORMADO.

Se enviaron a secuenciar las muestras de DNA plasmídico para verificar la presencia del gen en el vector y efectivamente esto se confirmó con los resultados de la secuenciación.

Se alinearon las secuencias de aminoácidos de cada línea vegetal y se observaron dos mutaciones (Figura 4.9.). Una de ellas en el residuo 103 del triple mutante y otra de ellas en el residuo 292 del mutante *fad3*.

El aminoácido 103 en el silvestre es una cisteína mientras que en el triple mutante ha mutado a una tirosina como consecuencia de un cambio de G por A en posición 308 de la secuencia codificante de nucleótidos. Por otro lado en el mutante *fad3* la glicina 292 cambia a glutámico, como consecuencia de un cambio de G por A en la posición 875 en la secuencia codificante de nucleótidos.



Figura 4.9. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas FAD3 de las diferentes líneas vegetales de *Arabidopsis thaliana*. En la figura aparece la secuencia de aminoácidos de las tres líneas vegetales empleadas en este trabajo (WT, TM y FAD3), además de la secuencia de un *Arabidopsis silvestre* obtenida de la base de datos “The Arabidopsis Information Resource” (WT tair). Sobre fondo blanco se ven los aminoácidos mutados y en recuadros rojos aparecen las tres cajas de histidina de la desaturasa.

La cisteína en posición 103 forma parte de la caja de histidinas la, por lo que su cambio por tirosina (Figura 4.10.) puede provocar la pérdida de la capacidad de la desaturasa de ligar átomos de hierro, o bien una pérdida de función por plegamiento erróneo, ya que dicha cisteína podría estar implicada en la formación de puentes disulfuro que estabilizasen la estructura de la enzima. Otra posibilidad es que la desaturasa actuase como un dímero que se mantuviese unido mediante puentes disulfuro en los que participase la cisteína mutada. Por otro lado la glicina 292 cambia a glutámico (Figura 4.10.). La glicina es un aminoácido de tamaño pequeño y apolar mientras que el glutámico tiene una cadena lateral de mayor tamaño y es polar por lo que puede interactuar con las moléculas de agua y provocar impedimento estérico con aminoácidos vecinos impidiendo el correcto plegamiento de la desaturasa. La glicina se encuentra próxima a la caja de histidinas II por lo que quizá el cambio por glutámico impida un plegamiento incorrecto para que la desaturasa pueda coordinar átomos de hierro.

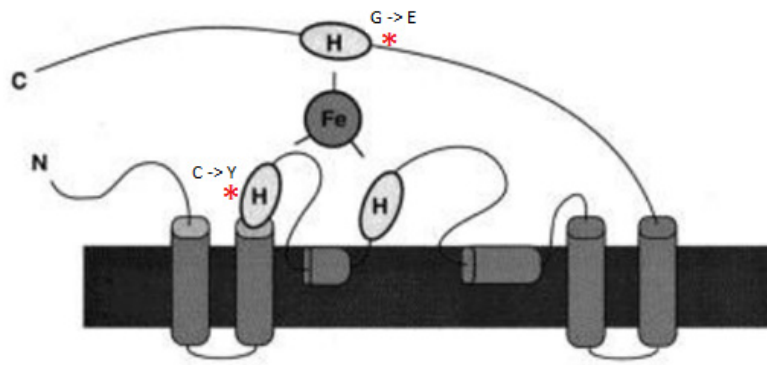


Figura 4.10. Aminoácidos mutados y su localización en el modelo predictivo de plegamiento de ω -3 desaturasas de membrana.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO CONCLUSIONS AND

- Se han identificado dos mutaciones diferentes en el gen *AtFAD3* que codifica la ω 3 desaturasa reticular en *Arabidopsis thaliana*. Ambas mutaciones producen una pérdida de actividad ω 3 desaturasa reticular en la planta.
- El análisis funcional de las proteínas FAD3 silvestre y mutadas en un sistema heterólogo, como la levadura *Sacharomyces cerevisiae*, permitirá realizar un estudio estructura-función de esta desaturasa de membrana.
- Este análisis funcional proporcionará información del sitio activo del enzima y de aquellos residuos implicados en el plegamiento de la proteína.

CONCLUSIONS AND FUTURE PROSPECTS

- Two mutations have been identified in the *AtFAD3* gene which encodes the ω 3 reticular desaturase in *Arabidopsis thaliana*. Both mutations produce a loss of the activity of the ω 3 desaturase in the plant.
- The functional analysis of the wild type FAD3 protein and the mutated proteins in a heterologous system, such as the yeast *Sacharomyces cerevisiae*, will allow to carry out a structure-function study of this membrane desaturase.
- This functional analysis will provide us with information about the active site of the enzyme and the residues involved in the correct folding of the protein.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Andersson M.X., Kjellberg J.M. y Sandelius A.S.** 2001. Chloroplast biogenesis. Regulation of lipid transport to the thylakoid in chloroplasts isolated from expanding and fully expanded leaves of pea. *Plant Physiol*, 127 (1): 184-193.
- Andreu V., Lagunas B., Collados R., Picorel R. y Alfonso M.** 2010. The GmFAD7 gene family from soybean: identification of novel genes and tissue-specific conformations of the FAD7 enzyme involved in desaturase activity. *J Exp Bot*, 61 (12): 3371-3384.
- Behrouzian B. y Buist P.H.** 2002. Fatty acid desaturation: variations on an oxidative theme. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6 (5): 577-582.
- Benning C.** 2008. A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. *Prog Lipid Res*, 47 (5): 381-389.
- Block M.A., Dorne A.J., Joyard J. y Douce R.** 1983. Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *J Biol Chem*, 258 (21): 13281-13286.
- Bonaventure G., Salas J.J., Pollard M.R., y Ohlrogge J.B.** 2003. Disruption of the FATB gene in Arabidopsis demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plants growth. *Plant Cell*, 15 (4): 1020-1033.
- Browse J. y Somerville C.** 1991. Glycerolipids synthesis, biochemistry and regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 467-506.
- Chen X., Snyder C.L., Truksa M., Shah S. y Weselake R.J.** 2011. sn-Glycerol-3-phosphate acyltransferases in plants. *Plant Signal Behav*, 6 (11): 1695-1699.
- Frentzen M.** 2004. Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. *Curr Opin Plant Biol*, 7 (3): 270-276.
- Froehlich J.E., Benning C. y Dormann P.** 2001. The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. *J Biol Chem*, 276 (34): 31806-31812.
- Guskov A., Kern J., Gabdulkhakov A., Broser M., Zouni A. y Saenger W.** 2009. Cyanobacterial photosystem II at 2.9 - A resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat Struct Mol Biol*, 16 (3): 334-342.
- Jones M.R.** 2007. Lipids in photosynthetic reaction centres: structural roles and functional holes. *Prog Lipid Res*, 46 (1): 56-87.
- Li-Beisson Y., Shorrosh B., Beisson F., Andersson M.X., Arondel V., Bates P.D., Baud S., Bird D., Debono A., Durrett T.P., Franke R.B., Graham I.A., Katayama K., Kelly A.A., Larson T., Markham J.E., Miquel M., Molina I., Nishida I., Rowland O., Samuels L., Schmid K.M., Wada H., Welti R., Xu C., Zallot R. y Ohlrogge J.** 2013. Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book*, 11: 161.

- Los D.A. y Murata N.** 1998. *Structure and expression of fatty acid desaturases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1394 (1): 3-15.
- Ohlrogge J. y Browse J.** 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, 7 (7): 957-970.
- Román A.** 2014. Tesis doctoral. Análisis comparado de los mecanismos moleculares de respuesta a la temperatura de las ω 3 desaturasas en *Glycine max* y *Arabidopsis thaliana*. Estación Experimental de Aula Dei (EEAD-CSIC). Universidad de Zaragoza.
- Román A., Andreu V., Hernández M.L., Lagunas B., Picorel R., Martínez-Rivas J.M. y Alfonso M.** 2012. Contribution of the different omega-3 fatty acid desaturase genes to the cold response in soybean. *J Exp Bot*, 63 (13): 4973-4982.
- Shanklin J., Whittle E. y Fox B.G.** 1994. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry*, 33 (43): 12787-12794.
- Shanklin J. y Cahoon E.B.** 1998. Desaturation and related modifications of fatty acids¹. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 611-641.
- Somerville C. y Browse J.** 1991. Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. *Science*, 252 (5002): 80-87.
- Somerville C., Browse J., Jaworski J.G. y Ohlrogge J.B.** 2000. Plant Growth Regulation. Buchanan B.B., Gruissem W. y Jones R. Sherwry, P. American Society of Plants Physiologists. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 35 (1): 105-106.
- Sperling P., Franke S., Luthje S. y Heinz E.** 2005. Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiol Biochem*, 43 (12): 1031-1038.
- Xu C., Fan J., Froehlich J.E., Awai K. y Benning C.** 2005. Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in Arabidopsis. *Plant Cell*, 17 (11): 3094-3110.

ANEXOS

ANEXO I. Biosíntesis de lípidos.

El proceso comienza con la síntesis de malonil CoA mediante la carboxilación de una molécula de acetil-CoA por parte de ACC. A continuación FAS sintetiza la cadena hidrocarbonada mediante la adición sucesiva de dos unidades de carbono cedidas por moléculas de malonil-CoA. La malonil-CoA ACP transacilasa une el grupo malonilo a la proteína transportadora de acilos (ACP). El ácido graso permanece unido a la ACP hasta su completa elongación (16-18 átomos de carbono). Después la β -cetoacil sintasa III (KASIII) condensa un grupo malonilo a una primera molécula de acetil-CoA. El malonilo sufre una descarboxilación y se forma un intermediario de 4 carbonos. En cada ciclo el intermediario sufrirá una reducción del grupo ceto, una deshidratación y una reducción más llevadas a cabo por la cetoacil-ACP reductasa, hidroxiacil-ACP deshidratasa y enoil-ACP reductasa, respectivamente. El poder reductor es aportado por el NADPH. Posteriormente tiene lugar una nueva condensación con una molécula de malonil-ACP llevada a cabo por la KASI que participa en la incorporación de átomos de carbono hasta alcanzar los 16, momento tras el cual KASII puede adicionar dos carbonos más para dar lugar al 18:0

ANEXO II. Descripción de *Arabidopsis thaliana*

Es una planta herbácea con una altura comprendida normalmente entre los 1 y 3 dm (*Figura A*). El tallo es erecto con ramificación un poco alejada de la base. Desde la base de la planta está cubierto de pelos cortos y ramificados, dispuestos muy densamente y que van desapareciendo o cuya densidad se va reduciendo a medida que nos aproximamos a las inflorescencias. Las hojas son simples, de elípticas a ovales con los bordes enteros. Tiene dos tipos de hojas, las basales de hasta 2 × 0,5 cm y arrosetadas (pegadas al suelo y formando una roseta de cuyo centro saldrá el tallo); y las caulinares (las que están a lo largo del tallo) que son más pequeñas y carentes de pecíolo. Las inflorescencias se presentan en racimos, en el extremo de las ramas o el tallo, no demasiados compactos. Éstas se van separando unas de otras a medida que el tallo crece, por lo que los pedúnculos de los frutos maduros estarán separados del orden de un centímetro entre ellos.

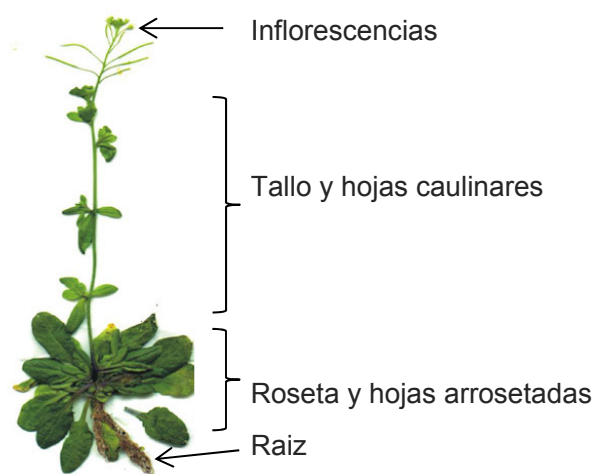


Figura A. Partes de *Arabidopsis thaliana*. (<http://dynamo.ku.dk/research/>)

ANEXO III. Desaturasas en Arabidopsis y sus características principales

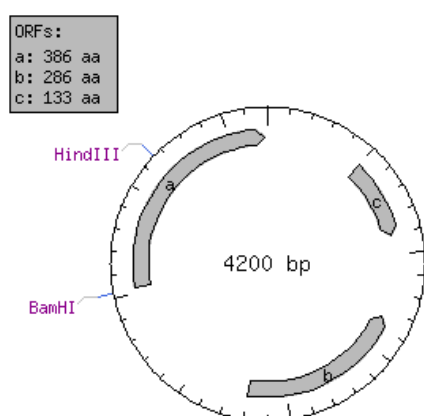
Como se comenta en la introducción del presente trabajo existen 8 tipos de desaturasas en *Arabidopsis thaliana*, cada una de las cuales está implicada en la síntesis de unos ácidos grasos particulares como se muestra en la *Tabla A*. Así por ejemplo, FAD6 es una ω -6 desaturasa que está implicada en la síntesis de 16:2 y 18:2 utilizando como precursores 16:1 y 18:1 respectivamente.

Gen	Código TAIR	Enzima	Sustrato (lípidos)	Sustrato (AG)	Producto (AG)	Posición doble enlace
FAB2*	At2g43710	Δ 9 estearoil-ACP desaturasa	Acil-ACP*	18:0	18:1 ^{Δ9}	Δ 9
FAD2	At3g12120	Δ 12 oleato desaturasa	PC	18:1 ^{Δ9}	18:2 ^{Δ9,12}	ω 6
FAD3	At2g29980	Δ 15 linoleato desaturasa	PC	18:2 ^{Δ9,12}	18:3 ^{Δ9,12,15}	ω 3
FAD4	At4g27030	Δ 3 <i>trans</i> -palmitato desaturasa	PG	16:0	16:1 ^{Δ3t}	Δ 3
FAD5	At3g15850	Δ 7 <i>cis</i> -palmitato desaturasa	GL, SQ	16:0	16:1 ^{Δ7}	Δ 7
FAD6	At3g30950	Δ 10 palmitoleato desaturasa	GL,SQ,PG	16:1 ^{Δ7}	16:2 ^{Δ7,10}	ω 6
		Δ 12 oleato desaturasa	GL,SQ,PG	18:1 ^{Δ9}	18:2 ^{Δ9,12}	
FAD7	At3g11170	Δ 13 palmitolinoleato desat.	GL,SQ,PG	16:2 ^{Δ7,10}	16:3 ^{Δ7,10,13}	ω 3
		Δ 15 linoleato desaturasa	GL,SQ,PG	18:2 ^{Δ9,12}	18:3 ^{Δ9,12,15}	
FAD8	At5g05580	Δ 13 palmitolinoleato desat.	GL,SQ,PG	16:2 ^{Δ7,10}	16:3 ^{Δ7,10,13}	ω 3
		Δ 15 linoleato desaturasa	GL,SQ,PG	18:2 ^{Δ9,12}	18:3 ^{Δ9,12,15}	

*Tabla A. Desaturasas en Arabidopsis thaliana y características principales (función, sustratos y productos). Sobre fondo verde aparecen las desaturasas localizadas en el cloroplasto y sobre fondo amarillo las que se encuentran en el RE. El * indica la única desaturasa soluble. El resto son proteínas de membrana. Tabla adaptada de Román A. 2014.*

ANEXO IV. Digestión pGEM-T Easy + AtFAD3 con BamHI y HindIII

En la *Figura B* se ve que el tamaño del vector con el inserto clonado alcanza las 4200 pb. Esta construcción presenta 3 marcos de lectura siendo el denominado como “a” el correspondiente al gen *AtFAD3*. Las enzimas BamHI y HindIII presentan un sitio de corte único en la construcción y al llevar a cabo una reacción de digestión se obtienen fragmentos de los tamaños descritos en la *Tabla B*.



#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	HindIII-BamHI	3660-3020	3561
2	BamHI-HindIII	3021-3659	639

Figura B. Vector pGEM-T Easy en el que se ha insertado AtFAD3. Presenta tres marcos de lectura en gris y aparecen representados los sitios de corte BamHI y HindIII

Tabla B. Tamaños de los fragmentos obtenidos después de digerir el constructo con BamHI y HindIII

ANEXO V. Digestión de pGEM-T Easy + AtFAD3 con BamHI y XhoI

En la *Figura C* se ve que el tamaño del vector con el inserto clonado alcanza las 4200 pb. Esta construcción presenta 3 marcos de lectura siendo el denominado como “a” el correspondiente al gen AtFAD3. Las enzimas BamHI y HindIII presentan un sitio de corte único en la construcción y al llevar a cabo una reacción de digestión se obtienen fragmentos de los tamaños descritos en la *Tabla C*.

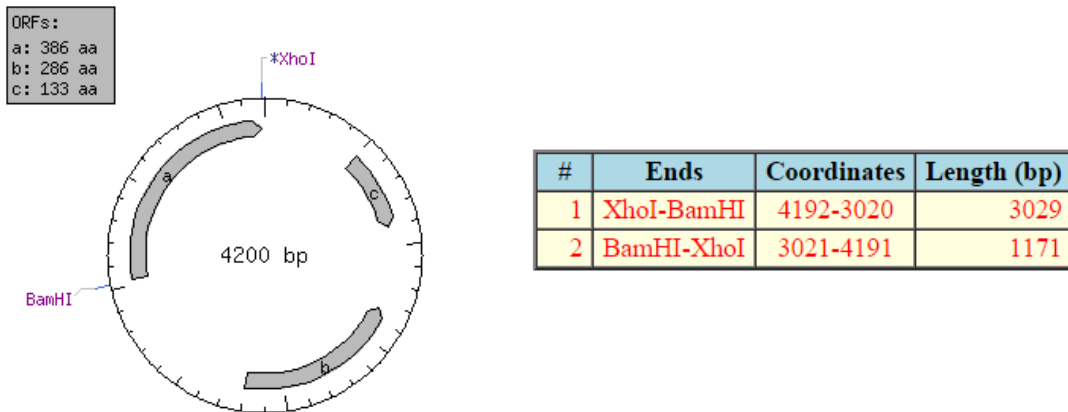


Figura C. Vector pGEM-T Easy en el que se ha insertado AtFAD3. Presenta tres marcos de lectura resaltados en gris y aparecen representados los sitios de corte de las enzimas BamHI y XhoI

Tabla C. Tamaños de los fragmentos obtenidos después de digerir el constructo con BamHI y XhoI.