

TRABAJO FIN DE GRADO

Análisis de la abundancia relativa y de los estados conformacionales de las omega-3 desaturasas plastidiales de *Arabidopsis thaliana*

Raúl Díaz-Guerra Aparicio

Grado en Biotecnología
2017



 **CSIC**
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Director

Dr. Miguel Alfonso Lozano

Departamento de Nutrición Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei
(EEAD-CSIC)

Ponente

Dra. María Luisa Peleato Sánchez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de
Ciencias de la Universidad de Zaragoza



 **CSIC**
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

D. MIGUEL ALFONSO LOZANO, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), adscrito a la Estación Experimental de Aula Dei de Zaragoza (EEAD-CSIC), y Dña. MARÍA LUISA PELEATO SÁNCHEZ, Catedrática de la Universidad de Zaragoza:

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Grado en Biotecnología titulado "Análisis de la abundancia relativa y de los estados conformacionales de las omega-3 desaturasas plastidiales de *Arabidopsis thaliana*" ha sido realizado por RAÚL DÍAZ-GUERRA APARICIO en el Departamento de Nutrición Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei de Zaragoza (EEAD-CSIC) bajo la dirección del Dr. MIGUEL ALFONSO LOZANO y que cumple con los objetivos recogidos en las Directrices para el TFG en Biotecnología, por lo que consideran procedente su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos firman la presente en Zaragoza a 27 de julio de 2017.

A blue ink signature of Miguel Alfonso Lozano, consisting of stylized initials and a long horizontal stroke.

Fdo.: Miguel Alfonso Lozano

Director

A blue ink signature of María Luisa Peleato Sánchez, featuring a cursive name and a long horizontal stroke.

Fdo.: María Luisa Peleato Sánchez

Ponente

Índice

1. Resumen – Abstract.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Lípidos vegetales.....	2
2.1.1. Características generales y funciones de los lípidos vegetales	2
2.1.2. Ácidos grasos	3
2.1.3. Lípidos de membrana.....	3
2.2. Síntesis de lípidos en plantas.....	4
2.2.1. Biosíntesis de ácidos grasos	4
2.2.2. Biosíntesis de lípidos de membrana.....	5
2.3. Desaturasas de ácidos grasos	7
2.3.1. Omega-3 desaturasas plastidiales.....	8
3. Objetivos y planteamiento experimental	10
4. Materiales y métodos.....	11
4.1. Organismo modelo: <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
4.2. Tratamientos experimentales	12
4.2.1. Tratamiento de herida	12
4.2.2. Tratamiento con MeJA.....	12
4.2.3. Tratamiento con ABA	12
4.2.4. Tratamiento de frío	12
4.3. Extracción de proteínas	12
4.4. Cuantificación de proteínas.....	12
4.5. Electroforesis SDS-PAGE	13
4.5.1. Preparación de geles de poliacrilamida.....	13
4.5.2. Desarrollo de la electroforesis SDS-PAGE.....	13
4.5.3. Detección de proteínas en geles SDS-PAGE.....	14
4.6. Detección inmunológica de proteínas mediante Western blot.....	14
5. Resultados y discusión.....	16
5.1. Abundancia relativa de FAD7 y FAD8 en tejido fotosintético y no fotosintético	16
5.2. Análisis de la presencia de agregados de alto peso molecular	17
5.3. Efecto de la herida y el metil jasmonato en la abundancia relativa de FAD7	18
5.4. Efecto del ácido abscísico en la abundancia relativa de FAD7.....	19
5.5. Efecto del frío en la abundancia relativa de FAD8	20
6. Conclusiones – Conclusions	22
7. Bibliografía.....	23
8. Anexos.....	25
8.1. Datos de abundancia relativa de FAD7 y FAD8 en tejido fotosintético y no fotosintético obtenidos mediante microscopía confocal.....	25
8.2. Datos de abundancia relativa de FAD7 en respuesta al ácido abscísico obtenidos mediante microscopía confocal	26
8.3. Datos de abundancia relativa de FAD8 en respuesta al frío obtenidos mediante microscopía confocal	27

1. Resumen – Abstract

Las omega-3 desaturasas FAD7 y FAD8 son proteínas integrales de membrana localizadas en las envueltas plastidiales y responsables de la síntesis de ácidos grasos trienoicos. Su actividad es crucial para el correcto funcionamiento de las membranas biológicas, manteniendo su fluidez. Además, los ácidos grasos trienoicos son precursores de la biosíntesis de jasmonatos, hormonas clave en las respuestas defensivas frente al ataque por patógenos. Pese a su enorme relevancia en la fisiología vegetal, todavía se desconocen datos importantes como sus parámetros cinéticos, abundancia relativa, organización cuaternaria o estructura tridimensional. El motivo es que las aproximaciones bioquímicas convencionales (purificación, uso de anticuerpos específicos, estudios enzimológicos) no son posibles con estas enzimas, al ser proteínas homólogas con alto grado de similitud y con elevado carácter hidrofóbico. Como alternativa, el Grupo de Investigación de la EEAD-CSIC ha desarrollado unas líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan las proteínas AtFAD7 y AtFAD8 bajo el control de su promotor endógeno y fusionadas a la proteína fluorescente verde (GFP). En este trabajo se ha analizado la abundancia relativa de FAD7 y FAD8 mediante inmunodetección con anticuerpo anti-GFP en diferentes tejidos y en respuesta a distintos estreses ambientales. Los resultados muestran que FAD7 es más abundante que FAD8 tanto en hojas (tejido fotosintético) como en raíces (tejido no fotosintético) y que FAD7 es más abundante en hojas que en raíces. Al no conseguir detectar la proteína FAD8, mucho menos abundante, el trabajo se ha enfocado en FAD7, cuya abundancia en hojas aumenta en respuesta a los estímulos de herida y de la hormona metil jasmonato y disminuye en respuesta al ácido abscísico. Además, los resultados apuntan a un control fundamentalmente transcripcional de la expresión de FAD7. Finalmente, la obtención de agregados de alto peso molecular podría responder a la existencia de complejos supramoleculares en los que participe FAD7.

The omega-3 desaturases FAD7 and FAD8 are integral membrane proteins located in the plastidial envelopes and responsible for the synthesis of trienoic fatty acids. Their activity is crucial for the proper functioning of biological membranes, maintaining their fluidity. In addition, trienoic fatty acids are precursors for the biosynthesis of jasmonates, key hormones in defensive responses to pathogen attack. Despite their enormous relevance in plant physiology, important data are still unknown such as their kinetic parameters, relative abundance, quaternary organization or three-dimensional structure. The reason is that conventional biochemical approaches (purification, use of specific antibodies, enzymatic studies) are not possible with these enzymes, being homologous proteins with high degree of similarity and high hydrophobic character. As an alternative, the Research Group from the EEAD-CSIC has developed transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* expressing the proteins AtFAD7 and AtFAD8 under the control of their endogenous promoter and fused to the green fluorescent protein (GFP). In this work we have analyzed the relative abundance of FAD7 and FAD8 by immunodetection with anti-GFP antibody in different tissues and in response to different environmental stresses. The results show that FAD7 is more abundant than FAD8 in leaves (photosynthetic tissue) and in roots (non-photosynthetic tissue) and that FAD7 is more abundant in leaves than in roots. Failing to detect the much less abundant FAD8 protein, the work has focused on FAD7, whose leaf abundance increases in response to wound and methyl jasmonate hormone stimuli and decreases in response to abscisic acid. In addition, the results point to a fundamentally transcriptional control of FAD7 expression. Finally, the obtaining of high molecular weight aggregates could respond to the existence of supramolecular complexes in which FAD7 participates.

2. Antecedentes

2.1. Lípidos vegetales

2.1.1. Características generales y funciones de los lípidos vegetales

Los lípidos son un grupo estructuralmente heterogéneo de moléculas que comparten la característica común de ser insolubles en medio acuoso. Incluyen una amplia variedad de compuestos derivados de ácidos grasos, así como muchos pigmentos y compuestos secundarios no relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos. Cada célula vegetal contiene una diversa colección de lípidos, localizados en estructuras específicas. Además, tejidos vegetales diferentes contienen lípidos distintos. En la **Figura 2.1.** se muestra la distribución de los distintos tipos de lípidos en hojas de *Arabidopsis thaliana*.

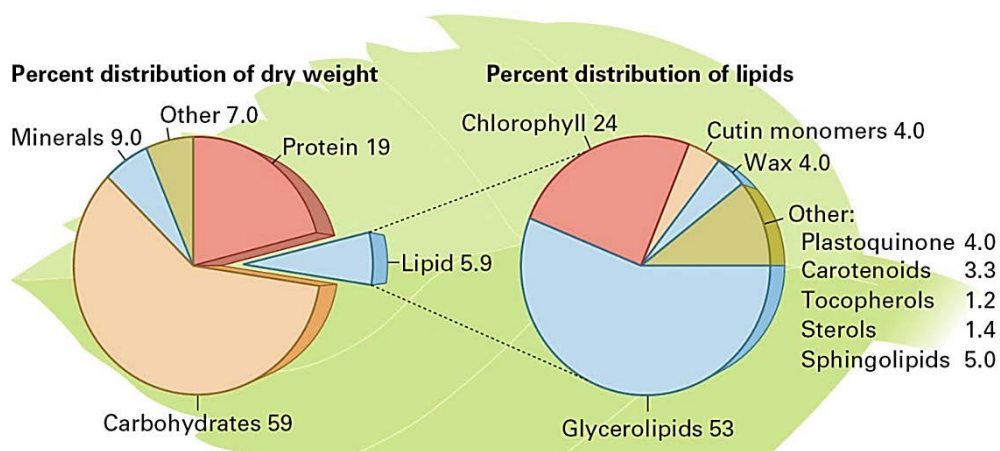


Figura 2.1. Distribución aproximada de los constituyentes celulares y de los tipos de lípidos en hojas de *Arabidopsis thaliana*. Izquierda: distribución de los constituyentes celulares en porcentaje del peso seco total. Derecha: distribución de los distintos lípidos en porcentaje del peso de lípidos totales. (Somerville *et al.*, 2015).

Los lípidos tienen múltiples funciones esenciales en las plantas. Los lípidos de membrana forman una barrera hidrofóbica, delimitando a la célula en compartimentos funcionales y aislándola del exterior. La compartimentación celular depende de una bicapa lipídica que impide la difusión libre de moléculas hidrofílicas entre orgánulos y entre el interior y exterior celular. Los lípidos de reserva son casi exclusivamente triacilgliceroles, que se acumulan en orgánulos llamados cuerpos grasos. La movilización y catabolismo de los triacilgliceroles proporciona energía y carbono para el crecimiento de la plántula tras la germinación. El catabolismo de los ácidos grasos liberados de los triacilgliceroles ocurre mediante β -oxidación en los peroxisomas. Los lípidos de superficie, como las ceras y la cutina, protegen a las plantas de la desecación y del ataque por patógenos. Algunos ácidos grasos y derivados participan en rutas de transducción de señales, como por ejemplo los jasmonatos (hormonas vegetales y segundos mensajeros) y los fosfatidilinositoles. Los ácidos grasos también pueden estar involucrados en la regulación de varios procesos celulares mediante acilación de proteínas. Las plantas pueden sintetizar ácidos grasos inusuales, habiéndose encontrado más de 200 ácidos grasos diferentes en distintas especies. Estos ácidos grasos inusuales se encuentran casi exclusivamente en aceite de semillas, y se piensa que pueden tener función defensiva (Somerville *et al.*, 2015).

2.1.2. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos de cadenas hidrocarbonadas altamente reducidas. Pueden ser saturados o insaturados. Los ácidos grasos insaturados se caracterizan por la presencia de dobles enlaces en la cadena alifática que provocan curvaturas en la molécula. En la **Tabla 2.1.** se recogen los principales ácidos grasos en plantas (Somerville *et al.*, 2015).

	Nombre común	Abreviatura
Ácidos grasos saturados	Ácido láurico	12:0
	Ácido palmítico	16:0
	Ácido esteárico	18:0
	Ácido araquidónico	20:0
	Ácido behénico	22:0
	Ácido lignocérico	24:0
Ácidos grasos insaturados	Ácido oleico	18:1 ^{Δ9}
	Ácido petroselinico	18:1 ^{Δ6}
	Ácido linoleico	18:2 ^{Δ9,12}
	Ácido α-linolénico	18:3 ^{Δ9,12,15}
	Ácido γ-linolénico	18:3 ^{Δ6,9,12}
	Ácido roigánico	16:3 ^{Δ7,10,13}
	Ácido erúxico	22:1 ^{Δ13}

Tabla 2.1. Principales ácidos grasos en plantas. Los ácidos grasos sombreados son los principales constituyentes de los lípidos de membrana. Los ácidos grasos no sombreados se encuentran fundamentalmente en lípidos de reserva. (Tabla adaptada de Somerville *et al.*, 2015).

2.1.3. Lípidos de membrana

Entre los lípidos de membrana se encuentran los *glicerolípidos*, los *esfingolípidos* y los *esteroides*, siendo los glicerolípidos los más abundantes. No sólo son importantes por delimitar la célula y sus compartimentos, sino que la composición lipídica de la membrana también afecta a la forma de la planta, así como a muchas funciones celulares. Por ejemplo: la fotosíntesis está disminuida en plantas con un menor contenido en lípidos de membrana poliinsaturados; la composición lipídica afecta a la sensibilidad al frío e influye en las respuestas de la planta a la congelación. Los lípidos de membrana actúan también en rutas de transducción de señales y en procesos defensivos ante el ataque por patógenos (Somerville *et al.*, 2015). Esto se debe a que los ácidos grasos trienoicos (18:3 y 16:3) son precursores de la síntesis de ácido jasmónico, una hormona clave en los procesos anteriormente citados (Wasternack y Hause, 2013).

Los glicerolípidos están constituidos por ácidos grasos esterificados con derivados del glicerol. En plantas hay cuatro tipos principales: triacilgliceroles (lípidos de reserva), fosfolípidos, galactolípidos y sulfolípidos. Las membranas de los plastidios contienen principalmente galactolípidos, mientras que el resto de membranas están compuestas mayoritariamente por mezclas de fosfolípidos. Los fosfolípidos se sintetizan por esterificación de ácidos grasos a los dos grupos hidroxilo del glicerol-3-fosfato, produciendo ácido fosfatídico (PA). Todos los demás fosfolípidos derivan del ácido fosfatídico por esterificación de un grupo polar al grupo fosforilo: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG),

difosfatidilglicerol (cardiolipina) y fosfatidilinositol (PI). En los galactolípidos, un grupo galactosil reemplaza al grupo fosforilo de los fosfolípidos. Los galactolípidos mayoritarios son el monogalactosildiacylglicerol (MGD) y el digalactosildiacylglicerol (DGD). Por otra parte, en el sulfolípidosulfoquinovosildiacylglicerol (SQD) es el grupo sulfoquinovosil el que sustituye al grupo fosforilo de los fosfolípidos (Somerville *et al.*, 2015).

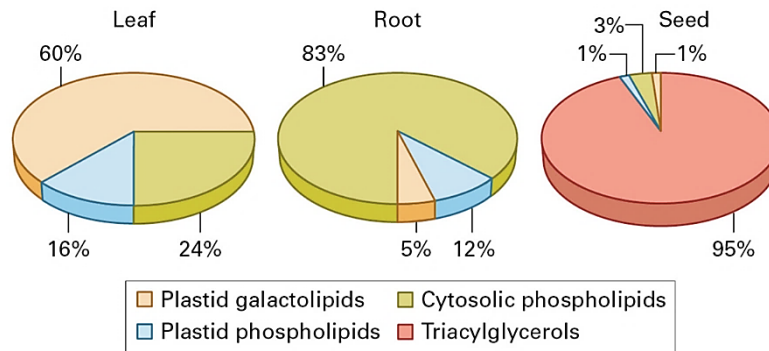


Figura 2.2. Composición de glicerolípidos en distintos tejidos. En hojas (izquierda) predominan los galactolípidos, ya que los tilacoides del cloroplasto son las membranas más abundantes. En raíces (centro) la mayoría de las membranas son extraplastidiales (retículo endoplásmico y aparato de Golgi), por lo que abundan más los fosfolípidos citosólicos. Las semillas (derecha) de especies oleaginosas contienen mayoritariamente triacylgliceroles (Somerville *et al.*, 2015).

2.2. Síntesis de lípidos en plantas

2.2.1. Biosíntesis de ácidos grasos

La biosíntesis de ácidos grasos en plantas comienza en los cloroplastos y demás plastidios e involucra a las enzimas acetil-CoA carboxilasa (ACC) y ácido graso sintasa (FAS). En esta ruta, una serie de reacciones repetidas incorpora grupos acetilo derivados del acetil-CoA hasta formar un acilo de 16 o 18 átomos de carbono. FAS incluye todas las actividades enzimáticas de la ruta, a excepción de la ACC. En la naturaleza existen dos tipos de FAS diferentes. Animales y levaduras poseen la FAS tipo I, que consiste en una única enzima multifuncional. Por otra parte, las plantas y la mayoría de las bacterias tienen una FAS tipo II, en la cual las diferentes actividades enzimáticas residen en proteínas individuales que parecen organizarse en un complejo supramolecular. La proteína transportadora de acilos (ACP), proteína cofactora esencial, generalmente se considera componente de FAS. La síntesis de ácidos grasos se inicia con la carboxilación dependiente de ATP del acetil-CoA para formar malonil-CoA. A continuación, el grupo malonilo se transfiere a ACP. Entonces comienza el ensamblado del ácido graso, con la formación de un enlace carbono-carbono entre el carbono 1 de un acetilo cebador y el carbono 2 del grupo malonilo unido a ACP, que libera una molécula de CO₂. Esta condensación resulta en la formación de acetoacetil-CoA. Seguidamente, una serie de tres reacciones (reducción, deshidratación y reducción) produce el acil-ACP completamente reducido. El NAD(P)H proporciona el poder reductor necesario para las dos reacciones de reducción que se producen por cada ciclo de elongación del acilo en dos átomos de carbono. La reacción de condensación es catalizada por la 3-cetoacetil-ACP sintasa (KAS). Todas las plantas analizadas hasta la fecha contienen tres isoenzimas (I, II y III). KAS III inicia la biosíntesis del ácido graso usando acetil-CoA como cebador, KAS I extiende la cadena hasta 12-16 carbonos y, finalmente, KAS II completa la

síntesis hasta 18 carbonos. Normalmente, la síntesis de ácidos grasos termina con un ácido graso 16:0 o 18:0. Las reacciones más comunes para finalizar la síntesis son: hidrólisis del acilo del ACP por una tioesterasa; transferencia del acilo del ACP directamente a un glicerolípido por una aciltransferasa o formación de un doble enlace en el acilo por una acil-ACP desaturasa. En plantas existen dos tipos principales de acil-ACP tioesterasas, con distinta preferencia de sustrato. La clase mayoritaria, FatA, tiene preferencia por el 18:1^{Δ9}-ACP, mientras que FatB, tipificada como 16:0-ACP tioesterasa, es más activa sobre acil-ACPs saturados de cadena más corta (Somerville *et al.*, 2015).

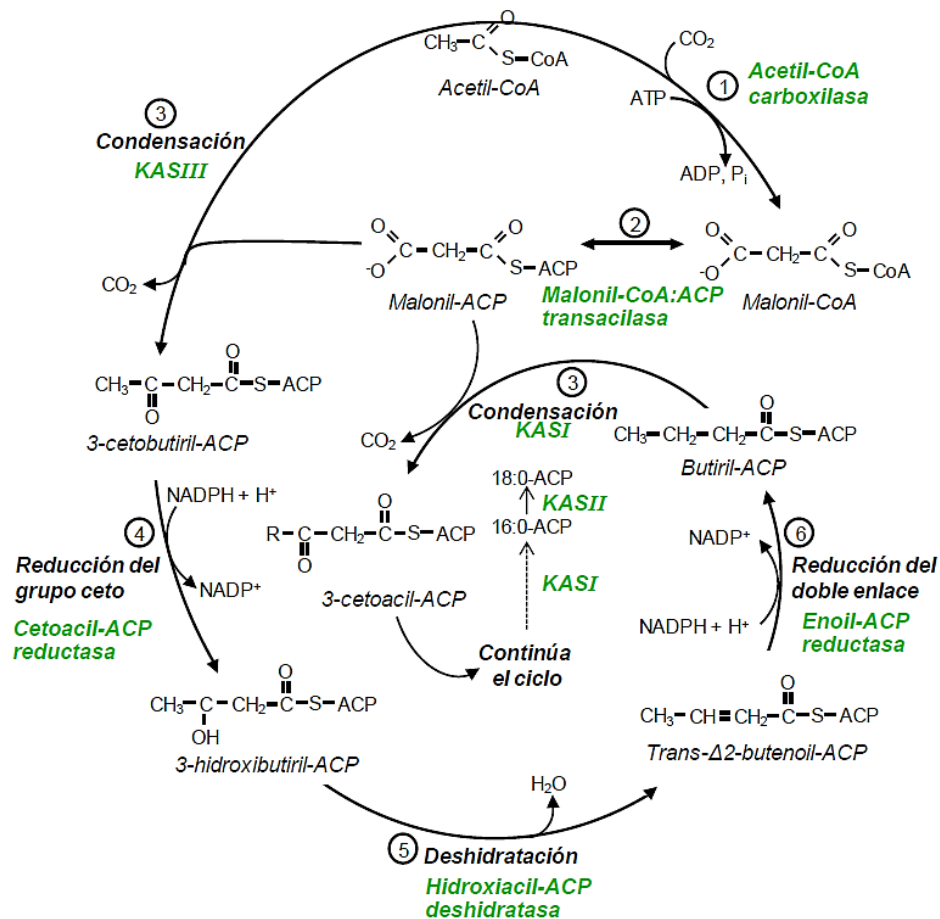


Figura 2.3. Reacciones de la ruta de síntesis de ácidos grasos en plantas. En verde se indican las enzimas implicadas en cada reacción. (Figura adaptada por Raquel Collados a partir de Ohlrogge y Browse, 1995).

2.2.2. Biosíntesis de lípidos de membrana

En las plantas existen dos rutas de síntesis de glicerolípido de membrana, denominadas *ruta procariota* y *ruta eucariota*, que tienen lugar en el plastidio y en el retículo endoplásmico, respectivamente. Los productos de la síntesis de ácidos grasos en los plastidios (16:0-, 18:0- y 18:1^{Δ9}-ACP) pueden incorporarse directamente a la ruta procariota o ser exportados al retículo endoplásmico como acil-CoA y entrar en la ruta eucariota. Las primeras reacciones de ambas rutas resultan en la formación de PA por transferencia de los ácidos grasos del acil-ACP o acil-CoA al glicerol-3-fosfato (G3P). Debido a la distinta especificidad por el sustrato de las enzimas aciltransferasas de cada orgánulo, el PA generado en la ruta procariota tiene 16:0 en la posición *sn*-2 (hidroxilo central del G3P) y, en la mayoría de los casos, 18:1^{Δ9} en la posición *sn*-1 (hidroxilo terminal no fosforilado del G3P), mientras que el PA formado en la ruta eucariota está enriquecido

en ácidos grasos de 18 carbonos en *sn*-2 y, cuando hay 16:0, sólo se encuentra en *sn*-1. En la ruta procarionota, el PA se utiliza para la síntesis de PG o se convierte en diacilglicerol (DAG) por acción de una enzima fosfatasa ácida de la envuelta plastidial interna. Entonces, el DAG sirve de precursor para la síntesis de MGD, DGD y SQD. En la ruta eucariota, el PA sirve para la síntesis de fosfolípidos como PC, PE, PI y PS. El PA se sintetiza a partir de los acil-CoA procedentes del plastidio o bien a partir de acil-CoA generado en unas reacciones citosólicas que equilibran reversiblemente los grupos acilos de PC y otros lípidos. Además, el DAG intermediario que se genera en estas reacciones puede regresar al plastidio para contribuir a la síntesis de lípidos plastidiales (Somerville *et al.*, 2015).

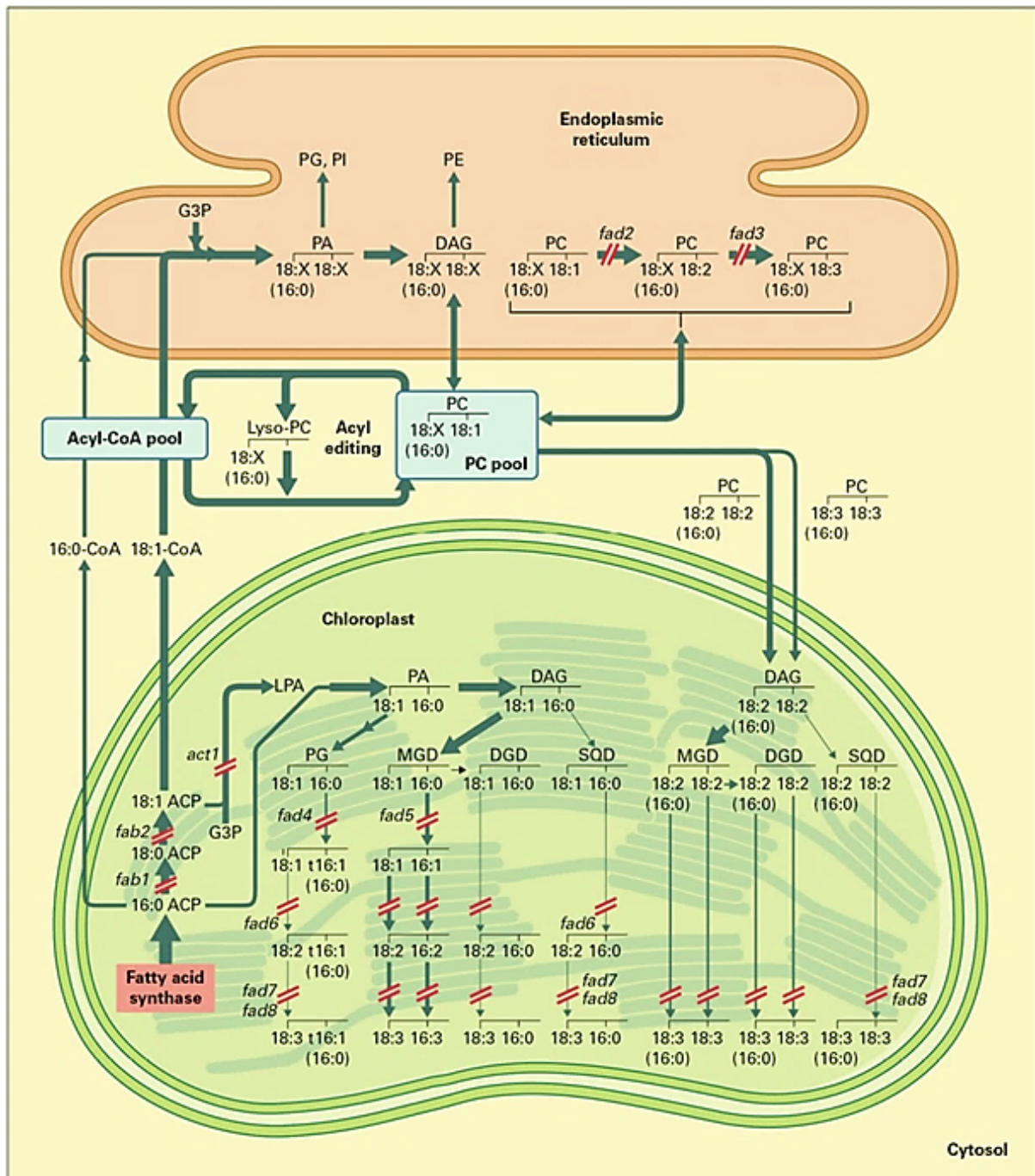


Figura 2.4. Esquema de la síntesis de lípidos en hojas de *Arabidopsis*. Las barras rojas indican enzimas de cuyos genes se han obtenido mutantes en *Arabidopsis*. (Somerville *et al.*, 2015).

2.3. Desaturasas de ácidos grasos

Las desaturasas de ácidos grasos (FAD) son enzimas que catalizan la conversión de un enlace simple entre dos átomos de carbono (C-C) en un doble enlace (C=C) en la cadena alifática de los ácidos grasos, transformándolos así en ácidos grasos insaturados. Casi todas las desaturasas de plantas actúan sobre ácidos grasos esterificados en glicerolípidos. La insaturación de los ácidos grasos de los glicerolípidos es crucial para el correcto funcionamiento de las membranas biológicas, ya que disminuye su temperatura de fusión y les proporciona la fluidez adecuada. La purificación de las desaturasas y su análisis mediante técnicas bioquímicas convencionales han sido dificultadas por su carácter hidrofóbico como proteínas de membrana. Por este motivo, datos tales como sus parámetros cinéticos, su organización cuaternaria o su abundancia relativa son aún desconocidos. Una colección de mutantes de *Arabidopsis* con distintas deficiencias en la insaturación de ácidos grasos ha permitido conocer el número y propiedades de las distintas enzimas, que se diferencian en la especificidad por sustrato, la localización celular y el modo de regulación (Los y Murata, 1998; Somerville *et al.*, 2015). En la **Tabla 2.2.** se presentan las 8 desaturasas de ácidos grasos de *Arabidopsis*.

Nombre	Localización	Sustrato (lípidos)	Sustrato (AG)	Producto (AG)	Posición del doble enlace
FAB2	Plastidio	Acil-ACP	18:0	18:1 Δ^9	Δ^9
FAD2	RE	PC	18:1 Δ^9	18:2 $\Delta^9,12$	ω^6
FAD3	RE	PC	18:2 $\Delta^9,12$	18:3 $\Delta^9,12,15$	ω^3
FAD4	Plastidio	PG	16:0	16:1 $^{trans\Delta^3}$	Δ^3
FAD5	Plastidio	GL, SQD	16:0	16:1 Δ^7	Δ^7
FAD6	Plastidio	GL, SQD, PG	16:1 Δ^7 18:1 Δ^9	16:2 $\Delta^7,10$ 18:2 $\Delta^9,12$	ω^6
FAD7	Plastidio	GL, SQD, PG	16:2 $\Delta^7,10$ 18:2 $\Delta^9,12$	16:3 $\Delta^7,10,13$ 18:3 $\Delta^9,12,15$	ω^3
FAD8	Plastidio	GL, SQD, PG	16:2 $\Delta^7,10$ 18:2 $\Delta^9,12$	16:3 $\Delta^7,10,13$ 18:3 $\Delta^9,12,15$	ω^3

Tabla 2.2. Enzimas desaturasas de *Arabidopsis* y sus principales características. De izquierda a derecha: localización celular (RE: retículo endoplásmico), lípidos en el que el ácido graso sustrato está esterificado (GL: galactolípido), ácido graso sustrato, ácido graso producto y posición de la cadena en la que se añade el doble enlace. FAB2 es la única desaturasa que no es proteína integral de membrana ni actúa sobre un glicerolípido, sino que es una proteína soluble que actúa sobre 18:0-ACP (Somerville *et al.*, 2015). (Tabla adaptada de Román, 2014).

La mayoría de las desaturasas son proteínas hidrofóbicas de 300-350 residuos de aminoácidos que parecen atravesar la membrana cuatro veces. Todas las desaturasas conocidas se caracterizan por la presencia de tres cajas de histidinas (típicamente HXXHH), localizadas en posiciones fuertemente conservadas en su secuencia. Estas cajas de histidinas, que ligan dos iones hierro, constituyen el centro catalítico de las enzimas. Las reacciones de desaturación requieren oxígeno molecular (O₂), así como la transferencia de dos electrones. El citocromo *b*₅ es el donador de electrones en el retículo endoplásmico, mientras que en los plastidios lo es la ferredoxina reducida durante la fotosíntesis. En el estado basal, el sitio activo de las desaturasas contiene un centro dihierro oxidado (Fe^{III}-O-Fe^{III}). La transferencia de los dos electrones a los iones hierro genera la forma reducida del centro dihierro (Fe^{II}-O-Fe^{II}), a la cual se une el O₂ para formar un

intermediario peroxo (2Fe^{III}-2O). La ruptura del enlace O-O da lugar a la forma activa del centro dihierro (2Fe^{IV}-2O), que atrae dos átomos de hidrógeno de dos grupos metileno del ácido graso de forma sucesiva. Al perder el primer átomo de hidrógeno se forma un radical ácido graso intermediario y, con la pérdida del segundo átomo de hidrógeno, se forma el doble enlace, así como la pérdida de una molécula de H₂O y la regeneración del sitio activo oxidado de la enzima (Los y Murata, 1998; Somerville *et al.*, 2015).

2.3.1. Omega-3 desaturasas plastidiales

Las omega-3 desaturasas plastidiales son FAD7 y FAD8, enzimas que catalizan la síntesis de ácidos grasos trienoicos mediante la formación de un doble enlace en la posición ω-3 de los ácidos grasos dienoicos esterificados en glicerolípidos. Ambas son proteínas integrales de membrana localizadas en los plastidios (Browse *et al.*, 1986; Iba *et al.*, 1993; McConn *et al.*, 1994). FAD7 es una proteína de un tamaño de 446 aminoácidos y 51,2 kDa, codificada por un gen nuclear del cromosoma 3 (TAIR: AT3G11170). Por otro lado, FAD8 es una proteína de 435 aminoácidos y 50,1 kDa, codificada por un gen nuclear del cromosoma 5 (TAIR: AT5G05580). Las dos proteínas poseen péptidos de tránsito que las dirigen a los plastidios y cuyo tamaño, predicho a partir de su secuencia, es de 81 aminoácidos para FAD7 (UniProtKB: P46310) y 42 aminoácidos para FAD8 (UniProtKB: P48622). Mientras que en *Arabidopsis* ambas proteínas están codificadas en un único gen nuclear, en otras especies como la soja (*Glycine max*) se ha demostrado la existencia de dos genes *FAD7* y dos genes *FAD8* que codifican isoformas funcionales (Andreu *et al.*, 2010; Román *et al.*, 2012). Los miembros de esta familia son proteínas homólogas con un alto grado de similitud, lo cual dificulta su análisis mediante el uso de anticuerpos específicos para cada una de ellas. En la **Figura 2.5.** se muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las ω3 desaturasas plastidiales de *Arabidopsis* y soja.

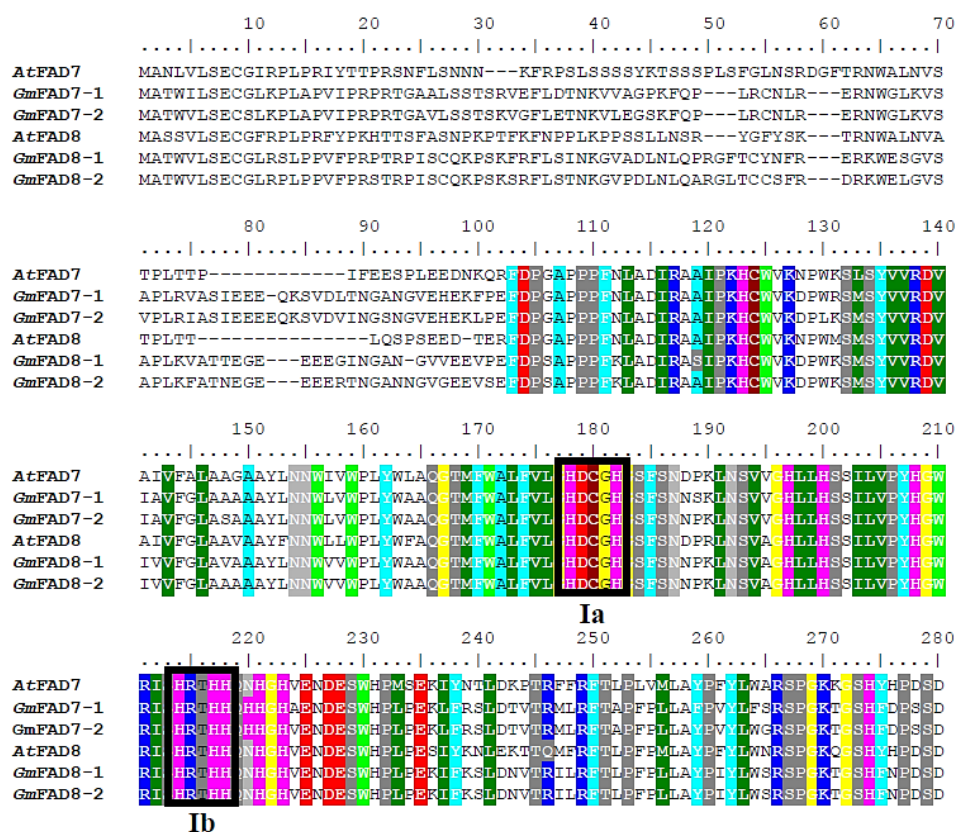


Figura 2.5. (Pie de figura en página siguiente).

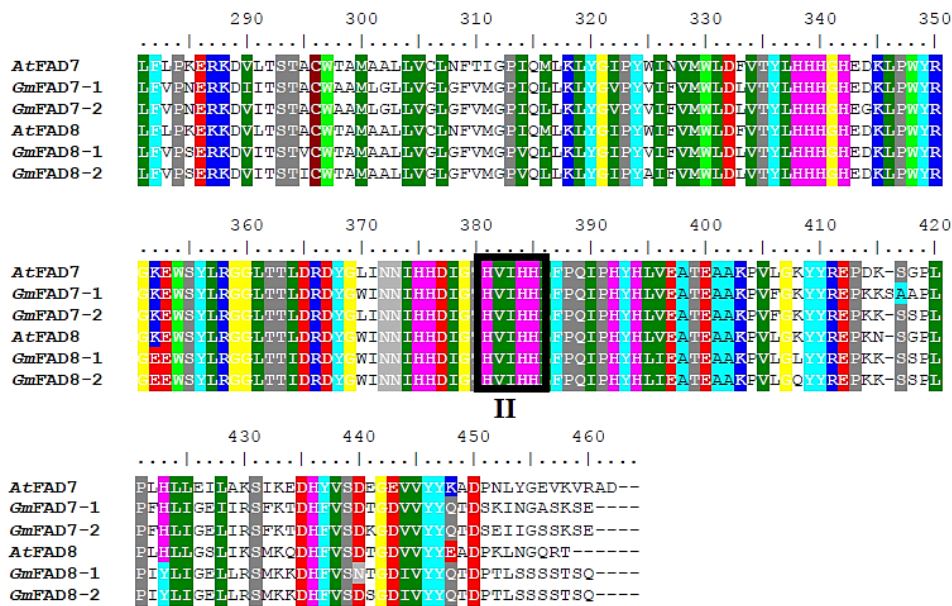


Figura 2.5. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las ω 3 desaturasas plastidiales de *Arabidopsis* y soja. At: *Arabidopsis thaliana*. Gm: *Glycine max*. Los recuadros negros indican las cajas de histidinas conservadas. (Figura adaptada de Román, 2014).

Cabe preguntarse por qué la evolución ha mantenido dos enzimas que catalizan la misma reacción en el mismo compartimento subcelular. FAD8 se identificó originalmente como una desaturasa específica de frío, pues el análisis fenotípico de un mutante *fad7* reveló que la reducción del nivel de ácidos grasos trienoicos observado a temperatura de crecimiento control (22 °C) era menos pronunciada a bajas temperaturas (15 °C). Por tanto, se asumió que el papel de FAD8 a temperaturas control era en gran medida irrelevante (Gibson *et al.*, 1994; McConn *et al.*, 1994). Sin embargo, recientemente se han encontrado evidencias de que FAD8 no sólo actúa a bajas temperaturas o en ausencia de FAD7 (Román *et al.*, 2015). Además, también se han obtenido resultados que sugieren funciones no redundantes de FAD7 y FAD8 (Román *et al.*, 2015). FAD7 sería la encargada de catalizar la desaturación de ácidos grasos 16:2 y 18:2, con mayor preferencia por MGD y DGD, que son los principales lípidos de la membrana plastidial. A su vez, FAD8 tendría mayor especificidad por sustratos 18:2 esterificados en lípidos como el PG, menos abundantes pero con funciones importantes en la dinámica del cloroplasto: organización de los fotosistemas, formación de la membrana tilacoidal, sensibilidad al frío y adaptación a bajas temperaturas (Hagio *et al.*, 2002; Sakamoto *et al.*, 2004; Wada y Murata, 2007). Una hipótesis atractiva para explicar la mayor selectividad de FAD8 por el 18:2 es que actúe preferentemente sobre ácidos grasos esterificados en la posición *sn*-1 de glicerolípidos, lo cual concuerda con el hecho de que actúe menos en sustratos 16:2 (siempre están en posición *sn*-2) y con la mayor selectividad por PG (contiene 18:2 sólo en *sn*-1) (Román *et al.*, 2015).

El conocimiento actual sobre la organización supramolecular de las desaturasas en las membranas es muy limitado. Existen datos obtenidos mediante experimentos de co-localización y microscopía confocal que sugieren una estrecha relación espacial de FAD7 y FAD8 en la envuelta plastidial (Román *et al.*, 2015). Por otra parte, resultados de interactómica han revelado que las desaturasas FAD2, FAD3, FAD6, FAD7 y FAD8 pueden formar homodímeros. Además, las desaturasas reticulares FAD2 y FAD3 pueden formar heterodímeros, dando lugar a un canal metabólico en el que el 18:1-PC es convertido en 18:3-PC sin que se libere el intermediario 18:2-PC (Lou *et al.*, 2014). Todavía está por confirmar si en el plastidio se forman canales similares.

3. Objetivos y planteamiento experimental

Dada la enorme relevancia de los lípidos de membrana y su grado de insaturación en la fisiología vegetal, resulta de gran interés profundizar en el conocimiento sobre las desaturasas de ácidos grasos, puesto que todavía quedan muchas incógnitas por desvelar, tales como los mecanismos de regulación de la expresión génica, las variaciones durante el desarrollo y ante distintas condiciones ambientales o estímulos, su estructura y organización en las membranas y su coordinación para conseguir la mayor eficacia catalítica. Los objetivos de este trabajo son:

- Analizar la abundancia relativa de las omega-3 desaturasas plastidiales FAD7 y FAD8 de *Arabidopsis thaliana* en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos.
- Averiguar el efecto de ciertos estímulos en la abundancia relativa de FAD7 y FAD8: herida, metil jasmonato (MeJA), ácido abscísico (ABA) y frío.
- Obtener evidencias de una posible organización de FAD7 y FAD8 en complejos supramoleculares.

Con este trabajo se pretende conseguir la primera aproximación a la detección de las enzimas FAD7 y FAD8. Hasta el momento no existen datos de abundancia relativa de dichas proteínas por dos motivos principales: el alto grado de similitud entre los miembros de esta familia génica y su elevado carácter hidrofóbico, que responde a su naturaleza de proteínas integrales de membrana. El alto grado de similitud de las secuencias de las proteínas *AtFAD7* y *AtFAD8*, con un 80,5% de identidad, hace difícil encontrar regiones específicas para el diseño de anticuerpos que las reconozcan de manera independiente. Por otro lado, la elevada hidrofobicidad de estas proteínas dificulta su purificación, así como la obtención de su estructura tridimensional, todavía desconocida.

Como alternativa a las dificultades de aplicar métodos bioquímicos al estudio de estas proteínas, el Grupo de Investigación de la Estación Experimental de Aula Dei (EEAD-CSIC) ha desarrollado unas líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresan las proteínas *AtFAD7* o *AtFAD8* bajo el control de su promotor endógeno y fusionadas a la proteína fluorescente verde (GFP) (líneas TG7 y TG8, respectivamente). En estas líneas transgénicas, la abundancia de la proteína responderá a los mismos estímulos y la misma regulación que la endógena. Gracias a la etiqueta fluorescente (GFP) podrá estudiarse su abundancia relativa mediante métodos bioquímicos y su localización celular mediante técnicas de microscopía confocal.

Promotor <i>AtFAD7</i> (1646 pb)	<i>AtFAD7</i>	<i>gfp</i>
Promotor <i>AtFAD8</i> (2958 pb)	<i>AtFAD8</i>	<i>gfp</i>

Figura 3.1. Construcciones que contienen las líneas transgénicas TG7 y TG8. Arriba: construcción de TG7. Abajo: construcción de TG8. De izquierda a derecha: secuencias promotoras de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*, secuencias codificantes de *AtFAD7* y *AtFAD8* y secuencia codificante de GFP.

4. Materiales y métodos

4.1. Organismo modelo: *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una pequeña planta con flor que pertenece a la familia de las brasicáceas (Brassicaceae), de la cual forman parte también especies cultivadas como la mostaza, la col o el rábano. Pese a no tener una relevancia agronómica significativa, *A. thaliana* posee una serie de características que la convierten en un interesante organismo modelo: relación filogenética cercana con varios cientos de miles de especies de plantas; pequeño tamaño y requerimientos de crecimiento sencillos que favorecen su cultivo en condiciones de laboratorio; ciclo de vida relativamente corto (aproximadamente 8 semanas); es una planta diploide que produce miles de semillas mediante auto-fertilización, facilitando la producción rápida de progenie a partir de plantas mutantes o transgénicas; transformación eficiente mediante *Agrobacterium tumefaciens*; genoma pequeño de unas 135 Mb secuenciado en el año 2000; disponibilidad de gran variedad de mutantes de inserción, microarrays de DNA y plantas transgénicas (Somerville y Koornneef, 2002; TAIR - About Arabidopsis, 2017).

En cuanto al ciclo vital de la planta, primero se produce la germinación de la semilla, que consiste en la imbibición (absorción de agua), emergencia de la radícula y emergencia del hipocótilo y los cotiledones (tallo y hojas embrionarias). Después tiene lugar el desarrollo vegetativo de la planta, durante el cual crecen las hojas de roseta. Luego crece el tallo, con hojas caulinares, y con la transición floral emergen las inflorescencias. Por último, las silicuas maduras (frutos) liberan nuevas semillas (Boyes *et al.*, 2001).



Figura 4.1. *Arabidopsis thaliana*. Izquierda: rosetas en distintos estadios de desarrollo. Centro: planta adulta con tallos, hojas caulinares e inflorescencias. Derecha: flor (arriba), tallo con flores y silicua (centro) y semillas (abajo). Las barras blancas representan 1 cm, excepto para la flor y semillas, donde representan 1 mm. (Institut Jean-Pierre Bourgin, 2017).

Las semillas de las líneas transgénicas TG7 y TG8 se sembraron en macetas con una mezcla compuesta por turba (Kekkilä):vermiculita 3:1 (v/v) y fertilizante (Ficote, Scotts) en concentración 2 g/L. Las plantas crecieron en una cámara bioclimática (Fitoclima 10000 EHHF,

Aralab) bajo condiciones controladas de temperatura (22/18 °C, día/noche), humedad relativa (70%), intensidad de luz (100-140 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y con un fotoperiodo de día corto (13/11 h, luz/oscuridad), regándose el sustrato con agua según las necesidades del cultivo.

4.2. Tratamientos experimentales

4.2.1. Tratamiento de herida

El tratamiento de herida consistió en lesionar masivamente las hojas de roseta mediante aplastamiento con pinzas dentadas, lo que simula el ataque por herbívoros. El tratamiento se realizó en paralelo en varias rosetas, congelando algunas en nitrógeno líquido pasada 1 hora de tratamiento y otras a las 2 horas.

4.2.2. Tratamiento con MeJA

El tratamiento con metil jasmonato (MeJA) se realizó administrando a las rosetas una disolución 100 μM de MeJA en forma de aerosol. La operación se llevó a cabo en varias rosetas en paralelo, congelando algunas en nitrógeno líquido pasada 1 hora de tratamiento y otras a las 2 horas.

4.2.3. Tratamiento con ABA

El tratamiento con ácido abscísico (ABA) consistió en aplicar a las rosetas una disolución 100 μM de ABA en metanol usando un pincel. Las rosetas se congelaron en nitrógeno líquido después de 3 días de tratamiento.

4.2.4. Tratamiento de frío

El tratamiento de frío consistió en el cultivo de plantas de 4 semanas de edad en condiciones de baja temperatura (6-8 °C) durante una semana. Pasado ese tiempo se congelaron las hojas de roseta en nitrógeno líquido.

4.3. Extracción de proteínas

Para la obtención de los extractos crudos de las distintas muestras vegetales, primero se congelaron los tejidos en nitrógeno líquido. Cuando no se procedió directamente a la extracción, las muestras se almacenaron a -80 °C. Los extractos se prepararon mediante homogeneización manual del material vegetal usando un émbolo de teflón en un tubo Eppendorf con tampón de extracción o mediante molienda con mortero en nitrógeno líquido y posterior resuspensión del polvo en tampón de extracción, lo que proporcionaba extractos más homogéneos y fáciles de manipular. La composición del tampón de extracción fue: Tris-HCl pH 7,5 0,1 M, EDTA 1 mM, MgCl_2 10 mM e inhibidores de proteasas (Pefabloc 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Fluka, antipaína 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma-Aldrich y leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma-Aldrich). Para evitar el calentamiento de la muestra la operación se realizó en hielo. Los extractos se congelaron a -80 °C hasta su uso.

4.4. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína de los extractos se cuantificó con un kit comercial (Biorad Protein Assay; Biorad) basado en el método de Bradford (1976). Esta técnica se basa en el cambio de color del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 cuando se une a residuos de aminoácidos

básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Al unirse a las proteínas, el colorante cambia de color rojo a azul, desplazando su máximo de absorción de 465 a 595 nm. La interpolación del valor de absorbancia a 595 nm respecto a una recta de calibrado proporciona la concentración de proteína total.

La mezcla de reacción se componía de 200 μL de reactivo de proteínas Biorad, 2-4 μL del extracto a cuantificar y el volumen de H_2O Milli-Q necesario para completar 1 mL. La mezcla se mezcló con vórtex y se dejó desarrollar el color durante al menos 5 minutos a temperatura ambiente. Como blanco se utilizó el tampón de extracción de proteínas, que sustituía en la mezcla de reacción al volumen de extracto. A partir de la medida de absorbancia a 595 nm, y considerando las diluciones oportunas, se interpoló la concentración de proteína usando una recta de calibrado obtenida con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1 y 2 mg/mL).

4.5. Electroforesis SDS-PAGE

Las proteínas de los extractos crudos se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Las condiciones desnaturalizantes (presencia de SDS y urea) provocan la separación de las proteínas en función de su masa molecular. Se utilizó el sistema de electroforesis vertical Miniprotein III (BioRad).

4.5.1. Preparación de geles de poliacrilamida

Se prepararon geles de 0,75 mm de espesor, compuestos de dos fases de distinta porosidad y pH: gel concentrador y gel separador. La concentración de poliacrilamida en el gel concentrador es menor que en el gel separador, por lo que su tamaño de poro es mayor. La función de este gel es facilitar la migración de las proteínas hasta la interfase con el gel separador, punto en el cual se concentran. Esto es determinante para que todas las proteínas comienzan a migrar desde el mismo punto y se obtenga una separación en bandas finas en el gel separador.

Reactivo	Gel concentrador	Gel separador
Urea	-	4 M
Tris-HCl pH 8,8	-	375 mM
Tris-HCl pH 6,8	125 mM	-
SDS	0,1% p/v	0,1% p/v
Acrilamida/Bisacrilamida 40%	4% v/v	12% v/v
APS	0,1% p/v	0,05% p/v
TEMED	13,3 mM	3,32 mM
H_2O Milli-Q	Hasta 2,5 mL	Hasta 5 mL

Tabla 4.1. Composición de los geles concentrador y separador. Urea y SDS son los agentes desnaturalizantes, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina) es el iniciador de la polimerización y APS (persulfato de amonio) es el catalizador de la reacción.

4.5.2. Desarrollo de la electroforesis SDS-PAGE

En primer lugar se llevó a cabo la desnaturalización de las muestras. El volumen correspondiente de cada extracto para cargar una cantidad de proteína total concreta (en general 20 μg de proteína total) se mezcló con tampón de desnaturalización en determinadas condiciones. A lo largo de este trabajo se utilizaron varios tampones y métodos de desnaturalización diferentes,

que se especifican en cada uno de los resultados del apartado 5 (Resultados y discusión). Una vez desnaturalizadas, las muestras se cargaron en los pocillos de los geles, así como 5 µL del marcador de masa molecular preteñido SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific). La electroforesis se desarrolló en una cubeta con tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 0,1% p/v) a un voltaje constante de 100 V durante 3-4 horas. Una vez acabada la electroforesis se procedió a la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno).

4.5.3. Detección de proteínas en geles SDS-PAGE

Para visualizar las proteínas no transferidas a la membrana de PVDF, los geles se tiñeron a temperatura ambiente durante la noche con azul de Coomassie (azul de Coomassie 0,025% p/v, metanol 45% v/v y ácido acético glacial). El exceso de colorante se eliminó decolorando los geles durante aproximadamente 30 minutos con solución de desteñido (metanol 10% v/v y ácido acético glacial 30% v/v). Finalmente los geles se lavaron con agua.

4.6. Detección inmunológica de proteínas mediante Western blot

Las proteínas separadas mediante electroforesis fueron transferidas a una membrana de PVDF mediante la aplicación de un campo eléctrico en el equipo Mini Trans-Blot (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar se preparó el tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y metanol 20% v/v), que debe estar frío en el momento de su uso. Después, por cada gel a transferir, se recortaron una membrana y dos papeles de filtro Whatman de las dimensiones del gel separador. Como la membrana es muy hidrofóbica, se activó hidratándola en metanol durante 2 minutos. Luego se lavó en tampón de transferencia. A continuación se dispuso en la carpeta de transferencia junto al gel de electroforesis, entre los dos filtros y dos esponjas planas, que previamente se habían sumergido también en tampón de transferencia. Entonces, la carpeta se introdujo en la cubeta con un agitador y junto a una unidad de refrigeración para evitar el aumento de temperatura. Finalmente, la cubeta se llenó con tampón de transferencia. Las proteínas se transfirieron con un voltaje constante de 100 V durante 90 minutos. Una vez terminada la transferencia, la membrana se bloqueó con leche en polvo al 5% p/v en T-TBS (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 0,9% p/v, Tween-20 0,05% v/v) durante toda la noche, en una cámara frigorífica a 4 °C y con agitación. El objetivo es que las proteínas de la leche se unan a todos los espacios de la membrana que no hayan sido ocupados por las proteínas transferidas, para así evitar uniones inespecíficas del anticuerpo que se va a utilizar para detectar las proteínas de interés. Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces durante 10 minutos con tampón T-TBS y se incubó con el anticuerpo primario durante 90 minutos en T-TBS. Pasado el tiempo de incubación, se lavó la membrana 3 veces durante 15 minutos y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario, durante 90 minutos en leche en polvo 5% p/v en T-TBS. Por último se lavó la membrana 3 veces durante 20 minutos.

Anticuerpo contra	Primario/Secundario	Huésped	Nombre comercial	Marca	Dilución
GFP	Primario	Conejo	anti-GFP ab290	Abcam	1:2000
IgG de conejo	Secundario	Cabra	anti-rabbit IgG peroxidase conjugate	Sigma- Aldrich	1:8000

Tabla 4.2. Anticuerpos utilizados.

El anticuerpo primario reconoce a la proteína GFP, fusionada a FAD7 y FAD8. Por otra parte, el anticuerpo secundario reconoce al anticuerpo primario y está conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP), que cataliza una reacción quimioluminiscente. La membrana se incubó 5 minutos con el reactivo SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Fisher Scientific), que se compone de una mezcla 1:1 (v/v) de luminol y peróxido. A continuación se expuso a una película fotográfica (CL-Xposure Blue X-Ray Film, Thermo Fisher Scientific) en una cámara oscura (Hypercassette, Amersham Biosciences) el tiempo necesario para obtener una señal adecuada al final del procedimiento. Para revelar y fijar la película fotográfica, se incubó 3 minutos en la solución de revelado (T-Max Professional, Kodak), se lavó en agua destilada 2 minutos, se incubó 2 minutos en la solución de fijación (Polymax, Kodak) y se lavó otra vez en agua destilada. La película fue finalmente escaneada para su digitalización.

Los últimos resultados se obtuvieron incubando la membrana 5 minutos con el reactivo Clarity Max Western ECL Substrate (Biorad), compuesto también por una mezcla 1:1 (v/v) de luminol y peróxido. Finalmente, la quimioluminiscencia se detectó usando un equipo ChemiDoc (Biorad).

5. Resultados y discusión

5.1. Abundancia relativa de FAD7 y FAD8 en tejido fotosintético y no fotosintético

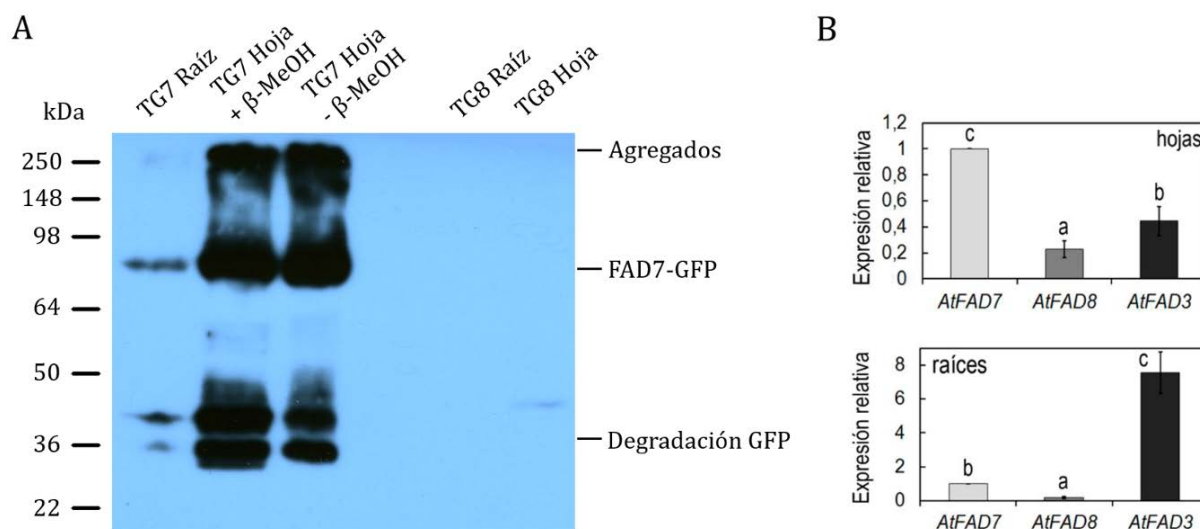


Figura 5.1. Abundancia relativa de FAD7 y FAD8 en hoja y raíz. A: Comparación de la abundancia relativa de FAD7 y FAD8 mediante detección inmunológica con anticuerpo anti-GFP. En cada carril se cargaron los siguientes μ g de proteína total: TG7 Raíz: 41 μ g; TG7 Hoja +/- β -MeOH: 35 μ g; TG8 Raíz: 23 μ g; TG8 Hoja: 73 μ g. Las proteínas se desnaturalizaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en tampón de desnaturalización (Tris-HCl 62 mM pH 6,8, SDS 0,5% p/v, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0,02% p/v, β -mercaptoetanol 1,5% v/v). B: Análisis de la expresión de los genes de las ω 3 desaturasas en hojas (arriba) y raíces (abajo) mediante RT-Q-PCR realizado por Ángel Soria-García para su Tesis Doctoral (pendiente de publicación). Los datos proceden de la media de tres réplicas biológicas junto con tres réplicas técnicas usando hojas de roseta y raíces de 10 días.

La inmunodetección de FAD7-GFP y FAD8-GFP utilizando anticuerpo anti-GFP sólo proporcionó señal en el caso de FAD7. Concretamente, se detectó una banda muy intensa entre 72-79 kDa compatible con la suma de la proteínas FAD7 (51,2 kDa) más GFP (26,9 kDa), con una masa teórica de 78,1 kDa (**Figura 5.1. A**). Además de esta banda se detectaron bandas de bajo peso molecular en el entorno de 30-45 kDa, que podrían corresponder con fragmentos de degradación de la GFP (**Figura 5.1. A**). También se detectó proteína de alto peso molecular, por encima de los 200 kDa, compatible con la posible formación de agregados de FAD7-GFP (**Figura 5.1. A**). El patrón de bandas fue el mismo en presencia y ausencia del agente reductor β -mercaptoetanol, por lo que no parece haber participación de puentes disulfuro oxidados en estos agregados (**Figura 5.1. A**). Cabe mencionar que la migración de las proteínas de membrana en una SDS-PAGE se produce en función de su masa molecular aparente, diferente de la masa teórica deducida a partir de su secuencia de aminoácidos. Esto se debe a que el detergente SDS no se une uniformemente a este tipo de proteínas (Rath *et al.*, 2009). La presencia de agregados de alto peso molecular puede responder a la tendencia a la agregación de las proteínas de membrana debido a su alta hidrofobicidad o bien estar relacionada con complejos cuaternarios en los que participe FAD7, como por ejemplo homodímeros de FAD7 o heterodímeros FAD6-FAD7 semejantes a los heterodímeros FAD2-FAD3 del retículo endoplásmico. Los resultados obtenidos no permiten extraer conclusiones a este respecto, por lo que se requiere más investigación.

Los resultados indican que la proteína FAD7-GFP es más abundante que FAD8-GFP en todos los tejidos analizados. Del mismo modo, se observó que la proteína FAD7 es mucho más abundante en hojas (tejido fotosintético) que en la raíz (tejido no fotosintético) (**Figura 5.1. A**). Estos resultados son consistentes con los obtenidos por otros miembros del Grupo de Investigación en el análisis de expresión por RT-Q-PCR, tanto en hojas como raíces, de los tres genes que codifican las ω 3 desaturasas (FAD7 y FAD8 localizadas en los plastidios y FAD3 en el retículo endoplásmico). Dicho análisis reveló que los niveles de expresión de *AtFAD7* eran 5 veces superiores a los de *AtFAD8* tanto en hojas como en raíces y que el gen *AtFAD3* es el que más se expresa en raíces (**Figura 5.1. B**). Los resultados son consistentes también con la información obtenida por otros miembros del Grupo de Investigación en el análisis de las mismas líneas transgénicas mediante microscopía confocal, donde se observó una mayor abundancia de FAD7 que de FAD8 en hojas y raíces, así como una abundancia de FAD7 en hoja superior a la de raíz (**Anexo 8.1.**). El hecho de que FAD7 sea más abundante que FAD8 apoya la hipótesis de que FAD7 actúa preferentemente sobre los galactolípidos, lípidos principales de la membrana plastidial, mientras que FAD8 lo hace sobre fosfolípidos (PG), que son menos abundantes. Por otra parte, la mayor abundancia de FAD7 en la hoja con respecto a la raíz es consecuente con el menor número de plastidios en las raíces, donde los lípidos predominantes son los fosfolípidos citosólicos.

Debido a la imposibilidad de detectar la proteína FAD8 en las condiciones experimentales empleadas, el trabajo se centró en el análisis de la proteína FAD7.

5.2. Análisis de la presencia de agregados de alto peso molecular

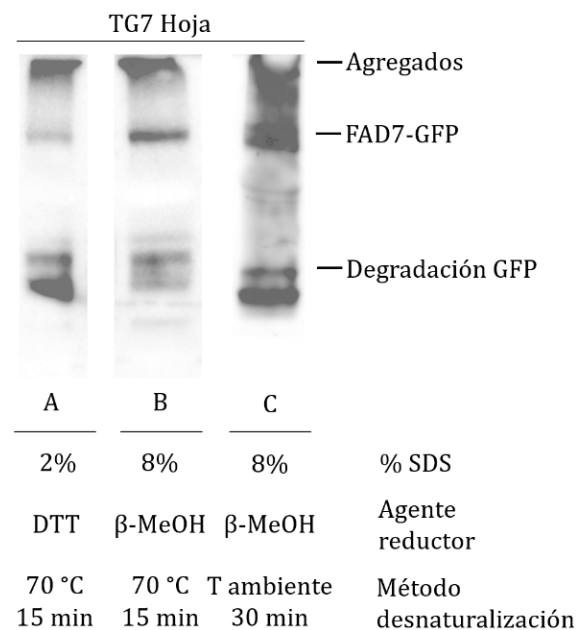


Figura 5.2. Análisis de la presencia de agregados de alto peso molecular. Inmunodetección de FAD7-GFP con anticuerpo anti-GFP en hoja. En cada carril se cargaron 40 μ g de proteína total, que se desnaturalizaron mediante los métodos indicados en tampones de desnaturalización con 2% o 8% SDS y con ditioneitol (DTT) 80 mM o β -mercaptoetanol (β -MeOH) 5% v/v como agentes reductores. En todos los casos se utilizó el mismo extracto de proteínas.

A la vista de los resultados obtenidos en la inmunodetección de FAD7-GFP, en los que se detectaba una fracción importante de proteína formando parte de agregados de alto peso

molecular, se llevaron a cabo varios intentos de resolver la presencia de dichos agregados utilizando diferentes combinaciones de tampón, tiempo y temperatura de desnaturalización. Tal y como se muestra en la **Figura 5.2.**, el incremento de SDS del 2% (carril A) al 8% (carril B) permitió incrementar la presencia de monómero FAD7-GFP. También se estudió un cambio en el procedimiento de desnaturalización probando el mismo tampón pero con un tratamiento corto de 15 minutos a 70 °C (carril B) frente a un tratamiento más largo de 30 minutos a temperatura ambiente (carril C). Los resultados mostraron un incremento notable de la fracción monomérica en el caso del tratamiento más largo (carril C), pero también aumentó la degradación inespecífica de la proteína. Este incremento de la degradación se debe posiblemente a que al aumentar el tiempo de tratamiento se favoreció la formación de agregados de tamaños intermedios. Sin embargo, también reveló información interesante, como es la aparición de lo que parece una doble banda de monómero, que podría corresponder a la forma inmadura de la proteína que contiene todavía el péptido de tránsito al cloroplasto y a la forma madura en la que el péptido ya se ha procesado.

En definitiva, la heterogeneidad de los resultados obtenidos en estos experimentos impide extraer conclusiones definitivas acerca de cuál es el mejor método de desnaturalización de las proteínas para conseguir solubilizar los agregados de alto peso molecular. La investigación a este respecto debería proseguir con la repetición de los experimentos para asegurar su reproducibilidad y con la adición de ciertas variaciones. Por ejemplo, se podría añadir urea al tampón de desnaturalización, cambiar la concentración de SDS o utilizar un detergente diferente.

5.3. Efecto de la herida y el metil jasmonato en la abundancia relativa de FAD7

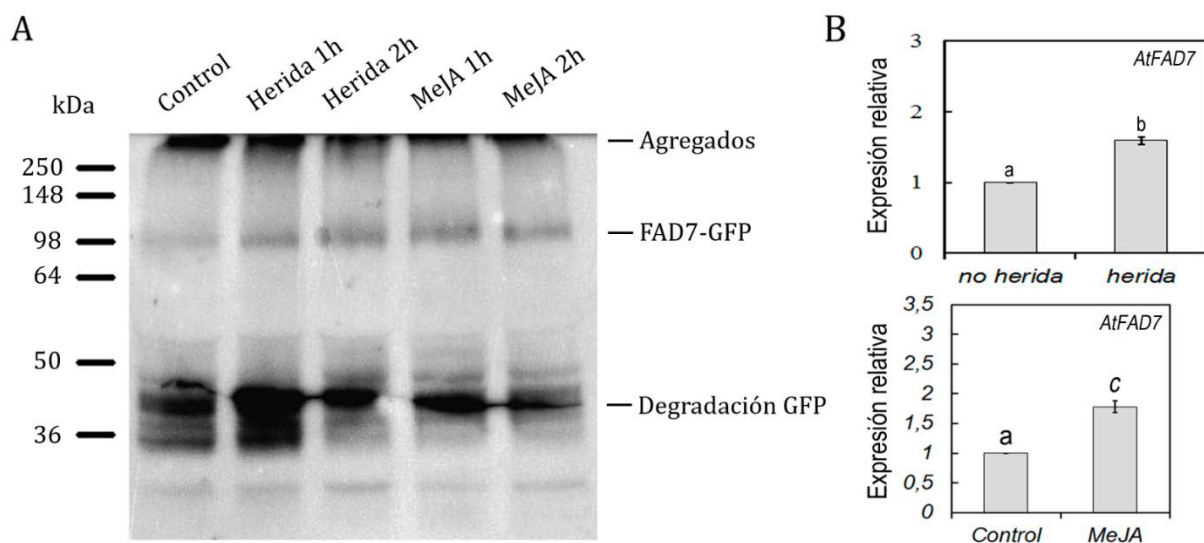


Figura 5.3. Efecto de la herida y el metil jasmonato en la abundancia relativa de FAD7. A: Comparación de la abundancia relativa de FAD7 en respuesta a los estímulos de herida y metil jasmonato (100 μ M), tras 1 y 2 horas de tratamiento, mediante detección inmunológica con anticuerpo anti-GFP. En cada carril se cargaron 40 μ g de proteína total. Las proteínas se desnaturalizaron durante 12 minutos a 70 °C en tampón de desnaturalización (Tris-HCl 62 mM pH 6,8, SDS 8% p/v, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0,08% p/v, β -mercaptoetanol 5% v/v). B: Análisis de la expresión de *AtFAD7* en hojas de roseta en respuesta a la herida (arriba) y al metil jasmonato (100 μ M, 2 horas de tratamiento) mediante RT-Q-PCR realizado por Ángel Soria-García para su Tesis Doctoral (pendiente de publicación). Los datos proceden de la media de tres réplicas biológicas junto con tres réplicas técnicas.

La herida es un estímulo que induce la expresión a nivel local del gen *FAD7* (Nishiuchi *et al.*, 1997). Por otro lado, el metil jasmonato (MeJA) es una hormona vegetal que deriva del ácido jasmónico, cuya biosíntesis utiliza como sustrato inicial el ácido α -linolénico (18:3^{Δ9,12,15}) liberado de los galactolípidos de la membrana plastidial. Los jasmonatos son reguladores importantes en las respuestas de las plantas a estreses bióticos y abióticos, así como durante el desarrollo (Wasternack y Hause, 2013). Cuando una planta sufre una herida, una de las primeras respuestas defensivas es la producción de ácido jasmónico, de manera que el aumento de la transcripción del gen *FAD7* permite reponer los niveles de ácido α -linolénico. Algunos de los genes implicados en la biosíntesis del ácido jasmónico son inducibles por el propio ácido jasmónico, de forma que este sistema de retroalimentación positiva facilita la rápida acumulación de la hormona en respuesta a estreses. La herida activa la transcripción de un mayor espectro de genes que el ácido jasmónico, estimulando mecanismos de señalización dependientes e independientes del ácido jasmónico (Matsuda *et al.*, 2009). En cuanto a la inducción de *FAD7*, parece estar regulada mediante mecanismos dependientes e independientes de ácido jasmónico en tejidos subterráneos y aéreos, respectivamente (Nishiuchi *et al.*, 1997).

Para comprobar el efecto de la herida y del metil jasmonato en la abundancia relativa de la proteína *FAD7*, se llevó a cabo la inmunodetección con anticuerpo anti-GFP de la proteína quimérica *FAD7*-GFP en hojas que habían sufrido un tratamiento de herida y MeJA durante 1 y 2 horas (**Figura 5.3. A**). Ambos estímulos provocaron un aumento semejante en la abundancia relativa de *FAD7* con respecto a hojas control, no observándose cambios importantes entre los dos tiempos de tratamiento. El análisis de la expresión de *AtFAD7* en hojas de roseta en respuesta a la herida y al MeJA mediante RT-Q-PCR realizado por otros miembros del Grupo de Investigación (**Figura 5.3. B**) detectó un incremento en la expresión del gen de 1,6 veces respecto al control en respuesta a la herida y de 1,7 veces en respuesta al MeJA. Estos resultados sugieren que la regulación de la expresión de la desaturasa *FAD7* responde principalmente a un control a nivel transcripcional, puesto que el aumento similar en la expresión del gen se traduce en un incremento semejante en la abundancia de la proteína.

5.4. Efecto del ácido abscísico en la abundancia relativa de *FAD7*

El ácido abscísico (ABA) es la hormona principal en la señalización de procesos relacionados con la respuesta a estreses abióticos como la sequía, la salinidad y el frío (Vishwakarma *et al.*, 2017). Para analizar el efecto del ABA en la abundancia relativa de la proteína *FAD7* se realizó la inmunodetección de la proteína quimérica *FAD7*-GFP con anticuerpo anti-GFP en hojas que habían sufrido un tratamiento de ABA durante 3 días (**Figura 5.4. A**). El resultado reveló una drástica reducción del contenido de *FAD7* en las hojas expuestas a la hormona con respecto a las hojas no tratadas. Por otra parte, el análisis de la expresión de *AtFAD7* en hojas de roseta expuestas a ABA durante 2 horas mediante RT-Q-PCR realizado por otros miembros del Grupo de Investigación (**Figura 5.4. B**) reveló que el ABA reprime la expresión del gen, reduciéndose a menos de la mitad respecto al control. Los resultados son consistentes también con la información conseguida por otros miembros del Grupo de Investigación en el análisis mediante microscopía confocal de la misma línea transgénica, donde se observó una importante disminución de la abundancia de *FAD7* en hojas tratadas con ABA durante 48 horas con respecto a hojas control (**Anexo 8.2.**).

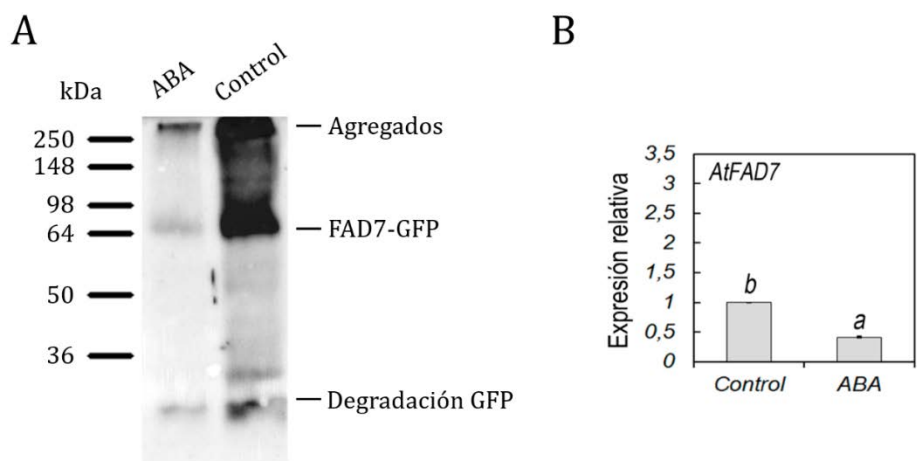


Figura 5.4. Efecto del ácido abscísico en la abundancia relativa de FAD7. A: Comparación de la abundancia relativa de FAD7 en respuesta al ácido abscísico (100 μ M, 3 días de tratamiento), con respecto a plantas no tratadas, mediante detección inmunológica con anticuerpo anti-GFP. En cada carril se cargaron 15 μ g de proteína total. Las proteínas se desnaturalizaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en tampón de desnaturalización (Tris-HCl 62 mM pH 6,8, SDS 8% p/v, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0,08% p/v, β -mercaptoetanol 5% v/v). B: Análisis de la expresión de *AtFAD7* en hojas de roseta en respuesta al ácido abscísico (100 μ M, 2 horas de tratamiento) mediante RT-Q-PCR realizado por Ángel Soria-García para su Tesis Doctoral (pendiente de publicación). Los datos proceden de la media de tres réplicas biológicas junto con tres réplicas técnicas.

5.5. Efecto del frío en la abundancia relativa de FAD8

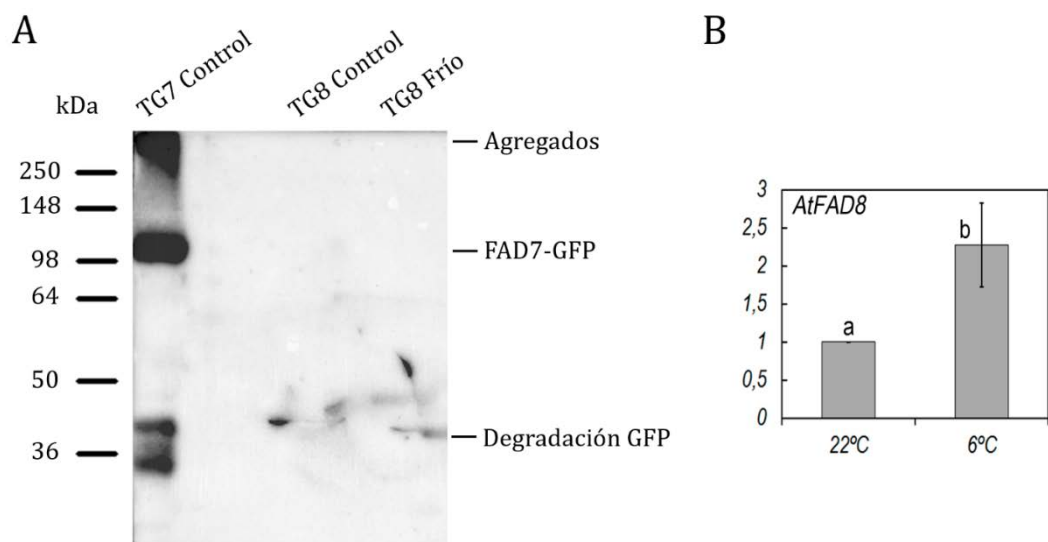


Figura 5.5. Efecto del frío en la abundancia relativa de FAD8. A: Comparación de la abundancia relativa de FAD8 en respuesta al frío mediante detección inmunológica con anticuerpo anti-GFP. En cada carril se cargaron 20 μ g de proteína total. Las proteínas se desnaturalizaron durante 5 minutos a 70 $^{\circ}$ C en tampón de desnaturalización (Tris-HCl 62 mM pH 6,8, SDS 2% p/v, glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 0,02% p/v, DTT 80 mM). B: Análisis de la expresión de *AtFAD8* en hojas de roseta en respuesta a las bajas temperaturas mediante RT-Q-PCR realizado por Ángel Soria-García para su Tesis Doctoral (pendiente de publicación). Los datos proceden de la media de tres réplicas biológicas junto con tres réplicas técnicas.

Pese a no haber sido posible detectar la proteína FAD8 en los experimentos de inmunodetección con anticuerpo anti-GFP, se realizó un intento por conseguir detectarla en hojas de roseta que habían sufrido un tratamiento de frío. Desde el descubrimiento de FAD8 se sabe que es inducible por bajas temperaturas (Gibson *et al.*, 1994; McConn *et al.*, 1994). El análisis de la expresión de *AtFAD8* en hojas de roseta en respuesta a bajas temperaturas mediante RT-Q-PCR realizado por otros miembros del Grupo de Investigación (**Figura 5.5. B**) confirmó un incremento en los niveles de expresión de cerca de 2,5 veces con respecto a plantas control. Además, la observación mediante microscopía confocal de hojas de la línea transgénica que expresa FAD8-GFP llevada a cabo por otros miembros del Grupo de Investigación (**Anexo 8.3.**) evidenció un claro aumento en la abundancia de FAD8 en respuesta a las bajas temperaturas. Por estas razones, se pensó que quizás el tratamiento de frío aumentaría suficientemente la abundancia de la proteína como para ser detectada mediante inmunodetección. Sin embargo, tampoco en estas condiciones se obtuvo señal de FAD8 (**Figura 5.5. A**). Las alternativas para conseguir detectar esta desaturasa en el futuro pasan por probar tiempos más cortos de tratamiento (48-72 horas frente a 1 semana), emplear temperaturas más bajas (0-4 °C frente a 6 °C) o emplear temperaturas un poco más altas (10 °C) durante tiempos más largos.

6. Conclusiones – Conclusions

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. La proteína *AtFAD7* es más abundante que *AtFAD8* tanto en hojas (tejido fotosintético) como en raíces (tejido no fotosintético).
2. La proteína *AtFAD7* es más abundante en hojas que en raíces.
3. La herida y la hormona metil jasmonato (MeJA) son estímulos que incrementan la cantidad de *AtFAD7* en las hojas.
4. La hormona ácido abscísico (ABA) disminuye la cantidad de *AtFAD7* en las hojas.
5. La regulación de la expresión de la desaturasa *AtFAD7* parece responder a un control fundamentalmente transcripcional.
6. La obtención de agregados de alto peso molecular podría ser compatible con la existencia de complejos supramoleculares que involucren a *AtFAD7*.
7. La proteína *AtFAD8* no es detectable en las condiciones de trabajo, ni siquiera tras un tratamiento de baja temperatura que aumenta la expresión de la desaturasa.
8. El comportamiento irregular de estas proteínas en SDS-PAGE, debido a su carácter hidrofóbico, complica su análisis mediante técnicas de inmunodetección convencionales (Western blot), haciendo necesario el uso de métodos adicionales como la microscopía confocal.

The results obtained in this work allow us to draw the following conclusions:

1. *AtFAD7* protein is more abundant than *AtFAD8* both in leaves (photosynthetic tissue) and in roots (non-photosynthetic tissue).
2. *AtFAD7* protein is more abundant in leaves than in roots.
3. Wound and methyl jasmonate hormone (MeJA) are stimuli that increase the amount of *AtFAD7* in the leaves.
4. The abscisic acid hormone (ABA) decreases the amount of *AtFAD7* in the leaves.
5. Regulation of *AtFAD7* desaturase expression appears to respond to a fundamentally transcriptional control.
6. The obtaining of high molecular weight aggregates could be compatible with the existence of supramolecular complexes involving *AtFAD7*.
7. *AtFAD8* protein is not detectable under working conditions, even after a low temperature treatment that increases the expression of the desaturase.
8. The irregular behavior of these proteins in SDS-PAGE, due to their hydrophobic nature, complicates their analysis by means of conventional immunodetection techniques (Western blot), making necessary the use of additional methods such as confocal microscopy.

7. Bibliografía

- 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.
- Boyes D.C., Zayed A.M., Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffman N.E., Davis K.R. y Görlach J.** 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis. *Plant Cell*, 13 (7): 1499-1510.
- Bradford M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Browse J., McCourt P. y Somerville C.** 1986. A mutant of *Arabidopsis* deficient in C(18:3) and C(16:3) leaf lipids. *Plant Physiol*, 81 (3): 859-864.
- Gibson S., Arondel V., Iba K. y Somerville C.** 1994. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 106 (4): 1615-1621.
- Hagio M., Sakurai I., Sato S., Kato T., Tabata S. y Wada H.** 2002. Phosphatidylglycerol is essential for the development of thylakoid membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 43 (12): 1456-1464.
- Iba K., Gibson S., Nishiuchi T., Fuse T., Nishimura M., Arondel V., Hugly S. y Somerville C.** 1993. A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 268 (32): 24099-24105.
- Institut Jean-Pierre Bourgin.** 2017. Accedido junio 14.
<http://www-ijpb.versailles.inra.fr/en/arabido/arabido.htm>.
- Los D.A. y Murata N.** 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim Biophys Acta*, 1394 (1): 3-15.
- Lou Y., Schwender J. y Shanklin J.** 2014. FAD2 and FAD3 desaturases form heterodimers that facilitate metabolic channeling in vivo. *J Biol Chem*, 289 (26): 17996-18007.
- Matsuda O., Sakamoto H., Nakao Y., Oda K. y Iba K.** 2009. CTD phosphatases in the attenuation of wound-induced transcription of jasmonic acid biosynthetic genes in Arabidopsis. *Plant J*, 57 (1): 96-108.
- McConn M., Hugly S., Browse J. y Somerville C.** 1994. A mutation at the *fad8* locus of *Arabidopsis* identifies a second chloroplast [omega]-3 desaturase. *Plant Physiol*, 106 (4): 1609-1614.
- Nishiuchi T., Hamada T., Kodama H. y Iba K.** 1997. Wounding changes the spatial expression pattern of the Arabidopsis plastid ω -3 fatty acid desaturase gene (*FAD7*) through different signal transduction pathways. *Plant Cell*, 9 (10): 1701-1712.
- Ohlrogge J. y Browse J.** 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, 7 (7): 957-970.
- Rath A., Glibonicka M., Nadeau V.G., Chen G., Deber C.M.** 2009. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (6): 1760-1765.

Román Á. 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.

Román Á., Hernández M.L., Soria-García Á., López-Gomollón S., Lagunas B., Picorel R., Martínez-Rivas J.M. y Alfonso M. 2015. Non-redundant contribution of the plastidial FAD8 ω -3 desaturase to glycerolipid unsaturation at different temperatures in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 8 (11): 1599-1611.

Sakamoto A., Sulpice R., Hou C.X., Kinoshita M., Higashi S.I., Kanaseki T., Nonaka H., Moon B.Y. y Murata N. 2004. Genetic modification of the fatty acid unsaturation of phosphatidylglycerol in chloroplasts alters the sensitivity of tobacco plants to cold stress. *Plant Cell Environ*, 27 (1): 99-105.

Somerville C., Browse J., Jaworski J.G. y Ohlrogge J.B. 2015. Lipids. Buchanan B.B., Gruissem W. y Jones R.L. American Society of Plant Physiologists. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 337-400.

Somerville C. y Koornneef M. 2002. A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat Rev Genet*, 3 (11): 883-889.

TAIR - About Arabidopsis. 2017. Accedido junio 13.
<https://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>.

TAIR - Locus: AT3G11170. 2017. Accedido junio 26.
<https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=35642&type=locus>

TAIR - Locus: AT5G05580. 2017. Accedido junio 26.
<https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=134033&type=locus>

UniProtKB - P46310. 2017. Accedido junio 26.
<http://www.uniprot.org/uniprot/P46310>

UniProtKB - P48622. 2017. Accedido junio 26.
<http://www.uniprot.org/uniprot/P48622>

Vishwakarma K., Upadhyay N., Kumar N., Yadav G., Singh J., Mishra R.K., Kumar V., Verma R., Upadhyay R.G., Pandey M. y Sharma S. 2017. Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Front Plant Sci*, 8: 161.

Wada H. y Murata N. 2007. The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis. *Photosynth Res*, 92 (2): 205-215.

Wasternack C. y Hause B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot*, 111 (6): 1021-1058.

8. Anexos

8.1. Datos de abundancia relativa de FAD7 y FAD8 en tejido fotosintético y no fotosintético obtenidos mediante microscopía confocal

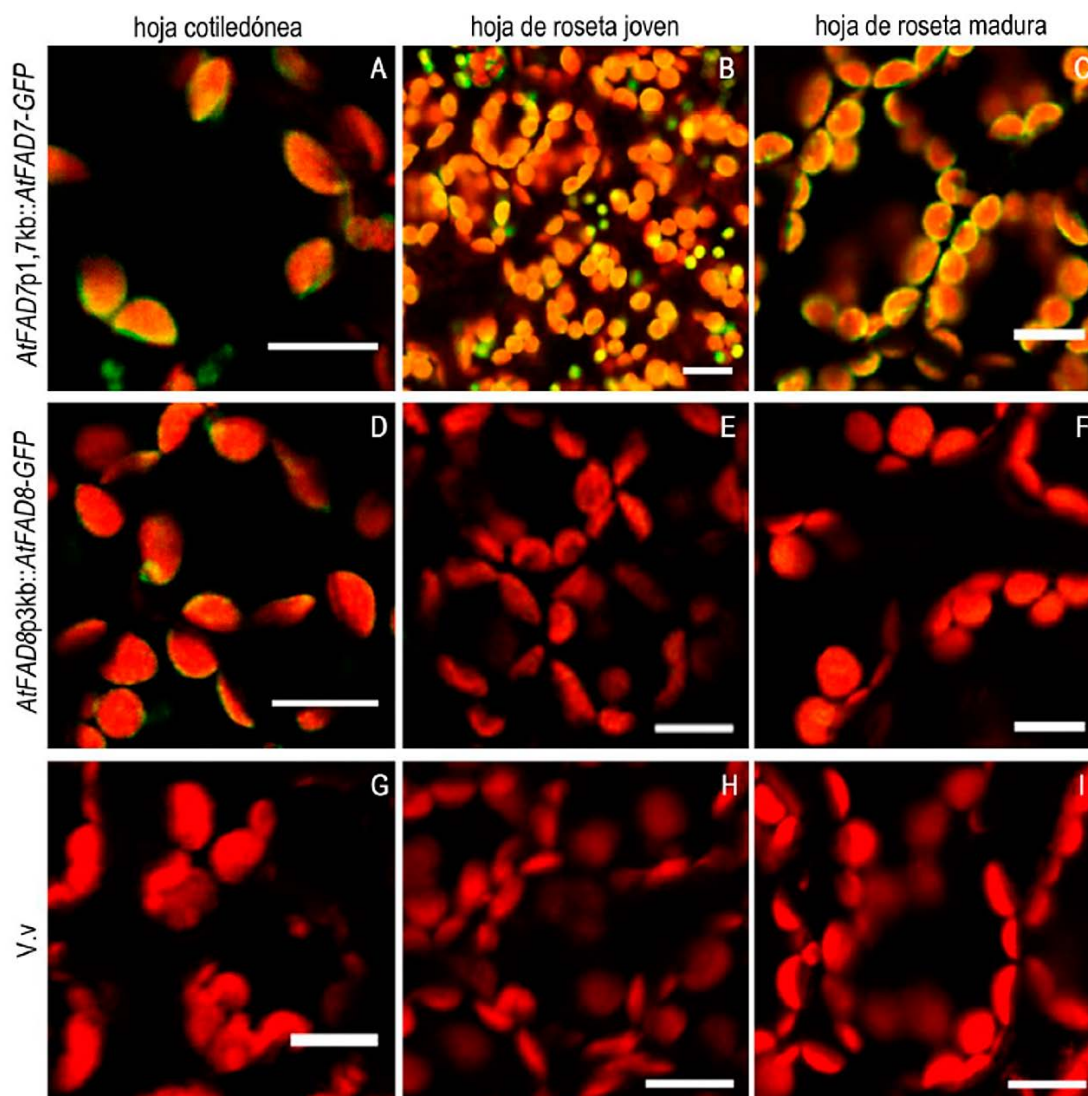


Figura 8.1. Abundancia relativa de *AtFAD7* y *AtFAD8* en hojas de plantas de 2 semanas de *A. thaliana*. Superposición de canales de fluorescencia correspondientes a plantas transformadas con *AtFAD7-GFP* (A-C), *AtFAD8-GFP* (D-F) y el vector vacío (G-I) en hojas cotiledóneas (A, D, G), hojas de roseta jóvenes (B, E, H) y hojas de roseta maduras (C, F, I). El canal de fluorescencia verde se corresponde con la señal emitida por la GFP y el canal de fluorescencia roja se corresponde con la señal emitida por la clorofila. Las barras se corresponden con 10 μ m. *Resultados obtenidos por Ángel Soria-García para su Tesis Doctoral (pendiente de publicación).*

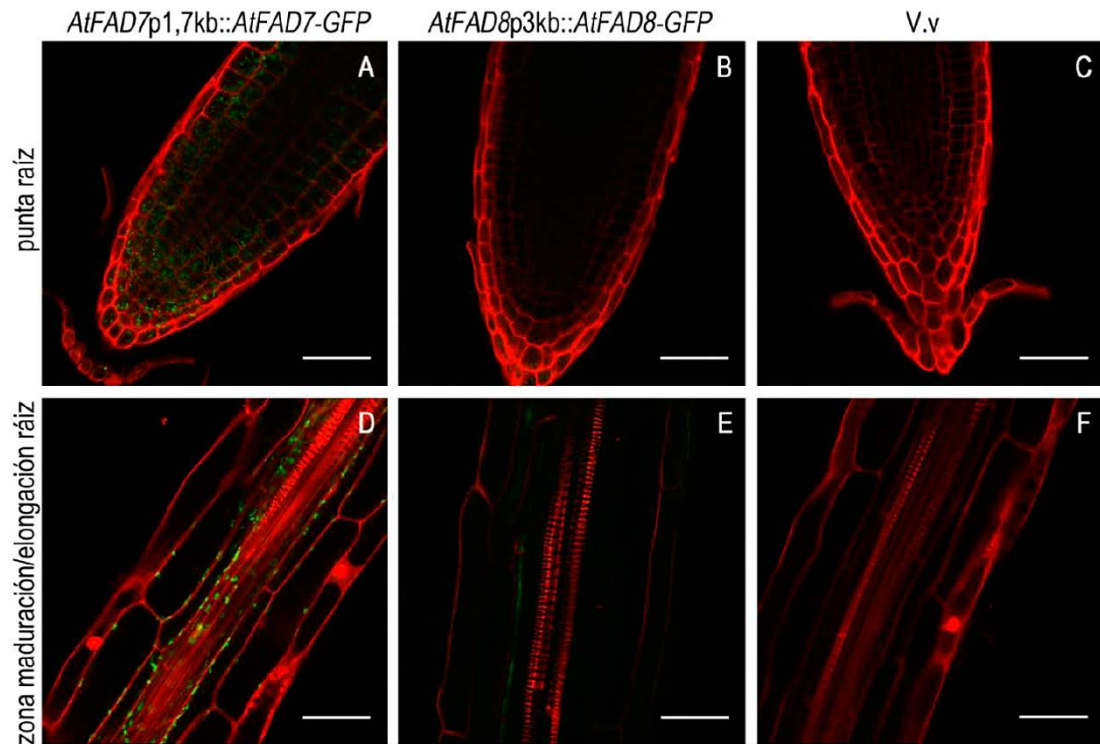


Figura 8.2. Abundancia relativa de *AtFAD7* y *AtFAD8* en raíces de plantas de 2 semanas de *A. thaliana*. Superposición de canales de fluorescencia correspondientes a plantas transformadas con *AtFAD7-GFP* (A, D), *AtFAD8-GFP* (B, E) y el vector vacío (C, F) en la punta de la raíz (A-C) y en la región de maduración/elongación de la raíz (D-F). El canal de fluorescencia verde se corresponde con la señal emitida por la GFP y el canal de fluorescencia roja se corresponde con la señal emitida por el yoduro de propidio. Las barras se corresponden con 100 μm . *Resultados obtenidos por Ángel Soria-García para su Tesis Doctoral (pendiente de publicación).*

8.2. Datos de abundancia relativa de FAD7 en respuesta al ácido abscísico obtenidos mediante microscopía confocal

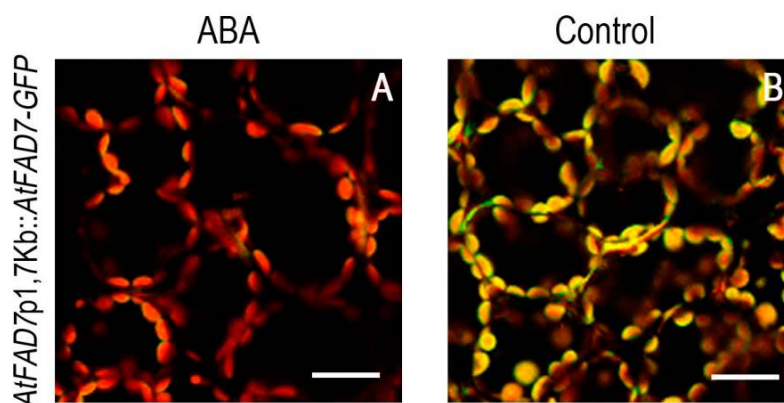


Figura 8.3. Abundancia relativa de *AtFAD7* en respuesta al ácido abscísico. Superposición de canales de fluorescencia correspondientes a plantas transformadas con *AtFAD7-GFP* tras 48 horas de exposición a ácido abscísico (A) y sin tratamiento hormonal (B). El canal de fluorescencia verde se corresponde con la señal emitida por la GFP y el canal de fluorescencia roja se corresponde con la señal emitida por la clorofila. Las barras se corresponden con 20 μm . *Resultados obtenidos por Ángel Soria-García para su Tesis Doctoral (pendiente de publicación).*

8.3. Datos de abundancia relativa de FAD8 en respuesta al frío obtenidos mediante microscopía confocal

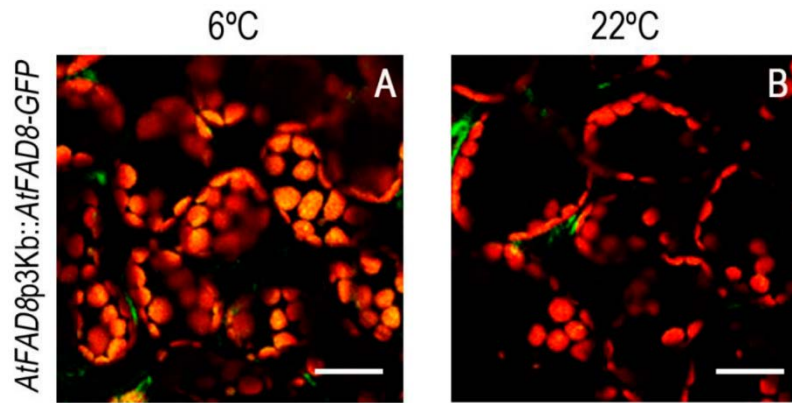


Figura 8.4. Abundancia relativa de AtFAD8 en respuesta al frío. Superposición de canales de fluorescencia correspondientes a plantas transformadas con *AtFAD8-GFP* crecidas a 6 °C (A) y a 22 °C (B) durante 1 semana. El canal de fluorescencia verde se corresponde con la señal emitida por la GFP y el canal de fluorescencia roja se corresponde con la señal emitida por la clorofila. Las barras se corresponden con 20 μ m. *Resultados obtenidos por Ángel Soria-García para su Tesis Doctoral (pendiente de publicación).*