

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

TESIS DOCTORAL



## Metabolismo de acil-CoA y acil-ACP en girasol

Doctorando:

Jose Antonio Aznar Moreno

Tutor:

Dr. Antonio José Márquez Cabeza

Directores:

Dr. Joaquín Jesús Salas Liñán

Dra. Mónica Venegas Calerón



Trabajo presentado para optar al grado de Doctor por el Licenciado

Jose Antonio Aznar Moreno

Fdo. Jose Antonio Aznar Moreno

El Tutor:

Dr. Antonio José Márquez Cabeza  
Catedrático de la Universidad de Sevilla

Fdo. Dr. Antonio José Márquez Cabeza

Los Directores

Dr. Joaquín Jesús Salas Liñán  
Científico Titular  
Instituto de la Grasa (CSIC)

Dra. Mónica Venegas Calerón  
Contrato Ramón y Cajal  
Instituto de la Grasa (CSIC)

Fdo. Dr. Joaquín Jesús Salas Liñán

Fdo. Dra. Mónica Venegas Calerón

**Sevilla, 29 de Noviembre, 2013**



*Para mis padres, mi hermana, Iris  
Y mis dos maravillosas hijas,  
por su cariño, apoyo y comprensión  
incondicional en todo momento*



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Productos Vegetales del Instituto de la Grasa y sus Derivados (CSIC) de Sevilla, bajo la dirección del Dr. Joaquín Jesús Salas Iñan, la Dra. Mónica Venegas Calerón y bajo la tutoría universitaria del Dr. Antonio José Márquez Cabeza.

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que han colaborado para que hoy esta tesis sea un hecho. Al Instituto de la Grasa por poner a mi disposición el material e instrumental necesario para la realización de este trabajo, así como a todo el personal cuya colaboración me fue brindada en todo momento.

En particular a mis directores, Quino y Mónica, por confiar en mí, por su constante apoyo y orientación, por ser además de mis jefes unos buenos amigos y por su tesón a la hora de buscar un contratos posdoctoral.

Gracias Rafael por permitirme formar parte de este fenomenal grupo compuesto por maravillosas personas. Nuca olvidare esas arrozadas que nos preparabas así como el viaje que hicimos a Hong Kong.

Gracias Quique por tu dedicación, tu apoyo personal, por todas y cada una de tus correcciones, por estar siempre ahí cuando te he necesitado dispuesto a ayudarme. A la Dr. Alicia Muro por ayudarme en la realización de los ensayos southern.

Agradezco al Dr. Antonio Márquez por acceder a mi tutoría y siempre estar disponible a cualquier duda que haya surgido durante estos cuatro años.

Al Dr Robert Mullen (Canada) y la Dra. Mee-Len Chye (Hong Kong) por permitirme realizar las estancias breves en sus laboratorios y brindarme toda su ayuda y conocimientos.

A Arantxa, Bárbara y Marisol, por ser simplemente geniales. Gracias por la alegría que me habéis transmitido. A Rosario, por toda su ayuda, consejos y dedicación.

A Miguel Ángel, por su apoyo y por estar siempre dispuesto a ayudarme cuando he tenido alguna duda informática.

A Antonio, porque además de ser un compañero de trabajo, ha sido un compañero en el campo de futbol, ayudándome y mostrándome el camino a seguir en todo momento.

Al resto de miembros del grupo, los que ya terminaron (Damián, Irene, M<sup>a</sup> Carmen Ruiz, Alicia, Javi,...), a los que continuaran (Ana, Miriam, Manuel, Adrian,...) por ser mi segunda familia durante estos años y por todos los ratos divertidos que hemos vivido juntos.

En especial a la segunda planta del Instituto de la Grasa (M<sup>a</sup> del Mar Yust, Justo Pedroche, Juanma, Álvaro, Paco Millán, Carmen Millán, José Manuel Rivas, David, Luisa, Lola Sicardo, Manolo Alaiz, Julio Girón, Javier Vioque, Isabel, Lola García,...) por lo bien que me han tratado siempre.

A mis padres y hermana, gracias por la educación que me habéis dado, por vuestra preocupación y todo el cariño que me demostráis a diario. Gracias a vuestro esfuerzo y sacrificio he logrado ser lo que soy.

Por último, quisiera agradecersele y dedicárselo a Iris y nuestras dos maravillosas hijas (Grecia y Sofía) por disfrutar con mis buenos momentos y levantarme de los malos. Por orientarme y mimarme.

**GRACIAS A TODOS.**



## **ÍNDICE**



# ÍNDICE

Índice de figuras.	VII
Índice de tablas.	XI
Abreviaturas.	XII
Tabla de oligonucleótidos.	XVI
<b>I</b>	
<b><u>INTRODUCCIÓN.</u></b>	
<b>1.1 EL GIRASOL.</b>	1
1.1.1 Historia, origen y botánica de <i>Helianthus annuus</i> L.	1
1.1.2 Importancia económica.	2
1.1.3 Morfología y fisiología.	4
1.1.4 Mejora del cultivo de girasol.	7
1.1.4.1 Mutagénesis.	8
1.1.4.2 Ingeniería genética.	9
1.1.5 El aceite de girasol.	9
1.1.5.1 Características generales.	9
1.1.5.2 Composición del aceite de girasol.	10
1.1.6 Modificación de la composición del aceite de girasol.	11
<b>1.2 LÍPIDOS DE PLANTAS: ESTRUCTURA Y DISTRIBUCIÓN.</b>	12
1.2.1 Naturaleza y función de los lípidos.	12
1.2.2 Ácidos grasos.	13
1.2.2.1 Definición y clasificación.	13
1.2.2.2 Nomenclatura.	14
1.2.2.3 Ácidos grasos más frecuentes en la naturaleza.	14
1.2.2.4 Estructura tridimensional.	15
1.2.3 Lípidos complejos de plantas.	16
<b>1.3 BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS Y TRIACILGLICÉRIDOS EN PLANTAS.</b>	18
1.3.1 Biosíntesis de ácidos grasos.	18
1.3.1.1 Enzimas que realizan el paso de condensación. Complejo FAS.	20
1.3.1.2 Importancia de las proteínas portadoras de acilos.	21
1.3.1.3 Liberación de ácidos grasos. Acil-ACP tioesterasas.	23

1.3.2	Coenzima A y las acil-CoA sintetasas.	25
1.3.2.1	El Coenzima A. Transportador de los grupos acilos.	25
1.3.2.2	Acil-CoA sintetasas de cadena larga.	26
1.3.3	Proteínas de unión a los acil-CoA.	28
1.3.4	Biosíntesis de los TAG.	30
1.3.4.1	Síntesis activa de lípidos de reserva.	30
1.3.4.2	Reacciones implicadas en la biosíntesis de TAG.	31
1.3.4.3	Rutas alternativas para la síntesis de TAG.	32
1.3.5	Modificación de los grupos acilos como intermediarios en la síntesis de TAG.	33
1.4	<b>UTILIZACIÓN DE LA RESERVA LIPÍDICA EN LA GERMINACIÓN.</b>	35
II	<b><u>OBJETIVOS.</u></b>	37
III	<b><u>MATERIALES Y MÉTODOS.</u></b>	41
3.1	<b>ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.</b>	43
3.1.1	<i>Escherichia coli.</i>	43
3.1.1.1	Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas.	43
3.1.1.2	Cultivo de <i>E. coli</i> en medio líquido y sólido.	43
3.1.2	<i>Agrobacterium tumefaciens.</i>	44
3.1.2.1	Condiciones de cultivo.	44
3.1.3	Girasol ( <i>Helianthus annuus</i> ).	44
3.1.3.1	Líneas empleadas.	44
3.1.3.2	Condiciones de cultivo.	45
3.1.4	Tabaco ( <i>Nicotiana benthamiana</i> ).	45
3.2	<b>MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.</b>	46
3.2.1	Aislamiento de ARNm.	46
3.2.2	Síntesis de ADNc a partir de ARNm.	46
3.2.3	Transformación genética.	47
3.2.3.1	Preparación de células competentes <i>E.coli</i> para transformación mediante choque térmico.	47
3.2.3.2	Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico.	47

3.2.3.3	Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium</i> .	48
3.2.3.4	Transformación de <i>Agrobacterium</i> mediante choque térmico.	48
3.2.4	Aislamiento de plásmidos de <i>E. coli</i> a pequeña escala.	49
3.2.5	Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR.	49
3.2.5.1	Amplificación rápida de los extremos del ADNc.	49
3.2.5.2	Diseño de cebadores.	50
3.2.5.3	Condiciones de amplificación.	52
3.2.6	Estudios de RT-qPCR.	53
3.2.6.1	Preparación de las muestras.	53
3.2.6.2	Métodos utilizados.	54
3.2.7	Análisis del ADN.	56
3.2.7.1	Electroforesis de ADN en geles de agarosa.	56
3.2.7.2	Purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa.	57
3.2.8	Digestión de ADN usando endonucleasas de restricción.	57
3.2.9	Defosforilación de extremos 5' del ADN.	57
3.2.10	Ligación de fragmentos de ADN.	58
3.2.11	Transferencia de ADN ( <i>Southern blot</i> ).	59
3.2.11.1	Aislamiento de ADN genómico.	59
3.2.11.2	Preparación y separación de las muestras.	59
3.2.11.3	Transferencia de fragmentos de ADN.	60
3.2.11.4	Marcaje radiactivo de las sondas de ADN.	60
3.2.11.5	Hibridación de los fragmentos de ADN.	61
3.2.12	Análisis de la secuencia de ADN.	61
3.3	<b>ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.</b>	62
3.3.1	Modelado tridimensional de las proteínas.	62
3.3.2	Purificación de proteínas recombinantes en columnas de NTA-niquel.	62
3.3.3	Purificación de proteínas recombinantes en columnas de GST-agarosa.	63
3.3.4	Aislamiento de fracción membranosa para los ensayos <i>HaLACS</i> .	64
3.3.5	Electroforesis de proteínas.	65
3.3.5.1	Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida.	65
3.3.5.1.1	Preparación de las muestras.	65
3.3.5.1.2	Condiciones electroforéticas.	65
3.3.5.1.3	Método de tinción de las proteínas.	66

3.3.5.1.4	Purificación y análisis de proteínas.	66
3.3.5.2	Electroforesis de proteínas en condiciones nativas.	67
3.3.5.2.1	Preparación de las muestras.	67
3.3.5.2.2	Método de tinción de las proteínas.	68
3.3.5.3	<i>Western blot</i> .	68
3.3.5.3.1	Electroforesis y transferencia de las proteínas.	68
3.3.5.3.2	Bloqueo y detección de las proteínas.	68
3.3.6	Medidas espectrofotométricas.	69
3.3.7	Determinación de la concentración proteica.	69
3.3.8	Medidas de pH.	69
3.4	<b>DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.</b>	70
3.4.1	Determinación de la actividad <i>HaLACS</i> .	70
3.4.2	Caracterización de las <i>HaACBP</i> .	70
3.4.2.1	Estudio de la afinidad por diferentes fosfolípidos.	70
3.4.2.2	Determinación de la afinidad a los acil-CoA.	71
3.4.3	Síntesis de acil-ACP.	71
3.4.3.1	Activación de los apo-ACP.	71
3.4.3.2	Preparación de la sal amónica de los ácidos grasos.	72
3.4.3.3	Síntesis de acil-ACP radiactivos.	72
3.4.3.4	Cuantificación de la radiactividad y determinación de la concentración de los acil-ACP sintetizados.	72
3.4.4	Estudio de actividad de <i>HaFAT</i> sobre diferentes acil-ACP.	73
3.5	<b>ESTUDIOS DE EXPRESIÓN TRANSITORIA.</b>	73
3.5.1	Expresión transitoria en células de tabaco BY-2.	73
3.5.1.1	Eliminación de la región hidrofóbica en la secuencia <i>HaFatB</i> .	74
3.5.1.2	Transformación de células BY-2 mediante biobalística.	75
3.5.2	Expresión transitoria en hoja de tabaco.	76
3.5.2.1	Construcción de la secuencia gen-GFP.	76
3.5.2.2	Agroinfiltración en hoja de tabaco.	78
3.5.3	Técnica de microscopía láser confocal.	78
3.5.4	Estudio de localización mediante <i>western blot</i> .	78
3.5.4.1	Aislamiento de plastidios.	78

<b>3.5.4.2</b>	Ensayo de actividad fosfofructoquinasa dependiente de PPI como medida de la pureza de la preparación.	79
<b>3.6</b>	<b>ANÁLISIS DE ACIL-CoA Y ÁCIDOS GRASOS.</b>	80
<b>3.6.1</b>	Extracción de los acil-CoA.	80
<b>3.6.2</b>	Formación de acil-eteno-CoA fluorescentes.	80
<b>3.6.3</b>	Síntesis de acil-CoA no comerciales.	81
<b>3.6.4</b>	Preparación de 26:1-CoA.	81
<b>3.6.5</b>	Análisis de los acil-etenos-CoA derivados por HPLC.	82
<b>3.6.6</b>	Análisis de ácidos grasos. Formación de sus ésteres metílicos.	82
<b>3.6.7</b>	Estudios de espectroscopía de masas.	83
<b>IV</b>	<b><u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</u></b>	85
<b>4.1</b>	<b>ESTUDIO DE LAS PROTEINAS PORTADORAS DE ACILOS.</b>	87
<b>4.1.1</b>	Clonación de tres genes de <i>ACP</i> en girasol.	87
<b>4.1.2</b>	Análisis filogenético de las <i>HaACP</i> .	88
<b>4.1.3</b>	Modelo estructural de las <i>HaACP</i> .	90
<b>4.1.4</b>	Niveles de expresión génica de <i>HaACP1</i> , <i>HaACP2</i> y <i>HaACP3</i> .	91
<b>4.1.5</b>	Expresión heteróloga de las apo- <i>HaACP</i> .	92
<b>4.1.6</b>	Clonación de la holo-ACP sintasa de <i>E. coli</i> .	93
<b>4.1.7</b>	Expresión heteróloga de la holo-ACP sintasa. Activación de las apo-ACP.	94
<b>4.1.8</b>	Expresión y purificación de <i>HaFatA</i> y <i>HaFatB</i> .	96
<b>4.1.9</b>	Especificidad de las tioesterasas de girasol por distintos acil-ACP.	97
<b>4.1.10</b>	Caracterización cinética de las tioesterasas de girasol utilizando distintos acil-ACP.	100
<b>4.2</b>	<b>LOCALIZACIÓN DE <i>HaFatA</i> y <i>HaFatB</i>.</b>	102
<b>4.2.1</b>	Estudio de localización de <i>HaFatB</i> mediante microscopía confocal.	102
<b>4.2.2</b>	Estudio de localización de <i>HaFatB</i> en fracciones purificadas mediante <i>western blot</i> .	108
<b>4.2.2.1</b>	Aislamiento de la fracción plastidial.	108
<b>4.2.2.2</b>	Ensayos <i>western blot</i> para la localización de <i>HaFatB</i> .	109
<b>4.3</b>	<b>ESTUDIO DE LAS ACIL-CoA SINTETASAS DE CADENA LARGA.</b>	111

4.3.1	Clonación y caracterización de dos genes <i>LACS</i> de girasol.	111
4.3.2	Análisis filogenético de <i>HaLACS</i> .	114
4.3.3	Niveles de expresión de los genes <i>HaLACS1</i> y <i>HaLACS2</i> .	116
4.3.4	Expresión heteróloga y especificidad de las proteínas <i>HaLACS</i> .	118
4.3.5	Estudios de localización de <i>HaLACS1</i> y <i>HaLACS2</i> .	122
4.4	<b>ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A LOS ACIL-CoA EN GIRASOL.</b>	127
4.4.1	Clonación de tres genes <i>ACBP</i> en girasol.	127
4.4.2	Estudio estructural de las <i>HaACBP</i> .	128
4.4.3	Análisis filogenético de las <i>HaACBP</i> .	133
4.4.4	Niveles de expresión génica de <i>HaACBP1</i> , <i>HaACBP4</i> y <i>HaACBP6</i> .	135
4.4.5	Expresión heteróloga de las proteínas <i>HaACBP</i> .	136
4.4.6	Estudio de afinidad de las proteínas <i>HaACBP</i> recombinantes.	138
4.4.6.1	Estudios de afinidad hacia diferentes fosfolípidos.	138
4.4.6.2	Estudios de afinidad hacia diferentes acil-CoA.	140
4.4.7	Estudios de localización de <i>HaACBP4</i> y <i>HaACBP6</i> .	142
4.5	<b>ESTUDIO DEL CONJUNTO DE ACIL-CoA EN GIRASOL.</b>	144
4.5.1	Síntesis de acil-eteno derivados y de los acil-CoA no comerciales.	144
4.5.2	Análisis de acil-CoA mediante cromatografía líquida de alta resolución.	147
4.5.3	Caracterización del conjunto de acil-CoA en diferentes mutantes de girasol.	148
4.5.3.1	Caracterización en semillas en desarrollo.	148
4.5.3.2	Caracterización en cotiledones durante la germinación.	156
4.5.3.3	Caracterización en hojas de diferentes mutantes.	161
V	<b><u>CONCLUSIONES.</u></b>	163
VI	<b><u>BIBLIOGRAFÍA.</u></b>	169



---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

	<i>Pág</i>
<b>Fig. 1</b> Distribución mundial del cultivo de girasol.	1
<b>Fig. 2</b> Evolución de la producción y superficie cultivada de semillas de girasol en las últimas décadas a nivel mundial.	3
<b>Fig. 3</b> Parte aérea de la planta de girasol.	4
<b>Fig. 4</b> Sección longitudinal de un capítulo de girasol.	5
<b>Fig. 5</b> Sección longitudinal de un aquenio de girasol.	6
<b>Fig. 6</b> Estructura de los ácidos grasos.	15
<b>Fig. 7</b> Estructura de los acilglicéridos.	16
<b>Fig. 8</b> Esquema general de la biosíntesis de ácidos grasos en plastidios de semillas oleaginosas.	19
<b>Fig. 9</b> Reacción de la sintasa de ácidos grasos.	21
<b>Fig. 10</b> Activación de la apo-ACP a holo-ACP.	22
<b>Fig. 11</b> Transporte de los grupos acilos desde el interior del plastidio al citosol.	23
<b>Fig. 12</b> Esquema de las secuencias de FatA y FatB.	24
<b>Fig. 13</b> Estructura del lignoceril-CoA.	26
<b>Fig. 14</b> Reacción de activación del grupo acilo por la acil-CoA sintasa.	27
<b>Fig. 15</b> Esquema del transporte de los grupos acilos.	28
<b>Fig. 16</b> Esquema de las secuencias de <i>AtACBP</i> .	29
<b>Fig. 17</b> Esquema de la posible localización de las ACBP.	30
<b>Fig. 18</b> Formación de triacilglicéridos en plantas.	31
<b>Fig. 19</b> Formación de triacilglicéridos y su relación con fosfatidilcolina.	34
<b>Fig. 20</b> Acción de la acil-CoA sintetasa sobre los grupos acilos liberados de los oleosomas.	36
<b>Fig. 21</b> Esquema de la eliminación de la región hidrofóbica de la secuencia <i>HaFatB</i> mediante PCR.	75
<b>Fig. 22</b> Esquema de la adición del péptido GFP a la secuencia de <i>HACBP</i> mediante PCR.	77
<b>Fig. 23</b> Alineamiento de <i>HaACP</i> con <i>AtACP</i> y <i>EcACP</i> .	88
<b>Fig. 24</b> Comparación filogenética de las proteínas portadoras de grupos acilo de girasol con sus homólogos de otras especies.	89

<b>Fig. 25</b>	Modelo tridimensional propuesto para las proteínas portadoras de grupos acilos de girasol.	90
<b>Fig. 26</b>	Análisis de los niveles de expresión de los genes <i>HaACP1</i> , <i>HaACP2</i> y <i>HaACP3</i> .	91
<b>Fig. 27</b>	Gel SDS/PAGE de las construcciones pGEX, <i>HaACP1</i> , <i>HaACP2</i> y <i>HaACP3</i> .	93
<b>Fig. 28</b>	Gel SDS/PAGE de las fracciones <i>EcacpS</i> .	94
<b>Fig. 29</b>	Gel nativo de las fracciones apo-ACP y holo-ACP.	95
<b>Fig. 30</b>	Gel SDS/PAGE de las fracciones <i>HaFatA</i> y <i>HaFatB</i> .	97
<b>Fig. 31</b>	Especificidad de sustrato de la proteína His- <i>HaFatA</i> .	98
<b>Fig. 32</b>	Especificidad de sustrato de la proteína His- <i>HaFatB</i> .	99
<b>Fig. 33</b>	Imágenes de microscopía confocal de las proteínas <i>HaFat</i> frente a Tic40-RFP.	104
<b>Fig. 34</b>	Imágenes de microscopía confocal de las proteínas <i>HaFat</i> frente a Anti-NAGK.	105
<b>Fig. 35</b>	Alineamiento de la secuencia <i>HaFatB</i> y <i>HaFatBc</i> .	106
<b>Fig. 36</b>	Imágenes de microscopía confocal de las proteínas <i>HaFatA</i> , <i>HaFatB</i> y <i>HaFatBc</i> .	107
<b>Fig. 37</b>	Ensayo de actividad acil-CoA sintetasa en fracciones plastidiales.	109
<b>Fig. 38</b>	<i>Western blot</i> de distintas preparaciones de plastidios de girasol frente al anticuerpo anti- <i>AtFatB</i> .	110
<b>Fig. 39</b>	Ensayo de actividad tioesterasa en las fracciones plastidiales.	111
<b>Fig. 40</b>	Análisis mediante gel de agarosa de los genes <i>HaLACS1</i> y <i>HaLACS2</i> .	112
<b>Fig. 41</b>	Alineamiento de las secuencias de proteínas <i>HaLACS1</i> y <i>HaLACS2</i> .	113
<b>Fig. 42</b>	Comparación filogenética de las LACS de girasol con algunas proteínas homólogas de otras especies.	115
<b>Fig. 43</b>	Estudio del número de copias de las LACS en girasol mediante <i>southern blot</i> .	116
<b>Fig. 44</b>	Perfiles de expresión de los genes <i>HaLACS1</i> y <i>HaLACS2</i> .	117
<b>Fig. 45</b>	Análisis de la expresión de las <i>HaLACS</i> en <i>E. coli</i> mediante <i>western blot</i> .	119
<b>Fig. 46</b>	Especificidad a sustrato de la proteína <i>HaLACS1</i> .	120
<b>Fig. 47</b>	Especificidad a sustrato de la proteína <i>HaLACS2</i> .	121

<b>Fig. 48</b>	Imágenes de microscopía confocal de la proteína <i>HaLACS1</i> frente a Tic40-RFP.	123
<b>Fig. 49</b>	Imágenes de microscopía confocal de la proteína <i>HaLACS1</i> frente a ConavalinaA y RFP.	124
<b>Fig. 50</b>	Imágenes de microscopía confocal de la proteína <i>HaLACS2</i> frente a Tic40-RFP y ConavalinaA.	126
<b>Fig. 51</b>	Alineamiento de <i>HaACBP6</i> con otras ACBP6 de diferentes especies.	128
<b>Fig. 52</b>	Alineamiento de <i>HaACBP1</i> con otras ACBP1 de diferentes especies.	129
<b>Fig. 53</b>	Alineamiento de <i>HaACBP4</i> con otras ACBP4 de diferentes especies.	130
<b>Fig. 54</b>	Representación tridimensional de las proteínas <i>HaACBP</i> .	132
<b>Fig. 55</b>	Comparación filogenética de las proteínas de unión a grupos acilo con sus homólogos de otras especies.	134
<b>Fig. 56</b>	Análisis de los niveles de expresión de los ARNm de <i>HaACBP</i> .	135
<b>Fig. 57</b>	Análisis mediante SDS-PAGE de distintas fracciones obtenidas durante la purificación de las proteínas recombinantes <i>HaACBP</i> .	136
<b>Fig. 58</b>	Análisis <i>Western blot</i> de las proteínas purificadas <i>HaACBP4</i> y <i>HaACBP6</i> .	137
<b>Fig. 59</b>	Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas recombinantes <i>HaACBP4</i> y <i>HaACBP4c</i> .	138
<b>Fig. 60</b>	Análisis de afinidad de las proteínas recombinantes <i>HaACBP</i> por distintos fosfolípidos.	139
<b>Fig. 61</b>	Análisis de afinidad de las proteínas recombinantes <i>HaACBP</i> por distintos fosfolípidos. Efecto de la concentración.	140
<b>Fig. 62</b>	Estudio de afinidad por microcalorimetría (ITC) de las proteínas recombinantes <i>HaACBP1</i> , <i>HaACBP4</i> y <i>HaACBP6</i> hacia el 16:0-CoA.	141
<b>Fig. 63</b>	Imágenes de microscopía confocal de la localización de las proteínas <i>HaACBP4</i> y <i>HaACBP6</i> .	143
<b>Fig. 64</b>	Reacción de formación de un acil-eteno CoA.	144
<b>Fig. 65</b>	Espectro de masas donde se confirma la síntesis y derivatización del nervonil-CoA (24:1-CoA).	146
<b>Fig. 66</b>	Separación cromatografía de los patrones de acil-CoA-eteno derivados.	147

<b>Fig. 67</b>	Espectro de masas del 22:0-CoA-eteno derivado.	148
<b>Fig. 68</b>	Composición de ácidos grasos y contenido de triacilglicéridos en semillas en desarrollo de las cuatro líneas de girasol estudiadas en este trabajo.	150
<b>Fig. 69</b>	Cantidad total de acil-CoA en las semillas de girasol en desarrollo.	152
<b>Fig. 70</b>	Composición de acil-CoA en las semillas en desarrollo de cuatro líneas de girasol.	154
<b>Fig. 71</b>	Estadios utilizados en el estudio de la composición de acil-CoA de cotiledones de girasol en germinación.	157
<b>Fig. 72</b>	Composición de ácidos grasos y contenido en triacilglicéridos en cotiledones de distintas líneas de girasol en germinación.	158
<b>Fig. 73</b>	Composición del conjunto de acil-CoA en cotiledones en germinación de cuatro líneas de semillas de girasol.	160
<b>Fig. 74</b>	Composición del conjunto de acil-CoA (A) y de los ácidos grasos (B) en las hojas de distintas líneas de girasol.	162

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

	<i>Pág.</i>
<b>Tabla 1</b>	Producción mundial de las principales semillas oleaginosas. 3
<b>Tabla 2</b>	Especies de triacilglicéridos en aceites de girasol común. 10
<b>Tabla 3</b>	Composición típica de ácidos grasos en distintas líneas de girasol. 11
<b>Tabla 4</b>	Clasificación de los ácidos grasos según su longitud y número de dobles enlaces. 13
<b>Tabla 5</b>	Ácidos grasos más comunes en los lípidos de reserva en plantas. 14
<b>Tabla 6</b>	Principales fosfolípidos. 17
<b>Tabla 7</b>	Estirpes de <i>E. coli</i> empleadas en este trabajo. 43
<b>Tabla 8</b>	Estirpe de <i>A. tumefaciens</i> usada en este trabajo. 44
<b>Tabla 9</b>	Secuencias de oligonucleótidos empleados en la amplificación de secuencias 5' y 3' no conocidas. 50
<b>Tabla 10</b>	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de secuencias completas de los genes clonados en el presente trabajo. 51
<b>Tabla 11</b>	Secuencias de oligonucleótidos utilizados en la RT-qPCR 55
<b>Tabla 12</b>	Plásmidos utilizados en este trabajo. 58
<b>Tabla 13</b>	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de sondas para los estudios de <i>southern blot</i> . 60
<b>Tabla 14</b>	Oligonucleótidos utilizados para los estudios de localización en los que se empleó el plásmido pUC18. 74
<b>Tabla 15</b>	Oligonucleótidos utilizados para los estudios de localización en los que se empleó el plásmido pSa13. 77
<b>Tabla 16</b>	Parámetros cinéticos de la His- <i>HaFatA</i> . 100
<b>Tabla 17</b>	Parámetros cinéticos de la His- <i>HaFatB</i> . 101
<b>Tabla 18</b>	Parámetros cinéticos de la His- <i>HaFatB</i> con diferentes acil- <i>EcACP</i> . 102
<b>Tabla 19</b>	Parámetros de afinidad de las proteínas recombinantes His- <i>HaACBP1</i> y His- <i>HaACBP6</i> con distintos acil-CoA. 142

## ABREVIATURAS

<b>4'-PP</b>	4-fosfopantoteína.
<b>aa</b>	Aminoácidos.
<b>ACBP</b>	Proteína de unión a acil-CoA.
<b>ACC</b>	Acetil-CoA carboxilasa.
<b>ACP</b>	Proteína transportadora de acilos.
<b>acpS</b>	Holo-ACP sintetasa.
<b>ACS</b>	Acil-CoA sintetasa.
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico codificante.
<b>ADP</b>	Adenosin difosfato.
<b>A.E.</b>	Actividad específica.
<b>AMP</b>	Adenosin monofosfato.
<b>APS</b>	Persulfato amónico.
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero.
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato.
<b>BrEt</b>	Bromuro de etidio.
<b>BY-2</b>	<i>Bright yellow-2</i> .
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario.
<b>CoA</b>	CoenzimaA.
<b>ConA</b>	Concavalina A.
<b>CU</b>	Ciclo umbral (PCR cuantitativa).
<b>DAG</b>	Diacilglicérido.
<b>DAGAT</b>	Diacilglicerol aciltransferasa.
<b>DAGDG</b>	Digalactosildiacilglicerol.
<b>dcm</b>	Gen que codifica para una ADN citosina metiltransferasa.
<b>DDF</b>	Días después de la floración.
<b>DDI</b>	Días después de la imbibición.
<b>DGTA</b>	Diacilglicerol:diacilglicerol transacilasa.
<b>DH</b>	$\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa.
<b>DPM</b>	Desintegraciones por minuto.

---

<b>DTT</b>	Ditiotreitol.
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético.
<b>EMS</b>	Etilmetanosulfonato.
<b><i>endA1</i></b>	Mutación en la endonucleasa no específica I.
<b>ENR</b>	Enoil-ACP reductasa.
<b>ESI</b>	Ionización por electroespray.
<b>EST</b>	<i>Expressed sequence tags</i> .
<b>F</b>	Plásmido auto trasmisivo y de baja copia.
<b>FA2Z</b>	Oligonucleótido específico de la zona 3´.
<b>FAD</b>	Ácido graso desaturasa.
<b><i>fadD</i></b>	Mutación en el gen <i>fadD</i> (ácido graso desaturasa).
<b>FAMES</b>	Ésteres metílicos de ácidos grasos.
<b>FAS</b>	Ácido graso sintasa.
<b>FAT</b>	Acil-ACP tioesterasa.
<b>FFA</b>	Ácidos grasos libres.
<b>FS</b>	Fase soluble.
<b>G3P</b>	Glicerol-3-fosfato.
<b><i>gal</i></b>	Mutación en la galactoquinasa.
<b>GC</b>	Cromatografía de gases.
<b>GFP</b>	Proteína fluorescente verde.
<b>GPAT</b>	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa.
<b>GST</b>	Glutación-S-transferasa.
<b><i>gyrA96</i></b>	Mutante de la ADN girasa da resistencia al ácido nalidíxico.
<b>HEPES</b>	Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico).
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida alta eficacia.
<b><i>hrcA</i><sup>+</sup></b>	Represor de la transcripción inducible por temperatura HrcA.
<b><i>hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i></b>	Carácter que permite la clonación de ADN sin la necesidad de escisión.
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.
<b>ITC</b>	Calorimetría de titulación isotérmica.
<b>IUPAC</b>	Unión internacional de química pura y aplicada.
<b>KAS</b>	β-cetoacil-ACP sintasa.
<b>Kcat</b>	Constante catalítica.

<b>kd</b>	Constantes de disociación.
<b>Km</b>	Constante de Michaelis-Menten.
<b>KR</b>	$\beta$ -cetoacil-ACP reductasa.
<b>lac</b>	Codifica el represor lac.
<b>LACS</b>	Acil-CoA sintetasa.
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani.
<b>LDS</b>	Linoleil desaturasa.
<b>LPA</b>	Ácido lisofosfatídico.
<b>LPAAT</b>	Lisofosfatidil aciltransferasa.
<b>LPC</b>	Lisofosfatidilcolina.
<b>LPCAT</b>	Lisofosfatidilcolina aciltransferasa.
<b>MAG</b>	Monoacilglicérido.
<b>MAGAT</b>	Monoacilglicerol aciltransferasa.
<b>mcrA, mcrCB o mrr</b>	Mutación que permite la metilación del ADN que no ha sido reconocido como foráneo.
<b>Mel-1</b>	Mutación del gen <i>mel</i> .
<b>MES</b>	Ácido 4-Morfolineetanosulfónico.
<b>MGDG</b>	Monogalactosildiacylglicerol.
<b>MRM</b>	Monitor de multireacción.
<b>MS</b>	Espectroscopía de masas.
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido.
<b>NAGK</b>	<i>N</i> -acetilglucosamida quinasa.
<b>NUP</b>	<i>Nested universal primer</i> .
<b>NHS</b>	<i>N</i> -hidroxisuccinamida.
<b>ODS</b>	Oleato desaturasa.
<b>OEP</b>	Proteína de membrana externa en el plastidio.
<b>ompT</b>	Deficiencia en la proteasa <i>ompT</i> .
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura.
<b>PA</b>	Ácido fosfatídico.
<b>pb</b>	Pares de base.
<b>PBS</b>	Disolución fosfato salina.
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina.
<b>PCR</b>	Replicación en cadena de la polimerasa.



---

<b>PDAT</b>	Fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa.
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina.
<b>PG</b>	Fosfatidilglicerol.
<b>PI</b>	Fosfatidilinositol.
<b>PIM</b>	Medio para la purificación de plastidios.
<b>pLysS</b>	Lisozima del fago T7, inhibidor de la T7 polimerasa.
<b>PPasa</b>	Fosfatidato fosfatasa.
<b>proAB</b>	Mutante <i>proAB</i> que requiere prolina para crecer en un medio mínimo.
<b>RACE</b>	Rápida amplificación de los extremos codificantes.
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico.
<b>recA1</b>	Mutación en gen responsable para la recombinación de ADN.
<b>relA1</b>	Mutación en el gen <i>relA</i> (ATP:GTP 3'-pirofosfotransferasa).
<b>RFP</b>	Proteína fluorescente roja.
<b>rpoH<sup>+</sup></b>	Gen <i>rpoH</i> codifica para el gen homólogo de <i>E. coli</i> sigma 32.
<b>RT-qPCR</b>	Replicación en cadena de la polimerasa a tiempo real.
<b>SAD</b>	Estearil-ACP desaturasa.
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico.
<b>supE</b>	Supresor del ARN transferente de glutamina de ámbar.
<b>TAG</b>	Triacilglicérido.
<b>TEA</b>	<i>N,N,N</i> -trietanolamina.
<b>TEMED</b>	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametiletilendiamina.
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano.
<b>Thi-1</b>	Mutante que requiere tiamina para crecer en medio mínimo.
<b>TIC</b>	Proteína de importación al cloroplasto.
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina.
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometano.
<b>tyrT(AS)</b>	Mutación del gen <i>tyrT</i> .
<b>UPM</b>	Mezcla de oligonucleótidos universal.
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidad máxima.
<b>ΔRn</b>	Incremento en la emisión de fluorescencia.
<b>λDE3</b>	Profago λ que lleva la ARN polimerasa T7 y el gen <i>lacI</i> .

## TABLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS

<b>Fa2Z</b>	5'-AACTGGAAGAATTCGCGG-3'
<b>NUP</b>	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
<b>UPM (largo)</b>	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGT ATCAACGCAGAGT-3'
<b>UPM (corto)</b>	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
<b>HaLACS2-3rac</b>	5'-ACCGGGGACATCGGTAGGTTTC-3'
<b>HaACP3-5rac 1</b>	5'-CGGTTGAGATTGTGATGGGACTGGAAG-3'
<b>HaACP3-5rac 2</b>	5'-GAGCATTGCAACCGTTCAGGATGCAGC-3'
<b>HaACBP1-5rac 1</b>	5'-CTTCACAAGCAGCTCGGCTATGTG-3'
<b>HaACBP1-5rac 2</b>	5'-CACAGGAATGCCAGCCTCGACAC-3'
<b>HaACBP4-3rac 1</b>	5'-CAGACCCTGTTGTAGATGTAGAGATG-3'
<b>HaACBP4-3rac 2</b>	5'-CCCACGTCCAAAGCCCCGATACG-3'
<b>HaACP-1(noPS)</b>	5'-CCGGATCCATGGCCAAGCCAGAGAC-3'
<b>HaACP1e-R</b>	5'-CGCTCGAGTTACGCAGAGTC-3'
<b>HaACP-2(noPS)</b>	5'-CCGGATCCATGGCCAAACCAGAACAG-3'
<b>HaACP2e-R</b>	5'-CCCTCGAGTTACGCACTGTCTTTC-3'
<b>HaACP-3(noPS)</b>	5'-CCGGATCCATGGCGACACCTGAGACGG-3'
<b>HaACP3e-R</b>	5'-CCCTCGAGTTATTTTTTCGAAACGAGC-3'
<b>LACS-1F-Hist</b>	5'-TAGGATCCATGAGTGCATATGTAGTTG-3'
<b>LACS-1-R</b>	5'-GGTACCTCAATCAAGAAAGATAAAACTTT-3'
<b>LACS-2F-Hist</b>	5'-TAGGATCCATGGATGTTGGGGGATC-3'
<b>LACS-2-R</b>	5'-GGTACCTTAACCATATAGCATTTGCAAAT-3'
<b>HK1pQ80-F</b>	5'-GCGCATGCATGTTTCGAGATCAAAATCTC-3'
<b>ACBP1pQ80-R</b>	5'-AAGGTACCTCAAAGAGAGGGCGCC-3'
<b>ACBP4pQ80-F</b>	5'-AAGGTACCATGGCGATGGCGAGAGC-3'
<b>ACBP4pQ80-R</b>	5'-ACGGTACCTTAAGTATCATGGGTAGGAGG-3'
<b>ACBP6pQ80-F</b>	5'-ACGAGCTCATGGGTTTGAAGGAGGACTTT-3'
<b>ACBP6pQ80-R</b>	5'-AACCCGGGTCAAGCAGCGGCAG-3'
<b>acpS-F(Hist)</b>	5'-GACGCATGCGCAATATTAGGTTTAGGCAC-3'
<b>acpS-R</b>	5'-GTCAAGCTTAACTTTCAATAATTACCGTGG-3'
<b>ACP-1F-cuant</b>	5'-AACCTGATCTCTCCTCCAC-3'
<b>ACP-1R-cuant</b>	5'-CGTGGA AAAAGTTTGTGACATTGTTAA-3'
<b>ACP-2F-cuant</b>	5'-ACCTTCATGCCAATGCCTGG-3'
<b>ACP-2R-cuant</b>	5'-TAGACAAGGTTTGCAACATAGTGAG-3'

<b>ACP-3F-cuant</b>	5'-TTCATGCCCTCTCTTTCATGCCAT-3'
<b>ACP-3R-cuant</b>	5'-CACGCTTCCGGGTTTGCTGT-3'
<b>LACS-1Fcuant</b>	5'-GAGTGCATATGTAGTTGGTGTCTTGG-3'
<b>LACS-1Rcuant</b>	5'-GTTTCGATCCCGGCCCATGC-3'
<b>LACS-2Fcuant</b>	5'-GGATGTTGGGGGATCCTTGTC-3'
<b>LACS-2Rcuant</b>	5'-CACCGCCAACTTCAACTGGAAC-3'
<b>ACBP1F(RT)</b>	5'-CCAATCAATCACCGGCGTCC-3'
<b>ACBP1R(RT)</b>	5'-GTTGCCAGTCGAACATTGTG-3'
<b>ACBP4F(RT)</b>	5'-CGATCTGATCTGATCTAATCCG-3'
<b>ACBP4R(RT)</b>	5'-GGGCATAAAGCAAGAGAGCG-3'
<b>ACBP6F(RT)2</b>	5'-CTTTCGTCACGAAATGGGTTTG-3'
<b>ACBP6R(RT)2</b>	5'-CGGTCCGGTGTTCACCGGT-3'
<b>LACS-1AF(2)</b>	5'-CGAGACGGAGGTTACTACCG-3'
<b>LACS-1R(pET)</b>	5'-CGCATATGTCAAGAAAGATAAAACTT-3'
<b>LACS-2BF(2)</b>	5'-GGGACGGAATAGTCCGGTTTAAGC-3'
<b>LACS-2ER(2)</b>	5'-CTCAAGGCAACCGTCTTTATGG-3'
<b>LACS1-F</b>	5'-GCTAGCATGAGTGCATATGTAGTTG-3'
<b>LACS1-R</b>	5'-GCTAGCAGAAAGATAAAACTTTGCCAGC-3'
<b>LACS2-F</b>	5'-GCTAGCATGGATGTTGGGGGAT-3'
<b>LACS2-R</b>	5'-GCTAGCACCATATAGCATTTGC-3'
<b>FATA-F</b>	5'-GCTAGCATGCTCTCCAGAGGTGTTCC-3'
<b>FATA-R</b>	5'-GCTAGCTTTTTTTGCGGGTTTTTTCC-3'
<b>FATB-F</b>	5'-GCTAGCATGGTAGCTATGAGTGCTAC-3'
<b>FATB-R</b>	5'-GCTAGCAACATTTCCAGCAGAGAAGTG-3'
<b>FATB-Fc</b>	5'-TTTATCAACCAATTGATGATGCTGGAATGG-3'
<b>FATB-Rc</b>	5'-CCATTCCAGCATCATCAATTGGTTGATAAA-3'
<b>ACBP4-F</b>	5'-CCCGGGATGGCGATGGCGAGAGCGAG-3'
<b>ACBP4GFP-Ra</b>	5'-GCCCTTGCTCACCATAGTATCATGGGTAGG-3'
<b>ACBP4GFP-Fa</b>	5'-CTACCCATGATACTATGGTGAGCAAGGGC-3'
<b>GFP-R</b>	5'-CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTC-3'
<b>ACBP6-F</b>	5'-CCCGGGATGGGTTTGAAGGAGGAC-3'
<b>ACBP6GFP-Ra</b>	5'-AGCGGCAGCGTCCATAGTATCATGGGTAGG-3'
<b>ACBP6GFP-Fa</b>	5'-CCTACCCATGATACTATGGACGCTGCCGCT-3'
<b>GFP-F</b>	5'-CCCGGGATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'



## **I. INTRODUCCIÓN**



## 1.1 EL GIRASOL.

### 1.1.1 Historia, origen y botánica de *Helianthus annuus* L.

El girasol, *Helianthus annuus* L., comprende tres subespecies principales:

- *Helianthus annuus* ssp. *lenticularis*, girasol silvestre.
- *Helianthus annuus* ssp. *annuus*, girasol maleza.
- *Helianthus annuus* ssp. *macrocarpus*, girasol cultivado.

Su centro de origen es América del Norte, y su antecesor silvestre es una especie diploide ( $2n = 2x = 34$ ) perteneciente a la división *Helianthinae*, subfamilia *Asteroideae* y familia *Asteraceae* (compuestas) (Seiler, 1997), siendo también el centro de diversidad de dicha especie América del Norte (Figura 1).

El nombre latino del género alude a la forma y aspecto de la inflorescencia mientras que el de la especie da cuenta de la anualidad del ciclo vegetativo-reproductivo de la planta. El género *Helianthus* comprende 68 especies, de las que *Helianthus annuus* tiene la mayor extensión geográfica y es la más variable del género. Dentro de esta especie existen numerosos tipos o subespecies cultivadas como plantas ornamentales, oleaginosas y forrajeras (Kesseli et al., 1997).

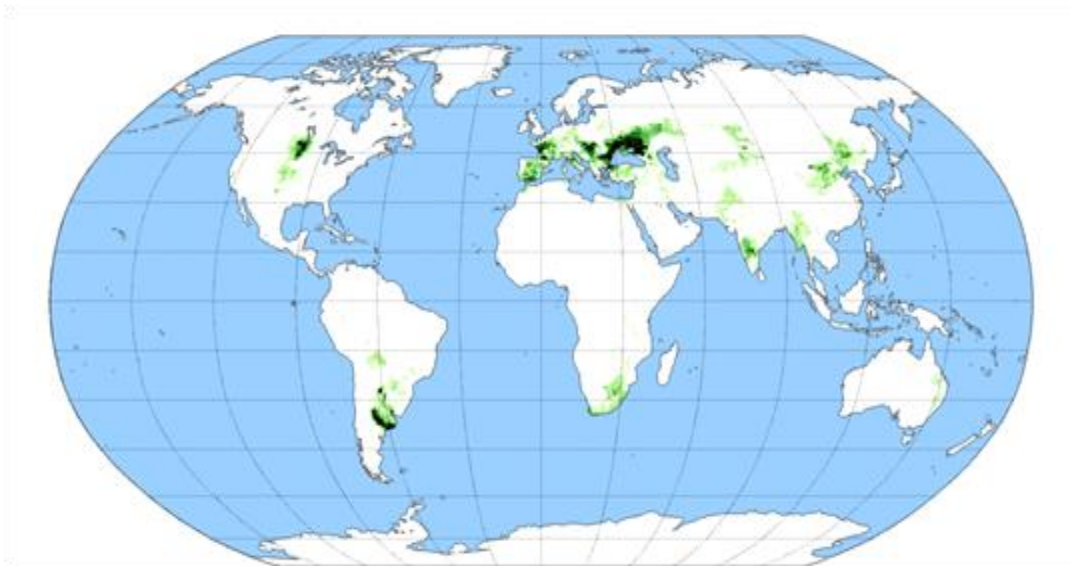


Figura 1. Distribución mundial del cultivo de girasol. En verde se marcan las zonas de cultivo (<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:SunflowerYield.png>).

Las variedades de girasol cultivadas en el mundo son el resultado de un largo proceso de selección y adaptación a distintos ambientes, dirigido normalmente a la obtención de plantas con mayor contenido en aceite. El girasol cultivado tiene una alta producción de semillas (aproximadamente 1.000 semillas/planta) y un tiempo generacional corto de 70 a 100 días. Se cultiva por su aceite y en segundo lugar por sus proteínas. El aceite de girasol se caracteriza por su alto contenido en ácido linoleico. Sin embargo, en las últimas décadas se han desarrollado variedades con composiciones de ácidos grasos modificadas, como son el girasol alto oleico (Soldatov, 1976; Garcés et al., 1989; Martínez-Force et al., 1999) o las líneas de girasol alto saturado (Osorio et al., 1995; Fernández-Martínez et al., 1997).

### **1.1.2 Importancia económica.**

Las razones del éxito de este cultivo se resumen en que el girasol es una planta rústica de fácil cultivo y buena adaptación a una gran variedad de suelos. Su aceite ha encontrado, desde el primer momento, una excelente acogida entre los consumidores y ha obtenido el respaldo de científicos y dietistas, especialmente, como sustituto de las grasas de origen animal. La relativa sencillez de las técnicas industriales para su extracción, así como su fácil conservación, son otras de las ventajas para su industrialización y su comercio (Alba y Llanos, 1990).

En el mercado mundial de aceites, el de girasol es el cuarto en orden de importancia. El aceite de girasol compite en el segmento de aceites de semilla de mejor calidad junto con el de canola. En las campañas que van desde los años 2008/2009 a 2012/2013, la producción de aceites de girasol se encontró entre el 8 y 9 % de la producción mundial de aceites vegetales (Tabla 1).



Producción (Millones de toneladas)					
	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13
Soja	211,64	260,25	263,59	238,73	269,5
Colza	57,81	60,96	60,55	61,56	59,3
Algodón	41,08	38,91	43,56	46,62	44,7
Maní	33,07	33,74	36	35,34	37,2
<b>Girasol</b>	35,48	32,18	33,46	40,3	36,37
Copra	5,88	5,88	6,02	5,54	5,66
<b>Total</b>	396,7	444,13	455,72	441,39	466,87

Tabla 1. Producción mundial de las principales semillas de oleaginosas (USDA, 2013 <http://www.fas.usda.gov/oilseeds/Current/>).

Según datos de la FAO, en los últimos veinte años, la producción mundial de girasol, que osciló en torno a los 23-30 millones de toneladas (Figura 2) se concentró en cuatro países productores: la Federación Rusa, que habitualmente aporta unas 6,5 millones de toneladas (Mt), la Unión Europea (de 4,8 a 6,5 Mt), Ucrania, (de 4,2 a 5,3 Mt) y en último lugar Argentina de (3,5 a 4,5 Mt). El principal producto de la molienda de girasol, y el que contribuye principalmente al precio de la semilla, es el aceite. Además, se pueden extraer otros componentes como la harina, la cual se vende como subproducto para la elaboración de piensos compuestos.

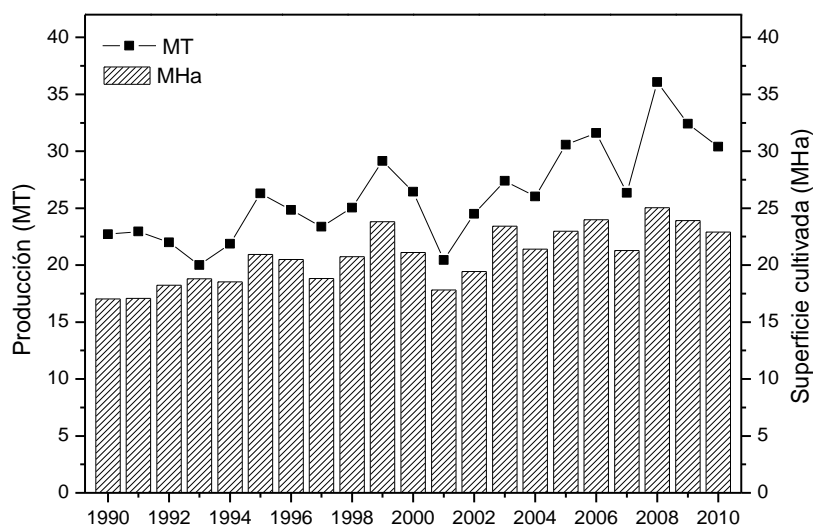


Figura 2. Evolución de la producción (Mt) y superficie cultivada (Mha) de semillas de girasol en las últimas décadas a nivel mundial (FAOSTAT, 2012 <http://faostat.fao.org/>).

### 1.1.3 Morfología y fisiología.

La raíz de la planta de girasol es de tipo pivotante, sobrepasando a menudo en longitud al tallo. Presenta además un sistema de raíces secundarias y terciarias que exploran el suelo en sentido horizontal. Además, el tallo es de consistencia semileñosa y maciza en su interior, siendo cilíndrico, con un diámetro variable entre 2 y 6 cm y una altura hasta el capítulo entre 40 cm y 2 m.

La superficie exterior del tallo es rugosa, asurcada y vellosa, excepto en su base. En la madurez, el tallo se inclina en su parte terminal debido al peso del capítulo. Las hojas son alternas, grandes, trinervadas, largamente pecioladas, acuminadas, dentadas y de áspera vellosidad tanto en el haz como en el envés. El número de hojas varía entre 12 y 40, según las condiciones del cultivo y la variedad. El color también es variable y va del verde oscuro al verde amarillento (Figura 3).



Figura 3. Parte aérea de la planta de girasol.

La inflorescencia consiste en un disco de 10 a 40 cm de diámetro (según variedades y condiciones de cultivo), que puede ser plano, cóncavo o convexo. El capítulo es solitario y rotatorio y está rodeado por bracteadas involucrales. Está formado por un tejido de naturaleza esponjosa en el que se insertan las flores que nacen sobre su cara superior (Figura 4A). El número de flores varía entre 700-3.000 en variedades para la producción y extracción de aceites o incluso 6.000 o más, en variedades destinadas al consumo directo.

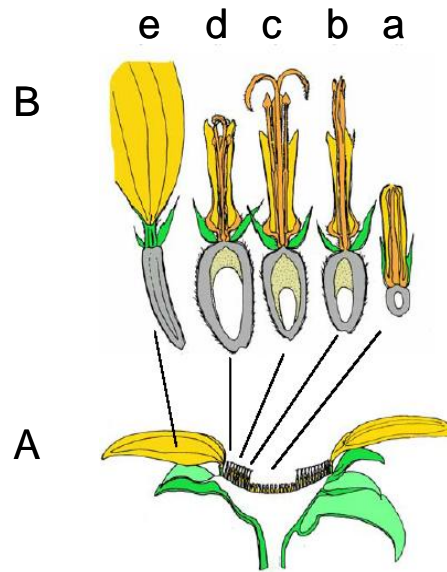


Figura 4. A) Sección longitudinal de un capítulo de girasol; B) Flores liguladas (e) y tubulosas en diferentes estadios de desarrollo: antes de abrirse (a); abriéndose (emergencia de estambres) (b); abierta (c) y después de fecundadas (d) (Alba y Llanos, 1990).

El verticilo o anillo exterior del capítulo está formado por flores liguladas, estériles, dispuestas radialmente (Figura 4B-e), con una función de exhibición y atracción visual para los insectos polinizadores. Las flores propiamente dichas son las tubulosas, que están en el interior del capítulo y forman espirales desde el centro (Figura 4B-a-d). Estas flores están formadas por un ovario inferior, dos sépalos, una corola en forma de tubo compuesta por cinco pétalos, y cinco anteras unidas a la base del tubo de la corola.

El fruto es un aquenio de tamaño comprendido entre 30 y 20 mm de largo, 2 y 13 mm de ancho, 2,5 y 5 mm de grueso (Figura 5). Las flores del centro del capítulo generalmente no se transforman en fruto. El pericarpio (envuelta exterior del fruto) es duro y fibroso, y queda pegado a las semilla menos en sus aristas. La membrana seminal crece con el endospermo y forma una película fina que cubre el embrión de la semilla y asegura la adherencia entre el pericarpio y ésta. Los cotiledones representan la reserva energética de la semilla, y entre estos esta la gémula.

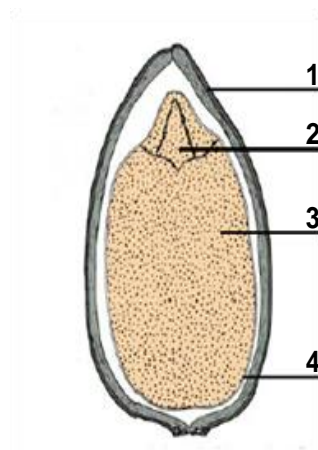


Figura 5. Sección longitudinal de un aquenio: 1. Pericarpio; 2. Gémula; 3. Cotiledón; 4. Membrana seminal (Vranseanu, 1997).

La duración del ciclo del girasol depende de la variedad y el momento de la siembra, y se divide en varias etapas (Alba et al., 1990). La germinación y emergencia van desde la siembra hasta la aparición de los cotiledones. En función de la humedad y temperatura puede durar de 10 a 30 días. La formación de las primeras hojas va desde la emergencia hasta la aparición de 4-5 pares de hojas. Durante estas fases se produce un rápido crecimiento de la raíz, lo que condiciona el posterior vigor de la planta. En esta etapa, la disponibilidad de agua es muy importante, siendo perjudicial tanto la falta como el exceso de la misma. Esta fase dura entre 15 y 25 días.

A partir de ese momento tiene lugar la fase de crecimiento más activa y de máxima absorción de elementos minerales del suelo, que dura hasta el principio de la floración. Cuando se forma el botón floral es cuando la planta es más sensible al estrés hídrico. Esta fase tiene una duración entre 40 y 50 días. La floración comprende todo el periodo en el que las flores se van abriendo.

Las primeras flores en abrir son las de la parte exterior del capítulo y continúan con la apertura de los anillos exteriores hasta el centro, a razón de 1 a 5 anillos diarios. En esta etapa se determina el número de flores que se convertirán en semillas. En este momento la planta es muy sensible a la falta de agua y las temperaturas elevadas. Las flores liguladas (pétalos amarillos) que rodean el capítulo se secan y empiezan a caerse un día después de abrirse las últimas flores del centro del mismo. El proceso tarda en completarse entre 10 a 12 días. La polinización y fecundación, llevada a cabo por insectos, es generalmente alógama (fecundación cruzada entre flores distintas). Los óvulos una vez fecundados reciben sustancias de reserva hasta que se convierten en semillas maduras.

La fase de maduración de la semilla va desde el final de la floración, hasta el estado de madurez fisiológica. Durante este periodo se llena la semilla y se produce la biosíntesis del aceite. Esta finaliza cuando la semilla tiene aproximadamente un 40 % de humedad. El periodo de maduración puede durar entre 35 y 50 días.

#### **1.1.4 Mejora del cultivo de girasol.**

En el cultivo de girasol ha sido continua la búsqueda de nuevas variedades con mejores rendimientos. Estas implicaban una mayor producción de semillas y aceite, la resistencia a enfermedades y parásitos, tales como el jopo (*Orobanche cumana*), la roya (*Puccinia helianthi*), o el mildiu (*Plasmopara helianthi*), y la tolerancia a condiciones de cultivo adversas, como la sequía o la elevada salinidad de los suelos; todas ellas encaminadas a incrementar el rendimiento final del cultivo. Estos objetivos se han afrontado utilizando diversas estrategias.

La mejora clásica de este cultivo se ha basado en aprovechar la gran variabilidad genética natural que posee el girasol. Gracias a este factor, desde los primeros programas de mejora, que comenzaron en Rusia a finales de siglo XIX, se ha conseguido reducir hasta uno el número de capítulos por planta, incrementar el tamaño de las semillas (Vranceanu, 1977) y pasar de variedades con un contenido de aceite del 30 % (1912-1926) a variedades con un rendimiento de aceite de entre el 45-50 % a principios de los años 60. Estas mejoras confirieron a esta planta, ornamental en sus inicios, la consideración e importancia que hoy posee como oleaginosa de producción (Röbbelen et al., 1989).

Posteriormente, se desarrolló la mejora mediante la obtención de híbridos, aprovechando el fenómeno de la heterosis o vigor del híbrido de primera generación. La mejora mediante la heterosis dio sus primeros frutos en Canadá a mediados del siglo pasado, pero debido a que sobre el parental hembra tenían lugar tanto autopolinización como polinización cruzada, los porcentajes de hibridación fueron relativamente bajos con un 50 % (Röbbelen et al., 1989). Este problema se solucionó a principios de los años 70 obteniéndose híbridos mediante la introducción en la línea parental hembra del carácter androesterilidad citoplásmica. Este carácter se transfiere de una generación a otra por vía materna y está relacionado con la producción de una proteína mitocondrial alterada que impide la producción de polen (Köhler y Horn, 1991). La línea masculina

utilizada para obtener híbridos, además de producir polen, debe tener los genes restauradores de la fertilidad, para que los híbridos de primera generación puedan producir polen y semillas de manera normal.

Sin embargo, tanto la variabilidad genética natural del girasol como la conseguida mediante la hibridación son en ocasiones insuficientes para conseguir líneas con unas características determinadas. Por lo tanto, es necesario recurrir a otras técnicas, como la mutagénesis o la ingeniería genética, con el fin de obtener variedades con una serie de caracteres demandados por la industria.

### **1.1.4.1 Mutagénesis.**

Para mutagenizar semillas, se pueden emplear dos procedimientos.

*Mutagénesis química.* Consiste en sumergir las semillas en soluciones de mutágenos químicos que o bien reaccionan directamente con el ADN, como ocurre con los agentes alquilantes como el etilmetanosulfonato (EMS), o bien indirectamente por medio de la formación de un metabolito a partir de ellos que sí tiene propiedades mutagénicas, caso de la azida sódica que es efectiva sólo en algunas especies vegetales (McCourt et al., 1987).

*Mutagénesis física.* En este caso las semillas se someten a radiaciones ionizantes como rayos-X para así producir roturas en la doble cadena de ADN, algunas de las cuales serán reparadas por mecanismos celulares propios que introducirán modificaciones en el material genético.

Mediante técnicas de mutagénesis es posible obtener mutantes de oleaginosas con modificaciones en la composición de ácidos grasos de su aceite. Así, utilizando EMS en soja (*Glycine max*), se han obtenido mutantes con un menor contenido en ácido linolénico (18:3), reduciéndolo de un 7 % a un 3 % (Wilcox y Cavins, 1985). También se han obtenido mutantes con alto contenido en ácido esteárico (18:0), que se incrementó en esta semilla desde un 5 % a un 30 % (Graef et al., 1985). En el caso de la colza (*Brassica sp.*), se han obtenido mutantes alto oleico con hasta un 87 % de ácido oleico (18:1) en su aceite utilizando el agente EMS (Auld et al., 1992; Rucker y Röbbelen, 1995). En girasol, se han utilizado para la obtención de nuevas líneas mutagénicas diferentes agentes como son azida sódica, EMS o rayos-X (Osorio et al., 1995). Estas líneas mutagénicas serán descritas en el apartado 1.1.6 de la Introducción.

#### **1.1.4.2 Ingeniería genética.**

Actualmente, el uso de la biotecnología en la mejora del girasol se restringe a la utilización de marcadores moleculares, siendo uno de los pocos cultivos de importancia mundial que no cuenta con variedades transgénicas en el mercado, fundamentalmente debido a la ausencia de un protocolo de transformación eficiente. Estos protocolos requieren un sistema de cultivo *in vitro* capaz de producir un número importante de individuos transformados y que sea además reproducible y confiable, algo que aún no se ha logrado con plantas de girasol (Alibert et al., 1994).

#### **1.1.5 El aceite de girasol.**

##### **1.1.5.1 Características generales.**

El aceite de girasol se caracteriza por su alto contenido en ácidos grasos insaturados (85-91 %), representados en la mayor parte por los ácidos linoleico y oleico. El hecho de que prácticamente no contenga ácido linolénico le confiere una razonable estabilidad oxidativa.

Existe una fuerte relación inversa entre el contenido de ácido linoleico y oleico, causada por el genotipo y la temperatura durante la formación de la semilla. En la mayoría de los casos el aceite de girasol es rico en ácido linoleico conteniendo entre 50 a 70 % de dicho ácido graso, mientras que el ácido oleico suele suponer del 15 al 45 % (Murphy, 1993). A altas temperaturas de desarrollo se produce un incremento en la cantidad de ácido oleico, a expensas del linoleico. También se ha descrito la relación inversa entre la temperatura y el contenido de esteárico (Lajara et al., 1990). Así mismo, existen ligeras variaciones en cuanto al contenido de los ácidos linoleico, palmitico y oleico en las semillas respecto a la posición relativa de estas dentro del capítulo, así los dos primeros aumentan mientras que el oleico disminuye desde el perímetro hacia el centro del mismo (Zimmerman y Fick, 1973).

### 1.1.5.2 Composición del aceite de girasol.

El aceite de girasol está formado mayoritariamente por triacilglicéridos (TAG) y una pequeña parte de diacilglicéridos (DAG), fosfolípidos y ácidos grasos libres, el resto son sustancias que se pueden agrupar en el término genérico de insaponificables. En la Tabla 2 se representan los porcentajes de las clases mayoritarias de TAG en un aceite de girasol común, con aproximadamente un 57 % de ácido linoleico (Merrien, 1996).

En general, en el aceite de girasol el 97-98 % de las especies de TAG están formadas por tres ácidos grasos insaturados o por dos insaturados y uno saturado. El contenido de ácidos grasos libres es del orden del 0,5 %, igual que en otras semillas oleaginosas (Campbell, 1983). Los fosfolípidos mayoritarios, que suponen alrededor de un 2 % del aceite total crudo, son fosfatidilcolina (PC; 48,7 %), fosfatidilinositol (PI; 27,9 %), fosfatidiletanolamina (PE; 21,2 %) y ácido fosfatídico (PA; 2,2 %) (Chapman, 1980).

Clase de TAG	Mol%
OLL	28,0
LLL	19,0
OOL	15,6
POL	13,0
PLL	9,1
EOL	6,4
OOO	5,1
EOO	1,2
PLE	1,1
PLP	0,9
BLL	0,6

Tabla 2. Especies de triacilglicéridos en aceites de girasol común: (P, palmítico; E, esteárico; O, oleico; L, linoleico; B, behénico). No se han representado los triacilglicéridos en proporciones menores a 0.5 %.



En la fracción insaponificable hay sustancias de naturaleza muy diversa como hidrocarburos, carbohidratos, esteroides y tocoferoles. En el aceite girasol, el contenido total de tocoferoles es del orden de 700 mg/Kg, valor similar al que se encuentra en otros aceites vegetales como el de soja (*Glycine max*), maíz (*Zea mays*) y semilla de algodón (*Gossypium herbaceum*) (Landers y Rathmann, 1981). El porcentaje con respecto al peso total, es del 0,06 % de  $\alpha$ -tocoferol, y un 0,01 %  $\beta$ -tocoferol, el primero posee una alta actividad vitamina E, y el segundo es un buen antioxidante natural (Warner y Mounts, 1990).

El aceite de girasol desde el punto de vista de su valor calórico y del grado de asimilación por el organismo humano, se sitúa entre los mejores aceites vegetales. Compuestos como tocoferoles, lecitinas, y otros componentes, contribuyen a elevar su valor nutritivo (Gunstone et al., 1994).

### 1.1.6 Modificación de la composición del aceite de girasol.

Ya que las propiedades fisicoquímicas del aceite de girasol no son las adecuadas para su uso directo en la fabricación de productos que requieran grasas plásticas o sólidas (margarinas, snacks, productos de bollería, etc.) se llevaron a cabo programas de mutagénesis con el fin de seleccionar líneas con un mayor contenido en ácidos grasos saturados para su uso industrial (Osorio et al., 1995). Entre ellas cabe destacar las líneas CAS-3 (alto estérico) y CAS-5 (alto palmítico). Como podemos observar en la Tabla 3, en el caso de CAS-3 se obtiene una proporción en ácido esteárico del 26,1 % (p/p), cuatro veces superior a la que presenta la línea control CAS-6, la cual presenta una composición de ácido esteárico del 7,1 % (p/p).

Línea	Ácidos Grasos (% p/p)									
	16:0	16:1	16:2	18:0	18:1	18:1 <sup>Δ11c</sup>	18:2	18:3	20:0	22:0
CAS-6	8,0	0,2	-	7,1	30,5	0,3	51,9	0,6	0,3	1,1
CAS-9	5,6	0,1	-	6,4	80,1	0,9	5,3	0,1	0,3	1,2
CAS-3	5,4	-	-	26,1	14,2	-	51,3	-	1,4	1,3
CAS-5	31,5	4,4	0,7	2,8	12,7	3,6	40,4	1,6	1,5	0,8

Tabla 3. Composición típica de ácidos grasos en distintas líneas de girasol. 16:0 (ácido palmítico), 16:1 (ácido palmitoleico), 16:2 (ácido palmitolinoleico), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), 18:1<sup>Δ11c</sup> (ácido vaccénico), 18:2 (ácido linoleico), 18:3 (ácido linolénico), 20:0 (ácido aráquico), 22:0 (ácido behémico).

En el caso de la línea CAS-5, los contenidos en ácido palmítico (31,5 % p/p) fueron cuatro veces superiores al de la línea control CAS-6 (8,0 % p/p). Además, se desarrollaron líneas con la composición de sus ácidos grasos insaturados modificada. En este caso podemos destacar la línea CAS-9 (Soldatov, 1976) (alto oleico, bajo linoleico). Cuando comparamos esta línea con la línea control observamos un aumento del ácido oleico a valores del 80 % (p/p) y una drástica reducción de los niveles de ácido linoleico (5,3 % p/p), siendo diez veces menor que la presentada en la línea control CAS-6 (51,9 % p/p).

## 1.2 LÍPIDOS DE PLANTAS: ESTRUCTURA Y DISTRIBUCIÓN.

### 1.2.1. Naturaleza y función de los lípidos.

Clásicamente se han definido a los lípidos como la fracción de los seres vivos soluble en disolventes orgánicos. Esta definición resulta poco rigurosa, por lo que Christie (1987) propuso definir a los lípidos como la fracción de los seres vivos compuesta por los ácidos grasos y las sustancias derivadas biosintética o funcionalmente a partir de estos. Éstos son constituyentes esenciales de las células y componen un grupo químico variado y heterogéneo. Al igual que en el resto de seres vivos, los lípidos desempeñan importantes funciones biológicas en las plantas (Harwood, 1996), estas pueden clasificarse en:

*Funcion estructural.* Los lípidos son componentes básicos de las membranas celulares, que actúan como barreras delimitando tanto las células como los compartimentos celulares. Asimismo, en estas membranas son el soporte de importantes procesos celulares como la captación de luz, las reacciones de transporte de electrones o la generación de adenosin trifosfato (ATP).

*Reserva energética.* Las especies vegetales oleaginosas acumulan lípidos en la semilla o en los frutos generalmente en forma de TAG. En las semillas estos se emplean para alimentar al embrión, representando una fuente de energía más concentrada que los carbohidratos o proteínas. En el caso de los frutos su función es atraer a herbívoros que contribuyan a la dispersión de las semillas.

*Función regulatoria.* Los lípidos son intermediarios activos en procesos biológicos fundamentales como la transducción de señales, actuando como precursores en la síntesis de hormonas como el ácido jasmónico y de segundos mensajeros como el inositol-fosfato. Intervienen también en procesos como la fotoprotección, la modificación post-traducciona de proteínas, el reconocimiento celular y la adaptación al frío.

*Función protectora y aislante.* Los lípidos también actúan como componentes de la cubierta protectora en la superficie de muchas plantas, en forma de ceras, cutina y suberina.

## 1.2.2. Ácidos grasos.

### 1.2.2.1. Definición y clasificación.

Los ácidos grasos son biomoléculas orgánicas formadas por una cadena hidrocarbonada larga y un grupo carboxilo terminal que suele contener un número par de átomos de carbono (Coultatet, 1996). Son compuestos insolubles en agua en su forma protonada y ricos en energía. Se pueden clasificar en función de su longitud de cadena o del número y posición de los dobles enlaces (Tabla 4).

Longitud de la cadena		Número de dobles enlaces	
4-6 carbonos	Ácidos grasos de cadena corta	<u>Saturados</u>	No presentan ningún doble enlace, siendo moléculas lineales
8-12 carbonos	Ácidos grasos de cadena media		
14-18 carbonos	Ácidos grasos de cadena larga	<u>Insaturados</u>	Un doble enlace (monoinsaturados) o más de un doble enlace (poliinsaturados)
20 o más carbonos	Ácidos grasos de cadena muy larga		

Tabla 4. Clasificación de los ácidos grasos según su longitud de cadena o el número de dobles enlaces (Los dobles enlaces suelen ser de configuración *cis*, y cuando hay más de uno, suelen estar separados al menos por un grupo metileno).

### 1.2.2.2. Nomenclatura.

Los ácidos grasos se pueden nombrar de diferentes formas, pudiendo emplearse la nomenclatura sistemática o la abreviada, teniendo la mayoría de ellos además un nombre común. La nomenclatura sistemática sigue las reglas adoptadas por la IUPAC, donde se indica la longitud de la cadena, el número, posición y configuración de los dobles enlaces contando el número de átomos de carbono a partir del grupo carboxilo (carbono Δ). En la nomenclatura abreviada el ácido graso se simboliza por dos números separados por dos puntos, indicando el primero la longitud de la cadena y el segundo el número de dobles enlaces. A continuación, se indica la posición en la que se encuentra el doble enlace, ya sea contando el número de átomos de carbono a partir del grupo carboxilo (Δ) o a partir del grupo metilo terminal (n ó ω). Finalmente, se indica la configuración *cis* (c) o *trans* (t) del doble enlace.

### 1.2.2.3. Ácidos grasos más frecuentes en la naturaleza.

Los ácidos grasos son abundantes como componentes fundamentales de los lípidos, pero en estado libre (no esterificados) sólo aparecen en pequeñas cantidades. En la naturaleza existe una gran diversidad de ácidos grasos, pero no todos tienen la misma importancia. Se han descrito unos 300 tipos distintos de ácidos grasos, siendo los más comunes aquellos entre 12 y 22 átomos de carbono (Tabla 5).

Nombre común	Nombre sistemático	Nombre abreviado
Ác. Láurico	Dodecanoico	12:0
Ác. Mirístico	Tetradecanoico	14:0
Ác. Palmítico	Hexadecanoico	16:0
Ác. Palmitoleico	Cis-9-hexadecenoico	16:1 ω7c
Ác. Esteárico	Octadecanoico	18:0
Ác. Oleico	Cis-9-octadecenoico	18:1 ω9c
Ác. Linoleico	Cis,cis-9,12-octadecadienoico	18:2 ω6c,9c
Ác. α-linolénico	Cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico	18:3 ω3c,6c,9c
Ác. γ-linolénico	Cis,cis,cis-6,9,12-octadecatrienoico	18:3 ω6c,9c,12c
Ác. Aráquico	Eicosanoico	20:0
Ác. Gondónico	Cis-11-icosenoico	20:1 ω9c
Ác. Behénico	Docosanoico	22:0
Ác. Erúcico	Cis-13-docosenoico	22:1 ω9c
Ác. Lignocérico	Tetracosanoico	24:0

Tabla 5. Ácidos grasos más comunes en los lípidos de reserva en plantas: Ác. (ácido).

Los ácidos grasos considerados mayoritarios, que constituyen en la mayoría de los casos más del 95 % del total, son el palmítico, esteárico, oleico, linoleico y  $\alpha$ -linolénico (Harwood, 1979). Además de los ácidos grasos mencionados en la Tabla 5, existen también ácidos grasos con estructuras poco frecuentes, característicos de determinados grupos o especies vegetales. Estos ácidos grasos presentan dobles enlaces en posiciones poco comunes, triples enlaces, ramificaciones, sustituyentes como grupos hidroxilo, epoxi o anillos de ciclopropeno.

#### 1.2.2.4 Estructura tridimensional.

Como se muestra en la Figura 6, los dobles enlaces con isomería *cis* (B) introducen “codos” en las cadenas hidrocarbonadas, afectando con ello a sus propiedades físicas como, por ejemplo, el punto de fusión.

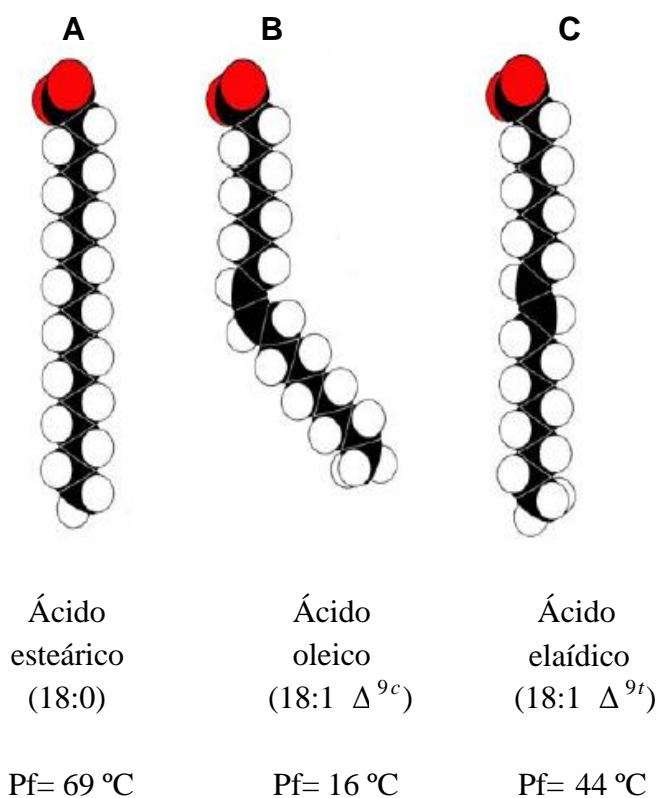


Figura 6. Estructura de los ácidos grasos y puntos de fusión; A) ácido esteárico (18:0), B) ácido oleico (18:1  $\Delta^{9c}$ ) y C) ácido eláidico (18:1  $\Delta^{9t}$ ).

No sucede lo mismo con los dobles enlaces en configuración *trans* (C), que no introducen más que un pequeño ángulo en la cadena, los que supone un cambio menor en las propiedades físico-químicas del compuesto y su comportamiento es más parecido al de los ácidos grasos saturados (A). Por ejemplo, el ángulo que introduce el doble enlace *cis* en la molécula del ácido oleico, hace que su punto de fusión baje desde 69 °C del ácido esteárico hasta los 16 °C del ácido oleico. El doble enlace *trans*, sin embargo, no distorsiona tanto la molécula, por lo que el punto de fusión en el caso del ácido eláidico baja hasta los 44 °C.

### 1.2.3 Lípidos complejos de plantas.

Los lípidos complejos o glicerolípidos son ésteres de glicerol y ácidos grasos y se clasifican como lípidos neutros o lípidos polares.

Los acilgliceroles ó acilglicéridos (lípidos neutros) están formados exclusivamente por ácidos grasos esterificados con una molécula de glicerol (Figura 7).

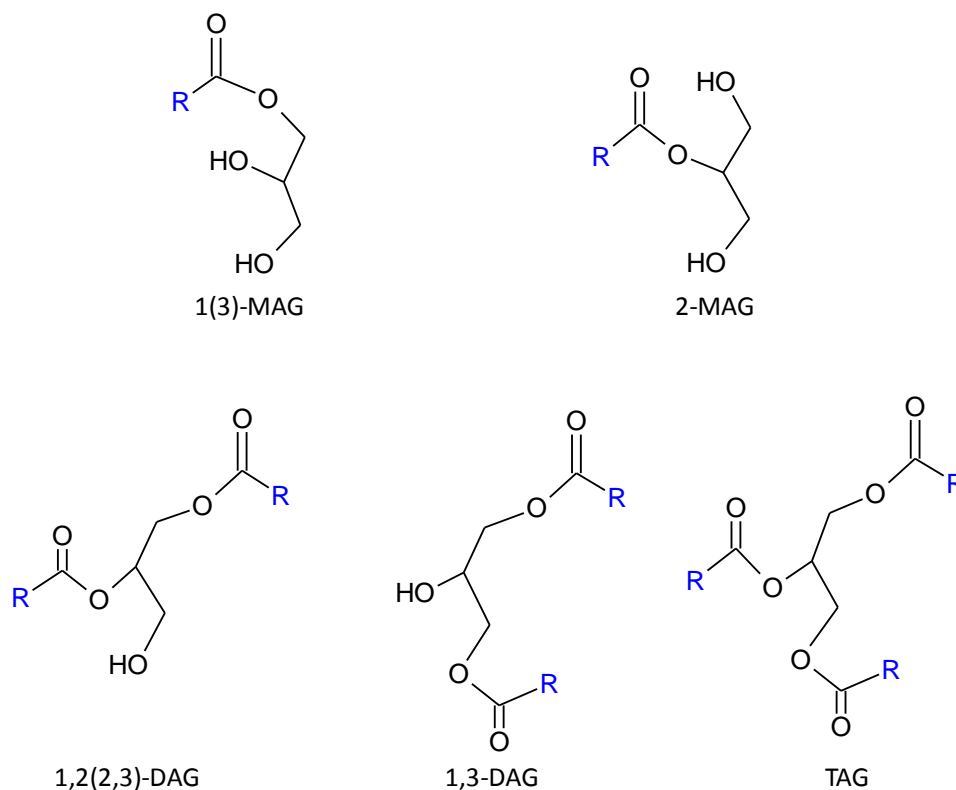


Figura 7. Estructura de los acilglicéridos. MAG: monoacilglicéridos, DAG: diacilglicéridos, TAG: triacilglicéridos, R: cadena de ácido graso.

Dependiendo del número de ácidos grasos que se unan a la molécula del glicerol se clasifican en monoacilglicéridos (MAG), DAG o TAG. Los TAG son los más abundantes y los principales constituyentes de los aceites, los MAG y DAG son intermediarios metabólicos suyos. Los acilgliceroles son solubles en disolventes no polares, como el hexano.

Los fosfoglicéridos o fosfolípidos son lípidos polares, están formados por una molécula de glicerol con dos ácidos grasos esterificados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 y un grupo fosfato con un sustituyente en la posición *sn*-3. Según el sustituyente del grupo fosfato se clasifican los distintos tipos de fosfolípidos. En la Tabla 6 se recogen los principales fosfolípidos, junto con sus sustituyente, carga eléctrica y abundancia de cada uno de ellos. Los lípidos polares son solubles en disolventes polares, como el cloroformo o el metanol. En los tejidos fotosintéticos son también importantes los galactolípidos.

Sustituyente	Fosfolípido	Carga	Función/Abundancia
H	Ácido fosfatídico	-1	Intermediario metabólico Trazas
Etanolamina	Fosfatidiletanolamina	0	Intermediario metabólico Cantidades apreciables
Colina	Fosfatidilcolina	0	Grandes cantidades
Serina	Fosfatidilserina	-1	Minoritario
Glicerol	Fosfatidilglicerol	-1	Abundante en tejidos fotosintéticos
Inositol	Fosfatidilinositol	-1	Minoritario

Tabla 6. Principales fosfolípidos, naturaleza de su sustituyente, carga eléctrica, abundancia y función de cada uno de ellos.

## 1.3 BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS Y TRIACILGLICÉRIDOS EN PLANTAS.

### 1.3.1 Biosíntesis de ácidos grasos.

La síntesis *de novo* de ácidos grasos en semillas y tejidos no verdes tiene lugar en el interior de los plastidios, mientras que en los tejidos verdes se desarrolla en los cloroplastos. Es llevada a cabo mediante la acción combinada de dos sistemas multienzimáticos: la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y las sintasas de ácidos grasos (FAS). El primer paso de este proceso es la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA y bicarbonato, paso catalizado en el interior del plastidio por la ACC (Harwood, 1988). Teniendo en cuenta que la molécula de acetil-CoA no puede cruzar la membrana plastidial, esta debe ser generada dentro del propio plastidio a partir de intermediarios de la glucólisis. Estos intermediarios pueden ser sintetizados en el interior del propio plastidio o ser importados activamente desde el citosol. Esta es una ruta metabólica primaria, siendo esencial para el crecimiento y desarrollo de las células en las semillas (Ohlrogge y Jaworski, 1997). El siguiente paso consiste en la extensión sucesiva de las cadenas de acilos en dos unidades de átomos de carbono llevada a cabo por la acción del complejo enzimático FAS (Figura 8).

En la naturaleza encontramos dos tipos de FAS; la FAS de tipo I está presente en animales y levaduras, donde las actividades enzimáticas y las proteínas transportadoras de acilos (ACP por *acyl carrier protein*) están localizadas en uno o dos polipéptidos multifuncionales. En cambio, la FAS tipo II (o disociada) se encuentra en procariotas y plantas, donde las enzimas que lo componen están totalmente disociadas. En ambos casos, las cadenas crecientes de acilos están unidas a una pequeña proteína ácida llamada ACP mediante un enlace tioéster.



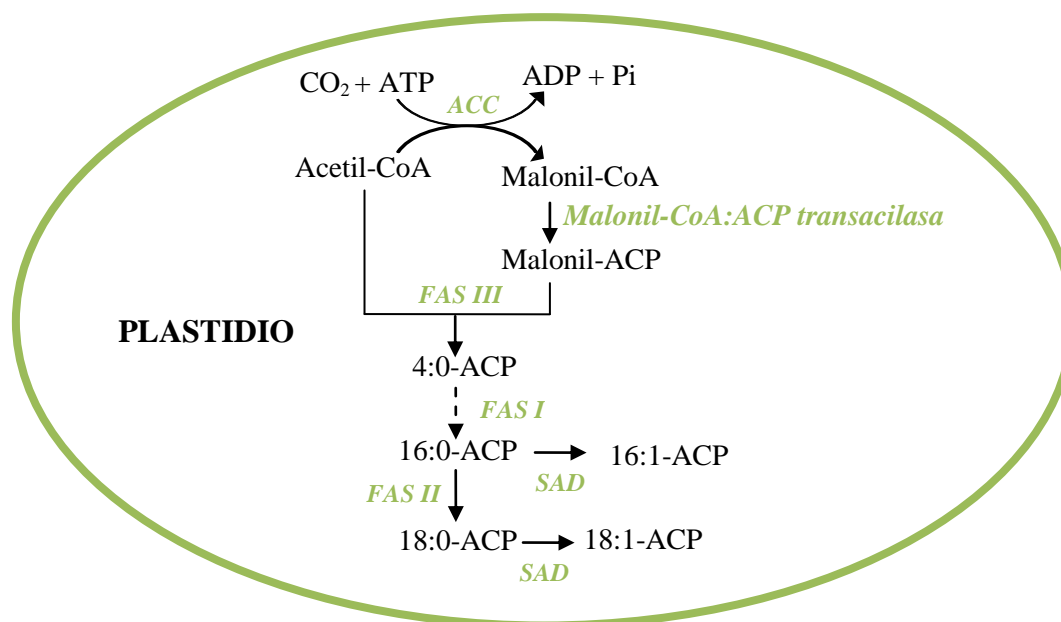


Figura 8. Esquema general de la biosíntesis de ácidos grasos en plastidios de semillas oleaginosas. ACC, acetil-CoA carboxilasa. FAS I, II, III, complejo ácido graso sintasa I, II, III. SAD, estearato desaturasa.

Una vez que la cadena de acil-ACP llega a 16 ó 18 carbonos es sustrato para distintas reacciones en el plastidio. El 18:0-ACP es el sustrato de la estearil-ACP desaturasa (SAD), que introduce un doble enlace en la posición  $\Delta^9$  formando oleil-ACP (18:1-ACP). Ésta es una enzima soluble que se localiza en el estroma del plastidio donde normalmente muestra una elevada actividad (Harwood, 1996).

La biosíntesis intraplastidial de los ácidos grasos termina con la hidrólisis de los acil-ACP, llevada a cabo por las acil-ACP tioesterasas (Fat por *fatty acid thioesterase*) que liberan una molécula de ACP y un ácido graso libre. Estos ácidos grasos libres se exportan fuera del plastidio y son esterificados con coenzima A (CoA) gracias a la acción de las acil-CoA sintetasas. Los acil-CoA formados son intermediarios en numerosos procesos bioquímicos como son la síntesis de los lípidos de membrana, síntesis de lípidos de reserva y la  $\beta$ -oxidación.

### 1.3.1.1 Enzimas que realizan el paso de condensación. Complejo FAS.

La extensión de las cadenas de acilos tiene lugar mediante ciclos de condensación-reducción-deshidratación-reducción, reacciones llevadas a cabo por enzimas que residen en los complejos FAS: sintasa de  $\beta$ -cetoacil-ACP (KAS), reductasa de 3-oxoacil-ACP (KR), deshidratasa de hidroacil-ACP (DH), y reductasa de enoil-ACP (ENR) (Figura 9).

Como ya se ha mencionado, el complejo FAS de plantas es de tipo II. Este tipo de sistema está totalmente dissociado, con cada componente codificado por un gen independiente que cataliza un paso individual de la ruta biosintética.

La condensación se inicia entre las moléculas de malonil-ACP y acetil-CoA. Esta condensación está catalizada por la enzima KAS III (Jaworski et al., 1989), enzima que da nombre al complejo FAS III. Aunque KAS III puede catalizar más reacciones además de ésta (González-Mellado et al., 2010), se considera que la enzima KAS I es la que lleva a cabo la síntesis de cadenas acílicas de 4 a 16 átomos de carbono mediante condensaciones sucesivas de 2 unidades de carbono procedentes del malonil-ACP. Posteriormente, el palmitil-ACP (16:0-ACP) generado sirve como sustrato de la FAS II (KAS II) que dará lugar al estearil-ACP (18:0-ACP), de 18 átomos de carbono..

La expresión de todos estos genes implicados en la síntesis *de novo* de ácidos grasos está estrictamente regulada y sincronizada. En semillas de *Brassica napus*, donde se han estudiado los niveles de expresión, se obtienen las mayores acumulaciones de mensajeros de estos genes entre los 20 y 29 días después de floración (DDF), que coinciden con el periodo de mayor síntesis de ácidos grasos (O'Hara et al., 2002).

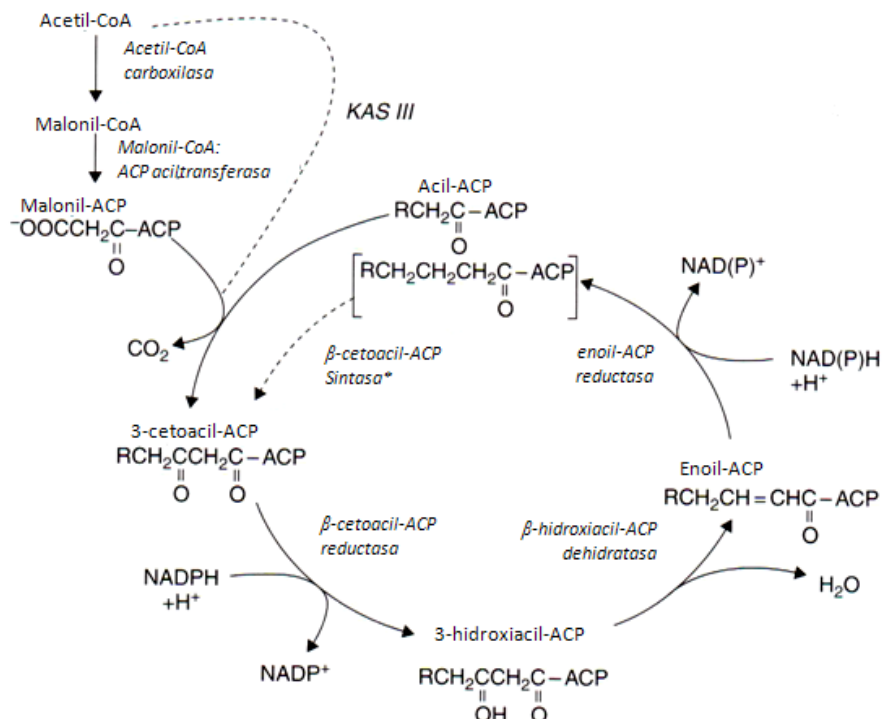


Figura 9. Reacción de la sintasa de ácidos grasos. \*La primera reacción de condensación está catalizada por la enzima β-cetoacil-ACP sintasa III (KAS III) que utiliza acetil-CoA y malonil-ACP como sustratos. Las siguientes reacciones de condensación hasta la síntesis de palmitil-ACP las cataliza KASI. La elongación de palmitil-ACP hasta estearil-ACP lo realiza KAS II. Modificado de Harwood (2005).

### 1.3.1.2 Importancia de las proteínas portadoras de acilos.

Las ACP son esenciales en la síntesis *de novo* de los grupos acilos llevada a cabo por el complejo FAS. Como se ha descrito anteriormente, en plantas encontramos el complejo FAS tipo II, donde las ACP son unas proteínas de pequeño tamaño (~9 kDa), solubles y de naturaleza acídica. Estas proteínas se unen a los grupos acilos durante los procesos de elongación de los mismos como vimos en el apartado 1.3.1.1. (Figura 9). Las ACP presentan dos formas, la forma apo-, que al carecer del grupo prostético es inactiva y la forma activa llamada holo-ACP.

La holo-ACP sintasa (*acpS*) transfiere el grupo 4-fosfopantoténico (4'-PP) desde una molécula de CoA a un residuo de serina de la ACP (Figura 10), produciéndose así la forma ACP activa u holo-ACP.

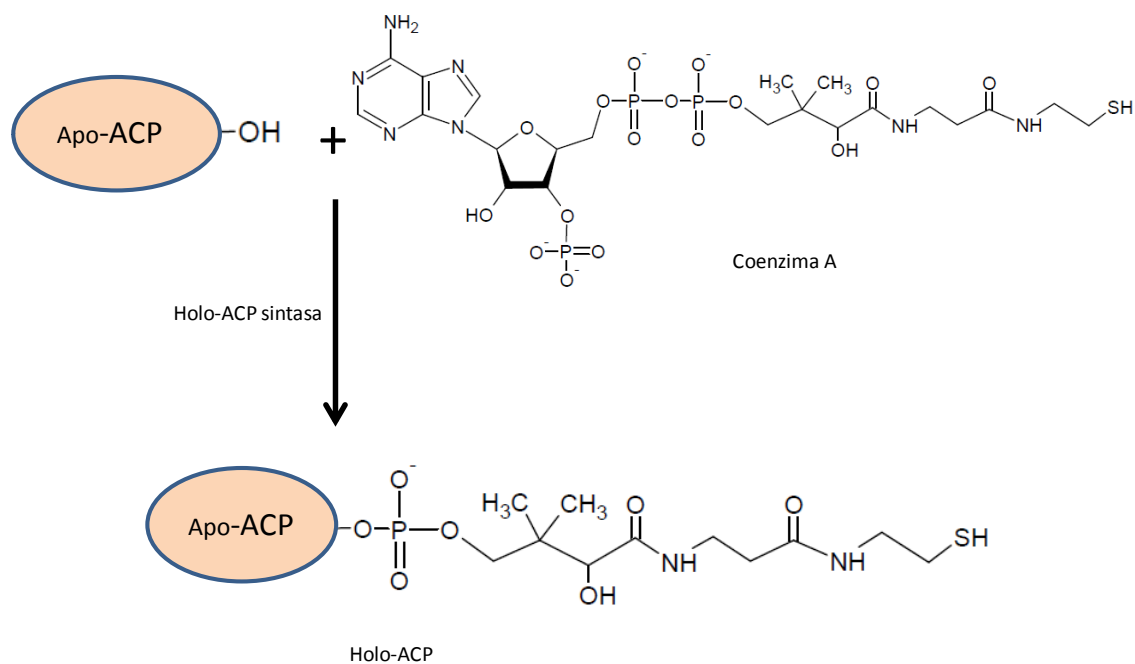


Figura 10. Activación de la apo-ACP a holo-ACP por la acción de la holo-ACP sintasa.

El crecimiento de la cadena de acilo tiene lugar estando esta unida a la molécula de 4'-PP de la holo-ACP mediante un enlace tioéster. Estas moléculas que se denominan acil-ACP actúan como sustrato con una gran variedad de enzimas de esta ruta metabólica como tioesterasas, desaturasas o aciltransferasas. Estudios anteriores han destacado la estabilización que se produce en la molécula de ACP tras la conversión de la forma apo a la holo, permitiendo una mayor flexibilidad de la mismas durante la interacción con las proteínas del complejo FAS (Kim et al., 2006). En bacterias, la ACP se expresa a niveles altos y es codificada por un solo gen (Maiti y Ghosh, 1996; Magnuson et al., 1993), mientras que en plantas se encuentran varias isoformas de estas proteínas, que se expresan de forma diferente en los distintos tejidos de las mismas. Así, en *Arabidopsis*, se han determinado cinco isoformas plastidiales y tres mitocondriales (Mekhedov et al., 2000). En todos los casos las ACP son codificadas por genes nucleares, siendo las proteínas posteriormente transportadas a los plastidios o mitocondrias. Las ACP mitocondriales no están relacionadas con la síntesis de TAG, sino que son necesarias para la síntesis de grupos acilos de tamaño corto o medio esenciales para la síntesis del ácido lipoico (Shintani y Ohlrogge, 1994; Gueguen et al., 2000). Aunque la regulación de estas isoformas aún no está completamente estudiada, hay indicios que apuntan a que estas muestran características específicas dependiendo del fragmento acílico esterificado y de la reacción en la que intervienen (Jyoti et al., 2007; Bonaventure y Ohlrogge, 2002).

### 1.3.1.3 Liberación de ácidos grasos. Acil-ACP tioesterasas.

Las enzimas Fat hidrolizan el enlace tioéster que une los grupos acilos a las holo-ACP en los acil-ACP. Estos grupos acilos quedan liberados para poder ser transportados al citosol y empleados en diferentes rutas metabólicas, entre ellas, la biosíntesis de glicerolípidos (Figura 11). La especificidad de las Fats tiene un papel muy importante en la composición final de los aceites. De ahí que exista interés en la caracterización de las mismas en distintas especies vegetales, para así determinar su especificidad, y la posibilidad de ser modificadas y empleadas en la mejora de plantas oleaginosas.

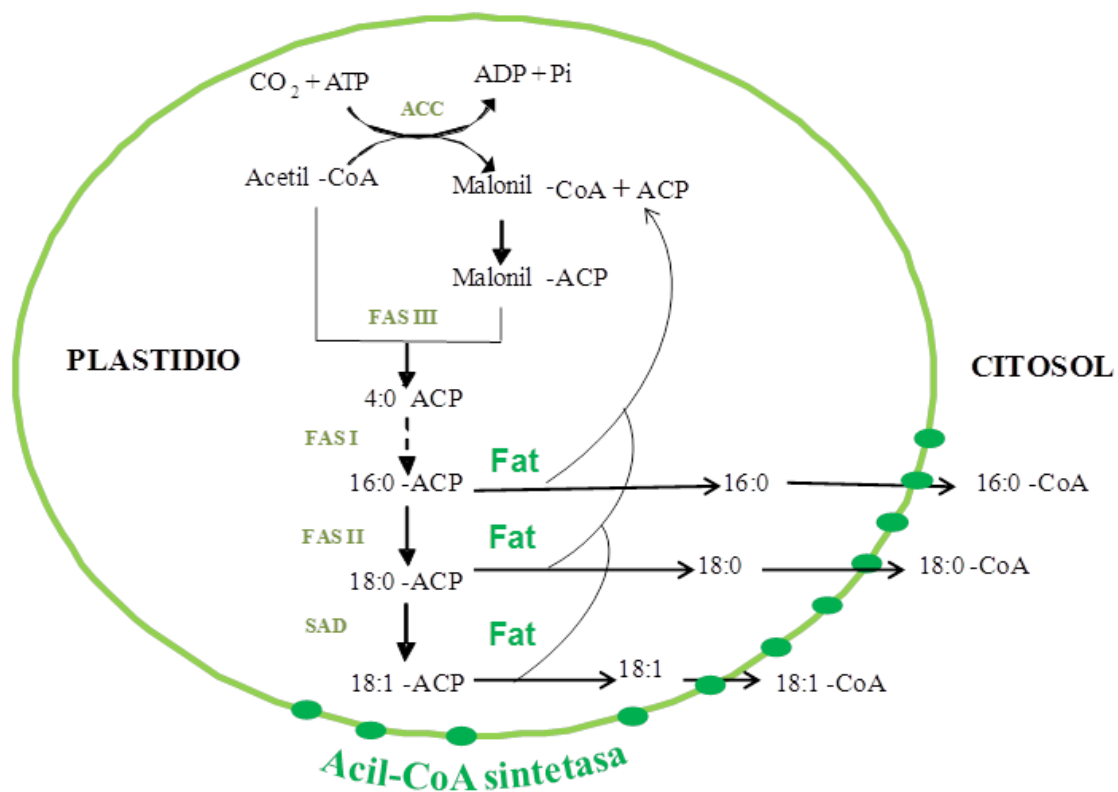


Figura 11. Transporte de los grupos acilos desde el interior del plastidio al citosol. Los grupos acilos son liberados por las tioesterasas (Fat) en el interior del plastidio y activados en la parte externa del plastidio por la acil-CoA sintetasa. ACC, acetil-CoA carboxilasa. FAS, complejo ácido graso sintasa. SAD, estearato desaturasa.

Las Fat son proteínas homodímeras, codificadas por genes nucleares. Se clasifican en dos grupos bien diferenciados en función de su secuencia génica y su especificidad por los distintos acil-ACP: FatA y FatB. Dichos genes son parálogos, derivan de la duplicación de un gen más antiguo (antes de la separación de las distintas familias de plantas), aparentemente del tipo de las FatB (Jones et al., 1995). Las Fat del tipo A (FatA), u oleoil-ACP tioesterasas presentan alta especificidad por 18:1-ACP, y menor por 16:0-ACP y 18:0-ACP, mientras que las del tipo B (FatB) tienen preferencia por ácidos grasos saturados. Dentro de las FatB hay dos grupos llamados FatB1 y FatB2, el primero con especificidad por cadenas de 8 a 14 carbonos (se han encontrado sólo en especies que acumulan ácidos grasos de cadena media), y el segundo con especificidad por cadenas de 14 a 18 carbonos (Jones et al., 1995).

Mientras que los genes FatA están muy conservados en todas las plantas superiores, posiblemente porque el ácido oleico es el precursor de la mayoría de los ácidos grasos encontrados tanto en fosfolípidos como en triglicéridos, los genes de Fat tipo FatB muestran mayores divergencias, con una cierta variabilidad de especificidades de sustrato. Al comparar las secuencias de ambos tipos de Fat podemos distinguir una serie de segmentos con distinto grado de conservación (Figura 12). Ésta estructura se conserva dentro de los dos grupos, existiendo regiones con gran homología entre ambos y regiones más específicas de cada tipo (Facciotti y Yuan, 1998). En la Figura 12 se representan esquemáticamente las distintas regiones encontradas en los dos tipos de enzimas Fat.

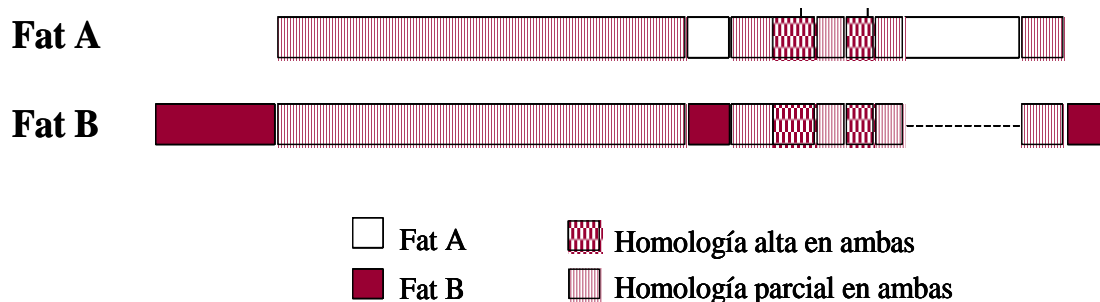


Figura 12. Esquema de las secuencias de tioesterasa de ácidos grasos FatA y FatB, sin el péptido de tránsito. Modificada de Facciotti *et al.* (1998).

Ambas Fat presentan en el extremo amino terminal un péptido de tránsito a los plastidios de aproximadamente unos 60 aminoácidos (aa) (Mayer, 2005) el cual es eliminado una vez transportado al compartimento plastidial. En ambos casos, el péptido es muy variable, dado que su secuencia no afecta a la función.

A continuación del péptido de tránsito, las FatBs tienen una región conservada entre ellas, altamente hidrofóbica, de unos 35 aa. Este dominio está ausente en las FatAs. Tras el péptido de tránsito, ambas Fat presentan una región parcialmente homóloga seguida de una región no homóloga. Posteriormente se localizan 2 cajas muy conservadas entre ambos tipos de proteínas donde encontramos una histidina y una cisteína con papel catalítico (Yuan et al., 1996).

### **1.3.2 Coenzima A y las acil-CoA sintetasas.**

Los ácidos grasos libres producidos por las Fats son rápidamente activados a sus correspondientes acil-CoA por la acil-CoA sintetasa (LACS por *long chain acyl-CoA synthetases*). Los acil-CoA son importantes metabolitos involucrados tanto en rutas biosintéticas, donde actúan como intermediarios donadores de acilos, como degradativas, siendo los principales intermediarios lipídicos de la  $\beta$ -oxidación.

#### **1.3.2.1 El coenzima A.**

El CoA actúa como transportador transitorio de grupos acilos. En su molécula pueden distinguirse partes derivadas de diferentes precursores: adenosin difosfato (ADP), una molécula de ácido pantoténico (Vitamina del grupo B) y un resto de  $\beta$ -aminoetanotiol (Figura 13). Ninguna de ellas participa directamente en su función primaria salvo el  $\beta$ -aminoetanotiol, pero si se eliminan de su estructura el resultado suele ser una drástica reducción de su actividad, por lo que parecen ser importantes en el reconocimiento del cofactor por parte de las distintas enzimas (Kornberg y Pricer, 1953). En la síntesis de este cofactor un grupo hidroxilo del ácido pantoténico se une a una porción del ADP quedando unidos a través de un enlace fosfato-éster. El grupo carboxilo del ácido pantoténico se une finalmente al  $\beta$ -aminoetanotiol por un enlace amida. El grupo tiol de la molécula  $\beta$ -aminoetanotiol será el grupo que reacciona para formar un enlace tioéster con el ácido graso dando lugar al acil-CoA.

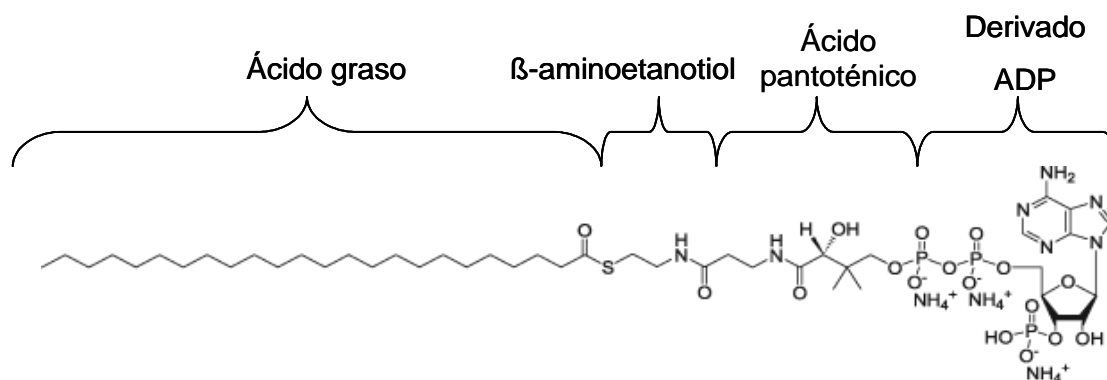


Figura 13. Estructura del lignoceril-CoA. Se muestran las diferentes moléculas que forman la molécula del acil-CoA.

Los acil-CoA son metabolitos necesarios en la biosíntesis de glicerolípidos y TAG, siendo la composición del conjunto de acil-CoA un factor importante a la hora de determinar el perfil de ácidos grasos presentes en los TAG. Además, en la germinación de las semillas, los acil-CoA se ven implicados en procesos degradativos como la  $\beta$ -oxidación, necesarios para suplir las necesidades energéticas del embrión (Goepfert y Poirier, 2007). La  $\beta$ -oxidación en los primeros estadios de la germinación de las semillas, implica la hidrólisis de los TAG, la activación de los grupos acilos a sus correspondientes acil-CoA y la degradación de las cadenas de acil-CoA hasta acetil-CoA, sustrato utilizado como fuente de carbono y producción de energía. El estudio del conjunto de acil-CoA en la germinación también da información acerca de cómo las semillas son capaces de asimilar los diferentes grupos acilos presente en los TAG. La determinación del tamaño y composición del conjunto de acil-CoA es también importante en los estudios de control del flujo de la biosíntesis de ácidos grasos (Ramli et al., 2005).

### 1.3.2.2 Acil-CoA sintetasas de cadena larga.

Las enzimas LACS están incluidas en la superfamilia de las proteínas dependientes de adenosin monofosfato (AMP). La reacción que catalizan implica la esterificación de una molécula de ácido graso con una de CoA libre (Introducción 1.3.2.1), con el correspondiente consumo de una molécula de ATP. El mecanismo de acción está bien definido (Figura 14) y consta de dos etapas; una primera en la que se activa el ácido graso a acil-AMP y otra segunda que corresponde a la acilación del CoA (Schnurr et al., 2002).



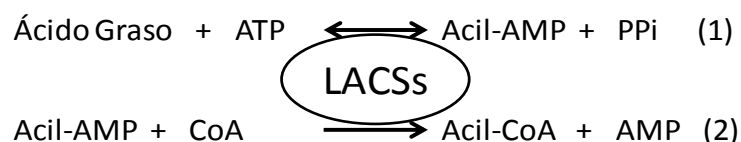


Figura 14. Reacción de activación del grupo acilo por la acil-CoA sintetasa.

En plantas, encontramos varias formas de LACS con localización específica, que participan en diferentes procesos metabólicos. En *Arabidopsis*, se han determinado nueve formas de LACS (Shockey et al., 2002), las cuales han sido bien estudiadas a fin de entender la relación entre su localización y el papel que juegan en el metabolismo vegetal. Las formas *AtLACS6* y *AtLACS7* se localizan en los peroxisomas y su actividad está relacionada con la activación de los ácidos grasos en la  $\beta$ -oxidación, siendo esenciales para la germinación de las semillas en *Arabidopsis* (Fulda et al., 2002; 2004). Las formas *AtLACS1* y *AtLACS2*, las cuales se expresan en diferentes órganos y se localizan en el retículo endoplasmático, están implicadas en la formación de la cutícula (Schnurr et al., 2004; Lu et al., 2009). Al mismo tiempo, las formas *AtLACS1* y *AtLACS4* están involucradas en la síntesis de lípidos específicos en el grano de polen siendo esenciales para la reproducción de las plantas (Jensen et al., 2011). En las semillas de oleaginosas, existe un continuo flujo de acilos desde su lugar de síntesis en el plastidio, hasta el retículo endoplasmático, donde ya en forma de acil-CoA serán empleados por distintas aciltransferasas que catalizarán la incorporación de los ácidos grasos en las tres posiciones de la molécula de glicerol, formando los TAG (Figura 15).

A este respecto, la forma *AtLACS9* presenta unos altos niveles de expresión en semillas durante su desarrollo y está localizada en la membrana del plastidio, siendo la primera candidata a estar involucrada en la activación de los grupos acilos que son exportados desde el interior del plastidio hacia el citosol. Sin embargo, estudios de genética reversa indicaron que esta enzima no era fundamental para síntesis de TAG de reserva, ya que el correspondiente mutante insercional presentó un fenotipo normal. Solamente cuando esta mutación fue combinada con otras, como la correspondiente al gen de la *AtLACS1*, se detectó una merma en la acumulación de aceite, lo que indicó que en este proceso están implicadas varias formas de LACS (Zhao et al., 2010).

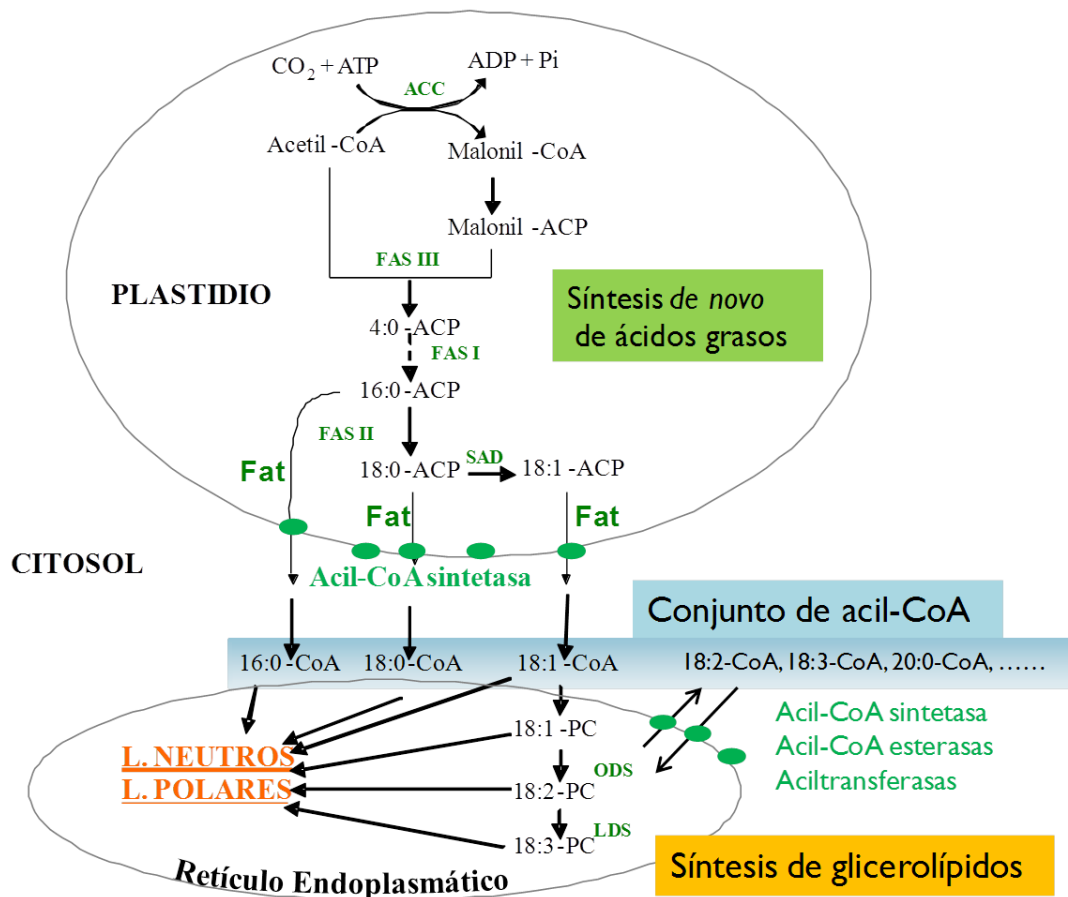


Figura 15. Esquema del transporte de los grupos acilos. Se representa el paso de los grupos acilos que han sido sintetizados en el interior del plastidio hasta el retículo endoplasmático. ACC; acetil-CoA carboxilasa, FAS; complejo ácido graso sintasa, Fat; ácido graso tioesterasa, SAD; estearato desaturasa, ODS; oleil desaturasa, LDS; linoleil desaturasa.

### 1.3.3 Proteínas de unión a los acil-CoA.

Las proteínas de unión a acil-CoA (ACBP por *acyl-CoA binding proteins*) son pequeñas proteínas (10 kDa aproximadamente) presentes en plantas y animales que participan en el transporte de los acil-CoA dentro de la célula, evitando su metabolización por parte de otras enzimas como son las hidrolasas, acetil-CoA carboxilasas o acil-CoA sintetasas (Faergeman et al., 2002; Knudsen et al., 2000; Xiao et al., 2009). Las primeras ACBP se caracterizaron a partir de tejidos cerebrales de ratón, donde se comprobó su efecto de inhibición competitiva sobre las benzodiazepinas, de ahí que se denominaran inicialmente proteínas inhibidoras del diazepam (Guidotti et al., 1983). La primera secuencia genética aislada y clonada de ACBP en plantas fue en *Brassica napus* y *Arabidopsis thaliana*, basada en la similitud entre estas secuencias y la de ACBP en animales (Engeseth et al., 1996, Hills et al., 1994).

A través del análisis genético se determinaron distintas formas de ACBP en plantas. En *Arabidopsis*, la familia de las ACBP está formada por seis miembros, clasificadas desde *AtACBP1* a *AtACBP6* (Figura 16).

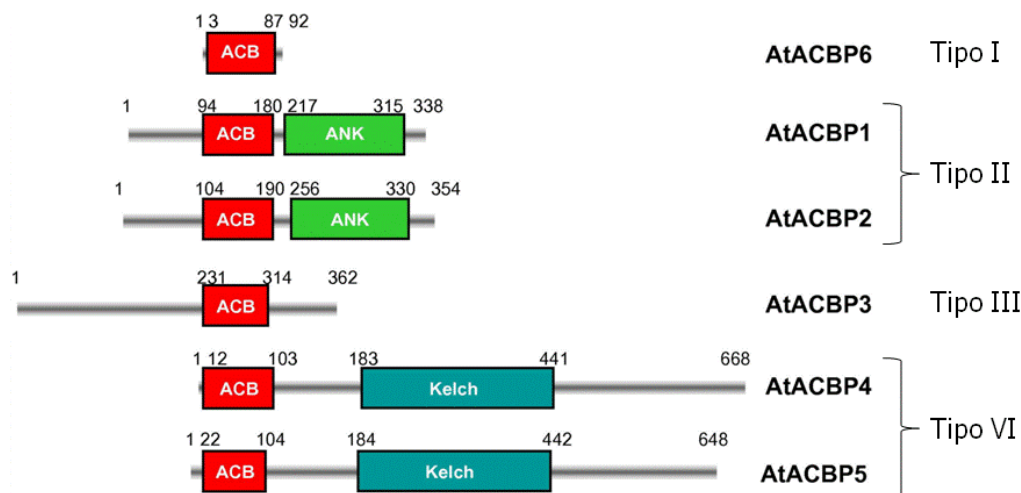


Figura 16. Esquema de las seis secuencias de *AtACBP* según Xiao et al. (2011). En rojo se muestra la zona común de unión al acil-CoA. En verde la zona de unión *ankyrin repeat* y en azul la zona correspondiente a *kelch motif*.

*AtACBP6* es la más pequeña del grupo, se localiza en el citosol y presenta un único dominio (Figura 16, ACB), dominio que es característico en esta familia de proteínas (Chen et al., 2008). *AtACBP1* y *AtACBP2*, con una homología entre ellas del 72 % en sus secuencias aminoacídicas, presentaron un dominio hidrofóbico en el extremo *N*-terminal y cinco dominios transmembrana del tipo *ankyrin repeat* en el extremo *C*-terminal inmediatamente después del dominio de unión a los acil-CoA (Chye et al., 2000, Li et al., 2003). Ambas enzimas han sido localizadas en la membrana plasmática y en el retículo endoplasmático (Chye et al., 1999). *AtACBP3* fue identificada únicamente en el espacio extracelular (Leung et al., 2005), mientras que *AtACBP4* y *AtACBP5*, son las proteínas de mayor tamaño de la familia, y están localizadas en el citosol. *AtACBP4* y *AtACBP5* además del dominio ACB, presentaron cada una cinco dominios del tipo *kelch motifs*. Tanto los *kelch motif* como los motivos *ankyrin*, se han descrito como estructuras de interacción entre las ACBP con otras proteínas (Leung et al., 2004; Li et al., 2004). Estudios anteriores sugirieron que la proteína *AtACBP6*, al estar localizada en el citosol, representa un papel importante en la acumulación de TAG en el desarrollo de las semillas (Hills et al., 1994), sin embargo resultados más recientes indican que además de *AtACBP6*, *AtACBP4* y *AtACBP5*

también se ven involucradas en la transferencia de los grupos acil-CoA desde el plastidio al retículo endoplasmático (Xiao et al., 2011), compartimento celular donde se lleva a cabo la síntesis de TAG. En la Figura 17 se representa la posible localización de las enzimas ACBP.

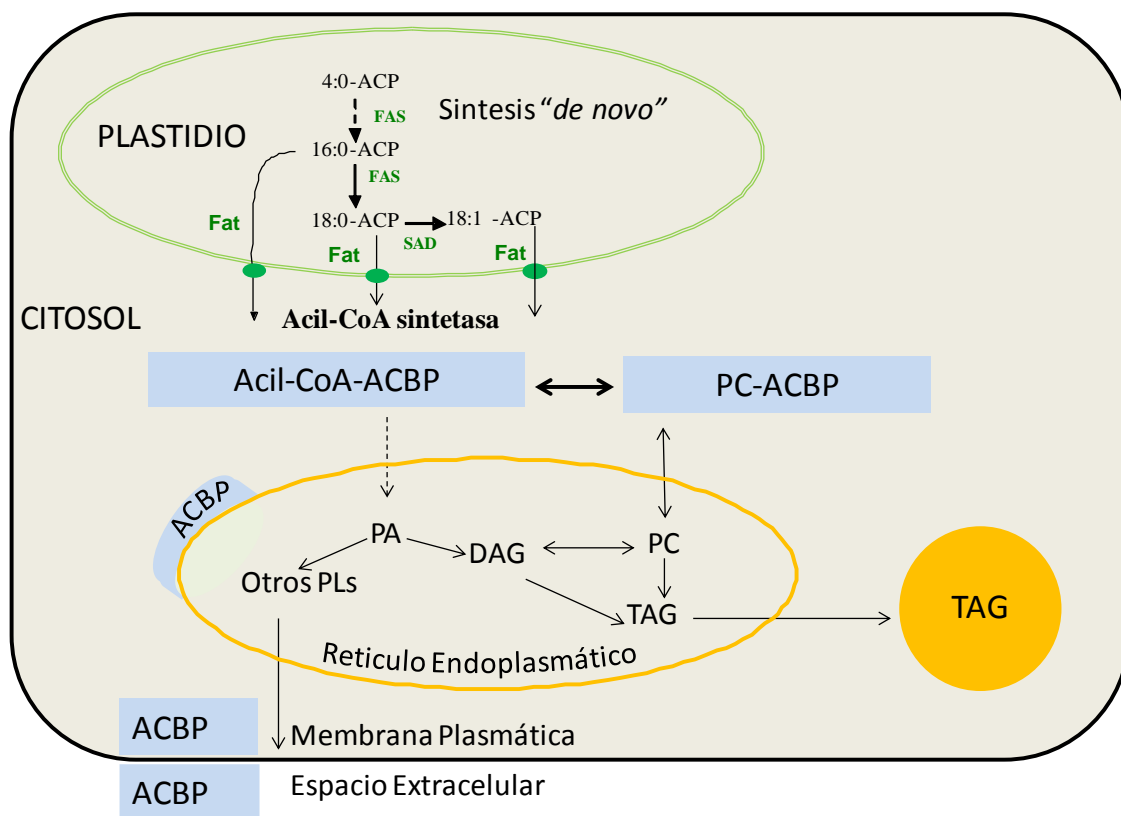


Figura 17. Esquema de la posible localización de las proteínas de unión a los acil-CoA (ACBP) en el interior de la célula. FAS; complejo ácido graso sintasa, Fat; ácido graso tioesterasa, SAD; estearato desaturasa, PA; ácido fosfatídico, PC; fosfatidilcolina, PL; fosfolípidos, DAG; diacilglicéridos, TAG; triacilglicéridos.

### 1.3.4 Biosíntesis de los TAG.

#### 1.3.4.1 Síntesis activa de lípidos de reserva.

Los TAG constituyen la reserva de carbono de las semillas oleaginosas destinada a alimentar al embrión. En la semilla madura, los TAG se encuentran densamente empaquetados formando oleosomas (Murphy et al., 1993; Herman et al., 1994). La acumulación de aceite implica un incremento en el número y tamaño de los oleosomas que consisten en gotas de aceite envueltas por una monocapa de fosfolípidos y proteínas llamadas oleosinas. El 98 % de los lípidos acumulados por la semilla durante su desarrollo son TAG, que se sintetizan en el retículo endoplasmático a través de una ruta que fue dilucidada por primera vez por Kennedy (1961).

En esta ruta están implicadas tres aciltransferasas diferentes y una fosfatidato fosfatasa (Figura 18). En plantas los acilos se transfieren a una molécula de glicerol-3-fosfato. Las aciltransferasas usan acil-CoA como donador de acilos, pero difieren en las especies de acil-CoA que aceptan. Los acilos se van incorporando de forma específica en las tres posiciones, en función de la especificidad de las enzimas que intervienen (Slabas et al., 2001).

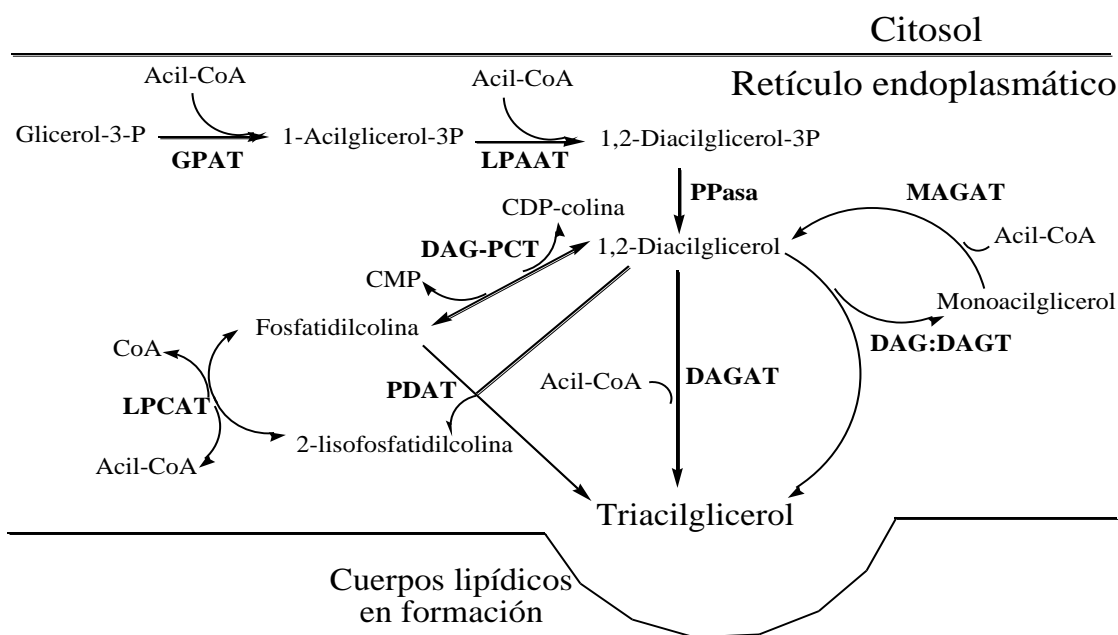


Figura 18. Formación de triacilglicéridos en plantas. DAGAT; diacilglicerol aciltransferasa, DAG:DAGT; diacilglicerol:diacilglicerol transacilasa, DAG-PCT; diacilglicerol fosfatidilcolinatransferasa, GPAT; glicerol 3-fosfato aciltransferasa, LPAAT; lisofosfatidato aciltransferasa, LPCAT; lisofosfatidilcolina aciltransferasa, MAGAT; monoacilglicerol aciltransferasa, PDAT; fosfolípido diacilglicerol aciltransferasa, PPasa; fosfatidato fosfatasa.

#### 1.3.4.2 Reacciones implicadas en la biosíntesis de los TAG.

En el primer paso de la ruta, la enzima acil-CoA: glicerol-3-fosfato aciltransferasa (glicerol 3-fosfato aciltransferasa; GPAT) cataliza la primera reacción de acilación, que sucede en la posición *sn*-1 del glicerol-3-fosfato. En el siguiente paso, la acil-CoA: *sn*-1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa (lisofosfatidato aciltransferasa; LPAAT) cataliza la segunda reacción de acilación, produciendo PA mediante la transferencia de un acilo a la posición *sn*-2. El PA es un importante precursor en la síntesis de lípidos polares y neutros.

La enzima 3-*sn*-fosfatidato fosfohidrolasa (fosfatidato fosfatasa, PPasa) hidroliza el fosfato de la posición *sn*-3 del PA, produciendo una molécula de fosfato inorgánico y otra de diacilglicérido. Esta enzima es importante también en la transducción de señales (Waggoner et al., 1999) y se ha publicado la existencia de varias isoformas en plantas (Carman et al., 1997; Pearce et al., 1998). Las PPasas presentan una clara preferencia por PA con dos ácidos grasos insaturados y sobre aquellas especies del tipo 1-palmitil-2-oleil (Ichihara et al., 1991). Los productos de la PPasa son los DAG, precursores de la mayoría de los lípidos de membrana extracloroplásticos así como de los TAG.

La acil-CoA:1,2-diacilglicerol aciltransferasa (diacilglicerol aciltransferasa, DAGAT) cataliza la última acilación, que se produce en la posición *sn*-3 de los DAG formando los TAG. Un reciente trabajo realizado sobre las semillas de girasol y cártamo (Banás et al., 2013) muestra que la enzima DAGAT en girasol presenta una mayor afinidad sobre 18:2-CoA comparado con 18:1-CoA, mientras que en el cártamo el resultado fue el contrario. El nivel de actividad y la especificidad de esta enzima varía en función de las especies estudiadas.

### **1.3.4.3 Rutas alternativas para la síntesis de triacilglicéridos.**

Durante muchos años se ha mantenido que la única ruta para la biosíntesis de TAG en plantas, animales y microorganismos era la ruta de Kennedy (Introducción 1.3.4.2). Sin embargo, en las dos últimas décadas se han descrito rutas alternativas para la síntesis de TAG.

La primera de éstas fue la de la diacilglicerol:diacilglicerol transacilasa (DAG:DAGT, Figura 18) de la mucosa intestinal en roedores (Lehner et al., 1993). En plantas, los experimentos de marcaje han demostrado que existen reacciones de transacilación entre DAG en microsomas de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) (Stobart et al., 1997), y en semillas de ricino (*Ricinus communis*) en desarrollo (Mancha et al., 1997).

Por otra parte, se ha identificado una fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa (PDAT) en levaduras y plantas (Dahlqvist et al., 2000). Esta enzima cataliza la transferencia del grupo acilo desde la posición *sn*-2 de distintos fosfolípidos (PC y lisofosfatidilcolina) al diacilglicerol, resultando una ruta de síntesis de TAG que difiere de la ruta de Kennedy. Esta enzima utiliza diferentes fosfolípidos como donadores de

acilos y acepta grupos acilos que van desde C10 a C22. Su especificidad es también diferente dependiendo de la especie que se estudie, pudiendo tener un papel importante en la incorporación de ácidos grasos inusuales en las moléculas de TAG de plantas. En el caso de *Arabidopsis* se ha aislado y caracterizado una línea *knock out* para la PDAT (Mhaske et al., 2005). El contenido de TAG y su composición de ácidos grasos no estaban muy afectados en las semillas del mutante, indicando que esta actividad no es la principal responsable en la síntesis de TAG en esta especie.

Ambas enzimas, DAGAT y PDAT, llevan a cabo la acilación de DAG. Estudios realizados sobre las semillas de girasol y cártamo (Banas et al., 2013) mostraron que la relación de actividad de PDAT frente a DAGAT fue significativamente mayor en el caso de las semillas de cártamo que en las de girasol. La diacilglicerol: fosfolina transferasa (DAG-PCT) (Slack et al., 1983) transfiere el grupo polar de la PC a una molécula de DAG, dando lugar a un DAG de composición diferente al primero que puede ser incorporado a la fracción de TAG. Finalmente, el conjunto de acil-CoA presente en la semilla podrían también esterificarse a la lisofosfatidilcolina (LPC), rindiendo una molécula de PC mediante la acción de la acil-CoA: lisofosfatidilcolina aciltransferasas (LPCAT), (Stobart, 1986) y de este modo, incorporarse en la ruta de síntesis de TAG.

### **1.3.5 Modificación de los grupos acilos como intermediarios de la síntesis de TAG.**

En muchas semillas oleaginosas, algunos ácidos grasos sintetizados *de novo* no intervienen inmediatamente en la formación de los TAG. Estos ácidos grasos pueden sufrir desaturaciones u otras modificaciones y pasar, posteriormente, a formar parte de TAG, fosfolípidos, ceras, esfingolípidos, etc, a través de varios mecanismos. Así, la oleil-PC desaturasa (ODS) o  $\Delta^{12}$  desaturasa es la enzima responsable de la conversión del ácido oleico a ácido linoleico. Es una enzima de localización microsomal (Dubacq et al., 1976) y de gran importancia, ya que este ácido graso es esencial para la mayoría de organismos superiores.

A diferencia de la SAD, la ODS no desatura acil-ACP sino ácidos grasos unidos a lípidos polares, es una acil-lípido desaturasa (Murata et al., 1995). En semillas de cártamo se observó que el oleil-CoA (18:1-CoA) se incorpora a la PC, ocurriendo posteriormente su desaturación, de manera que el linoleato aparece unido a la PC antes que a cualquier otro lípido analizado (Stymne et al., 1978). Así pues, la LPCAT es la enzima responsable de la transferencia del 18:1-CoA a la posición *sn*-2 de la PC (Figura 19). El producto principal de esta reacción es el 1-acil-2-oleil-PC, que es el sustrato de la ODS, existiendo un acoplamiento funcional entre estas dos enzimas (Murphy et al., 1985).

El linoleil-CoA (18:2-CoA) recién formado pasa al conjunto de acil-CoA mediante un intercambio de acilos catalizado por las propias aciltransferasas, y a partir de ahí puede entrar en las rutas biosintéticas anteriormente descritas. El intercambio de acilos entre acil-CoA y PC juega un papel determinante en el número de insaturaciones presentes en los ácidos grasos que componen el aceite final (Stobart et al., 1983).

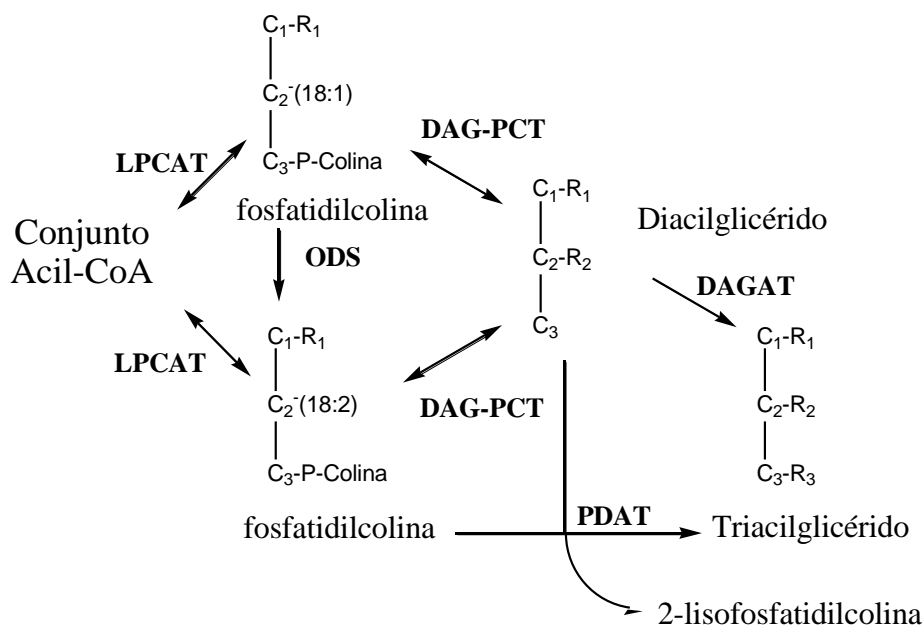


Figura 19. Formación de triacilglicéridos y su relación con la fosfatidilcolina. DAGAT; diacilglicerol aciltransferasa, DAG-PCT; diacilglicerol fosfatidilcolinatransferasa, LPCAT; lisofosfatidilcolina aciltransferasa, ODS,oleato desaturasa; PDAT; fosfolípido diacilglicerol aciltransferasa.



El ácido linolénico ( $18:3\Delta^{9c,12c,15c}$ ) es muy abundante en la naturaleza, por ser el principal componente de las membranas tilacoidales de los cloroplastos, representando el 65 % de los lípidos de la hoja. La síntesis del 18:3 la llevan a cabo las  $\Delta^{15}$  desaturasas mediante la introducción de un tercer doble enlace al 18:2. Esta enzima está unida a membrana y se ha comprobado que existen dos sustratos diferentes en función de la localización de la isoenzima: linoleil-PC (cuando se encuentra en las membranas del retículo endoplasmático, como la ODS), y linoleil-MGDG (monogalactosil diglicérido) en las envueltas cloroplásticas.

Por último, los ácidos grasos pueden ser también elongados hasta tener más de 20 átomos de carbono, formando los denominados ácidos grasos de cadena muy larga. Normalmente, éstos se encuentran formando parte de los lípidos de superficie de las plantas, aunque hay algunas semillas oleaginosas que los acumulan en su aceite. Las enzimas que los sintetizan son las elongasas y están presentes en el retículo endoplasmático (Barrett et al., 1998).

## **1.4 UTILIZACIÓN DE LA RESERVA LIPÍDICA EN LA GERMINACIÓN.**

Durante la germinación de las semillas oleaginosas se produce la degradación de los lípidos de reserva acumulados durante el desarrollo de las mismas y la síntesis de nuevos lípidos, fundamentalmente glicerofosfolípidos y galactolípidos (para formar membranas celulares) y en menor medida TAG (Harwood, 1975; Wilson et al., 1986). Las lipasas son las encargadas de degradación de los TAG que están almacenados en los oleosomas (Figura 20). La especificidad en la degradación de sustratos por las lipasas se ha estudiado en diferentes especies de plantas y existe cierta controversia, en cuanto a la hidrólisis de las distintas especies moleculares de los TAG durante la germinación.

Estudios llevados a cabo con la especie *Pinus edulis* parecen indicar que las lipasas son inespecíficas para las especies de TAG durante la germinación (Hammer et al., 1994). Sin embargo, en otras especies como *Glycine max* (Yoshida, 1984), *Zea mays* (Lin et al., 1986) o *Brassica napus* (Hills et al., 1988), se ha visto que hay especies moleculares que son hidrolizadas preferentemente debido a cierta especificidad de sustrato de estas enzimas. Así, en girasol se han observado dos fases diferentes, una inicial con alta actividad catalítica y preferencia por moléculas de TAG con al menos dos ácidos oleicos; y una segunda, con menor tasa de degradación por moléculas con dos ácidos grasos saturados acompañadas por un ácido oleico (Fernández-Moya et al., 2000).

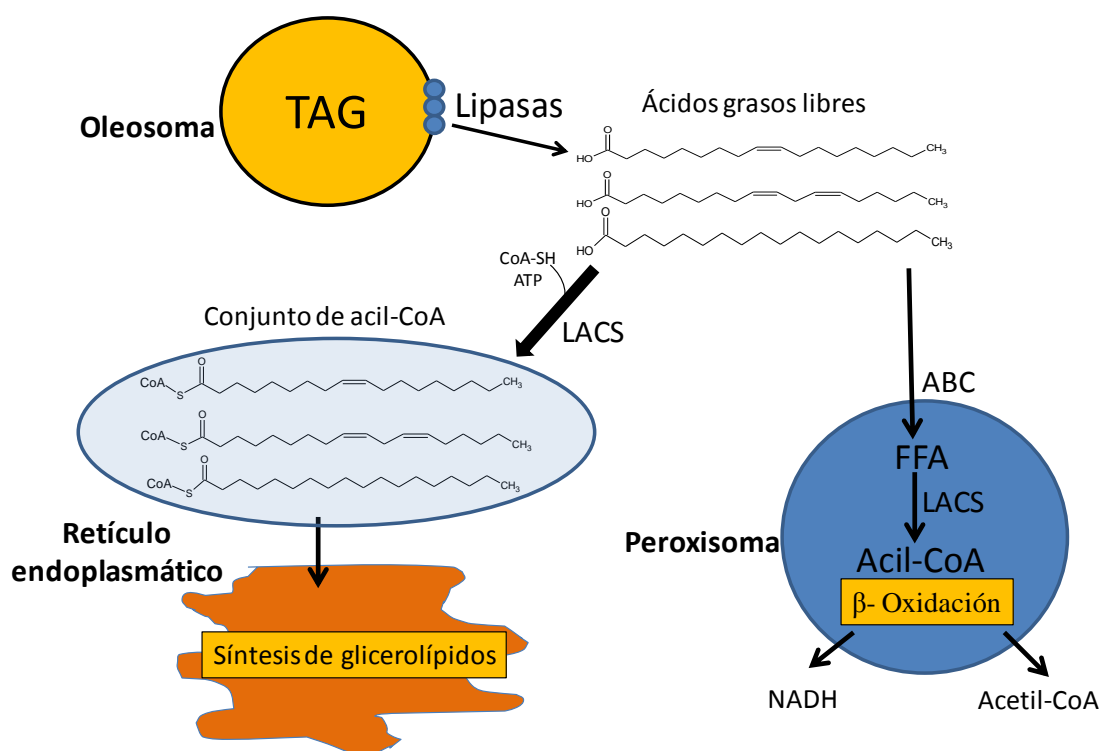


Figura 20. Acción de la acil-CoA sintetasa sobre los grupos acilos liberados de los oleosomas antes de ser dirigidos al retículo endoplasmático para la síntesis de glicerolípidos. Los ácidos grasos libres pueden entrar en el peroxisoma y son activados a acil-CoA donde son sustratos en la ruta de la β-oxidación. TAG; triacilglicéridos, ABC; *ATP-binding cassette transporter*, FFA; ácidos grasos libres, LACS; acil-CoA sintetasa.

Los grupos acilos son transportados a los peroxisomas y activados a sus correspondientes acil-CoA entrando en la ruta β-oxidativa con la correspondiente producción final de energía en forma de ATP, o bien, activados a acil-CoA en el citosol y dirigidos al retículo endoplasmático donde se llevará a cabo la síntesis de moléculas necesarias en el desarrollo de la planta (Graham, 2008) (Figura 20).

## **II. OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

La Tesis Doctoral se enmarca dentro de la caracterización de la ruta biosintética de ácidos grasos en semillas de girasol, que el Grupo de Genética y Bioquímica de Lípidos de Semillas del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Productos Vegetales del Instituto de la Grasa está llevando a cabo desde el año 1995. Los objetivos que se proponen son los siguientes:

- Primero:* Purificación y clonación de los genes que codifican a las holo-ACP de girasol implicadas en la síntesis de aceite.
- Segundo:* Caracterización bioquímica de las actividades acil-ACP tioesterasa empleando las diferentes isoformas de ACP de girasol.
- Tercero:* Estudios de localización de acil-ACP tioesterasas de girasol.
- Cuarto:* Purificación, clonación, localización y caracterización de las acil-CoA sintetasas de cadena larga (LACS) en semillas girasol.
- Quinto:* Estudio de la familia de proteínas de unión a los acil-CoA (ACBP) en semillas de girasol.
- Sexto:* Análisis del conjunto de acil-CoA en la formación de las semillas, desarrollo del cotiledón y hoja en diferentes líneas de girasol.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**





### 3.1 ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

#### 3.1.1 *Escherichia coli*.

##### 3.1.1.1 Estirpes de *E. coli* utilizadas.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han empleado tres cepas de *E. coli*, tanto para clonar como expresar los distintos genes objeto de estudio. Dichas células, así como sus genotipos, vienen descritos en la Tabla 7.

Cepa	Descripción
BL21 (DE3)pLysS	F- <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) dcm galλ(DE3)</i> Cepa de expresión para los vectores (Novagen).
XL1-Blue MRF'	D( <i>mcrA</i> )183D( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac<sup>q</sup></i> IZDM15 Tn10] ( <i>Tet<sup>r</sup></i> )
K27	F-, <i>tyrT58(AS)?, fadD88, mel-1</i>

Tabla 7. Estirpes de *E. coli* empleadas en este trabajo.

##### 3.1.1.2 Cultivo de *E. coli* en medio líquido y sólido.

Los cultivos líquidos de *Escherichia coli* se realizaron en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al. 1989), cuya composición fue: 10 g/l NaCl, 10 g/l triptona y 5 g/l extracto de levadural. El pH del medio se ajustó a un valor de 7,0 y se esterilizó en autoclave a 120 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 min.

Los antibióticos, esterilizados por filtración, se añadieron al medio de cultivo cuando fue preciso a las concentraciones siguientes: ampicilina (100 µg/ml), cloranfenicol (25 µg/ml), kanamicina (100 µg/ml) y gentamicina (50 µg/ml).

Los inóculos líquidos, se realizaron en tubos de 15 ml que contenían 3 ml de medio, incubándose durante 15 h a 37 °C y agitación continua a 220 rpm.

Para el cultivo en medio sólido se utilizó el mismo medio LB descrito antes, solidificado con agar de grado bacteriológico al 1,5 % (p/v). Los antibióticos, se incorporaban a partir de una disolución concentrada esterilizada por filtración que se añadía aproximadamente a 55 °C, justo antes de extender el medio en placas de Petri.

### 3.1.2 *Agrobacterium tumefaciens*.

Durante el desarrollo de este trabajo se ha utilizado la cepa GV3101/pMP90 de *A. tumefaciens* (Koncz y Schell, 1986), la cual se empleó en los procesos de agroinfiltración en plantas de tabaco (*N. benthamiana*) (Tabla 8).

Estirpe	Genotipo	Compañía
GV3101/pMP90	rpoH+ hrcA+	Invitrogen, California

Tabla 8. Estirpe de *A. tumefaciens* usada en este trabajo.

#### 3.1.2.1 Condiciones de cultivo.

El *Agrobacterium tumefaciens* se incubó a 28 °C durante 16 h. Los cultivos en medio sólidos crecieron en placas de Petri, mientras que los cultivos líquidos lo hacían en tubos o matraces erlenmeyer estériles con agitación continua en incubadores orbitales a 200 rpm. En este caso se utilizaron los antibióticos gentamicina (50 µg/ml) y kanamicina (100 µg/ml), los medios de cultivo fueron los descritos para *E. coli* en el apartado 3.1.1.2 de Materiales y Métodos.

### 3.1.3 Girasol (*Helianthus annuus*).

#### 3.1.3.1 Líneas empleadas.

En el presente trabajo se emplearon diferentes líneas de girasol (*Helianthus annuus* L.) anteriormente descritas en el apartado de Introducción 1.1.6. La línea empleada como control fue CAS-6, que presenta un perfil estándar de ácidos grasos. CAS-3 es una línea mutante con alto contenido en ácido esteárico, 26 % (Tabla 3), que contrasta con el 6-8 % que suele encontrarse en la línea control. La Línea CAS-5 presenta un fenotipo alto palmítico, con contenido de dicho ácido graso del 30 % (Osorio et al. 1995). La línea CAS-9, es una línea alto oleico, y por tanto, presenta contenidos elevados de ácido oleico y bajos de ácido linoleico (<5 %).

Todos estos mutantes se desarrollaron en distintos programas de mutagénesis que se han llevado conjuntamente en el Instituto de la Grasa (IG-CSIC, Sevilla) y el Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC, Córdoba).

### **3.1.3.2 Condiciones de cultivo.**

Las semillas se sometieron a un tratamiento de higienización por agitación durante unos 5 min en una solución de lejía al 50 % con unas gotas de Tritón X-100. Se aclararon a continuación con agua y se germinaron en placas de Petri con perlita expandida húmeda en condiciones de oscuridad y a 25 °C durante los primeros dos días. Posteriormente, se pasaron a macetas pequeñas con turba húmeda donde continuó el crecimiento y tras dos semanas, se trasplantaron a macetas de 2 litros de turba.

Las plantas se crecieron en cámaras de cultivo con temperatura y fotoperiodo controlado. La iluminación se realizó con tubos fluorescentes que produjeron una densidad de flujo de fotones de 300  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. La temperatura de crecimiento fue de 25 °C/15 °C (día/noche). El riego en las cámaras se realizó de forma automática tres veces al día y el abonado mediante fertirrigación dos veces por semana.

### **3.1.4 Tabaco (*Nicotiana benthamiana*).**

Las semillas de tabaco fueron germinadas en macetas pequeñas con turba húmeda. Tras dos semanas, se trasplantaron a macetas de 2 litros de turba. El crecimiento de las plantas se llevó a cabo en cámaras de cultivo con temperatura y fotoperiodo controlado en condiciones similares a las descritas en el apartado 3.1.3.2 de Materiales y Métodos.

## **3.2 MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.**

### **3.2.1 Aislamiento del ARNm.**

Aproximadamente 0,1 g de tejido fue congelado en N<sub>2</sub> líquido y triturando en un mortero con una maza estéril hasta la formación de un polvo fino. El ARN total fue aislado usando el kit comercial Spectrum Plant Total RNA (Sigma-Aldrich, Alemania).

A partir de este ARN total y utilizando el Kit GenElute mRNA Minipre (Sigma-Aldrich, Alemania) se realizó la extracción del ARNm, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm obtenido se resuspendió finalmente en 33µl de solución TE (10 mM Bis(Hidroximetil)aminometano-TrisHCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) libre de ARNasa, y se guardó a -80 °C.

### **3.2.2 Síntesis de ADNc a partir de ARNm.**

La síntesis de ADNc a partir del ARNm extraído, tal y como se indica en el apartado 3.2.1 de los Materiales y Métodos, se realizó con el kit Ready-To-Go™ T-Primed First-Strand de Amersham Biosciences (EEUU). Este kit utiliza la retrotranscriptasa del virus “Moloney Murine Leukemia Virus” (M-MuLV) y un cebador oligo(dT) para generar la primera cadena de ADNc (3'RACE). Después de la primera síntesis de ADNc, el molde está listo para realizar las diferentes reacciones de PCR. El cebador utilizado incorpora a su vez una secuencia que contiene una diana de restricción NotI-(dT)<sub>18</sub>.

### 3.2.3 Transformación genética.

#### 3.2.3.1 Preparación de células competentes de *E. coli* para transformación mediante choque térmico.

El método seguido fue el descrito por Sambrook et al., (1989). Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron BL21 (DH5- $\alpha$ ), K27 y XL1-Blue. Para su preparación se siguió el protocolo siguiente:

Las células se cultivaron a 37 °C en medio LB sólido durante la noche. Pasado este tiempo se usó una sola colonia para preinocular 5 ml de medio LB y se cultivó en agitación continua a 37 °C hasta que la densidad óptica del cultivo ( $DO_{600}$ ) fue 0,3 (3 h aproximadamente). El preinóculo se añadió a 100 ml de LB precalentado a 37 °C en un matraz de 500 ml con una  $DO_{600}$  inicial de 0,015. Este se incubó a 37 °C en agitación (200 rpm) hasta que la  $DO_{600}$  fue de 0,48. A continuación el cultivo se enfrió 10 min en hielo, se transfirió a tubos de centrifuga previamente enfriados en hielo, y se centrifugó durante 5 min a 4 °C y a 3.000 rpm, en una centrífuga Sorvall (modelo RC5C). Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en 30 ml de solución TjBI (100 mM RbCl, 50 mM  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 30 mM AcK, 10 mM  $CaCl_2$ , 15 % glicerol; ajustado a pH 5,8 con acético 0,2 M y esterilizado por filtración) previamente enfriada. Las células se mantuvieron en hielo durante 10 min, se sedimentaron y se resuspendieron en TjBII (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM  $Cl_2Ca$ , 15 % glicerol; ajustado a pH 7,0 con NaOH, esterilizado por filtración) previamente enfriado en hielo. Finalmente las células se distribuyeron en alícuotas de 200  $\mu$ l, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

#### 3.2.3.2 Transformación de *E. coli* mediante choque térmico.

El método utilizado para la transformación fue el descrito por Sambrook et al., (1989). La transformación de células competentes por choque térmico se realizó añadiendo el ADN en un volumen máximo de 10  $\mu$ l a 200  $\mu$ l de la suspensión celular ( $10^5$  a  $10^6$  células transformantes por microgramo de plasmido), previamente descongelada (Materiales y Métodos 3.2.3.1). Tras 20 min de incubación en hielo, se sometían a un choque térmico a 42 °C durante 100 s y, posteriormente, se mantenían durante 3 min en hielo. Después se añadía 700  $\mu$ l de medio LB y se incubaba a 37 °C, con agitación, durante 1 h. Finalmente, las células se centrifugaban en una centrífuga para

tubos eppendorf Spectrafuge™ Mini Centrifuge (Labnet international, EEUU) a 8.000 rpm, durante 30 s y tras eliminar la mayor parte del sobrenadante, se sembraron en placas de Petri con medio LB con los antibióticos apropiados. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 10 - 12 h.

### **3.2.3.3 Preparación de células competentes de *Agrobacterium*.**

El método seguido fue el descrito por An y Ha (1988). La cepa de *A. tumefaciens* utilizada fue GV3101/pMP90. Para su preparación se siguió el siguiente protocolo:

Las células se cultivaron a 28 °C en medio LB sólido suplementado con gentamicina (50 µg/ml) y kanamicina (100 µg/ml) durante 16 h. A continuación se preparó un cultivo de 5 ml de medio LB a partir de una sola colonia, y se creció con agitación continua de 200 rpm a 28 °C durante otras 16 h. Transcurrido este tiempo, se inocularon 50 ml de medio LB con 2 ml del cultivo resultante y se incubó con agitación continua de 200 rpm a 28 °C hasta que la DO<sub>600</sub> alcanzó un valor de 0,5. A continuación, el cultivo se enfrió durante 10 min en hielo, posteriormente se transfirió a tubos de centrifuga Sorvall RC5C (Termo scientific, Massachussets) y se centrifugó a 3.000 x g, a 4 °C durante 5 min. Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y las células precipitadas se resuspendieron en 1 ml de disolución 20 mM CaCl<sub>2</sub> previamente enfriada en hielo. Finalmente las células se distribuyeron en alícuotas de 100 µl y se congelaron en N<sub>2</sub> líquido. Dichas alícuotas se conservaron a -80°C.

### **3.2.3.4 Transformación de *Agrobacterium* mediante choque térmico.**

El método utilizado para la transformación fue descrito por An y Ha (1988). La mezcla de ligación (Materiales y Métodos 3.2.10) que contenía el fragmento de ADN ligado al plasmido pSa13 (cedido por la profesora Mee-Len Chye, Universidad de Hong Kong), se añadió sobre 100 µl de células competentes previamente descongeladas en hielo. Las células se mantuvieron 5 min en hielo y pasado este tiempo se las sometió a un choque térmico durante 5 min en N<sub>2</sub> líquido, seguido de una incubación a 37 °C en un baño de agua durante 5 min. A continuación se añadió 1 ml de medio LB líquido y se incubaron a 28 °C durante 2-3 h con agitación continua, de manera que las bacterias pudiesen expresar los genes de resistencia a antibióticos. Transcurrido este tiempo, el cultivo se centrifugó durante 30 s, se descartó el sobrenadante y las células precipitadas

se resuspendieron en 100  $\mu$ l de medio líquido LB. Finalmente, estas se inocularon sobre medio sólido LB suplementado con kanamicina (50  $\mu$ g/ml) y se incubaron a 28 °C durante 2-3 días.

### **3.2.4 Aislamiento de plásmidos de *E. coli* a pequeña escala.**

Las preparaciones de plásmidos de *E. coli* a pequeña escala se obtuvieron aplicando un procedimiento de purificación por lisis alcalina, según una modificación del protocolo de Towner (1991). Un volumen de cultivo de células de unos 3 ml, crecido toda la noche a 37 °C, se centrifugó 2 min a 8.000 x g, transvasándose las células resultantes a tubos de 1,5 ml. La extracción de ADN plasmídico se llevaba a cabo con el Kit SpinClean Plasmid Miniprep de Mbiotech (EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.2.5 Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR.**

#### **3.2.5.1 Amplificación rápida de los extremos del ADNc.**

Para amplificar el extremo 5' de las secuencias no conocidas de los diferentes genes clonados en este trabajo, se utilizó el Smart<sup>TM</sup>-RACE DNAc Amplification kit (Clontech, Japón). La extracción de ARNm se realizó como se describe en el apartado 3.2.1 de los Materiales y Métodos. Tras la síntesis de la primera cadena de ADNc siguiendo las instrucciones del kit, se realizó una reacción de PCR utilizando 5  $\mu$ l del tampón BD Advantage 2 PCR 10X, dNTPs en una concentración final de 0,2 mM para cada uno, 1  $\mu$ l de BD Advantage 2 Polimerasa Mix 50X y 5  $\mu$ l de la mezcla de cebadores universal (UPM, Universal Primer Mix, Tabla 9) 10X, suministrados por el kit. El oligonucleótido específico de cada gen se añadió hasta una concentración 0,2  $\mu$ M, estando diseñado a partir del extremo 3' de la secuencia conocida. La reacción se llevó a cabo en 25 ciclos que incluyeron una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, una etapa de alineamiento a 68 °C durante 30 s y una última etapa de extensión a 72 °C durante 3 min. Con los fragmentos amplificados se llevaron a cabo segundas reacciones de PCR aplicando 20 ciclos en las mismas condiciones pero con los cebadores NUP 10X (Nested Universal Primer, del Kit de Smart<sup>TM</sup>-RACE) y otro oligonucleótido de cada gen que se habían diseñado más cerca al extremo 5' de la secuencia conocida (Tabla 9).

La zona 3' no conocida de los diferentes genes se amplificó utilizando el oligonucleótido FA2Z y otro oligonucleótido específico diseñado a partir de la secuencia conocida del gen en estudio. Las condiciones de PCR fueron las descritas en el párrafo anterior para la amplificación del extremo 5'.

Oligonucleótidos	Secuencia
FA2Z	5'-AACTGGAAGAATTCGCGG-3'
NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
UPM (largo)	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGT ATCAACGCAGAGT-3'
UPM (corto)	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
<i>HaACP3-5rac 1</i>	5'-CGGTTGAGATTGTGATGGGACTGGAAG-3'
<i>HaACP3-5rac 2</i>	5'-GAGCATTGCAACCGTTCAGGATGCAGC-3'
<i>HaLACS2-3rac</i>	5'-ACCGGGGACATCGGTAGGTTTC-3'
<i>HaACBP1-5rac 1</i>	5'-CTTCACAAGCAGCTCGGCTATGTG-3'
<i>HaACBP1-5rac 2</i>	5'-CACAGGAATGCCAGCCTCGACAC-3'
<i>HaACBP4-3rac 1</i>	5'-CAGACCCTGTTGTAGATGTAGAGATG-3'
<i>HaACBP4-3rac 2</i>	5'-CCCACGTCCAAAGCCCCGATACG-3'

Tabla 9. Secuencias de oligonucleótidos empleados en la amplificación de secuencias 5' y 3' no conocidas. *HaACP* (proteínas de unión a los grupos acilos), *HaLACS* (acil CoA sintetasa), *HaACBP* (proteínas de unión a los acil-CoA).

### 3.2.5.2 Diseño de cebadores.

El diseño se llevó a cabo siguiendo los siguientes requisitos: la longitud de los oligonucleótidos estuvo entre 18 y 25 pares de bases (pb), su contenido G+C fue mayor o igual al 50 %, la temperatura de hibridación (Tm) fue igual o menor a 72 °C [ $T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$ ] y se diseñaron conteniendo en todos los casos una G o una C en la posición 3' terminal. Mediante un programa de predicción creado por Premier Biosoft (<http://www.premierbiosoft.com/>) se analizaron estos cebadores para que no formaran estructuras secundarias y que no hibridaran entre sí los que se fueran a utilizar en una misma reacción.



Los oligonucleótidos de secuencia específica para los genes estudiados en esta tesis, se diseñaron a partir de las secuencias nucleotídicas conocidas de los mismos (Tabla 10). Todos los cebadores fueron sintetizados por Eurofins MWG Operon (Alemania).

Oligonucleótidos	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
<i>HaACP-1</i> (noPS) <sup>*</sup>	5'-CCGGATCCATGGCCAAGCCAGAGAC-3'	252
<i>HaACP1e-R</i>	5'-CGCTCGAGTTACGCAGAGTC-3'	
<i>HaACP-2</i> (noPS) <sup>*</sup>	5'-CCGGATCCATGGCCAAACCAGAACAG-3'	252
<i>HaACP2e-R</i>	5'-CCCTCGAGTTACGCACTGTCTTTC-3'	
<i>HaACP-3</i> (noPS) <sup>*</sup>	5'-CCGGATCCATGGCGACACCTGAGACGG-3'	246
<i>HaACP3e-R</i>	5'-CCCTCGAGTTATTTTTTCGAAACGAGC-3'	
LACS-1F-Hist	5'-TAGGATCCATGAGTGCATATGTAGTTG-3'	2098
LACS-1-R	5'-GGTACCTCAATCAAGAAAGATAAACTTT-3'	
LACS-2F-Hist	5'-TAGGATCCATGGATGTTGGGGGATC-3'	2136
LACS-2-R	5'-GGTACCTTAACCATATAGCATTGCAAAT-3'	
ACBP1pQ80-F <sup>*</sup>	5'-GCGCATGCATGTTTCGAGATCAAAATCTC-3'	960
ACBP1pQ80-R	5'-AAGGTACCTCAAAGAGAGGGGCGCC-3'	
ACBP4pQ80-F	5'-AAGGTACCATGGCGATGGCGAGAGC-3'	1989
ACBP4pQ80-R	5'-ACGGTACCTTAAGTATCATGGGTAGGAGG-3'	
ACBP6pQ80-F	5'-ACGAGCTCATGGGTTTGAAGGAGGACTTT-3'	273
ACBP6pQ80-R	5'-AACCCGGGTCAAGCAGCGGCAG-3'	
acpS-F(Hist)	5'-GACGCATGCGCAATATTAGGTTTAGGCAC-3'	381
acpS-R	5'-GTCAAGCTTAACTTTCAATAATTACCGTGG-3'	

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de secuencias completas de los genes clonados en el presente trabajo. *HaACP* (proteínas de unión a los grupos acilos), *LACS* (acil CoA sintetasa), *ACBP* (proteínas de unión a los acil-CoA), *acpS* (holo-ACP sintetasa). (<sup>\*</sup>)Se eliminó el péptido de tránsito para la expresión de la proteína.

### 3.2.5.3 Condiciones de amplificación.

A) Reacción estándar: Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador TGradient de Bio-Rad (EEUU). La reacción tuvo un volumen final de 50  $\mu$ l que contenía tampón comercial de la enzima (1X), 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido (dNTPs), 0,5  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 0,1-1  $\mu$ g de ADN molde y 1 U de Taq polimerasa (Biotaq, España). Los productos de las reacciones de amplificación se analizaban en geles de agarosa según se describe en el apartado 3.2.7.1 de los Materiales y Métodos. La mezcla de reacción se sometió a una activación de la enzima y primera desnaturalización a 94 °C durante 4 min. Posteriormente, se efectuaron 30 ciclos en los que la mezcla se sometía a una primera etapa de desnaturalización a 94 °C durante 45 s, una etapa de alineamiento de secuencias en la que la temperatura fue la  $T_m$  más baja de los dos cebadores menos 5 °C, y una etapa de extensión a 72 °C durante 1 min. Finalmente la mezcla se sometió a 72 °C durante 10 min en los que se produjo la extensión final de las secuencias. Estas condiciones fueron a veces modificadas de acuerdo a la  $T_m$  de los cebadores, las características del ADN molde, así como a la longitud esperada de los fragmentos.

B) Reacción de alta fidelidad: Cuando fue necesaria una mayor fidelidad en la replicación de la secuencia, la polimerasa empleada fue la iProof ADN polimerasa (Bio-Rad, EEUU). Esta enzima posee actividad correctora, o lo que es lo mismo, actividad 3'-5' exonucleasa, lo que aumenta en seis veces la fidelidad en la síntesis de ADN en comparación con la Taq polimerasa. Al no poseer actividad transferasa terminal, los fragmentos sintetizados con la iProof poseen extremos romos.

Las reacciones con la iProof se llevaron a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l que contenía: 1X iProof HF buffer, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 0.1-1  $\mu$ g de ADN molde y 1U de iProof DNA polimerasa. La mezcla se sometió a una activación de la enzima y primera desnaturalización a 98 °C durante 30 s. Posteriormente, se efectuaron de 25-30 ciclos en los que la mezcla se sometía a una primera etapa de desnaturalización a 98 °C durante 10 s, una etapa de alineamiento de secuencias en la que la temperatura fue 2 °C inferior a la  $T_m$  más baja de los dos oligonucleótidos durante 10-30 s, y otra etapa de extensión a 72 °C. La duración variaba dependiendo de la longitud del fragmento a amplificar siendo la relación 15-30 s/kb. Finalmente la mezcla se sometió a 72 °C durante 5-10 min en los que se produjo la extensión final de las cadenas.

En los casos en los que se deseaba introducir la secuencia nucleotídica en el vector de clonación pMBL-T (Dominion, España), se llevó a cabo la adición de una cola de poli-T en los extremos romos de la secuencia amplificada, utilizando la Tag polimerasa, nombrada en este mismo apartado. Se adicionaron todos los componentes citados previamente en el apartado A, junto con el resultado de la PCR de alta fidelidad, exceptuando los oligonucleótidos. Se sometió la mezcla a una temperatura de 72 °C durante 15 min, de esta manera es posible llevar a cabo la ligación del fragmento de ADN en el citado plásmido.

C) PCR de colonias: Esta técnica permite la amplificación directa de secuencias genéticas a partir de colonias bacterianas sin necesidad del aislamiento previo del ADN. Su uso en este trabajo tuvo como fin la identificación de clones portadores de las secuencias de interés y replicación de genes de *E. coli* (*EcacpS*).

Las condiciones de la mezcla de reacción y amplificación fueron las mismas que en los apartados anteriores (A y B), utilizando uno u otro, dependiendo de la fiabilidad con la que se deseara obtener el ADN. Aun así, en todas ellos se seguían las siguientes salvedades:

I- El ADN molde se sustituyó por 0,5 µl de una muestra de 20 µl de H<sub>2</sub>O, donde se había resuspendido la colonia a analizar.

II- El paso inicial de desnaturalización a 95 °C o 98 °C se realizó durante 5 min.

### **3.2.6 Estudios de PCR en tiempo real (RT-qPCR).**

#### **3.2.6.1 Preparación de las muestras.**

Se recolectaron tejidos de raíz, hoja, tallo, semillas a 12, 15, 20, 25 y 30 DDF (días después de la floración), además de cotiledón 2, 5 y 7 DDI (días después de la imbibición), siendo congelados inmediatamente usando nitrógeno líquido. El ARNm total fue aislado según el protocolo descrito en el apartado 3.2.1 de Materiales y Métodos. Se eliminaron posibles residuos de ADN empleando el kit DNA-free (Ambion®). Para cada reacción de transcripción, se cuantificaron los ARN en un nanodrop (ThermoScientific, EEUU) y se utilizaron 1-5 µg de ARN total, oligo(dT) y SuperScript II transcriptasa inversa (Amersham biosciences, EEUU) fue adicionado para la síntesis del ADNc, permitiendo la reacción durante 1 h a 37 °C. Finalmente se almacenaron las muestras a -20 °C.

### 3.2.6.2 Método utilizado.

Los experimentos se llevaron a cabo mediante la combinación de PCR junto con técnicas de fluorescencia. La PCR a tiempo real permite monitorizar el avance de las reacciones de PCR siguiendo su desarrollo ciclo a ciclo (Heid et al., 1996; Bustin et al., 2002).

Durante el proceso de la PCR la reacción pasa por dos fases distintas. Una primera fase donde tiene lugar un incremento exponencial de las moléculas de ADN, en la que una mayor cantidad de ADN molde implica una mayor producción de copias. Y una segunda fase, en la que la reacción alcanza una fase estacionaria en la que los componentes de la mezcla de reacción comienzan a ser limitantes, los inhibidores de la reacción se acumulan y la polimerasa pierde actividad.

El incremento en la emisión de fluorescencia ( $\Delta R_n$ ) que tiene lugar durante el transcurso de la reacción está directamente relacionado con el incremento en la amplificación de la secuencia diana. Cuando este incremento es expresado frente al número de ciclos se obtiene una curva de amplificación. El parámetro CU (ciclo umbral) se define como el ciclo en el cual la señal de fluorescencia cruza la línea base. En este punto CU, la reacción se encuentra en fase exponencial, existiendo relación lineal entre el logaritmo de cambio de fluorescencia y el número de ciclos. Cuanto mayor es la cantidad de ADN molde de partida menos ciclos son necesarios para que el producto de reacción se acumule y pueda ser detectado y, por tanto, más rápido se alcanza el CU. Así, dicho parámetro nos permite cuantificar el ADN presente en la muestra y realizar una estimación del nivel de expresión del gen.

Como método de generación de fluorescencia se empleó Platinum SyberGreen® (Invitrogen, California) en un MJ Mini Opticon Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, EEUU). La fluorescencia de este reactivo se ve incrementada cuando se une al surco menor del ADN de doble cadena generado en la PCR. La diferenciación entre productos específicos y no específicos se logra mediante la representación de la fluorescencia en función de la temperatura, generando una curva de fusión para cada producto de amplificación. Así, cada producto posee un pico de fusión característico en función de su composición nucleotídica, que permite distinguirlo de posibles artefactos generados durante el proceso.

El estudio de la expresión de cada uno de los genes fue realizado mediante la amplificación de una región concreta de los mismos, de unas 100 pb, utilizando cebadores específicos. Estos cebadores tuvieron un tamaño entre 15 y 20 pb, y su porcentaje de G+C menor al 70 % (Tabla 11).

Oligonucleótidos	Secuencia
ACP-1F-cuant	5'-AACCCCTGATCTCTCCTCCAC-3'
ACP-1R-cuant	5'-CGTGGAAAAAGTTTGTGACATTGTAA-3'
ACP-2F-cuant	5'-ACCTTCATGCCAATGCCTGG-3'
ACP-2R-cuant	5'-TAGACAAGGTTTGCAACATAGTGAG-3'
ACP-3F-cuant	5'-TTCATGCCCTCTCTTTCATGCCAT-3'
ACP-3R-cuant	5'-CACGCTTCCGGGTTTGCTGT-3'
LACS-1Fcuant	5'-GAGTGCATATGTAGTTGGTGTCTTGG-3'
LACS-1Rcuant	5'-GTTTCGATCCCGGCCCATGC-3'
LACS-2Fcuant	5'-GGATGTTGGGGGATCCTTGTC-3'
LACS-2Rcuant	5'-CACCGCCAACTTCAACTGGAAC-3'
ACBP1F(RT)	5'-CCAATCAATCACCGGCGTCC-3'
ACBP1R(RT)	5'-GTTGCCAGTCGAACATTGTG-3'
ACBP4F(RT)	5'-CGATCTGATCTGATCTAATCCG-3'
ACBP4R(RT)	5'-GGGCATAAAGCAAGAGAGCG-3'
ACBP6F(RT)2	5'-CTTTCGTCACGAAATGGGTTTG-3'
ACBP6R(RT)2	5'-CGGTCGGTGTTCACCGGT-3'

Tabla 11. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en la RT-qPCR realizados en esta tesis. ACP (proteínas de unión a los grupos acilos), *HaLACS* (acil CoA sintetasa), *HaACBP* (proteínas de unión a los acil-CoA).

El tratamiento de datos se realizó mediante cuantificación relativa, donde los valores de CU de los genes a estudiar son relativizados a los CU de un gen calibrador que tiene unos niveles de expresión constantes en girasol (Sánchez-García et al., 2010). El gen calibrador usado en nuestro estudio ha sido el de la actina de girasol (GenBank FJ487620).

El procedimiento a seguir fue el siguiente. Se realizaron diluciones del ADNc sintetizado a partir de 1 µg de ARN para uno de los tejidos, en este caso se utilizaron las muestras de semilla 15 DDF. A su vez también se realizó para el gen calibrador, la actina, obteniéndose una recta de calibrado para cada gen. Con ello se conseguía una mayor fiabilidad de los datos calculados a partir de las curvas de fusión, indicando la especificidad de los oligonucleótidos diseñados.

A continuación, se realizaron las PCR a tiempo real de los genes objeto de estudio y del gen calibrador. Tras ajustar los datos de CU obtenidos a partir de sus rectas de calibrado, los valores del gen calibrador serán tomados como referencia y los datos de CU de los genes en estudio serán relativizados al gen calibrador siguiendo el método del doble incremento de CU de Livak (Livak et al., 2001).

### **3.2.7 Análisis del ADN.**

#### **3.2.7.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.**

La separación de los fragmentos de ADN se llevaba a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa, según se describe en Sambrook et al., (1989). Los geles se preparaban en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM pH 8,0). La concentración de agarosa (p/v) en los geles variaba entre el 0,7 % (para la separación de bandas de tamaños mayores o iguales a 1 kb) y el 1,5 % para bandas de menor tamaño. Antes de ser sometidas a electroforesis, las muestras se suplementaban con 1/5 del volumen de tampón de carga de ADN 6X DNA loading (ThermoScientific, EEUU). Para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN se emplearon los marcadores de peso molecular: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, y MassRuler™ ADN Ladder Mix, suministrados por la casa comercial Fermentas (Massachussetts). Las electroforesis se llevaron a cabo en un aparato horizontal ECPS 3000/150 suministrado por BioRad (EEUU), aplicando diferencias de potencial entre 80 y 120 V.

Para la detección del ADN en los geles y su visualización, se añadieron durante la preparación del gel 0,5 ng/ml de bromuro de etidio (BrEt) (Sigma, Alemania). La visualización de los geles y el almacenamiento de las imágenes se llevó a cabo con un transiluminador de luz ultravioleta Chemi Genius<sup>2</sup> Bio-Imaging System (Syngene, India) conectado con un ordenador personal con el programa GeneSnap de Syngene (India).

### **3.2.7.2 Purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa.**

Por regla general los productos de PCR o reacciones de restricción (Materiales y Métodos 3.2.5 y 3.2.8) fueron separados por electroforesis en gel de agarosa, tal y como se describe en los Materiales y Métodos 3.2.7.1. Las bandas de interés se cortaron con un bisturí estéril, siendo el ADN extraído a continuación utilizando el kit NucleoSpin<sup>®</sup> Extract (Macherey-Hagel, Holanda), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.2.8. Digestión de ADN usando endonucleasas de restricción.**

Las endonucleasas fueron suministradas por New England Biolabs (Reino Unido) y Amersham-Pharmacia (Reino Unido). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20  $\mu$ l, según las recomendaciones del fabricante, en el tampón suministrado con cada enzima. Las digestiones con dos enzimas de restricción se realizaron en un tampón compatible de la misma casa comercial. Cuando era requerido, las enzimas eran inactivadas incubándolas durante 15 min a 65 °C.

### **3.2.9 Defosforilación de extremos 5' del ADN.**

Para realizar ligaciones de fragmentos de ADN con extremos romos fue necesaria la defosforilación de los extremos del plásmido sobre el que iba a realizarse la ligación, con el fin de aumentar la eficiencia de la misma. Para ello, se empleaba una preparación de plásmido obtenida según el protocolo de digestión descrito en el apartado de Materiales y Métodos 3.2.8, con la salvedad de que, en el paso final, el ADN se resuspendía en agua MilliQ. Una fracción de 1  $\mu$ g del plásmido se sometía a restricción con la enzima deseada, en un volumen final de 40  $\mu$ l. Una vez la digestión era completa, a esta mezcla de reacción se le añadían 6 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Promega, Wisconsin), 5  $\mu$ l de tampón 10 X comercial y agua MilliQ, hasta un volumen final de 50  $\mu$ l. Se incubaron durante 30 min a 37 °C. A continuación, la mezcla de reacción se suplementaba con EDTA 200 mM pH 8,0 y se incubaba durante 15 min a 65 °C para la inactivación de la enzima. Finalmente, el ADN se purificó utilizando el kit NucleoSpin<sup>®</sup> Extract (Macherey-Hagel, Holanda) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.2.10 Ligación de fragmentos de ADN.

La ligación de fragmentos de ADN se realizaba mezclando preparaciones de los fragmentos de PCR previamente purificados y el correspondiente plásmido e incubando en presencia de la DNA Ligasa T4 (Fermentas, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las ligaciones se llevaban a cabo en un volumen final de 20 µl del tampón comercial de la enzima 10X suministrado por los fabricantes. Para calcular la cantidad apropiada de inserto (producto de PCR) a incluir en la reacción de ligación, se usó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{Kb de inserto}}{\text{Kb del vector}} \times \text{proporción inserto/vector} = \text{ng de inserto}$$

Los plásmidos utilizados se muestran en la Tabla 12.

Plásmido	Características	Organismo	Casa comercial
pMBL-T <sup>®</sup>	Vector clonación y secuenciación	<i>E. coli</i>	Dominion
pQE80	Vector expresión	<i>E. coli</i>	Qiagen
pGEX	Vector expresión	<i>E. coli</i>	GE Healthcare
pUC18-GFP	Vector expresión	Células de tabaco <i>BY-2</i>	* <sup>1</sup>
pUC18-Cherry	Vector expresión	Células de tabaco <i>BY-2</i>	* <sup>1</sup>
pSa13	Vector expresión	<i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i>	* <sup>2</sup>

Tabla 12. Plásmidos utilizados en este trabajo. \*<sup>1</sup> Plásmido cedido por el profesor Robert Mullen (Universidad de Guelph, Canada), \*<sup>2</sup>Plásmido cedidos por la Profesora Mee-Len Chye (Universidad de Hong Kong, China).

En el caso del plásmido pMBL-T Easy Vector (Dominion, España) este lleva unas colas de deoxitimina de cadena simple en sus extremos 3', en el lugar de inserción. Estas colas aumentan la eficiencia de ligación para productos de PCR, previniendo la recirculación del vector y proporcionando colas compatibles a las generadas en la PCR por las Taq polimerasas termoestables usadas, ya que, estas Taq polimerasas añaden deoxiadenuina al extremo 3' de los fragmentos amplificados. La ligación en este plásmido se realizó a 22 °C durante 1 h, en una mezcla de reacción que contenía 30 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, PEG al 5 %, 55 ng de vector, 3 U de ligasa T4 (Dominion, España) y una cantidad apropiada del inserto de ADN.



La ligación en los demás plásmidos (pQE80, pGEX, pUC18, pSa13) se realizó a 22 °C durante 5 h, en una mezcla de reacción que contenía 40 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 400 ng de vector y 2 U de ligasa de T4 (Fermentas, Wisconsin) y una cantidad apropiada del inserto de ADN (40 – 80 ng). La enzima se inactivó al incubar durante 10 min a 65 °C.

### **3.2.11 Transferencia de ADN (*Southern blot*).**

#### **3.2.11.1 Aislamiento de ADN genómico.**

El aislamiento de ADN genómico se llevó a cabo siguiendo el método de Murray y Thompson (1980). Se tomaron 2,5 g de hojas frescas de la planta a estudiar. Rápidamente se congelaron con nitrógeno líquido y se trituraron con un mortero y maza estéril. Al tejido se añadieron 5 ml de la solución 2 x CTAB (0,1 M Tris pH 8,8, 2 % Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA), con 50 µg/ml de ARNasa añadidos en el momento de la preparación. La mezcla se incubó a 65 °C durante 20 min, se añadieron 5 ml de CHCl<sub>3</sub> (Merk, Alemania) y se agitó vigorosamente. Tras 2 min de centrifugación a 15.000 x g se añadieron 5 ml de isopropanol, mezclando inmediatamente e incubando 1-2 min a temperatura ambiente. Tras una nueva centrifugación de 5 min a 15.000 x g se apreció un precipitado amarillento de ADN. A continuación, se lavó el precipitado con un 70 % de etanol, y se dejó secar en campana tras desechar el sobrenadante. Una vez seco, el pellet se resuspendió en 875 µl de agua, obteniéndose hasta 2 mg de ADN por preparación.

#### **3.2.11.2 Preparación y separación de las muestras.**

Las muestras de ADN genómico (15 µg) fueron digeridas con diferentes enzimas de restricción (Materiales y Métodos 3.2.8) y separadas por electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % a 80 V durante 3-4 h (Materiales y Métodos 3.2.7.1). Una vez obtenida la separación en el gel, se tomaron imágenes del gel mismo en presencia de un marcador de peso molecular. De esa manera, se pretende tener una medida exacta de a qué tamaño pertenecen las bandas radiactivas que se detectaran posteriormente.

### 3.2.11.3 Transferencia de fragmentos de ADN.

A continuación el gel fue sumergido en una solución 250 mM HCl durante 30 min con agitación suave. Con ello se desnaturaliza el ADN para facilitar la transferencia de los fragmentos de mayor tamaño. Después de tres lavados con agua destilada, el gel fue montado sobre un soporte cubierto con papel de filtro Whatman de 3 mm. El papel de filtro se encontraba en contacto con el tampón de transferencia 0,4 N NaOH contenido en una cubeta bajo el soporte del papel de filtro. Sobre el gel se colocó una membrana de transferencia de nylon Hybond-N+ (GE Healthcare, Reino Unido) sobre la cual se montaron papeles Whatman de 3 mm y capas de papel absorbente presionados por un peso. La transferencia se llevó a cabo durante 24 h pasando el ADN desde el gel a la membrana de nylon por capilaridad en condiciones alcalinas. Tras desmontar el sistema y marcar la membrana, se procedió a su lavado en tampón SSC 2X (3M NaCl, 0,3 M Citrato sódico pH 7,0 ajustado con NaOH) y a su secado en campana sobre papel de aluminio.

### 3.2.11.4 Marcaje radiactivo de sondas de ADN.

Las sondas de ADN específico de los genes a estudiar (Tabla 13) fueron marcadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP siguiendo las instrucciones del kit “Ready to go” de Pharmacia, (EEUU). En él se utiliza una mezcla de reacción liofilizada que contiene dATP, dGTP, dTTP, 4-8 U del fragmento Klenow de la ADN polimerasa y una mezcla de oligodesoxirribonucleótidos de secuencia aleatoria. El ADN a marcar (25-50 ng), previamente desnaturalizado, se añadió a la mezcla anterior disuelta en agua y, tras suplementar con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3.000 Ci/mmol), se incubó 30 min a 37 °C. Los nucleótidos no incorporados fueron eliminados filtrando la muestra a través de una columna de Sephadex G-50.

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
LACS-1AF(2)	5'-CGAGACGGAGGTTACTACCG-3'	1570
LACS-1R(pET)	5'-GCATATGTCAAGAAAGATAAAACT-3'	
LACS-2BF(2)	5'-GGGACGGAATAGTCCGGTTTAAGC-3'	1080
LACS-2ER(2)	5'-CTCAAGGCAACCGTCTTTATGG-3'	

Tabla13. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de sondas para los estudios de *southern blot*. LACS (acil CoA sintetasa).

### 3.2.11.5 Hibridación de los fragmentos de ADN.

La hibridación con sondas radiactivas al ADN fijado en membranas de nylon se llevó a cabo utilizando como disolución de prehibridación e hibridación el tampón SSPE 5 x (0,2 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH 7,2, 1mM EDTA). Tras 2-4 h de incubación del filtro (prehibridación) a 65 °C se añadió la sonda de ADN marcada radiactivamente y desnaturalizada mediante incubación a 100 °C durante 10 min seguida de enfriamiento inmediato en hielo. Tras incubar durante 14-16 h a 65 °C, la membrana se lavó dos veces manteniéndola durante 15 min cada vez en una disolución que contenía SSPE 2X y 0,1 % (p/v) SDS, y una vez durante 15 min en una disolución que contenía SSPE 1X y 0,1 % (p/v) SDS. Todos los lavados se realizaron a 65 °C. Las imágenes de los filtros radioactivos fueron obtenidas y cuantificadas usando un Cyclone TM Storage Phosphor System (PerkinElmer, EEUU) y el Optiquant TM *image analysis software* (Packard, EEUU). Las imágenes obtenidas fueron comparadas con la fotografía del gel teñido con BrEt para averiguar los tamaños de las bandas encontradas.

### 3.2.12 Análisis de las secuencias de ADN.

La secuenciación de insertos clonados en vectores fue llevada a cabo en los laboratorios Secugen, S.A. (Madrid, España). Las secuencias remitidas fueron identificadas mediante homología con secuencias conocidas utilizando el programa BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tools) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

El alineamiento de secuencias de aa se llevó a cabo utilizando el programa informático ClustalX v1.8 (Thompson et al., 1997) y la construcción de árboles filogenéticos mediante el uso del programa MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Asimismo, el paquete informático Seqtools 8.4 (Python<sup>TM</sup>) aportó numerosas herramientas para manejar las secuencias como la búsqueda de marcos abiertos de lectura (ORF) o la traducción de las secuencias de los nucleótidos a aminoácidos.

### 3.3 ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

#### 3.3.1 Modelado tridimensional de las proteínas.

A partir de modelos estructurales pertenecientes a proteínas homólogas descritos en la base de datos de estructuras tridimensionales de proteínas RCSB PDB (Berman et al., 2000) y mediante el uso de la secuencia de aa codificada en los ARNm clonados se modeló la estructura secundaria de diferentes proteínas utilizando el servidor Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>; Schwede et al., 2003). Las estructuras obtenidas fueron visualizadas utilizando el programa Swiss-PDBViewer (Guex y Peitsch, 1997).

#### 3.3.2 Purificación de proteínas recombinantes en columnas de NTA-níquel.

Las células de *E. coli* conteniendo plásmidos recombinantes adecuados para la expresión de proteínas con cola de polihistidina pQE80 fueron crecidas con agitación constante a 37 °C en 200 ml medio LB con el antibiótico correspondiente (ampicilina y cloranfenicol). Las células fueron inducidas a DO<sub>600</sub> 0,4-0,5 con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), y crecidas durante 6 h a 37 °C. A continuación fueron recogidas mediante centrifugación durante 15 min a 3.220 x g. El pellet bacteriano se resuspendió en 4 ml de tampón de rotura (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) enfriado en hielo y se sometió a un tratamiento con ultrasonidos durante 5 períodos de 15 s con un sonicador Branson modelo B12 (Dinamarca) manteniendo la muestra en un baño con hielo. Los períodos de rotura fueron alternados con otros de igual duración, en los que cesaba el tratamiento, evitando el excesivo calentamiento. La frecuencia de los ultrasonidos fue de 20 KHz a una potencia de 75 W. Una vez concluido el tratamiento de rotura el homogenado resultante se sometió a centrifugación a 4 °C durante 45 min, 12.000 x g. El sobrenadante así obtenido constituyó la fracción soluble (FS).

Un volumen de 5 ml de la FS se filtró a través de membranas de 0,45 μm, se mezcló con 1 ml de sefarosa Ni-NTA (Bio-Rad Poly-prep chromatography columns) y se sometió a agitación continua en un agitador rotatorio (Cole Parmer Instrument Company Model 7637-109) durante 20 min para permitir la unión de la proteína a la

fase fija. Tras ello se vació el contenido líquido de la columna y se añadieron otros 6 ml de solución de lavado (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,5, 300 mM NaCl, 30 mM imidazol). A continuación la columna se volvió a someter a agitación durante 10 min. Tras eluir la solución de lavado, se enjuagó la pared 2 veces con 1 ml de esta misma solución para asegurar que toda la matriz quedara empaquetada en el fondo y se eliminara toda la proteína que no se ha unido a la misma. A continuación, se añadieron 2 ml de solución de elución (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,5, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol) a la columna, recogiendo cuatro fracciones de 500 µl en tubos eppendorf hasta drenar la columna por completo. La matriz se regeneró con 5 ml de H<sub>2</sub>O y se conservó a 4 °C en 4 ml de etanol al 20 % para posteriores usos.

La concentración de proteínas de las fracciones purificadas fue determinada mediante el método de Bradford (1976), usando el reactivo de ensayo de proteínas de Bio-Rad (EEUU) y la albumina de suero bovino como proteína estándar (Materiales y Métodos 3.3.7).

Puesto que el imidazol puede ocasionar la precipitación de ciertas proteínas, este se eliminó mediante el uso de tubos concentradores de Amicon Ultra (Merck Millipore, 3, 10 o 30 kDa, dependiendo del tamaño de la proteína, Alemania) aplicando varias etapas de centrifugación a 2.810 x g y resuspensión de la proteína concentrada. Con ello se minimizó la concentración de imidazol en la muestra y se cambió el tampón final si procede, por otro más apropiado para los ensayos de caracterización. Las fracciones purificadas se conservaron a -20 °C después de la adición de 50 % (v/v) de glicerol.

### **3.3.3 Purificación de proteínas recombinantes en columnas de GST-agarosa.**

Este procedimiento se utilizó para expresar las ACP de girasol, las cuales resultaban tóxicas para *E. coli* (Schaeffer, et al., 2001). Se basó en la expresión de una construcción que producía una proteína híbrida, conteniendo la proteína deseada unida a través de un péptido digerible por trombina a la glutatión-S-transferasa (GST), una proteína voluminosa que se expresa a altos niveles en la fracción soluble de la bacteria. A continuación, la proteína híbrida se purificó en una columna de afinidad y se obtuvo la proteína de interés mediante digestión con trombina.

Las bacterias recombinantes expresando el vector pGEX (GE Healthcare Biosciences, Sweden) con el inserto codificante de la proteína objetivo se procesaron de manera similar a la descrita en el apartado 3.3.5 de Materiales y Métodos, modificándose únicamente el tampón de rotura utilizado. En este caso se resuspendió el pellet bacteriano en 4 ml tampón PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4). El proceso de purificación se inicia mezclando todo el volumen de la FS resultante de la lisis de las bacterias con 1 ml de matriz agarosa glutation-S-transferasa GST-Agarose (Biontex). La columna preparada se colocó en un agitador rotatorio (Cole Parmer Instrument Company Model 7637-109) durante 1 h. Tras ello se vació el contenido líquido de la columna y se dejó sedimentar la matriz en el fondo. A continuación se añadieron otros 6 ml de tampón PBS 1X para eliminar las proteínas que no habían sido unidas a la matriz de agarosa. A continuación, se añadieron 4 ml de solución PBS con 10 U de trombina (Sigma-Aldrich, Alemania) y se colocó la columna en el agitador rotatorio durante 1 h más. En este paso se liberan las ACP de girasol del residuo de GST adicionado en el extremo *N*-terminal de las mismas. Las ACP liberadas fueron pues eluidas con los 4 ml de tampón añadido y con los otros 2 ml de tampón de lavado. La trombina fue finalmente separada de las ACP empleando unidades de ultrafiltración Amicon-3 kDa (Merck Millipore, Alemania) y fueron almacenadas a -80 °C tal y como se describe en el apartado anterior.

Tras la elución de la proteína se regeneró la matriz añadiendo un segundo tampón de elución (10 mM glutatión reducido, 50 mM Tris-HCl pH 8,0), dejando de nuevo la columna durante 1 h en el agitador rotatorio. La columna se regeneró con 6 ml de (100 mM tris-HCl pH 8,5, 0,5 M NaCl), seguido de otros 6 ml (100 mM AcNa pH 4,5, 0,5 M NaCl). Al final la matriz se conservó a 4 °C en 4 ml de etanol al 20 % para posteriores usos.

### **3.3.4 Aislamiento de fracción membranosa para los ensayos *HaLACS*.**

Las construcciones *HaLACS*-pQE80 fueron clonadas en la estirpe K27 de *E. coli* deficiente en actividad acil-CoA sintetasa (Shockey et al, 2002). Se produjeron cultivos a partir de colonias aisladas que se crecieron toda la noche y se emplearon para inocular 1 L de medio LB con 100 µg/ml ampicilina a OD<sub>600</sub> = 0,1. Este cultivo se dejó incubar hasta alcanzar DO<sub>600</sub> = 0,6 y se indujo con 0,7 mM IPTG. El cultivo se mantuvo toda la

noche a 200 rpm y 37 °C. Al día siguiente se recolectaron las células por centrifugación a 4.000 x g durante 15 min. El pellet se resuspendió en 10 ml de 50 mM Tris pH 8,0, 1 mg/ml lisozima, 0,1 mg/ml DNase, 5mM DTT y se dejó durante 30 min en hielo, luego se procedió a romper las células mediante sonicación en hielo, con un sonicador Branson Models SLPe (Thomas Scientific), aplicando 10 pulsos de sonicación de 20 s cada uno, dejando entre cada pulso 20 s reposando en hielo. El lisado de bacterias fue centrifugado a 20.000 x g durante 40 min y el sobrenadante resultante fue de nuevo centrifugado a 100.000 x g durante 2 h. El pellet conteniendo la fracción membranosa donde se encuentra la proteína, fue resuspendido en 50 mM Tris pH 8,0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT y almacenado a -80 °C para su posterior uso en los ensayos enzimáticos.

### **3.3.5 Electroforesis de proteínas.**

#### **3.3.5.1 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida.**

##### 3.3.5.1.1 Preparación de las muestras.

Cuando fue necesario, las muestras proteicas se concentraron utilizando los filtros Amicon 3 kDa (Merck Millipore, Alemania). Tal y como indica el fabricante, se centrifugaron en los concentradores a 4.000 x g durante 20 min y se recuperó la muestra concentrada.

Las muestras se suplementaban con 0,5 volúmenes de tampón de carga 2 X compuesto por 0,25 M Tris-HCl pH 6,8, dodecil sulfato sódico (SDS) al 4 % (p/v), sacarosa al 27 % (p/v), glicina al 0,3 % (p/v), azul de bromofenol al 0,1 % (p/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol al 10 % (p/v). Posteriormente, las proteínas se desnaturalizaron al calentar la mezcla de 5 a 10 min a 80 – 90 °C.

##### 3.3.5.1.2 Condiciones electroforéticas.

Las separaciones analíticas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes se realizaron en geles de poliacrilamida NuPage<sup>®</sup> Novex Bis-Tris Gels 4-12 % gradient (Invitrogen, EE.UU) o Mini-PROTEAN TGX Gel (Bio-Rad, EEUU), siendo el gel de separación al 12 % (p/v) y el de empaquetamiento al 4 % (p/v), basado en el sistema de Laemmli (1970). En los estudios realizados sobre las ACBP, los geles fueron preparados manualmente en el laboratorio de la Facultad de Biología en la Universidad de Hong Kong (estancia predoctoral). En este caso, el gel

separador se preparaba a la concentración adecuada de acrilamida, con SDS al 0,1 % (p/v) en tampón 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, y el de empaquetamiento de las muestras se preparaba al 5 % de acrilamida con SDS al 0,1 % (p/v) en tampón 0,5 M Tris-HCl pH 6,8. Los geles se polimerizaban con persulfato amónico (APS) al 0,05 % (p/v), usando como agente catalizador N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) al 0,07 % (v/v). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de entre 80 y 175 V en una cubeta XCell II mini-Cell Novex (Invitrogen, California).

### 3.3.5.1.3 Método de tinción de las proteínas.

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas fueron fijadas y teñidas con una disolución de ácido acético/metanol/agua (8:20:72 v/v/v) al 0,5 % (p/v) de Coomassie<sup>TM</sup> Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich, Alemania). Los geles se lavaron a continuación con una solución ácido acético/metanol/agua (8:20:72 v/v/v) para retirar el exceso de colorante.

La determinación de los pesos moleculares de las proteínas se realizó para cada gel mediante rectas de calibrado en las que se representaron las movilidades relativas de las proteínas frente a los logaritmos de sus pesos moleculares. Como patrón se utilizó, generalmente, un kit de proteínas de bajo peso molecular compuesto por fosforilasa b (94,0 kDa), albúmina de suero bovino (66,0 kDa), ovoalbúmina (45,0 kDa), anhidrasa carbónica (30,0 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14,4 kDa) (Bio-Rad, EEUU). En el caso de los geles que se iban a transferir a membrana se utilizó un patrón de proteínas Spectra<sup>TM</sup> Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas, Massachusetts) con péptidos con los siguientes pesos moleculares de 10 kDa, 17k Da, 26 kDa, 34k Da, 42k Da, 52 kDa, 72 kDa, 95 kDa, 135 kDa y 260 kDa.

### 3.3.5.1.4 Purificación y análisis de proteínas.

Cuando fue necesario, se extrajeron proteínas de los geles desnaturalizantes. Para ello, se utilizaron columnas de tamaño Nanosep<sup>®</sup> Centrifugal Devices (PALL Corporation). Se desarrollaron dos geles en paralelo, usando uno como control y el otro para cortar el gel y extraer la proteína. El marcador utilizado fue el Spectra<sup>TM</sup> Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas, EEUU). Una vez obtenido el fragmento de gel que contenía la proteína se cortó en trozos pequeños y se colocó en el interior de la columna. Se añadió tampón de elución (250 mM Tris-HCl, 0,1 % (p/v) SDS), y se calentó la muestra a 50 °C durante 2 min con agitación en vortex antes de



centrifugar durante 20 min a 13.000 x g. Este paso se realizó tres veces y las fracciones eluidas se dializaron y concentraron en filtros Amicon (Merk, Alemania), conservándose a 4 °C en el correspondiente tampón de reacción.

### **3.3.5.2 Electroforesis de proteínas en condiciones nativas.**

La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes, denominada PAGE nativa, permite la separación analítica de las proteínas en su estado conformacional nativo, siendo la migración en el gel dependiente no sólo de la masa molecular sino también de su carga.

#### **3.3.5.2.1 Preparación de las muestras.**

La separación analítica de las formas apo y holo de las ACP de girasol se realizó mediante PAGE nativa. Las electroforesis nativas se llevaron a cabo según el sistema discontinuo descrito por Davis (1964) con las modificaciones incluidas por Rock et al. (1981) y Jackowski y Rock (1983). Para ello, el gel de separación se preparó al 20 % de acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 29:1) en tampón 0,375 M Tris-HCl pH 9,0, 1 mM EDTA. El gel de empaquetamiento, al 5 % de acrilamida, contenía 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 1 mM EDTA. Los geles se polimerizaron con APS al 0,2 % (p/v) usando TEMED 0,1 % como agente catalizador. Antes de cargar, las muestras se suplementaron con tampón de carga compuesto por 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, glicerol 10 % (v/v) y azul de bromofenol 0,05 % (p/v). El tamaño de los geles era de 8×6 cm y 1,5 mm de grosor. Las electroforesis se llevaron a cabo en un sistema Mini-Protean<sup>R</sup> Tetra Cell (Bio-Rad, EEUU), a voltaje constante (100 V, 2,5 h) y 37 °C. Como tampón de electroforesis se utilizó una disolución que contenía 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 1 mM EDTA, 0,25 M glicina.

El marcador de peso molecular utilizado (NativeMark, Invitrogen, EE.UU) lo constituían las siguientes proteínas: IgM hexamérica (1236 kDa), IgM pentamérica (1048 kDa), apoferritina banda 1 (720 kDa), apoferritina banda 2 (480 kDa), B-ficoeritrina (242 kDa), lactato deshidrogenasa (146 kDa), albumina de suero bovino (66 kDa) e inhibidor de tripsina de soja (20 kDa).

#### 3.3.5.2.2 Método de tinción de las proteínas.

El teñido de los geles se realizó según hemos descrito anteriormente (Materiales y Métodos 3.3.8.3)

### 3.3.5.3 *Western blot*.

#### 3.3.5.3.1 Electroforesis y transferencia de las proteínas.

Las proteínas previamente separadas mediante electroforesis SDS-PAGE (Materiales y Métodos 3.3.5.1) fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Se partió de un gel de proteínas Mini-PROTEAN TGX Precast Gels 4-15 % de poliacrilamida (Bio-Rad, EEUU), y mediante el Kit Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Mini PVDF Transfer Pack (Bio-Rad, EEUU) fueron transferidas a la membrana tal y como indica el fabricante, usando el programa Mixed MW de Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Transfer Starter System (Bio-Rad, EEUU).

#### 3.3.5.3.2 Bloqueo y detección de las proteínas.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se introdujo en la solución de bloqueo PBS (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4) con (5 % p/v de leche desnatada en polvo) y se sometió a agitación suave durante 1 h. Pasado este tiempo se procedió a la retirada de la solución de bloqueo y al posterior lavado de la membrana con tampón TPBS (0,1 % v/v Tween 20 en PBS), realizándose tres lavados de 10 min cada uno.

A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico para cada reacción. Se utilizó una dilución entre 1/5000 ó 1/1000 en tampón TPBS y se incubó durante 2 h con agitación suave. Después de retirar la disolución de anticuerpo primario, la membrana se lavó de la misma forma que se describió en el párrafo anterior.

El siguiente paso consistió en la incubación con el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG-Fragment Specific conjugado a la enzima peroxidasa, ThermoScientific, EEUU). Se utilizó una dilución 1/1000 en TPBS durante 1 h con agitación suave. Tras la incubación, la membrana fue lavada tres veces durante 10 min con TPBS y finalmente se mantuvo la membrana en PBS.

Para su visualización se utilizó la reacción de la peroxidasa de rábano (HPR) unida al anticuerpo y la adición del sustrato quimioluminiscente. Para ello se utilizó el Kit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate de ThermoScientific (EEUU). El revelado se hizo según el protocolo del fabricante dejando la reacción durante 1 min. La reacción se detectó en un transiluminador Chemi Genius<sup>2</sup> Bio-Imaging System (Syngene, India) conectado con un ordenador personal con el programa GeneSnap de Syngene. Debido a la reacción oxidativa del luminol por la acción de la peroxidasa anclada al anticuerpo secundario, apareció una banda negra sobre la proteína a la que se había unido la combinación de anticuerpo primario y secundario. Tras ello, se lavaron los filtros con agua y se secaron.

### **3.3.6 Medidas espectrofotométricas.**

Cuando fueron necesarias, las medidas de absorbancia de luz visible o ultravioleta se realizaron en un espectrofotómetro marca Ultrospec 3300pro (Amersham Biosciences, EEUU).

### **3.3.7 Determinación de la concentración proteica.**

El contenido de proteínas se determinó mediante el ensayo de BCA, utilizando el BCA Protein Assay Kit (Pierce, EE.UU.) o mediante el método de Lowry y colaboradores (1951), utilizando el Lowry Reagent (Sigma-Aldrich, Alemania), empleándose cantidades conocidas de BSA como patrón para realizar las correspondientes rectas de calibrado en ambos casos.

### **3.3.8 Medidas de pH.**

El pH de las disoluciones se determinó utilizando un pH-metro modelo pH900 (Eutech Instruments, Holanda).

## 3.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

### 3.4.1 Determinación de la actividad *Ha*LACS.

La mezcla utilizada en los ensayos de LACS contenía 100 mM Bis-tris-propano pH 7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 2,5 mM DTT, 1 mM CoA, 2 mM sal amónica de ácido graso y 0,3 µg de fracción membranosa de *E. coli* (Materiales y Métodos 3.3.7). La reacción enzimática fue llevada a cabo a temperatura ambiente durante 30 min. Se paró la reacción añadiendo 100 µl de 10 % (v/v) ácido acético en isopropanol. A continuación, se añadieron 20 nmoles de 17:0-CoA como patrón interno y la mezcla fue purificada mediante extracción en cartuchos de extracción en fase sólida C8 (Análisis Vínicos S.L., España) como se describe a continuación (Mangino et al., 1992). Antes de aplicar la muestra, la columna se activó con 5 ml de metanol, 5 ml de agua y 5 ml de 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. A continuación se añadió la muestra, realizando un lavado con 5 ml de 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:CH<sub>3</sub>CN (4:1, v/v). Los acil-CoA fueron eluidos de la columna con 2 ml de 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:CH<sub>3</sub>CN (3:7, v/v) y 2 ml de 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:MeOH (3:1, v/v). Las dos fracciones eluidas se recolectaron en un mismo tubo de vidrio que se evaporó bajo N<sub>2</sub> a 60 °C. Los acil-CoA purificados fueron derivatizados como se describen en el apartado de Materiales y Métodos 3.6.2 formando el acil-eteno derivado y analizados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) como se describe en el apartado de Materiales y Métodos 3.6.5, realizándose algunas variaciones en el gradiente de elución. En este caso la fase móvil solo estaba formada por dos disoluciones, A y B. La composición de la fase móvil fue: A, 0,25 % *N,N,N*-trietanolamina (TEA) 0,1 % tetrahidrofurano (THF); B, 90 % acetonitrilo. El gradiente de elución fue el siguiente: 0-8.5 min, (65 %A 35 %B a 20 %A 80 %B); 8.5-9min, (20 %A 80 %B a 65 %A 35 %B); 9-14min, (65 %A 35 %B a 65 %A 35 %B).

### 3.4.2 Caracterización de las *Ha*ACBP.

#### 3.4.2.1 Estudio de afinidad por diferentes fosfolípidos.

La afinidad de las His-*Ha*ACBP por diferentes fosfolípidos se determinó mediante inmuno-ensayo según el método descrito por Xiao et al. (2009) con algunas modificaciones. Se unieron a una membrana de nitrocelulosa diferentes concentraciones

de fosfolípidos y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h en oscuridad. Los fosfolípidos anclados se bloquearon con una disolución salina de tampón (PBS) al 5 % de leche desnatada en polvo y se dejaron incubando durante 1 h con agitación suave. Se añadió 1 µg/ml de proteína His-*Ha*ACBP purificada y se incubó con agitación suave durante 2 h más. El filtro fue lavado tres veces con TPBS (0,1 % Tween 20 en PBS), cada vez durante 10 min. A continuación, se incubó con el anticuerpo peroxidasa (HRP)-conjugado-anti-(His)<sub>6</sub> (1:2000; Qiagen) durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación suave. El filtro se lavó de nuevo tres veces con 20 ml de TPBS durante 10 min. La detección se realizó con el Kit ECL Western-Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **3.4.2.2 Determinación de la afinidad a los acil-CoA.**

Los experimentos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) se realizaron en un equipo MicroCal iTC<sub>200</sub> system (MicroCal). Los acil-CoA (Avanti Polar Lipids, Holanda) y las proteínas recombinantes usadas en estos ensayos se prepararon en un tampón de unión para ITC (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 mM EDTA y 175 mM KCl, pH 7,6) previamente desgasificado. Los ensayos se realizaron con 250 µM del acil-CoA correspondiente, que se fue inyectando en el interior de la cámara donde anteriormente se había añadido un volumen de 200 µL de disolución 12,5 µM de la proteína. Todo el proceso se realizó a una temperatura constante de 30 °C. Se inyectó todo el volumen de acil-CoA en intervalos de inyección de 1,5 µl cada 150 s. Los datos resultantes se procesaron usando el programa Microcal ORIGIN software (OriginLab Corporation, EEUU). Los parámetros constantes de disociación ( $K_d$ ), constante estequiométrica, entalpía ( $\Delta H$ ) y entropía ( $\Delta S$ ) fueron calculados mediante una regresión no lineal a partir de los datos obtenidos.

#### **3.4.3 Síntesis de acil-ACP.**

##### **3.4.3.1 Activación de los Apo-ACP.**

La composición del medio de reacción de activación de las ACP de girasol consistió en 400 µg de apo-ACP en tampón 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 1 mM CoA, 5 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>. A dicha mezcla de reacción se añadieron 200 nmoles de *EcacpS*, incubándose durante 4 h a 37 °C.

#### **3.4.3.2 Preparación de la sal amónica de los ácidos grasos.**

Los ácidos [ $^3\text{H}$ ]palmitoleico, [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oleico, [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]palmítico y [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]esteárico (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido) fueron utilizados para la síntesis de acil-ACP. Para ello fue preciso preparar primero sus sales amónicas. Así, cantidades de 5-10  $\mu\text{Ci}$  de los ácidos grasos radiactivos se transfirieron a tubos de metilar evaporándose el solvente bajo corriente de nitrógeno. Los residuos se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de etanol y se neutralizaron con 5  $\mu\text{l}$  de hidróxido amónico comercial. A continuación se evaporó el etanol añadido y el residuo se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de 10 % Tritón X-100 libre de peróxidos (Sigma, Alemania), se agitó y se incubó a 50 °C durante 10 min. Finalmente, se determinó en un contador de centelleo líquido (LS6500, Beckman Coulter, España) el nivel de radiactividad para calcular la cantidad de sal amónica de cada ácido graso y poder estimar el ACP necesario para la síntesis de los acil-ACP correspondientes.

#### **3.4.3.3 Síntesis de acil-ACP radiactivos.**

Los acil-ACP radiactivos se prepararon usando una acil-ACP sintetasa recombinante de *E. coli* suministrada por el Dr. John Shanklin (Brookhaven National Laboratory, EEUU). Las reacciones de acilación contenían 50  $\mu\text{g}$  de ACP, 660 MBq (aprox. 0,1  $\mu\text{mol}$ ) de la sal amónica del ácido graso marcado [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ], 5 mM ATP, 2 mM DTT, 4 mM  $\text{LiCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM Tris pH 8,0 y 10  $\mu\text{g}$  de la acil-ACP sintetasa en un volumen final de 0,5 ml.

Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, durante 3-4 h y los acil-ACP se purificaron y concentraron por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sefarosa tal como describen Rock et al. (1979).

#### **3.4.3.4 Cuantificación de la radiactividad y determinación de la concentración de los acil-ACP sintetizados.**

Para medir la radiactividad presente en los acil-ACP sintetizados se utilizó un contador de centelleo líquido (LS6500, Beckman Coulter, España) previamente calibrado. Para ello, se utilizaron viales de centelleo de polietileno de 5 ml de capacidad a los que se les añadió 3 ml de líquido de centelleo, Ecoscint<sup>TM</sup> H (National Diagnostics, Hesse, Reino Unido). Después de agitar fuertemente se cuantificó la radiactividad durante 120 s.

Las concentraciones de los acil-ACP se calcularon a partir de las radioactividades específicas de los ácidos grasos empleados como sustrato, que estuvieron alrededor de los 50 Ci/mol.

#### **3.4.4 Estudio de actividad de *HaFATs* sobre diferentes acil-ACP.**

La actividad Fat se calculó midiendo la cantidad de ácidos grasos libres liberados tras la incubación de [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] acil-ACP con el correspondiente extracto enzimático. El medio de reacción contenía 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM DTT, 0,2-12  $\mu\text{g}$  de proteína purificada (Materiales y Métodos 3.3.5) y como sustrato entre 0,02 a 0,08 nmol de acil-ACP (30-170 Bq approx.), (Materiales y Métodos 3.4.3.3). La reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente durante 5 min y se paró con la adición de 250  $\mu\text{l}$  1 M de ácido acético en 2-propanol. Los ácidos grasos no esterificados se extrajeron dos veces en 300  $\mu\text{l}$  de hexano y la radiactividad en la fase orgánica se determinó por centelleo líquido (Materiales y Métodos 3.4.3.4). Los datos obtenidos de estos ensayos se analizaron con el uso del programa OriginPro 8 (OriginLab Corporation, EEUU).

### **3.5 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN TRANSITORIA.**

#### **3.5.1 Expresión transitoria en células de tabaco BY-2.**

Los genes que codificaban las proteínas a estudiar se clonaron en el plásmido pUC18 (Materiales y Métodos 3.2.10), que permite unir a las proteínas expresadas la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) o cherry (color rojo). Para ello fueron amplificados empleando los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 14 y se clonaron como se describe en el apartado de Materiales y Métodos 3.2.3.2. En todas las construcciones se eliminó el codón de parada y la GFP fue anclada en el extremo C-terminal de cada proteína.

Oligonucleótidos	Secuencia
LACS1-F	5'-GCTAGCATGAGTGCATATGTAGTTG-3'
LACS1-R	5'-GCTAGCAGAAAGATAAACTTTGCCAGC-3'
LACS2-F	5'-GCTAGCATGGATGTTGGGGGAT-3'
LACS2-R	5'-GCTAGCACCATATAGCATTTC-3'
FATA-F	5'-GCTAGCATGCTCTCCAGAGGTGTTTC-3'
FATA-R	5'-GCTAGCTTTTTTTTGC GGGTTTTTTTCC-3'
FATB-F	5'-GCTAGCATGGTAGCTATGAGTGCTAC-3'
FATB-R	5'-GCTAGCAACATTTCCAGCAGAGAAGTG-3'
FATB-Fc	5'-TTTATCAACCAATTGATGATGCTGGAATGG-3'
FATB-Rc	5'-CCATTCCAGCATCATCAATTGGTTGATAAA-3'

Tabla 14. Oligonucleótidos utilizados para los estudios de localización en los que se empleó el plásmido pUC18. LACS (acil-CoA sintetasa), FAT (ácido graso tioesterasa).

### 3.5.1.1 Eliminación de la región hidrofóbica en la secuencia *HaFatB*.

La eliminación del fragmento interno (región hidrofóbica) de *HaFatB* se realizó aplicando varios pasos de PCR (Materiales y Métodos 3.2.5.3). Este método consiste en la replicación de la secuencia mediante PCR con unos oligonucleótidos internos (Tabla 14) que eliminan la secuencia de la mencionada región hidrofóbica (Figura 21). Se pueden diferenciar dos etapas:

A) Una primera etapa que consiste en la replicación mediante PCR de la secuencia anterior (Figura 21, región 1) y posterior a la región hidrofóbica (Figura 21, región 3). En esta etapa, tanto el oligonucleótido reverso (FATB-Rc) de la PCR-A como el oligonucleótido directo (FATB-Fc) de la PCR-B son secuencias complementarias, por lo que los fragmentos replicados presentan una zona común de afinidad.

B) Se tomó una muestra de la PCR-A y PCR-B diluida 100 veces y se amplificó con los oligonucleótidos directo (FATB-F) y reversos (FATB-R) del extremo de la secuencia mediante una nueva PCR-C. En esta segunda etapa se lleva a cabo la amplificación del fragmento completo habiendo eliminado la región hidrofóbica (Figura 21). La secuencia se clonó en el plásmido pMBL-T y se secuenció para confirmar la correcta pauta de lectura (Materiales y Métodos 3.2.12) antes de ser clonada en el plásmido pUC18-Cherry.



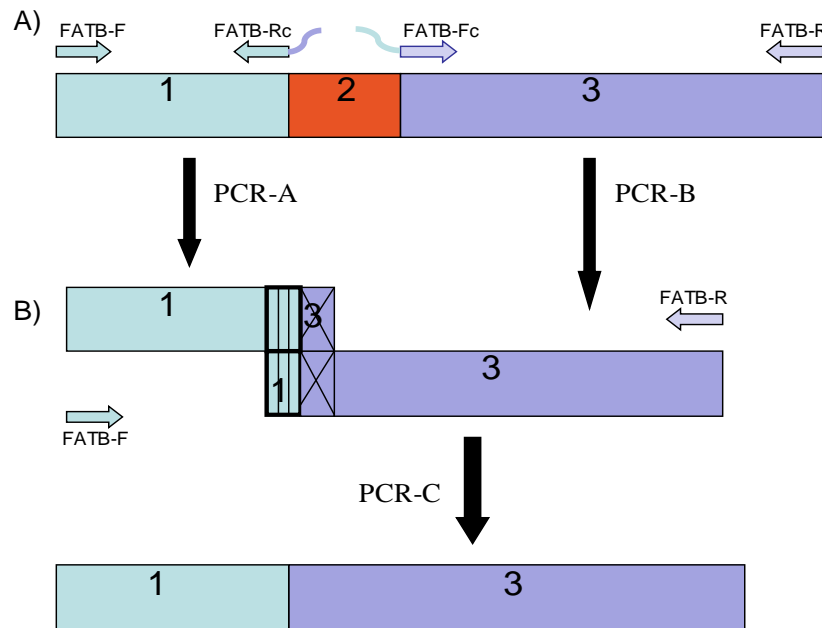


Figura 21. Esquema de la eliminación de la región hidrofóbica de la secuencia *HaFatB* mediante PCR. 1. Región anterior a la zona hidrofóbica. 2. Región hidrofóbica. 3. Región posterior a la zona hidrofóbica. A) amplificación de las secuencias 1 y 3 mediante dos PCR independientes. B) Amplificación de la secuencia completa sin la región hidrofóbica utilizando los oligonucleótidos de los extremos.

### 3.5.1.2 Transformación de células BY-2 mediante biobalística.

Las construcciones en pUC18 se usaron para transformar una suspensión de células de tabaco BY-2 (*N. tabacum* cv Bright Yellow-2). La transformación se llevó a cabo usando 5  $\mu\text{g}$  del plásmido. Como control se utilizaron 2,5  $\mu\text{g}$  de RFP (proteína fluorescente roja) utilizada como control citosólico o Tic40-RFP (translocon a la membrana interior del cloroplasto-RFP) utilizado como marcador de la membrana plastidial (Heins et al., 2002). Las células se transformaron empleando la técnica de biobalística con bombardeo de partículas (biolistic particle delivery system-1000/HE, Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Canadá). Las células transformadas se incubaron durante 6 h en oscuridad permitiendo la expresión de la proteína, entonces se fijaron en formaldehído, y se incubaron con 0,01 % (w/v) pectolidasa Y-23 (Kyowa Chemical Products, Osaka, Japan). Más tarde, las células se permeabilizaron con 0,3 % (v/v) tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Alemania). En el caso de usar un marcador del retículo endoplasmático, en este paso se añadió Concanavalina A (ConA) (Tartakoff y Vasalli, 1983) a una concentración final 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se incubaron durante 20 min. Las células tratadas se analizaron mediante microscopía confocal (Materiales y Métodos 3.5.3).

### 3.5.2 Expresión transitoria en hoja de tabaco.

#### 3.5.2.1 Construcción de la secuencia gen-GFP.

Para el estudio de expresión transitoria en hojas se empleó el plásmido pSa13 (Tabla 12). Dicho plásmido no añadía la proteína que aporta la fluorescencia, por lo tanto, la secuencia de la GFP se adicionó (Figura 22) al extremo *N*-terminal de las secuencias *HaACBP4* y *HaACBP6* mediante técnicas de PCR (Materiales y Métodos 3.2.5.3):

A) Se amplificaron las secuencias con los oligonucleótidos (Tabla 15) ACBP4-F y ACBP4GFP-Ra para *HaACBP4*-GFP, ACBP6-F y ACBP6GFP-Ra para *HaACBP6*-GFP, eliminado en ambos caso el codón de parada de traducción. Además, se amplificó por otro lado el gen que codifica a la proteína que aportaría la fluorescencia con los oligonucleótidos ACBP4GFP-Fa y GFP-R para *HaACBP4*-GFP, ACBP6GFP-Fa y GFP-R para *HaACBP6*-GFP (Figura 22).

B) Una vez amplificadas ambas secuencias, se tomaron como base para levantar la secuencia completa *HaACBP4*-GFP con los oligonucleótidos ACBP4-F y GFP-R, mientras que para la secuencia *HaACBP6*-GFP se utilizaron los oligonucleótidos ACBP6-F y GFP-R. La secuencia se clonó en el plásmido pMBL-T y se secuenció para confirmar la correcta pauta de lectura (Materiales y Métodos 3.2.12) antes de ser clonada en el plasmido pSa13.

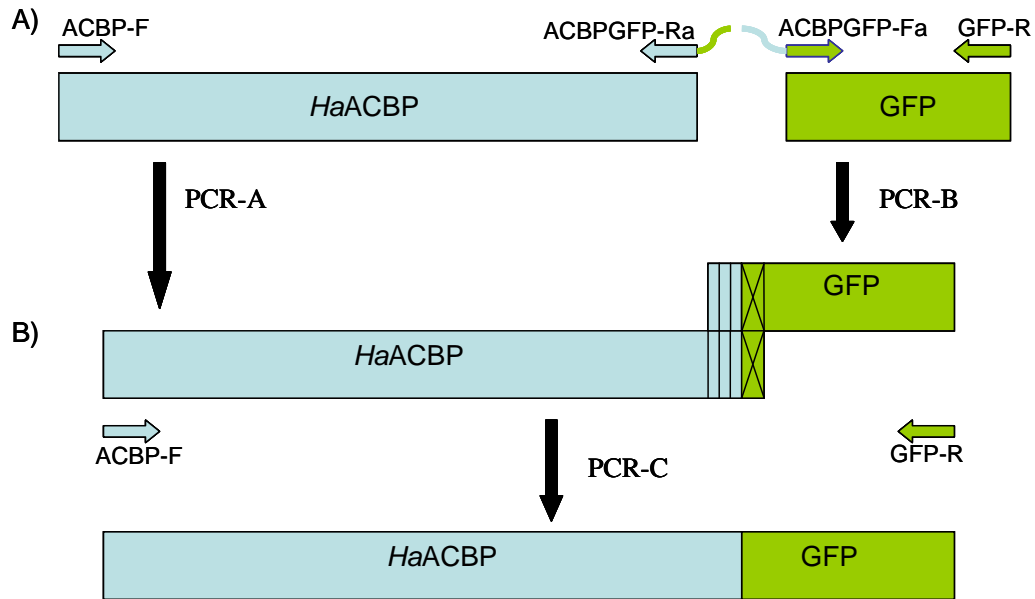


Figura 22. Esquema de la adición del péptido GFP a la secuencia de *HaACBP* mediante PCR. A) amplificación de las secuencias *HaACBP* y GFP mediante dos PCR independientes. Los oligonucleótidos ACBPGFP-Ra y ACBPGFP-Fa son secuencias complementarias. B) Amplificación de la secuencia completa con la adición de la molécula GFP.

Oligonucleótidos	Secuencia
ACBP4-F	5'-CCCGGGATGGCGATGGCGAGAGCGAG-3'
ACBP4GFP-Ra	5'- GCCCTTGCTCACCATAGTATCATGGGTAGG-3'
ACBP4GFP-Fa	5'- CTACCCATGATACTATGGTGAGCAAGGGC-3'
GFP-R	5'-CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTC-3'
ACBP6-F	5'-CCCGGGATGGGTTTGAAGGAGGAC-3'
ACBP6GFP-Ra	5'-AGCGGCAGCGTCCATAGTATCATGGGTAGG-3'
ACBP6GFP-Fa	5'-CCTACCCATGATACTATGGACGCTGCCGCT-3'
GFP-F	5'-CCCGGGATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'

Tabla 15. Oligonucleótidos utilizados para los estudio de localización en los que se empleó el plásmido pSa13. ACBP (proteína de unión a acil-CoA), GFP (proteína fluorescente verde).

### 3.5.2.2 Agroinfiltración en hoja de tabaco.

Se dejó crecer un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* transformado con las construcciones adecuadas durante 16 h a 28 °C en placas de LB-Agar con los antibióticos correspondientes. Este cultivo se utilizó para infiltrar en hoja de tabaco junto el supresor viral 35S:p19 (Voinnet et al., 2003). El cultivo se centrifugó a 5.000 x g, 15 min a temperatura ambiente para recoger las células. El pellet se resuspendió suavemente en 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 150 µg/ml de acetosiringona. Las células se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 3 h antes de ser infiltradas. Los medios que contenían las construcciones *HaACBP4-GFP* y *HaACBP6-GFP* se mezclaron con el medio 35S:p19 en la misma proporción hasta alcanzar una D<sub>600</sub> final de 0,6. En la infiltración se usaron hojas jóvenes de una planta de tabaco de 6 semanas (*N. benthamiana*). La epidermis de la hoja se examinó mediante microscopía confocal (Materiales y Métodos 3.5.3).

### 3.5.3 Técnica de microscopía láser confocal.

Los estudios de microscopía confocal se realizaron en un microscopio Leica DM RBE (España) equipado con un objetivo Leica 63x Plan Apochromat utilizando aceite de inmersión. La toma de imágenes tanto en los estudios con células BY-2 así como en hojas de tabaco se llevó a cabo con un microscopio confocal láser de barrido. El software utilizado en el equipo fue TCS SP2 scanning y LEICA TCN NT software package (version 2.61) (Leica). La GFP fue excitada a 488 nm con un láser de Argon, mientras que la RFP fue excitada a 543 nm con un láser de HeNe. Ambas con una abertura en el filtro de emisión de 480-550 nm. Las imágenes digitales fueron tomadas con resolución 512 x 512-píxeles.

### 3.5.4 Estudio de localización mediante *western blot*.

#### 3.5.4.1 Aislamiento de plastidios.

Aproximadamente 5 gramos de semillas peladas fueron troceadas con cuchilla en medio de aislamiento de plastidios enfriado sobre hielo (PIM: 0,5 M sorbitol, 20 mM HEPES /NaOH pH 7,4, 10 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) etanodiol, 5 mM DTT) (Jain et al., 2008). El extracto fue filtrado a través de tejido Miracloth

(Merck, Alemania) y el residuo de nuevo homogeneizado en medio PIM y vuelto a filtrar. Este proceso se repitió una vez más siendo el volumen del homogenado inicial de aproximadamente 25 ml. Un volumen de 1 ml de este homogenado fue tomado como muestra total y el resto se centrifugó a 750 x g durante 5 min. Un volumen de 1 ml del sobrenadante fue obtenido como fase soluble y el resto se desechó. El precipitado, que contiene los plastidios, fue resuspendido en 1 ml de PIM y mezclado suavemente para obtener intacta la fracción cruda de plastidios. Esta fracción se resuspendió nuevamente en 25 ml PIM, volviéndose a centrifugar a 750 x g durante 5 min. El sobrenadante fue eliminado y se resuspendió el precipitado en 1 ml de PIM obteniéndose la fracción lavada de plastidios. Posteriormente los plastidios fueron rotos por sonicación y centrifugados a 100.000 x g durante 2 h para separar la fracción membranosa del plastidio y la fracción soluble o estroma. La localización de *HaFatB* se realizó mediante *western blot* (Materiales y Métodos 3.3.10) utilizando anticuerpos anti-*AtFatB* producidos según se describe en (Doermann et al., 2000), cedido a nuestro laboratorio por el profesor John Ohlrogge (Michigan State University, East Lansing, Michigan, EEUU).

Las muestras de sobrenadante anteriormente tomadas se utilizaron para determinar el grado de purificación de los plastidios, mediante la medida de la actividad fosfofructuquinasa dependiente de pirofosfato, usada como marcador citosólico (Materiales y Métodos 3.5.4.2).

#### **3.5.4.2 Ensayo de actividad fosfofructuquinasa dependiente de PPi como medida de la pureza de la preparación.**

Los ensayos fueron realizados mediante la utilización de reacciones acopladas y detección espectrofotométrica a 340 nm (Ultrospec™ 3300 pro Amersham Biosciences, EEUU) del consumo de nicotinamida adenina dinucleotido (NADH). Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y el extracto utilizado para todos los ensayos se mantuvo en hielo hasta su utilización, siendo 1 ml el volumen final de las reacciones (Burrell et al., 1994; Schaffer et al., 1996). La mezcla de reacción fue 100 mM Tris pH 8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM NADH, 2 μM fructosa-2,6-bisfosfato, 0,2 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 unidad de aldolasa, 10 unidades de triosa-P-isomerasa, 1,3 unidades de glicerol-3-P deshidrogenasa, siendo la reacción iniciada por la adición de fructosa-6-P.

## **3.6 ANÁLISIS DE ACIL-CoA Y ÁCIDOS GRASOS.**

### **3.6.1 Extracción de los acil-CoA.**

La extracción de los acil-CoA se llevó a cabo según el método publicado por Larson y Graham (2001). Se recogieron muestras de semillas desde los 15 hasta los 50 DDF a intervalos de 5 días. En los estudios de germinación se tomaron muestras de cotiledón en distintos estadios dentro de este proceso. Se partió de un peso de 150-250 mg de muestra que se transfirió a tubo Eppendorf conteniendo un volumen de 10  $\mu$ l de 100 pmol/ $\mu$ l heptadecanoil-CoA como patrón interno. A continuación se añadieron 250  $\mu$ l de una disolución de 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,2, 50  $\mu$ l de ácido acético, 80  $\mu$ l BSA 50 mg/ml al 50 % de 2-propanol y el tejido fue triturado usando una varilla de plástico. Lípidos y pigmentos fueron extraídos tres veces con 200  $\mu$ l de una mezcla de éter saturado con 2-propanol: agua 1:1 (v/v). Las dos fases fueron separadas en una centrífuga a baja velocidad (100 x g) y el sobrenadante fue eliminado. Se añadió un volumen de 5  $\mu$ l de agua saturada en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 600  $\mu$ l de metanol/ cloroformo 2:1. Se agito con vortex y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 20 min. A continuación, se centrifugó a 21.000 x g durante 2 min. El sobrenadante acuoso se transfirió a tubos Eppendorf de 1,5 ml y fue llevado a sequedad a vacío a 40 °C en un sistema SpeedVac. El residuo fue reconstituido en 40  $\mu$ l de reactivo de cloroacetaldehído (Sigma-Aldrich, Alemania) y almacenado a -20 °C hasta su análisis.

### **3.6.2 Formación de acil-eteno-CoA fluorescentes.**

Los derivados fluorescentes de los acil-CoA fueron preparados mediante reacción con cloroacetaldehído (Sigma-Aldrich, Alemania) según el método descrito por Larson et al., (2001). Los estándares de acil-CoA comerciales fueron adquiridos de Avanti Lipids (EEUU), preparándose stocks a una concentración 0,1 mM en 10 mM MES pH 5,5. Un volumen de 10  $\mu$ l del stock de patrón fue disuelto en 1 ml de reactivo de cloroacetaldehído que consistió en una disolución acuosa 0,5 M de este compuesto en 0,15 M citrato pH 4,0, 0,5 % (p/v) SDS (almacenado a temperatura ambiente y oscuridad). Las muestras de acil-CoA preparadas a partir de tejido se atemperaron y se llevaron a 0,3 ml con mezcla derivatizante. La reacción de derivatización se llevó a cabo en un baño de agua a 80 °C durante 20 min antes del análisis por HPLC.

### 3.6.3 Síntesis de acil-CoA no comerciales.

Los acil-CoA no comerciales, ésteres de ácidos grasos del gondoico (20:1), erúico (22:1) y nervónico (24:1), fueron sintetizados para la calibración del método de análisis mediante la reacción de la *N*-hidroxisuccinamida de los correspondientes ácidos grasos (acil-NHS) con Con A reducido y preparado en el momento (Al-arif y Blecher, 1969). El acil-NHS fue preparado por la reacción de un ácido graso libre con *N*-hidroxisuccinamida en la presencia de dicitclohexilcarbodiimida disuelta en acetato de etilo seco, en una relación equimolar durante 16 h a 25 °C (Lapidot et al., 1967). Los acil-CoA fueron sintetizados por la reacción de 50 mg de Con A reducido en 3 ml de agua con un exceso de 0,8 g de acil-NHS disuelto en 6 ml de THF en la presencia de 50 µl de ácido tioglicólico y 168 mg de bicarbonato sódico durante 4 h a 25 °C. El CO<sub>2</sub> producido en la reacción fue eliminado en un sistema de vacío y el producto de la reacción se precipitó mediante la adición de 12 ml HClO<sub>4</sub> al 5 %. El precipitado de color blanco se filtró y lavo con una mezcla de HClO<sub>4</sub> al 8 %, acetona y finalmente en éter etílico. El acil-CoA seco se disolvió en agua y se precipitó de nuevo en la disolución de HClO<sub>4</sub> al 8 %. El producto purificado fue confirmado mediante técnicas de cromatografía en placa fina (TLC), desarrollando el método en una mezcla de *n*-butanol/agua/ácido acético (8:8:1) como solvente. El compuesto 18:0-CoA fue usado como patrón. La cuantificación del acil-CoA producido se llevó a cabo mediante cromatografía de gases (Materiales y Métodos 3.6.6) usando como patrón interno el ácido heptadecanoico.

### 3.6.4 Preparación de 26:1-CoA.

El *n*-9 26:1-CoA usado como estándar no comercial, se sintetizó a partir del ácido graso comercial 24:1 mediante dos reacciones de elongación de cadena sucesivas las cuales implicaron reducción, metilación, cianuración y metanolisis del grupo nitrilo resultante. La reducción del ácido graso (o éster metílico) para la formación del correspondiente alcohol se llevó a cabo en éter dietílico seco, con la adición de un exceso de AlH<sub>4</sub>Li. Se dejó la mezcla de reacción durante 10 min a temperatura ambiente. El exceso de agente reductor fue neutralizado con 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El compuesto alcohólico se recuperó de la fase orgánica y se transformó en el correspondiente

mesilato por reacción con  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$  (10 % en  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ , 2,4 % trietilamina) a temperatura ambiente durante 2 h. Este compuesto fue purificado por TLC y se llevó a cabo la cianuración durante toda la noche con un exceso de KCN disuelto en dimetilsulfóxido. El nitrilo fue purificado por TLC y tratado con metanol/HCl comercial (20:80) a 80 °C durante 2 h. El éster metílico del ácido graso producido contenía un átomo de carbono más que el producto de partida. El tamaño del producto final fue confirmado mediante GC-MS.

### 3.6.5 Análisis de los acil-etenos-CoA derivados por HPLC.

Los patrones y las muestras se analizaron por HPLC en un aparato Waters 2695 equipado con una columna XBridge C18 (250x 0.5, 5 $\mu\text{m}$ ) de Waters (España) y un detector de fluorescencia (Multi  $\lambda$  Fluorescence Detector Waters 2475) usando el sistema de gradiente cuaternario publicado por Larson y Graham, (2001). El flujo de la fase móvil en la columna fue de 0,75 ml/min y una temperatura de 40 °C. La composición de la fase móvil fue: A, 1 % ácido acético; B, 90 % acetonitrilo 1 % ácido acético; C, 0,25 % TEA 0,1 % THF; D, 90 % acetonitrilo. El gradiente de elución fue el siguiente: 0-7,0min, (90 %A 10 %B a 20 %A 80 %B); 7,0-7,1min, (20 %A 80 %B a 20 %A 80 %C); 7,1-9,0min, (20 %A 80 %C a 90 %C 10 %D); 9,0-34,0min, (90 %C 10 %D a 25 % C 75 %D); 34,0-35,0min, (25 %C 75 %D a 100 %D); 35,0-39,0min, (100 %D a 100 %D); 39,0-40,0min, (100 %D a 90 %A 10 %B); 40,0-45,0min, (90 %A 10 %B). Los derivados fueron detectados con una  $\lambda$  de excitación de 230 nm y una de emisión de 420 nm. La cuantificación se llevó a cabo en función del patrón interno. Los datos fueron procesados mediante el programa Empower suministrado por el fabricante del aparato.

### 3.6.6 Análisis de ácidos grasos. Formación de sus ésteres metílicos.

Para determinar la composición de ácidos grasos de los lípidos mediante cromatografía de gases es necesario formar sus ésteres metílicos (FAME, *Fatty Acid Methyl Esters*). Para ello se empleó un método de metilación rápida (Garcés y Mancha, 1993), que consistió en añadir a las muestras 3 ml de una mezcla compuesta por metanol/tolueno/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  (88:10:2 v/v/v), y calentarlas durante 1 h a 80 °C. Posteriormente,



una vez enfriada la mezcla, los ésteres metílicos del ácido graso se extrajeron dos veces con 2 ml de heptano y fueron analizados por cromatografía de gases. Los ésteres metílicos se separaron y cuantificaron usando un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890A (Palo Alto, CA, EEUU), con una columna capilar de sílice fundida SP2380 (30 m de longitud, 0,25 mm de luz interna y 0,20  $\mu\text{m}$  de grosor de fase) (Supelco Bellefonte, EEUU) y un detector de ionización de llama. El gas portador fue hidrógeno con una velocidad lineal de 28 cm/s con el horno a 170 °C. Inyector y detector se mantuvieron a una temperatura de 200 °C. El ratio de partición del inyector fue de 1:50, siendo el tiempo para cada análisis individual de unos 8 min. La identificación de los picos cromatográficos correspondientes a los ácidos grasos se determinaron por comparación con patrones conocidos (Sigma, Alemania).

### **3.6.7 Estudios de espectroscopía de masas.**

La caracterización mediante espectroscopía de masas (MS) se llevó a cabo en un aparato micrOTOF-QIITIM (Broker Daltonik GmbH, Bremen) con acelerador ortogonal TOF (tiempo de vuelo) y equipado con un ionizador de electrospray (ESI), trabajando con una fuente en modo negativo. Se aplicó un rango de escaneado de  $m/z$  50-3000 con una inyección continua de 6 l/min de gas a 200 °C. El gas colisionador utilizado fue argón con un voltaje de spray a 4.000 V. Se empleó nitrógeno como fuente de gas a 0,6 psi y 6 l/min. El modo de escaneado MS-MS se seleccionó para los compuestos de referencia y un monitor de multireacción (MRM) para muestras con calibración externa. Antes de las muestras, se inyectaron los patrones, previamente disueltos en metanol acidificado con 0,1 % AcOH, inyectándose a un flujo continuo de 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  en la fuente ESI. El modo MS-MS fue elegido para la adquisición del espectro de masas y adquirir el correspondiente ión molecular  $[M-H]$  como ión precursor a la obtención de las características del fraccionamiento iónico MS-MS. A continuación, las muestras fueron analizadas en modo MRM para la selección del ión protonado de todos los compuestos del estudio.



## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 4.1 ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS PORTADORAS DE ACILOS.

### 4.1.1 Clonación de tres genes de ACP en girasol.

Para llevar a cabo la clonación de los genes que codifican a las proteínas ACP de girasol, y utilizando la información existente en ARALIP (<http://aralip.plantbiology.msu.edu/pathways/pathways>), se identificó la ACP de *Arabidopsis* (*AtACP*), codificada por el gen *At3g05020* como aquella que presentaba los mayores niveles de expresión en semillas de desarrollo durante la fase activa de acumulación de aceite. Utilizando la secuencia proteica de dicho gen y el algoritmo de búsqueda TBLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se identificaron tres ESTs (*Expressed sequence tags*) de girasol en las bases de secuencias depositadas en el GenBank. La secuencia de estos ESTs se utilizó para el diseño de oligonucleótidos específicos que permitieran la clonación de los cDNA correspondientes en las semillas en desarrollo de la línea control de girasol utilizada CAS-6. De los tres ESTs hallados, solo dos de ellos contenían la secuencia completa de nucleótidos codificante para la proteína, los cuales se denominaron *HaACP1* y *HaACP2*. Estas dos secuencias pudieron amplificarse diseñando oligonucleótidos específicos para los extremos 5' y 3'. En el caso del gen denominado como *HaACP3*, el EST correspondía a una secuencia parcial en la que faltaba el extremo 5' y hubo de ser amplificada mediante el método RACE descrito en la sección experimental (Materiales y Métodos 3.2.5.1). Se utilizó como molde ADNc de semilla de girasol de 20 DDF y los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 10. Finalmente, los fragmentos de PCR correspondientes a las secuencias completas que codifican a las tres proteínas ACP, de unas 400 pb cada una, fueron clonados en el plasmido pMBL-T Easy (Invitrogen, España) para su posterior secuenciación. Las secuencias *HaACP1*, *HaACP2* y *HaACP3* se depositaron en GenBank con los números de acceso HM013970, HM013971 y HM013972, respectivamente.

El alineamiento de las secuencias proteicas deducidas a partir de los cDNA clonados con las secuencias de las proteínas *AtACP* (*At3g05020*) y ACP de *E. coli* (*EcACP*) (Figura 23), utilizando el programa ClustalX (Materiales y Métodos 3.2.12), puso de manifiesto el grado de conservación existente en estas proteínas incluso entre organismos distantes filogenéticamente, mostrando un 35 % de identidad entre ellas en la proteína madura. Como era de esperar, las secuencias de ACP de plantas presentaban un péptido de tránsito al cloroplasto que abarca los primeros ~55 aa.



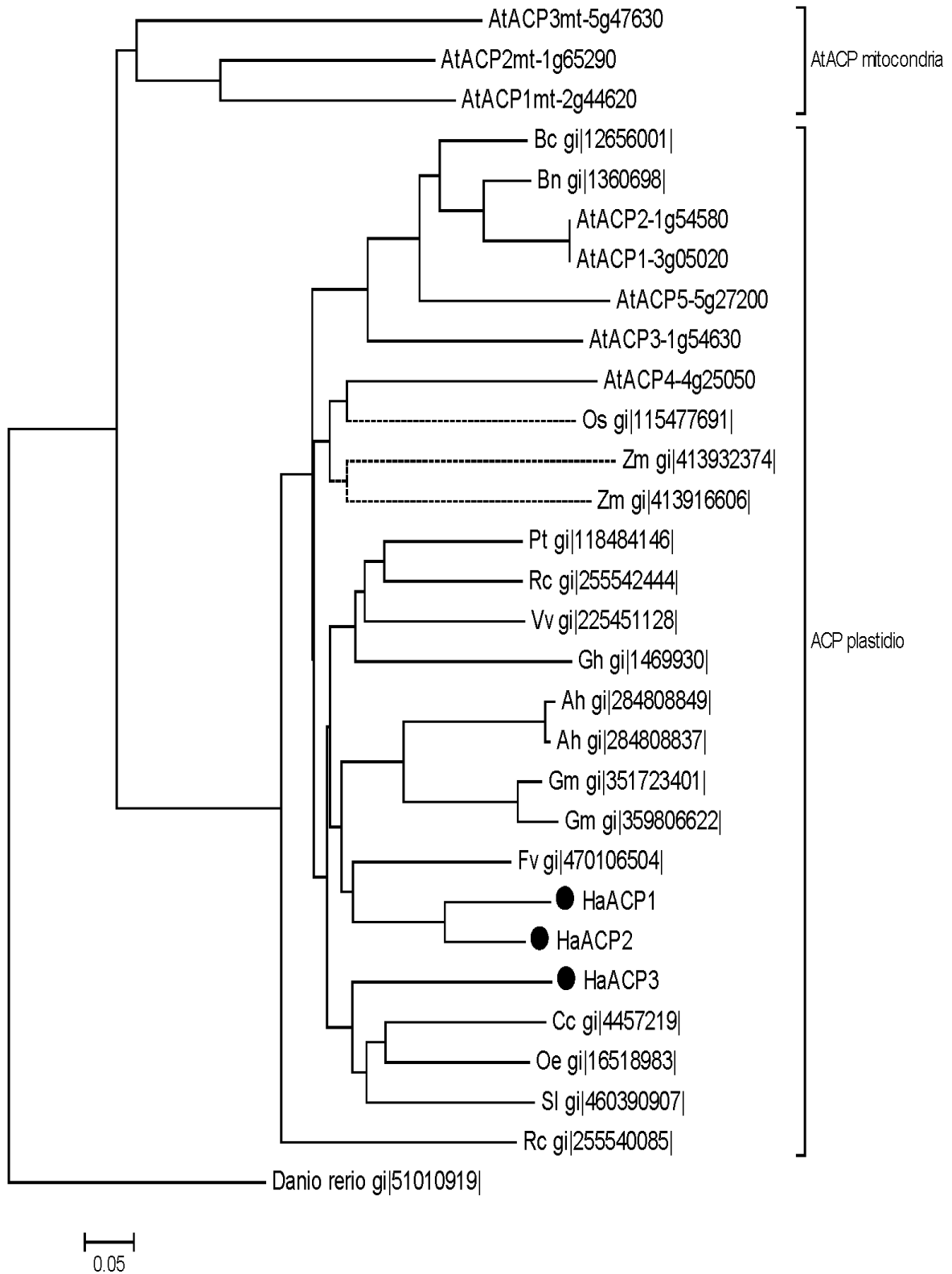


Figura 24. Comparación filogenética de las proteínas portadoras de grupos acilo de girasol con sus homólogas de otras especies. Las especies incluidas en este árbol son: Ah; *Arachis hipogea*, At; *Arabidopsis thaliana*, Bc; *Brassica campestris*, Bn; *Brassica napus*, Cc; *Cucumis colocynthis*, Fv; *Fragaria vesca*, Gh; *Glycine hirticaulis*, Gm; *Glycine max*, Ha; *Helianthus annuus*, Oe; *Olea europea*, Os; *Oryza sativa*, Pt; *Populus trichocarpa*, Rc, *Ricinus communis*, Sl; *Solanum lycopersicum*, Vv; *Vitis vinífera*, Zm; *Zea mays*, *Danio rerio* (Pez cebra). Monocotiledoneas (----).

### 4.1.3 Modelo estructural de las *HaACP*.

El modelado de las estructuras tridimensionales de las ACP de girasol se vio facilitado por la disponibilidad de estructuras cristalinas de ACP homólogas en la base de datos de proteínas RCSB PDB (Berman et al., 2000). Utilizando estas estructuras y el servidor de modelado de proteínas SWISS-MODEL (Guex et al., 1997), se obtuvo el modelo de la estructura tridimensional de estas proteínas portadoras de grupos acilos de girasol (Figura 25). La estructura que se representa es la forma inactiva apo- *EcACP* y como veremos a continuación es muy similar a otras ACP descritas anteriormente.

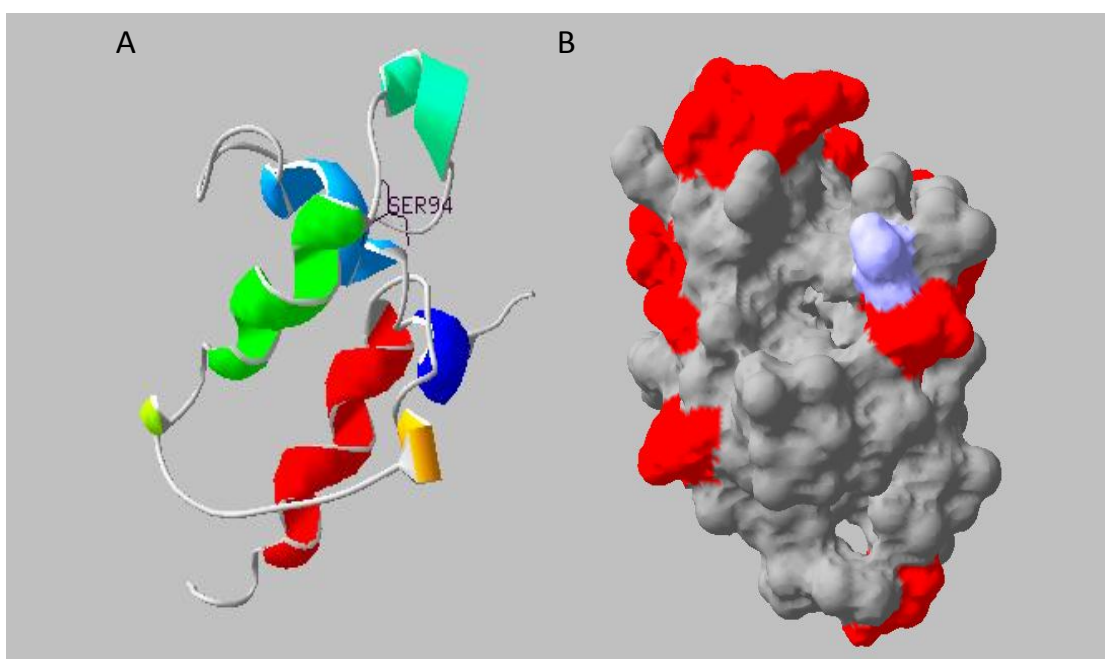


Figura 25. Modelo tridimensional propuesto para las proteínas portadoras de grupos acilos de girasol. A) Estructura tridimensional de la proteína portadora de grupos acilos (*N*-terminal en color azul y la *C*-terminal en rojo). Podemos observar el aminoácido serina (*Ser*), al que se une la fosfopantoteína. B) Estructura globular de la proteína, en rojo se observa la región hidrofóbica, en morado el aminoácido serina.

Un gran número de ACP de diferentes organismos como bacterias (Holak et al., 1987; Chan et al., 2010), levaduras (Leibundgut et al., 2007; Lomakin et al., 2007), espinaca (Zornetzer et al., 2006; Roujinikova et al., 2002) y humanos (Ploskon et al., 2008) han sido publicadas. La estructura general presenta entre 4-5  $\alpha$ -hélices, las cuales forman una región hidrofóbica (Figura 25-B) en su superficie que facilita la elongación de la cadena acílica de naturaleza hidrofóbica durante el proceso de síntesis *de novo* (Chan et al., 2010). Las ACP son sintetizadas por los ribosomas en su forma inactiva (apoACP) y deben ser activadas por la enzima *acpS* a su forma activa holo-ACP. La



activación consiste en la unión de un grupo fosfopantoténico aportado por el CoA a un residuo de serina (Ser) que forma parte de la secuencia de la proteína (Figura 25-A). Este residuo de Ser ha sido identificado en *EcACP* como el presente en la posición 36 de su secuencia. Esta región es una zona muy conservada y en todas las especies estudiadas se ha encontrado el motivo Asp-Ser-Leu (D-S-L) en su secuencia (Chan et al., 2010).

#### 4.1.4 Niveles de expresión génica de *HaACP1*, *HaACP2* y *HaACP3*.

El nivel de expresión de las tres ACP clonadas se estudió en distintos tejidos de girasol a partir de ADNc de hoja, raíz, tallo, semillas en desarrollo y cotiledones de semilla en germinación de la línea control CAS-6 mediante RT-qPCR (Materiales y Métodos 3.2.6). Los niveles de expresión de las tres isoformas de ACP durante la formación de las semillas fueron muy parecidos, no hallándose grandes diferencias entre ellos (Figura 26).

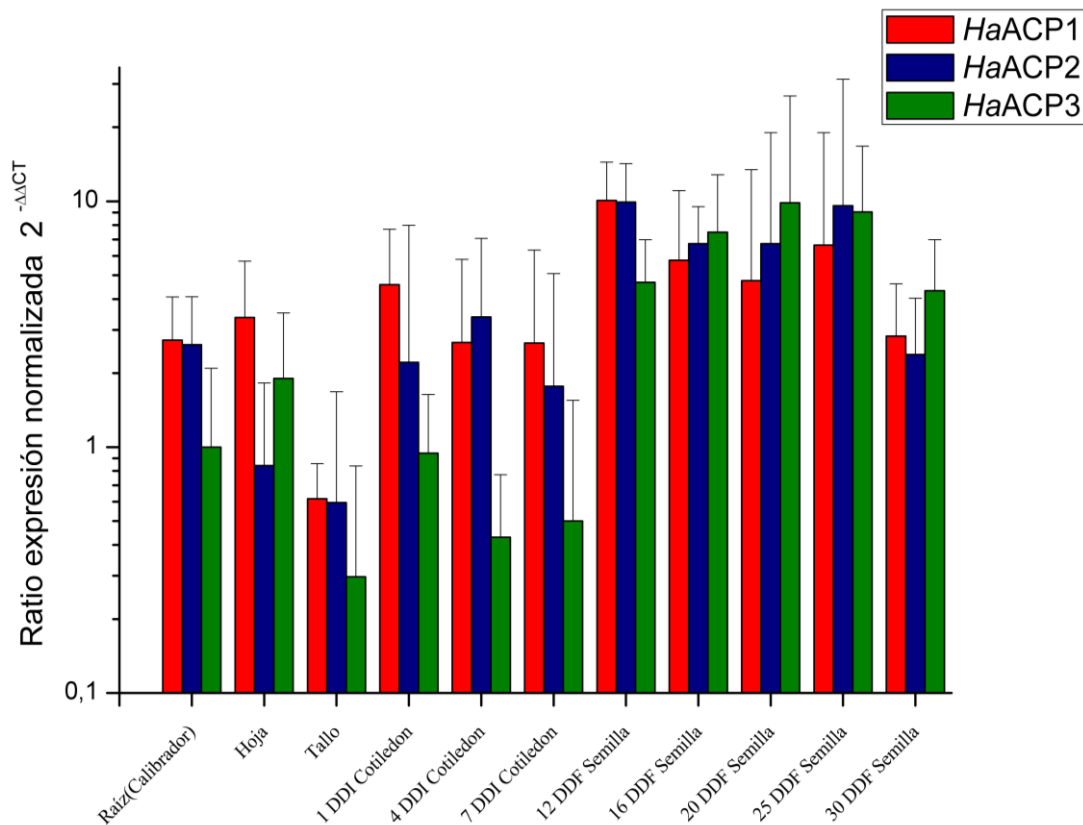


Figura 26. Análisis de los niveles de expresión de los genes *HaACP1*, *HaACP2* y *HaACP3* en diferentes tejidos de la línea control CAS-6 mediante RT-qPCR. Los valores para *HaACP1* están en rojo, para *HaACP2* en azul y para *HaACP3* en verde. Se representan medias +/- desviaciones estándar calculadas a partir de tres experimentos independientes.

En el caso del cotiledón, el gen *HaACP3* presento valores de expresión más bajos que los otras dos. Las tres formas de ACP se expresaron también en hoja, raíz y tallo indicando que estas participan tanto en la síntesis de los TAG de semillas como en la síntesis de lípidos de membrana que tiene lugar en los tejidos vegetativos de la planta.

### **4.1.5 Expresión heteróloga de las apo-*HaACP*.**

Para la expresión heteróloga de las *HaACP* en *E. coli*, se diseñaron oligonucleótidos para eliminar el péptido de tránsito de la proteína mediante PCR, añadiéndose en sus extremos dianas de restricción para las enzimas *BamHI* y *XhoI* en los tres casos (Materiales y Métodos 3.2.5.2). Para evitar los efectos tóxicos descritos anteriormente para estas proteínas (Schaeffer et al., 2001), simplificar el proceso de purificación y aumentar el rendimiento de las mismas disminuyendo así el volumen de cultivo bacteriano, el producto de PCR obtenido fue clonado en el vector de expresión pGEX (Tabla 12). Este vector adiciona una molécula de glutation-S-transferasa (GST) en el extremo *N*-terminal de la molécula facilitando así su purificación. Además, este péptido puede ser eliminado de las proteínas ACP mediante una digestión enzimática con trombina (Materiales y Métodos 3.3.3). El producto de PCR obtenido con cada par de oligonucleótidos, fue clonado en el vector pGEX, y las construcciones resultantes denominadas GST-ACP1, GST-ACP2 y GST-ACP3, utilizadas para transformar *E. coli* BL21 tal y como se detalla en Materiales y Métodos 3.2.3.2. La expresión de las proteínas de fusión resultantes, con un tamaño aproximado de 37 kDa, fue confirmada mediante análisis por SDS-PAGE (Figura 27-A).

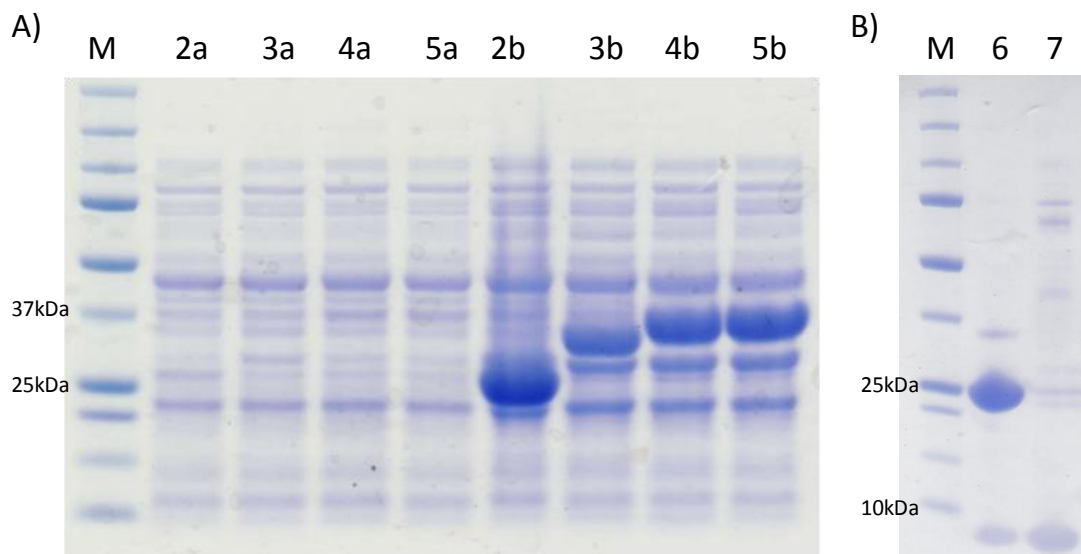


Figura 27. Gel SDS-PAGE de las construcciones pGEX, *HaACP1*, *HaACP2* y *HaACP3*. A) M; Marcador, 2; pGEX, 3; GST-*HaACP1*, 4; GST-*HaACP2*, 5; GST-*HaACP3*, a; muestras  $DO_{600}$  sin ser inducidas, b; muestras 4 h tras inducir el cultivo. B) 6; GST y *HaACP* añadiendo la trombina una vez eluida, 7; Fracción eluida tras ser hidrolizada por la trombina en el lecho de la columna.

Una vez las proteínas de fusión fueron purificadas, se aislaron las distintas apo-ACP mediante la digestión del fragmento GST con trombina (Sigma-Aldrich, Alemania) (Materiales y Métodos 3.3.3). Este método permitió la producción de las ACP de girasol evitando cualquier efecto tóxico de las mismas sobre las bacterias, así como su transferencia a los cuerpos de inclusión, recuperándose altas concentraciones de las mismas en la fracción soluble de las *E. coli* transformantes (Figura 27).

#### 4.1.6 Clonación de la holo-ACP sintetasa de *E. coli*.

Las ACP producidas mediante fusión con GST y posterior digestión con trombina no son funcionales ya que carecen del grupo 4'-PP al cual se enlazan los ácidos grasos mediante un enlace tioester. De esta forma, para estudiar su influencia en distintas reacciones enzimáticas es necesario activarlas. La activación de las ACP la lleva a cabo la *acpS* que transfiere el grupo 4'-PP desde una molécula de Con A a la apo-ACP para producir la forma activa, holo-ACP. Esta enzima no es comercial, por lo que fue clonada, sobreexpresada en *E. coli* y purificada para la activación de *EcACP* y de las tres formas de ACP de girasol estudiadas en el presente trabajo.

A partir de la secuencia conocida de la *EcacpS* disponible en la base de datos pública (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se diseñaron los oligonucleótidos *acpS-F(Hist)* y *acpS-R* con las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* necesarios para levantar la secuencia completa que codifica para esta enzima, tal y como se detalla en la sección de Materiales y Métodos 3.2.5.3 (c), a partir de una PCR de colonia. Se obtuvo la secuencia completa de ADNc de 381 pb y un ORF codificante para 127 aa. El fragmento resultante se ligó (Materiales y Métodos 3.2.3.2) con el plásmido de expresión pQE80 (Tabla 12), plásmido que adiciona en el extremo *N*-terminal una región de poli-histidinas (6xHis) para facilitar su purificación. Esta construcción se introdujo en la estirpe BL21 para la sobreexpresión de esta enzima (Materiales y Métodos 3.3.5).

#### 4.1.7 Expresión heteróloga de holo-ACP sintasa. Activación de las apo-ACP.

La purificación de la proteína His-*EcacpS* se llevó a cabo tal y como se detalla en el apartado 3.3.2 de Materiales y Métodos. La proteína fue eluida en 4 ml de tampón a una concentración de imidazol de 240 mM (Figura 50). El imidazol se eliminó de la disolución de enzima purificada mediante ultrafiltración y esta fracción se examinó mediante electroforesis, obteniéndose una banda del tamaño esperado de 16 kDa (Figura 28).

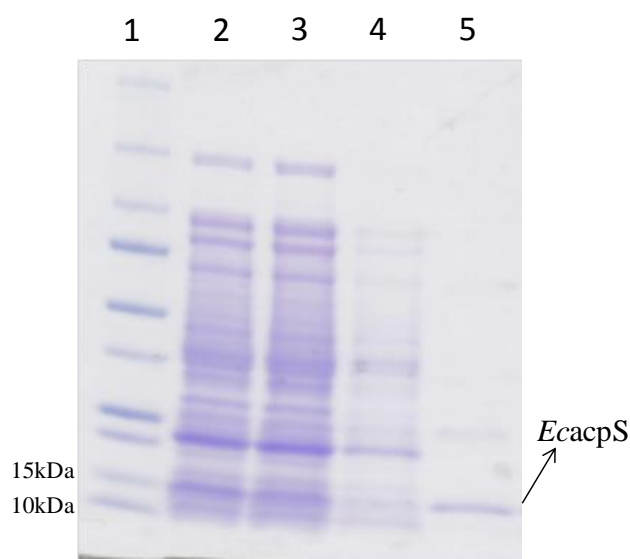


Figura 28. Gel SDS-PAGE de la purificación de *EcacpS*. 1, marcador, 2, fracción soluble, 3, carga de la muestra, 4, lavado de la columna, 5, fracción eluida de la columna.

La enzima His-*EcacpS* fue necesaria para llevar a cabo la activación de la apo-*EcACP* y las tres apo-ACP de girasol como se indica en Materiales y Métodos 3.4.3.1. La apo-*EcACP* se sobreexpresó en esta misma bacteria empleándose una construcción pQE80-His-*EcACP* cedida por la profesora Penny von Wettstein-Knowles de la Universidad de Copenhague, purificándose en columnas NTA-Ni mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2. La activación de las proteínas ACP fue confirmada utilizando geles nativos de las fracciones ensayadas (Figura 29), observándose la activación de apo a holo-ACP que se manifiesta en el gel con un ligero aumento del avance de la proteína activa holo-ACP frente a la proteína inactiva apo-ACP. La diferencia entre el recorrido de la forma apo y la holo fue más acusada en el caso de la *EcACP*. Un resultado similar ha sido publicado para ACP de *E. coli*, *S. meliloti* y *R. leguminosarum* (López-Lara y Geiger, 2000). Además, como se puede observar en la Figura 29-B, las *HaACP* formaban dímeros que experimentaban una mayor retención en el gel. Esta propiedad también ha sido descrita para la *EcACP* (Cicchillo et al., 2005) aunque en este trabajo no se observara este fenómeno en la forma de ACP bacteriana. La activación de las ACP también se confirmó en un segundo experimento empleando acil-ACP sintetasa recombinante como se describe en la sección de Materiales y Métodos 3.4.3.3. En este ensayo se empleó [ $^{14}\text{C}$ ] ácido oleico como sustrato para producir acil-ACP marcado radiactivamente, dando en todos los casos resultados positivos de acilación. Según los datos obtenidos en los dos experimentos realizados se puede concluir que la enzima His-*EcacpS* fue capaz de activar la mayor parte de la apo-ACP suministrada en dichos ensayos, independientemente de su origen vegetal (girasol) o bacteriano (*E. coli*).

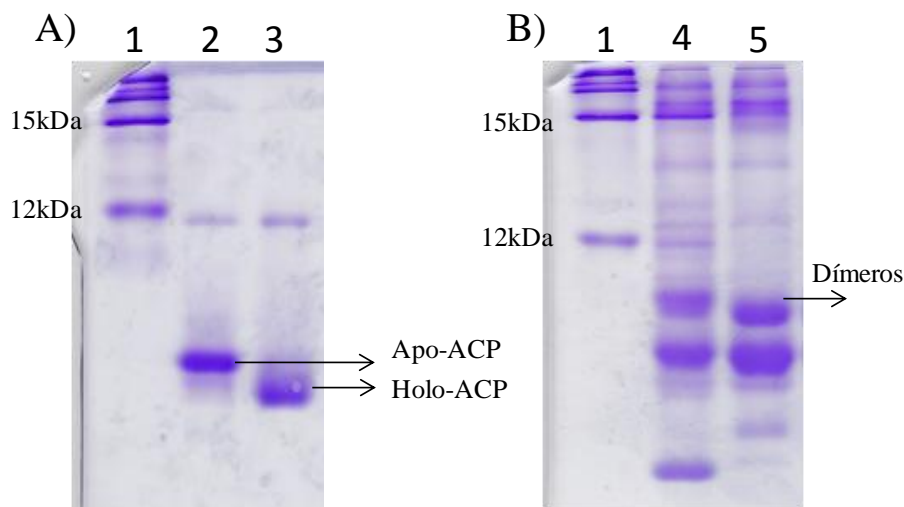


Figura 29. Gel nativo de las fracciones apo-ACP y holo-ACP, A) 1, Marcador, 2, apo-ACP de *E. coli*, 3, holo-ACP de *E. coli*. B) 4, apo-*HaACP1*, 5, holo-*HaACP1*.

Una vez confirmado que la His-*EcacpS* era activa, se activaron todas las apo-ACP (*EcACP*, *HaACP1*, *HaACP2*, *HaACP3*), y se acilaron con [<sup>3</sup>H]palmitoleico, [1-<sup>14</sup>C]oleico, [1-<sup>14</sup>C]palmítico y [1-<sup>14</sup>C]esteárico para formar los diferentes acil-ACP que serán utilizados como sustratos en las reacciones enzimáticas con las proteínas Fat (Materiales y Métodos 3.4.3.2 y 3.4.3.3).

#### **4.1.8 Expresión y purificación de *HaFatA* y *HaFatB*.**

Uno de los objetivos de esta tesis fue estudiar el efecto de los distintos ACP de girasol en la actividad de las enzimas plastidiales implicadas en la síntesis de ácidos grasos en esta planta. Las Fat son las enzimas responsables de la finalización de las reacciones intraplastidiales, catalizando la hidrólisis del enlace que une a los fragmentos acílicos con el ACP en los acil-ACP. Las Fat de girasol ya han sido estudiadas con anterioridad por nuestro grupo. Así, los genes His-*HaFatA* y His-*HaFatB*, los cuales codifican a la FatA y la FatB de girasol han sido anteriormente clonados en el vector de expresión pQE80 (Serrano-Vega et al., 2003; Serrano-Vega et al., 2005). Estas enzimas fueron sobreexpresadas en *E. coli* y purificadas empleando cromatografía de afinidad en columnas NTA-Ni (Materiales y Métodos 3.3.2). Este método fue muy eficaz para producir gran cantidad de proteína Fat activas con un alto grado de purificación, como puede observarse en la Figura 30. Estas Fat fueron caracterizadas con anterioridad empleándose acil-*EcACP* (Serrano-Vega et al., 2003; Serrano-Vega et al., 2005). En el presente trabajo se caracterizarán estas actividades empleándose las tres ACP de girasol descritas anteriormente y se compararán los resultados con aquellos obtenidos con *EcACP*, para investigar el efecto de esta coenzima en la reacción de las Fat

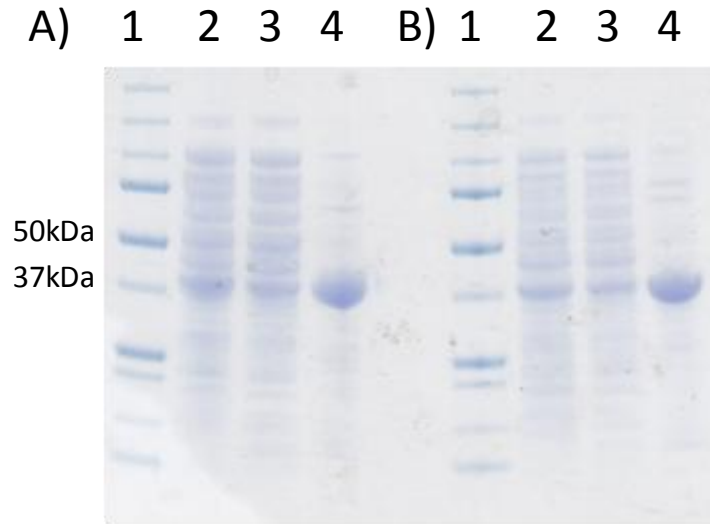


Figura 30. Gel SDS-PAGE de las fracciones *HaFatA* y *HaFatB*. A) Purificación *HaFatA*. B) Purificación de *HaFatB*. 1; Marcador, 2; Fracción total, 3; Fracción soluble, 4; Fracción eluida de la columna.

#### 4.1.9 Especificidad de las tioesterasas de girasol por distintos acil-ACP.

Las especificidades de las Fat de girasol han sido determinadas empleándose *EcACP* para la producción de los sustratos acil-ACP que emplea esta enzima (Materiales y Métodos 3.4.4). En este estudio se determinó la actividad de estas enzimas sobre los sustratos sintetizados anteriormente (Materiales y Métodos 3.4.3.3), 16:0-ACP, palmitoil-ACP (16:1-ACP), 18:0-ACP y 18:1-ACP, siendo los ACP portadores de los grupos acilos, los anteriormente descritos *EcACP*, *HaACP1*, *HaACP2* y *HaACP3*. Los resultados de estudios de especificidad de sustrato a concentración constante de acil-ACP se muestran en las Figura 31 y 32, para *HaFatA* y *HaFatB* respectivamente. En el caso de *HaFatA*, los perfiles resultantes empleándose *EcACP* reproducen los reportados en anteriores trabajos (Serrano-Vega et al., 2005) y son similares a los descritos en otras especies como macadamia y ricino (Moreno-Pérez et al., 2011; Sánchez-García et al., 2010), mostrando alta especificidad por el 18:1-ACP frente a los otros acil-ACP (Figura 31). Sin embargo, se encuentran diferencias significativas en el perfil de especificidad de la enzima *HaFatA* cuando se usaron los acil-ACP provenientes de las nuevas proteínas ACP recombinantes de girasol (Figura 31).

Así, respecto a los 18:1-ACP, se observa una mayor especificidad de la enzima *HaFatA* hacia las tres 18:1-*HaACP* frente al derivado 18:1-*EcACP*, siendo la actividad de la enzima doble en el caso del 18:1-*HaACP1* y 18:1-*HaACP2* y cuádruple para 18:1-*HaACP3*. En cuanto a los otros acil-ACP (16:0-ACP, 16:1-ACP y 18:0-ACP) es difícil establecer una tendencia clara. Cuando se usó la proteína portadora *HaACP3* se observó un perfil similar al obtenido con la *EcACP*, con una mayor velocidad de hidrólisis del derivado monoinsaturado 16:1-ACP. Con los derivados de las otras dos ACP de girasol *HaACP1* y *HaACP2*, el 18:0-ACP fue de los tres el sustrato hidrolizado a mayor velocidad. En todos los casos el 16:0-ACP fue el sustrato con el que la enzima mostró menores especificidades independientemente de la forma de ACP empleada.

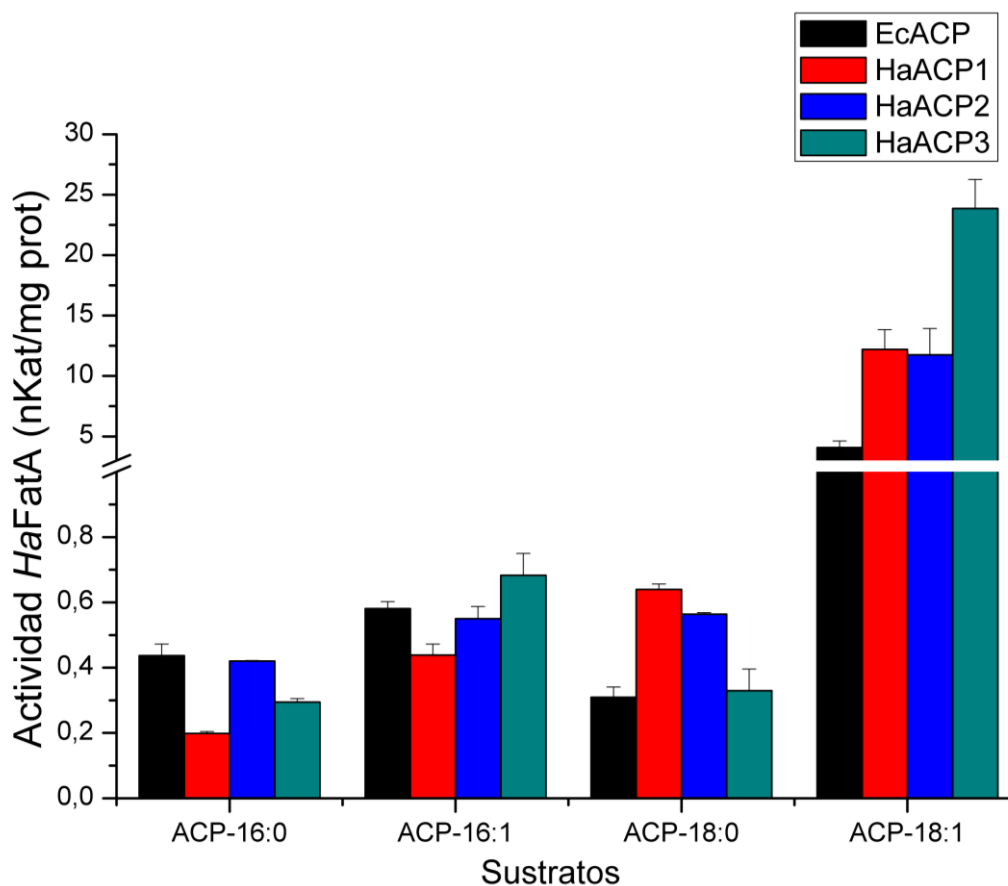


Figura 31. Especificidad de sustrato de la proteína His-*HaFatA* por distintos acil-ACP. En color negro se muestran los grupos acilos portados por la *EcACP*. En Rojo el cofactor es *HaACP1*, en azul *HaACP2* y en verde *HaACP3*.



En el caso de la enzima *HaFatB* (Figura 32), se observó un sesgo mucho mayor entre los sustratos conteniendo las ACP endógenas y la *EcACP*. Así, cuando se emplearon acil-*HaACP*, la *HaFatB* de girasol fue una enzima muy activa y muy específica hacia los acil-ACP saturados, mostrando hacia ellos actividades entre 7 y 20 veces más altas que hacia los derivados monoinsaturados 16:1-ACP y 18:1-ACP.

Estos perfiles fueron muy diferentes al mostrado por esta misma enzima hacia los acil-*EcACP*, con los que la actividad resultante fue mucho menor y el perfil de especificidad totalmente distinto, con actividades similares para 16:1-ACP, 18:0-ACP y 18:1-ACP. Un resultado similar a este aunque no tan acusado fue descrito por Salas y Ohlrogge (2002), quienes observaron que la enzima *FatB* de *Arabidopsis* sufrió un cambio en la especificidad de sustrato según se usara *EcACP* o ACP recombinante de hoja de espinaca. Así pues, podemos concluir que la actividad de las *Fat* de girasol se ve influenciada por la naturaleza del ACP al que va unido el grupo acilo y que estas coenzimas afectan sobre todo al perfil de actividad de la *FatB* en girasol.

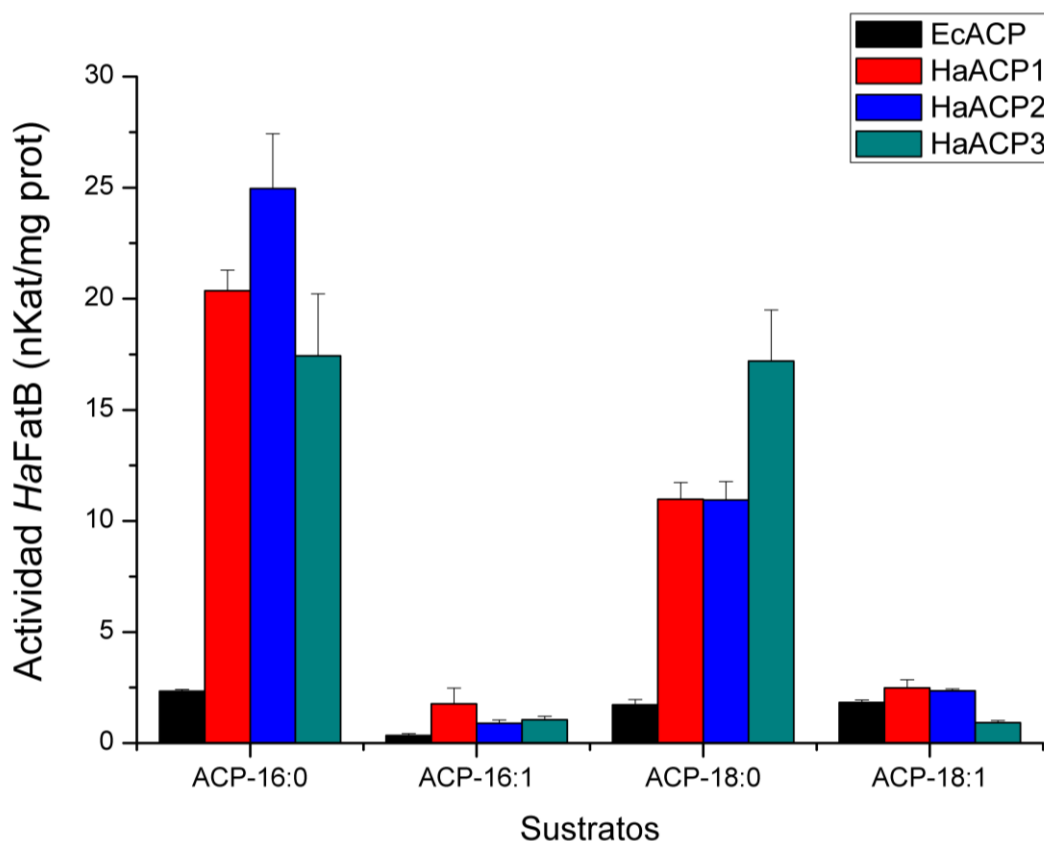


Figura 32. Especificidad de sustrato de la proteína His-*HaFatB* por distintos acil-ACP. En color negro se muestran los grupos acilos portados por la *EcACP*. En Rojo el cofactor es *HaACP1*, en azul *HaACP2* y en verde *HaACP3*.

#### 4.1.10 Caracterización cinética de las tioesterasas de girasol utilizando distintos acil-ACP.

Los análisis cinéticos se llevaron a cabo con las proteínas purificadas como se describe en el apartado de Materiales y Métodos 3.4.4. Como muestra la Tabla 16, *HaFatA* presenta valores de  $V_{\max}$  mucho más altos para los 18:1-ACP (hasta 10 veces mayor) que para los saturados 16:0-ACP y 18:0-ACP. Las  $K_m$  que presentaron también fueron más bajas para los 18:1-ACP, con valores comprendidos entre 2,08-2,75  $\mu\text{M}$ , mientras que en el caso de 16:0-ACP y 18:0-ACP los valores obtenidos fueron aproximadamente el doble (4,20-5,16  $\mu\text{M}$ ). La eficiencia catalítica ( $K_{\text{cat}}/K_m$ ) de *HaFatA* fue así hasta 15 veces superior hacia los 18:1-ACP que para el resto de sustratos. Resultados similares han sido descritos para esta enzima *HaFatA* cuando fue estudiada con acil-*EcACP* (Serrano-Vega et al., 2005), aunque las eficiencias catalíticas fueron la mitad que las reportadas en este trabajo.

<i>HaFatA</i>				
Acil-ACP	$V_{\max}$ (nkat/mg prot)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ )
HaACP1-16:0	2,09	4,53	3,54	0,78
HaACP2-16:0	4,77	4,92	4,17	0,85
HaACP3-16:0	4,73	5,16	3,94	0,76
HaACP1-18:0	3,51	4,20	3,59	0,85
HaACP2-18:0	4,59	4,94	3,99	0,81
HaACP3-18:0	3,59	4,58	6,00	1,31
HaACP1-18:1	68,97	2,08	25,48	12,28
HaACP2-18:1	53,19	2,36	17,31	7,35
HaACP3-18:1	86,21	2,75	24,04	8,74

Tabla 16. Parámetros cinéticos de la His-*HaFatA*.

La enzima *HaFatB*, mostró parámetros cinéticos similares para los derivados de las acil-*HaACP* saturadas, con valores de  $V_{max}$  muy altos hacia los acil-*ACP* saturados (16:0-*ACP*, 18:0-*ACP*) y bastante más bajos para 18:1-*ACP* (Tabla 17). Por lo demás, los valores de  $K_m$ , fueron más elevados para los acil-*ACP* saturados que para el 18:1-*ACP*. Cuando observamos los valores  $k_{cat}$ , estos también fueron superiores en el caso de los acil-*ACP* saturados 16:0-*ACP* y 18:0-*ACP* frente al 18:1-*ACP* resultando también eficacias catalíticas más altas (entre  $1,85-3,20 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ).

<i>HaFatB</i>				
Acil- <i>ACP</i>	$V_{max}$ (nkat/mg prot)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ )
HaACP1-16:0	74,63	4,00	9,61	2,40
HaACP2-16:0	91,74	5,05	9,35	1,85
HaACP3-16:0	88,50	4,74	9,61	2,03
HaACP1-18:0	40,32	9,60	20,39	2,12
HaACP2-18:0	29,59	6,71	21,45	3,20
HaACP3-18:0	69,93	12,85	26,48	2,06
HaACP1-18:1	7,88	0,91	0,72	0,85
HaACP2-18:1	10,06	1,37	0,60	0,43
HaACP3-18:1	4,55	2,04	0,18	0,09

Tabla 17. Parámetros cinéticos de la His-*HaFatB*.

Este estudio se completó con la caracterización de los parámetros cinéticos de esta enzima hacia los acil-*EcACP*, que se muestran en la Tabla 18. En esta pueden observarse valores de  $V_{max}$  dos órdenes de magnitud más bajos que con los sustratos fisiológicos, no existiendo gran diferencia entre los valores de este parámetros para 16:0-*EcACP*, 18:0-*EcACP* y 18:1-*EcACP*. Por otra parte las afinidades por los sustratos se mantuvieron en un orden similar, con valores de  $K_m$  alrededor de  $1 \mu\text{M}$ . Las eficiencias catalíticas también fueron inferiores a  $1 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  en todos los casos. Los valores en el caso de los 16:0-*HaACP* fueron cuatro veces superiores a los encontrados para 16:0-*EcACP*. En el caso de los 18:0-*HaACP* estos fueron del orden de diez veces superiores.

Por último, los 18:1-*HaACP*, mostraron eficiencias catalíticas similares. Estos resultados revelan que con los sustratos ACP fisiológicos, la *HaFatB* se muestra mucho más específica para acil-ACP saturados, lo cual encaja con una especialización de las *FatA* y *FatB* para distintos tipos de sustrato (saturado/ monoinsaturado) que no se llegaba a apreciar empleando los acil-*EcACP*.

<i>HaFatB</i>				
<i>EcACP</i>	$V_{\max}$ (nkat/mg prot)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ )
16:0- <i>EcACP</i>	0,90	0,84	0,52	0,62
16:1- <i>EcACP</i>	0,29	1,56	0,30	0,19
18:0- <i>EcACP</i>	0,60	1,11	0,27	0,24
18:1- <i>EcACP</i>	0,96	1,31	1,19	0,91

Tabla 18. Parámetros cinéticos de la His-*HaFatB* con diferentes acil-ACP de *E. coli* (*EcACP*).

## 4.2 LOCALIZACIÓN DE *HaFatA* y *HaFatB*.

### 4.2.1 Estudio de localización *HaFat* mediante microscopía confocal.

En el presente trabajo se continuó una línea de nuestro grupo dedicada a la caracterización de las *Fat* de semilla de girasol *HaFatA* y *HaFatB*. Estas enzimas han sido objeto de una exhaustiva caracterización respecto a sus especificidades y parámetros cinéticos. Para continuar con los estudios sobre estas enzimas, se decidió investigar la localización exacta de las proteínas *HaFatA* y *HaFatB* dentro del plastidio. Análisis de las secuencias de estas enzimas utilizando varios programas públicos como son ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) y SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) dan como resultado altas probabilidades de localización plastidial, conteniendo ambas un péptido de tránsito al plastidio en el extremo *N*-terminal de ambas secuencias (Mayer et al., 2005). Por otra parte, entre *HaFatA* y *HaFatB* existe cierta divergencia. Mientras que *HaFatA* es una proteína totalmente soluble, en el caso de *HaFatB* se ha descrito una región hidrófoba que puede ser una zona de anclaje a la membrana del plastidio (Yuan et al., 1996, Mayer y

Shanklin, 2005). Como vimos en el apartado anterior, ambas enzimas mostraron diferente afinidad por los distintos grupos acilos, que podría venir acompañada de diferencias en la localización de estas dentro del plastidio. En estos estudios de localización, las Fat se fusionaron con una proteína fluorescente (GFP) y las construcciones resultantes se utilizaron para transformar y expresarlas transitoriamente en protoplastos de células de tabaco BY-2 (Materiales y Métodos 3.5.1). El análisis de las muestras se llevó a cabo mediante microscopía confocal (Materiales y Métodos 3.5.3). Para confirmar la localización de las Fat se utilizó como control, la co-expresión de una proteína de localización conocida marcada con un extremo fluorescente de distinto color, este es el caso de los controles Tic40-RFP (proteína localizada en la membrana interna del plastidio-proteína fluorescente roja) o GFP-OEP9 (proteína fluorescente verde-proteína localizada en la membrana externa del plastidio) (Dhanao et al., 2010). El otro tipo de control utilizado consistió en añadir durante el procedimiento de fijación de las células un anticuerpo fluorescente que se une específicamente a alguna proteína de localización conocida, como por ejemplo, anti-NAGK (*N*-acetilglucosamida quinasa) (Chen et al., 2006), que se localiza en la fracción soluble del plastidio. En este segundo caso no existe una sobreexpresión de la molécula control que pueda introducir alguna interferencia en la localización final de la proteína objeto del estudio.

Cuando se realizaron los experimentos de localización de Fat de girasol con la co-expresión de Tic40-RFP, se observó en el caso de *HaFatA*-GFP, una clara localización en el estroma o fracción soluble del plastidio (Figura 33-1), mientras que la localización de *HaFatB*-GFP coincidía con la del control en la membrana de este mismo orgánulo (Figura 33-2).

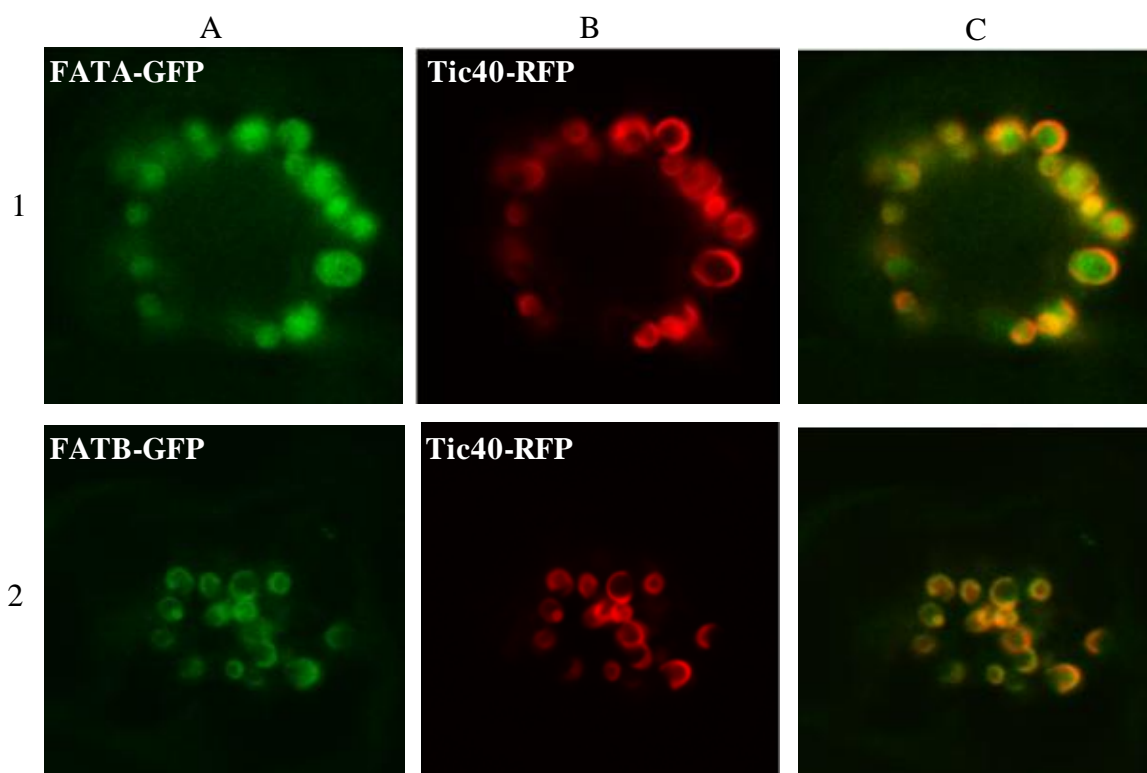


Figura 33. Imágenes de microscopía confocal de las proteínas *HaFatA* y *HaFatB* fusionadas con la molécula fluorescente GFP expresadas en células de tabaco BY-2. Columna A; se representan las imágenes de expresión *HaFatA*-GFP (fila 1) y *HaFatB*-GFP (fila 2). Columna B; Imagen de Tic40-RFP (translocón al interior del cloroplasto). Columna C; superposición de las imágenes.

Sin embargo, cuando se realizaron los mismos experimentos pero en este caso con el control anti-NAGK, en ambos casos, *HaFatA*-GFP y *HaFatB*-GFP, se localizaban con la proteína control anti-NAGK en el interior del plastidio (Figura 34-1 y 2).

Según los resultados obtenidos, la proteína *HaFatA*-GFP en ambos experimentos fue localizada en el estroma del plastidio, confirmándose así su localización. Sin embargo, los resultados concernientes a la proteína *HaFatB*-GFP, fueron contradictorios con los hallados en el primer estudio. Como comentamos anteriormente, a diferencia de Tic40-RFP, el control anti-NAGK no implica sobreexpresión de la proteína control. De esta forma, el primer resultado obtenido con el control Tic40-RFP podría ser debido a la sobreexpresión de proteínas localizadas en la membrana del plastidio, favoreciendo la unión de *HaFatB*-GFP a la membrana gracias a la región hidrofóbica que presenta en su secuencia, no permitiendo de este modo su paso al interior del plastidio.

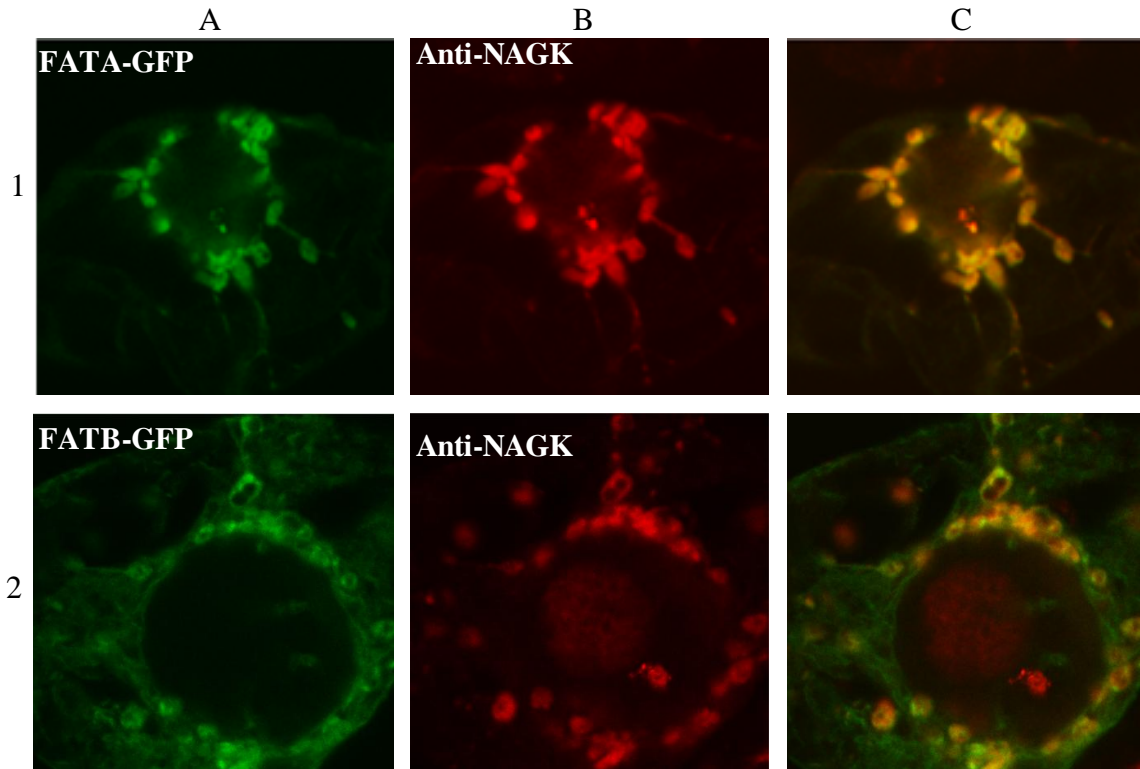


Figura 34. Imágenes de microscopía confocal de las proteínas *HaFatA* y *HaFatB* fusionadas con la molécula fluorescente GFP expresadas en células de tabaco BY-2. Columna A; se representan las imágenes de expresión *HaFatA*-GFP (fila 1) y *HaFatB*-GFP (fila 2). Columna B; imagen de anti-NAGK (*N*-acetilglucosamida quinasa), reacción de la proteína (antígeno) con un anticuerpo que posee una molécula con propiedades fluorescente. Columna C; superposición de las imágenes.

Para determinar si la región hidrofóbica en la secuencia *HaFatB* influye en la localización de la proteína en la membrana del plastidio, se realizaron experimentos de localización transitoria con la enzima *HaFatB* eliminando previamente de su secuencia la región hidrofóbica. La eliminación del fragmento interno se realizó mediante dos pasos de PCR (Materiales y Métodos 3.5.1.1) (Tabla 14). El gen resultante, antes de ser clonado en el vector de expresión pUC18, se clonó en el plásmido pMBL-T para confirmar su secuencia (Materiales y Métodos 3.2.12) (Figura 35). La nueva construcción se denominó *HaFatBc*-GFP.

## Resultados y discusión


---

```
HaFatBc 140 GTAGTGTTC TGTGCGCGGA ATCAAGACAA AATCTGTAA TTCCGGTGGT ATGAAAGTTA AGGCTAAC 208
HaFatB 140 GTAGTGTTC TGTGCGCGGA ATCAAGACAA AATCTGTAA TTCCGGTGGT ATGAAAGTTA AGGCTAACGC 210

HaFatBc 208 ----- 208
HaFatB 210 ACAGGCTCCT ACTGAGGTGA ATGGGAGTAG ATCACGTATC ACGCATGGCT TCAAACCGA TGATTATTCT 280

HaFatBc 208 ----- 208
HaFatB 280 ACATCMCTG CCSTGARAAC CTTTATCMAC CAATTGCCCG ATTGGAGCAT GCTTCTTGCT GCAATCACAA 350

HaFatBc 208 -----A TGATGCTGGA ATGGAAGACC AAACGCCCG ATATGATTGC 249
HaFatB 350 CAATCTTCTT GGCTGCAGAG AAGCAATGGA TGATGCTGGA ATGGAAGACC AAACGCCCG ATATGATTGC 420
```

Figura 35. Alineamiento de la secuencia *HaFatB* y *HaFatBc*. : fragmento hidrofóbico eliminado.

A continuación, se llevaron a cabo experimentos utilizando como control GFP-OEP9 y anti-NAGK. Cuando se estudió la proteína *HaFatB*-GFP frente a GFP-OEP9, se observó una localización de *HaFatB*-GFP fuera del plastidio (Figura 36-1). Cuando se realizó el mismo experimento con la construcción *HaFatBc*-GFP (la cual no presenta la región hidrofóbica), la proteína se localizaba en el interior del plastidio como una proteína soluble del estroma (Figura 36-2). Cuando se volvieron a realizar experimentos junto con anti-NAGK, en ambos casos, la localización de *HaFatB*-Cherry y *HaFatBc*-Cherry superponían con el control positivo, localizándose en el interior soluble del plastidio (Figura 36-3 y 4). Además, cuando se observó la localización de *HaFatA*-GFP frente a *HaFatB*-Cherry, ambas proteínas se superponían presentando una localización en la fase soluble del plastidio (Figura 36-5).



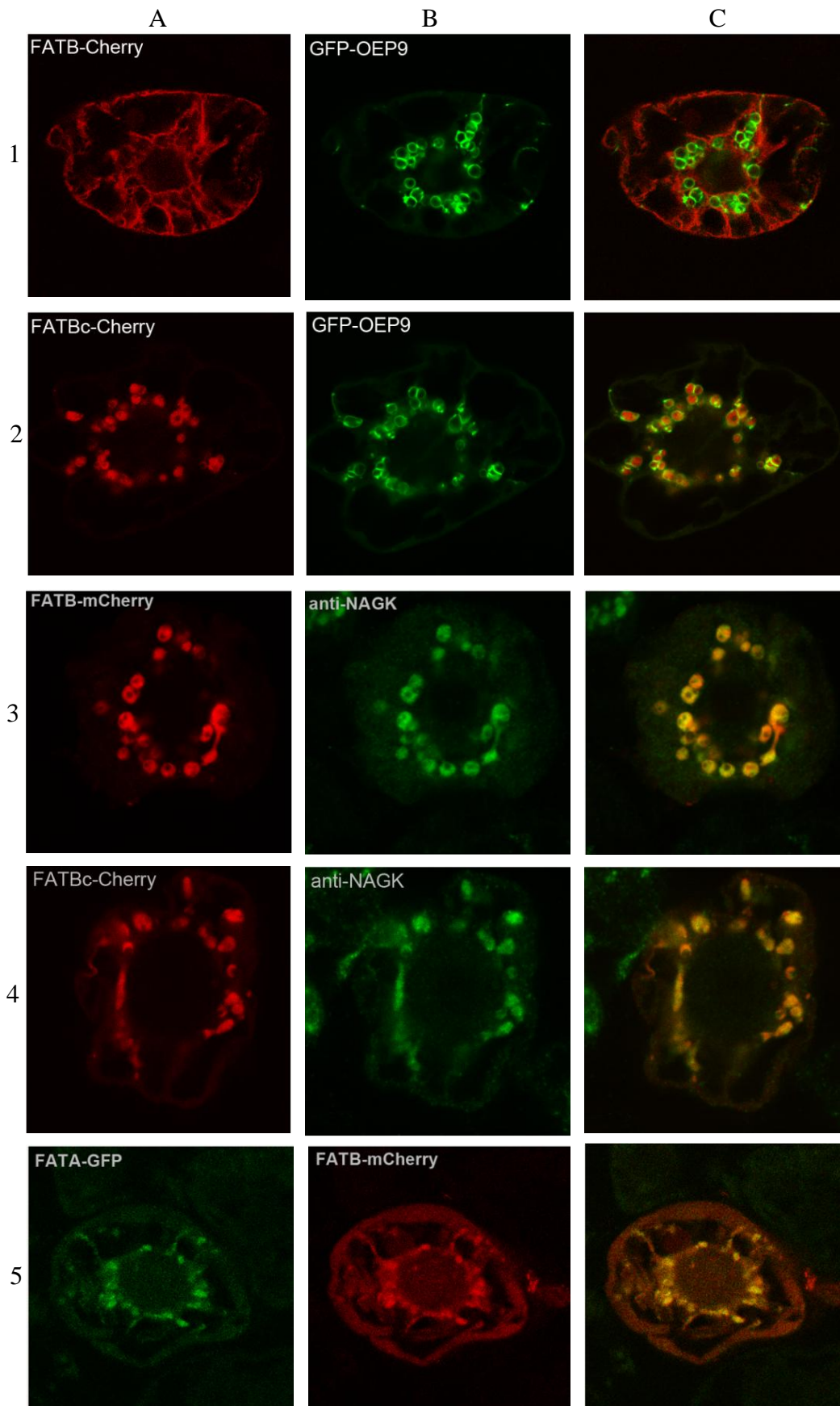


Figura 36. Imágenes de microscopía confocal de las proteínas *HaFatA*, *HaFatB* y *HaFatBc* fusionadas con las proteínas fluorescente GFP o Cherry, expresada en células de tabaco BY-2. Fila 1 y 2, control GFP-OEP9. Fila 3 y 4, control anti-NAGK. Fila 5, *HaFatA* frente a *HaFatB*. Columna C, superposición de las imágenes.

Con estos resultados se puede concluir que *HaFatA* es una proteína soluble que se localiza en el estroma de los plastidios de las células BY-2.

Por el contrario, la localización de *HaFatB* fue menos clara y varió en función de los controles de localización que se aplicaron en cada caso. Así, la proteína *HaFatB*-GFP se localizó en las membranas del cloroplasto cuando se empleó el control Tic-40-RFP y en la fase soluble cuando se empleó el anticuerpo anti-NAGK. Además, cuando el marcador control que se utilizó fue GFP-OEP9, la localización de la proteína *HaFatB*-GFP fue extraplastidial. Al eliminarse el péptido hidrofóbico del extremo N-terminal de *HaFatB*-GFP, la enzima resultante se localizó en todos los experimentos realizados de forma similar a *HaFatA*, soluble en el interior del plastidio. Por lo tanto, la región hidrofóbica de la proteína *HaFatB* parece que desempeña un papel decisivo en la localización final de la proteína. Sin embargo, con estos resultados no podemos concluir si la proteína *HaFatB* se encuentra en el estroma del plastidio o anclada mediante la región hidrofóbica a las membranas internas o externas del mismo.

### **4.2.2 Estudio de localización *HaFatB* en fracciones purificadas mediante *western blot*.**

#### **4.2.2.1 Aislamiento de la fracción plastidial.**

En vista de que los resultados obtenidos en los experimentos de microscopía confocal no fueron concluyentes con respecto a *HaFatB*, el estudio de localización de esta enzima se afrontó empleando una estrategia diferente y complementaria. Así, en nuestro laboratorio se disponía de anticuerpos anti-*AtFatB* producidos según se describe en Doermann et al. (2000), que fueron cedidos a nuestro laboratorio por el profesor John Ohlrogge (Michigan State University, East Lansing, Michigan, EEUU). De esta forma se aislaron plastidios (Materiales y Métodos 3.5.4.1) de semillas de girasol (20DDF) y se realizaron estudios de *western blot* sobre la fracción proteica total, membranas y fracción soluble de los mismos, empleando dicho anticuerpo para localizar la presencia de la enzima *HaFatB*.

Para determinar la pureza de los plastidios se realizaron medidas de la fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (Materiales y Métodos 3.5.4.2), enzima de localización citosólica. Estos ensayos se realizaron sobre la fracción total, estroma y membranas (Burrell et al., 1994; Schaffer y Petreikov, 1996), resultando un nivel aceptable de purificación de estos orgánulos (resultados no mostrados). Una vez

obtenidos los plastidios, se hidrolizaron y se separaron la fracción soluble de la membranosas (Materiales y Métodos 3.5.4.1). Además, para determinar la pureza de la fracción soluble del plastidio, se ensayó la enzima *HaLACS* (Materiales y Métodos 3.3.4), enzima que posteriormente describiremos en este trabajo (Resultados 4.3.5) y que se encuentra localizada en la membrana del plastidio. Como se observara en la Figura 37, la actividad acil-CoA sintetasa se encontró principalmente en la fracción total y en la fracción membranosas, presentando un nivel inferior al 15 % de actividad en el estroma (fracción soluble), confirmando que la preparación tuvo una calidad adecuada para realizar el experimento de localización de FatB mediante *western blot*.

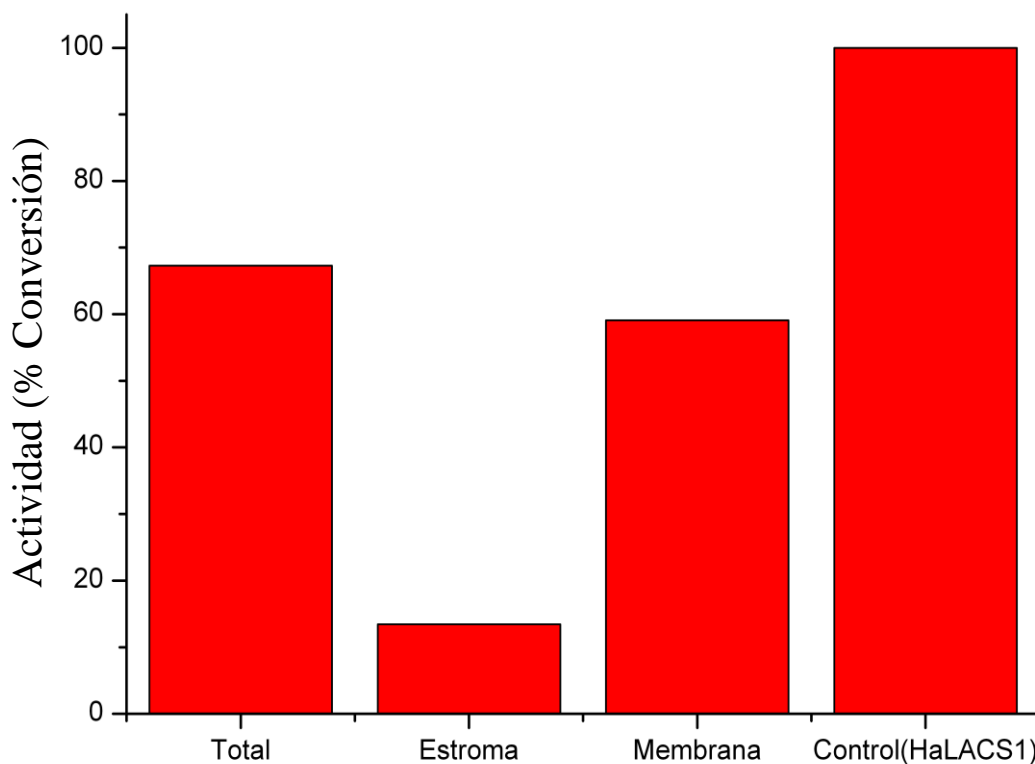


Figura 37. Ensayo de actividad acil-CoA sintetasa en las fracciones total, estroma (soluble), membrana y control positivo (fracción membranosas de *E. coli* expresando *HaLACS1*). Valores presentados en % frente al valor del control positivo.

#### 4.2.2.2 Ensayos *western blot* para la localización de *HaFatB*.

Una vez obtenidas las fracciones soluble y membranosas de los plastidios, se llevó a cabo con ellas un ensayo *western blot* junto con el anticuerpo *AtFatB* (Materiales y Métodos 3.3.5.3). Los resultados de la transferencia de proteína a membrana y su interacción con el anticuerpo *AtFatB* puede observarse en la Figura 38. Se encontró una banda de proteína del tamaño esperado y que interaccionó con el anticuerpo tanto en la

fracción total de los plastidios como en la fracción de membrana, no apreciándose trazas de la misma en la fracción soluble. Por lo tanto, podemos concluir que mientras *HaFatA* es una proteína soluble localizada en el estroma del plastidio, la proteína *HaFatB* se encuentra anclada a membrana gracias a la región hidrofóbica que presenta en su secuencia. Esta proteína podría estar realizando su actividad Fat sobre los acil-ACP anclada a la membrana del tilacoide o en la membrana interna del mencionado orgánulo.

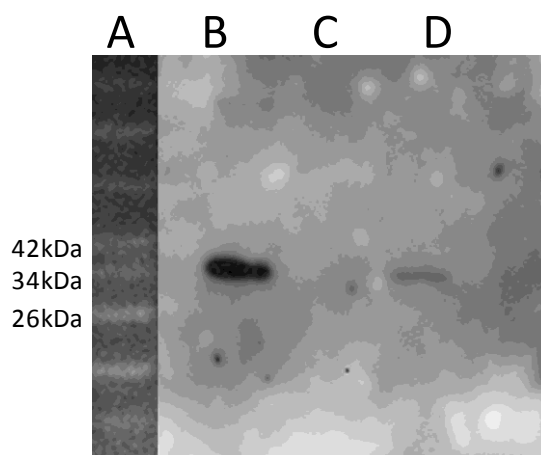


Figura 38. *Western* blot de distintas preparaciones de plastidios de girasol frente al anticuerpo anti-*AtFatB*. A) Marcador, B) Fracción total, C) Fracción soluble, D) Fracción membranosa.

Además, se realizaron ensayos de actividad Fat frente al 18:1-*EcACP* sobre las muestras aisladas (Figura 39), tal y como se describe en Materiales y Métodos 3.4.4. Como se puede observar, en este caso presentan actividad Fat todas las fracciones ensayadas, encontrándose una mayor actividad en la fracción soluble. Este resultado refuerza la localización de *HaFatB* en la fracción membranosa (baja actividad hacia 18:1-*EcACP*), mientras que *HaFatA*, con una actividad mucho más alta hacia el 18:1-*EcACP* se encuentra en la fracción soluble (Resultados 4.1.9).

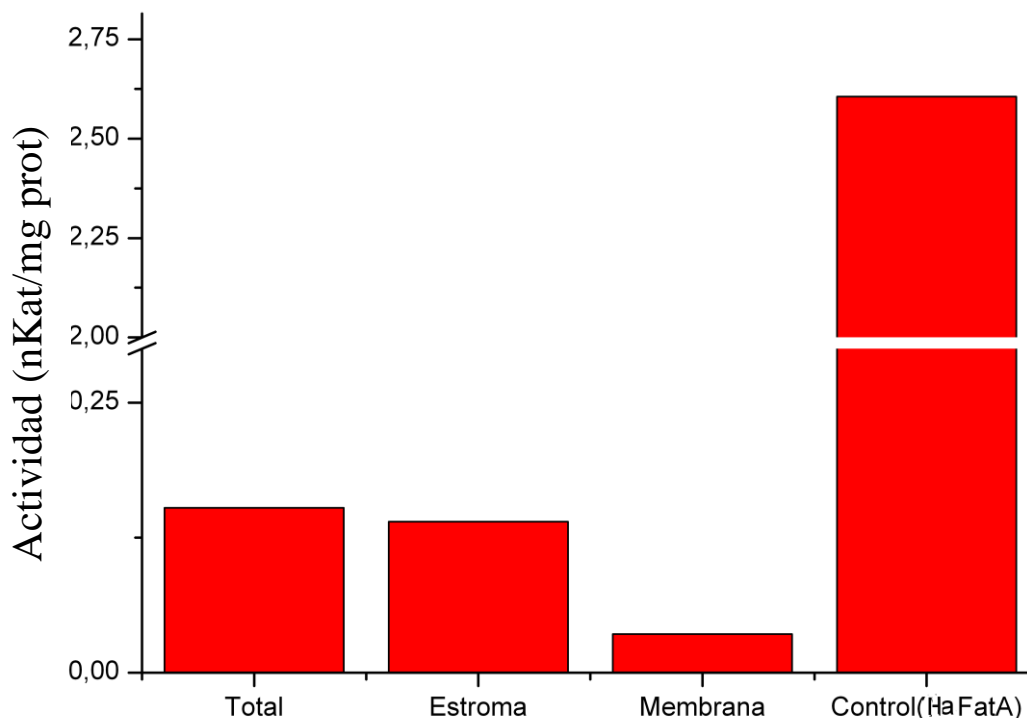


Figura 39. Ensayo de actividad tioesterasa en las fracciones total, estroma (soluble), membrana y control positivo (purificación de la proteína heteróloga *HaFatA*). Valores presentados en actividad específica.

### 4.3 ESTUDIO DE LAS ACIL-CoA SINTETASAS DE CADENA LARGA.

#### 4.3.1 Clonación y caracterización de dos genes *LACS* de girasol.

Durante esta tesis se han clonado dos genes a partir de semillas de girasol que codifican dos proteínas sintetasas de acil-CoA de cadena larga (*LACS*) que probablemente están involucradas en la biosíntesis de TAG de reserva en esta especie. Para la identificación de los genes *LACS* de girasol se utilizó la secuencia proteica del gen de *Arabidopsis thaliana* At1g77590 que codifica la *LACS9* que se expresa en las membranas de los plastidios y es en gran parte responsable de la activación de los ácidos grasos sintetizados *de novo* en las semillas de esta especie. En la base de datos pública (<http://aralip.plantbiology.msu.edu/pathways/path>) se encontraron dos secuencias EST con una alta homología, una correspondía con el gen *AtLACS9* antes mencionado y la otra con *AtLACS8*, una forma de *LACS* que se localizaba en el retículo endoplasmático. Estos ESTs de girasol no se correspondían con la secuencia completa de los genes. La secuencia de estos ESTs se utilizó para diseñar oligonucleótidos que se utilizaron posteriormente para amplificar todo el gen mediante la técnica de RACE

(Materiales y Métodos 3.2.5.1). Las secuencias completas se amplificaron mediante PCR (Materiales y Métodos 3.2.5.3) usando ADNc de semillas de girasol 20DDF como molde. Las secuencias completas, que se denominaron *HaLACS1* y *HaLACS2*, con un tamaño aproximado de 2,1 kb (Figura 40), codificaban proteínas de 697 y 711 aa, respectivamente. El nivel de homología entre ellas fue de un 62,74 % y los pesos moleculares estimados de 76,30 y 77,57 kDa, respectivamente. Las secuencias *HaLACS1* y *HaLACS2* fueron depositadas en GenBank con los números de acceso HM490305 y HM490306 respectivamente.

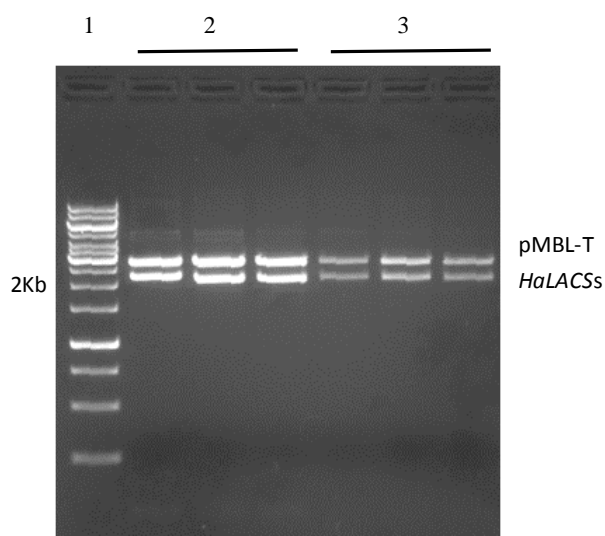


Figura 40. Análisis mediante gel de agarosa de los genes *HaLACS1* y *HaLACS2* clonadas en pMBL-T. 1; Marcador, 2; *HaLACS1*, 3; *HaLACS2* B.

La búsqueda con dichas secuencias en la base de datos de proteínas de membrana de plantas ARAMEMNOM (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/index.ep>) puso de manifiesto la posible existencia de un dominio transmembrana en el extremo *N*-terminal de las proteínas que actuaría como un elemento de fijación en los orgánulos donde se localizan. Mediante el uso de programas de predicción en línea, TargetP1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) y ChloroP1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) no fue posible establecer la localización de estas enzimas en base a su secuencia de aminoácidos. La enzima *HaLACS1* muestra alta homología (74,19 %) con la proteína *AtLACS9* localizada en el plastidio (Shockey et al., 2002), (Figura 41). Por otro lado, *HaLACS2* presenta una mayor similitud (69,88 %) con *AtLACS8* (Figura 41), enzima unida al retículo endoplasmático (Zhao et al., 2010).

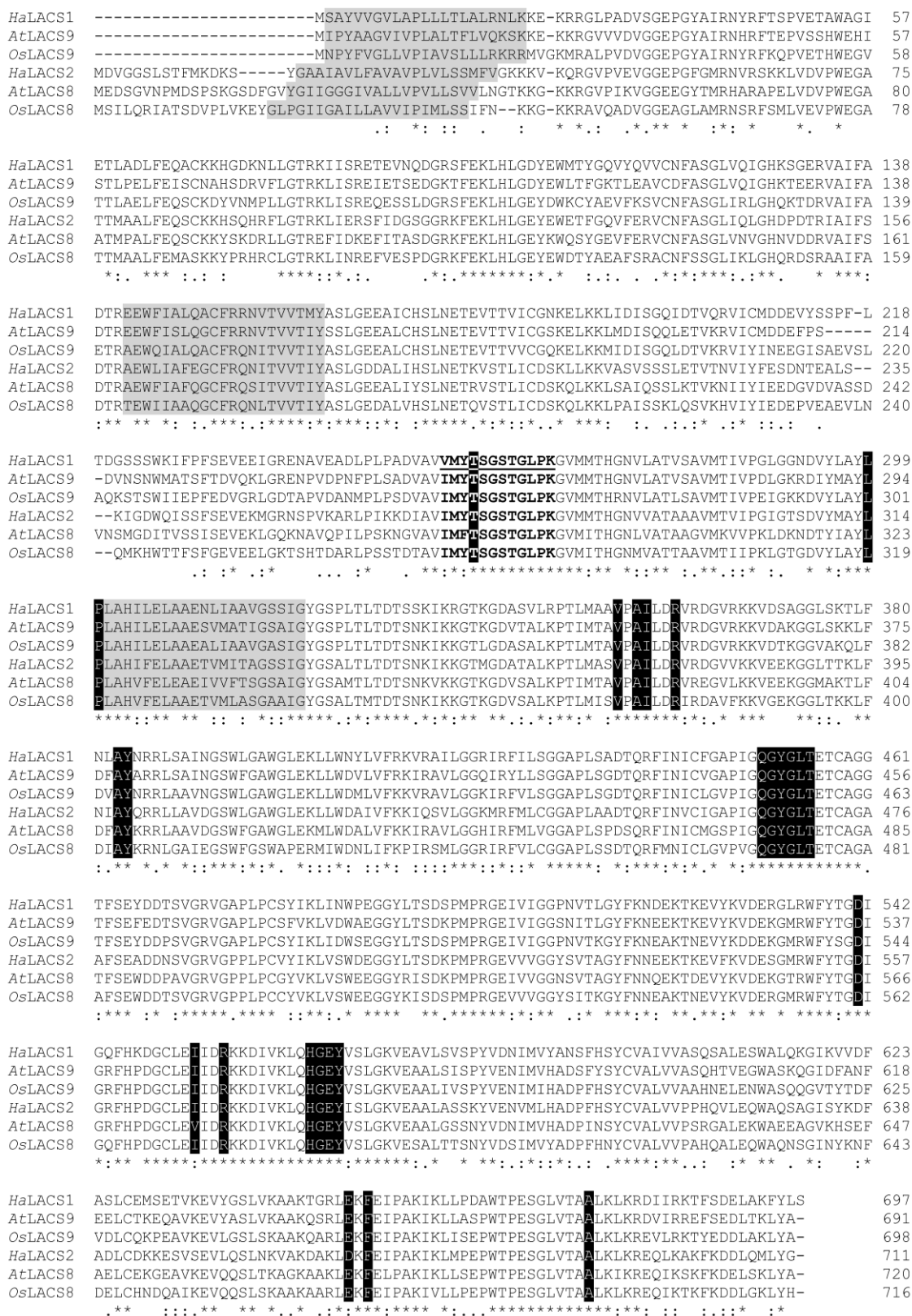


Figura 41. Alineamiento de la secuencia de proteínas *HaLACS1* y *HaLACS2*. Se compararon con las siguientes especies: At; *Arabidopsis thaliana* (*AtLACS8*, *AtLACS9*), Os; *Oryza sativa* (*OsLACS8*, *OsLACS9*). Los aminoácidos que intervienen en la actividad sintetasa están marcados en negro. Los residuos que intervienen en el centro catalítico están sombreados en negro. \*Aminoácidos idénticos.

### 4.3.2 Análisis filogenético de *HaLACS*.

El árbol filogenético mostrado en la Figura 42 muestra como estos dos genes *HaLACS1* y *HaLACS2* se relacionan con genes *LACS* de otras especies de plantas. Para una mejor interpretación, el árbol se encuentra enraizado con la secuencia *LACS* del organismo pluricelular *Danio rerio* (pez cebra). Dentro de las secuencias de plantas, se observan dos grupos diferenciados, uno de ellos correspondientes a especies dicotiledóneas, en el que se encuentran incluidas las secuencias de girasol *HaLACS1* y *HaLACS2*, y en el otro grupo se agrupan las especies monocotiledóneas. Dentro del grupo de las dicotiledóneas están presentes *HaLACS1* junto con su homóloga de *Arabidopsis AtLACS9*, así como *HaLACS2*, la cual se localizó con su homóloga *AtLACS8*. Como era de esperar, *HaLACS1* y *HaLACS2* tenían una mayor homología con las secuencias de otras especies de la subclase Asteridae como es el caso de *Solanum lycopersicum* (tomate). Estos dos grupos *HaLACS1-AtLACS9* y *HaLACS2-AtLACS8* también se vieron enraizados con aquellas secuencias *LACS* de especies incluidas dentro de los grupos Bryophyta y Lycopodiophyta.



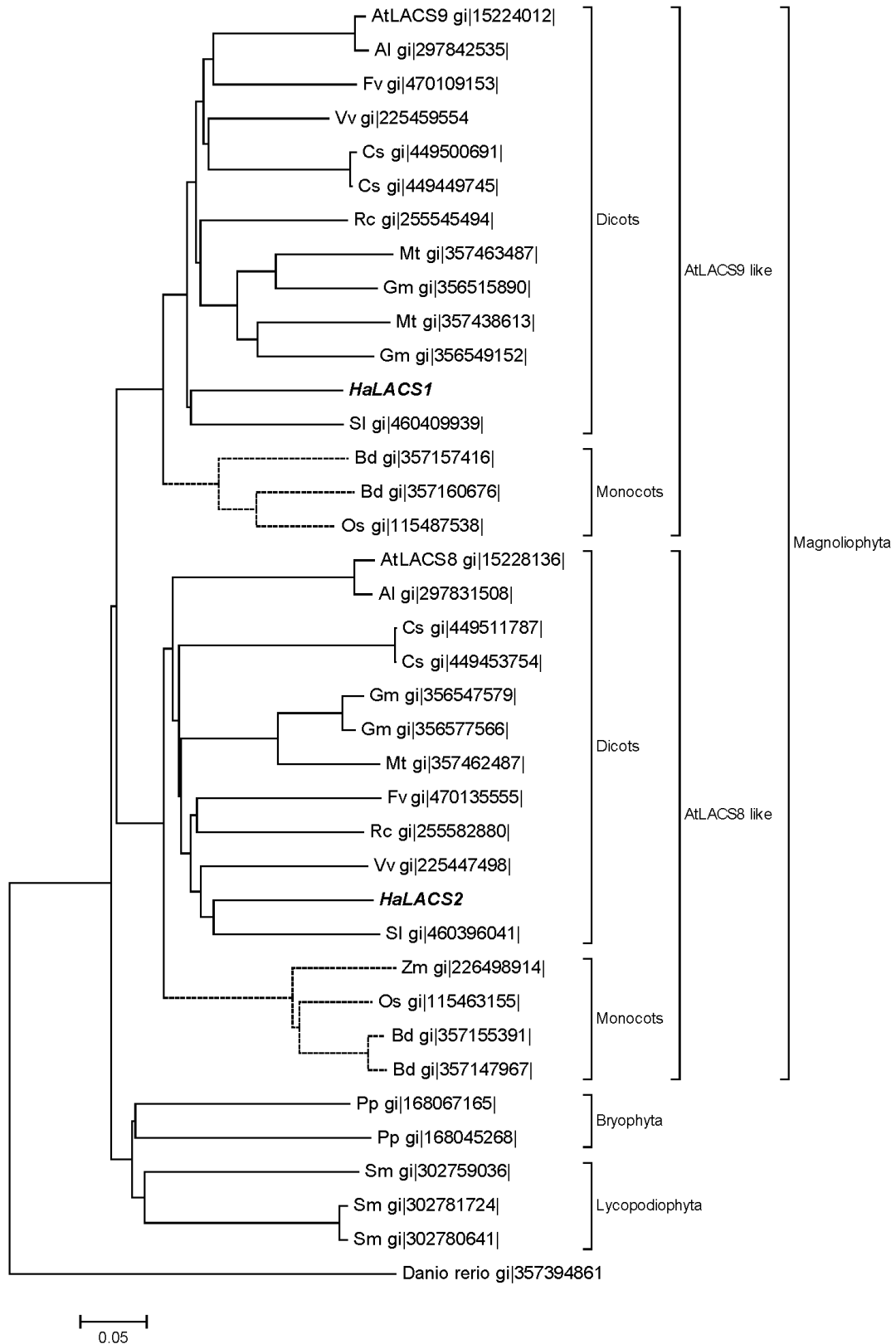


Figura 42. Comparación filogenética de las LACS de girasol con algunas proteínas homologas de otras especies. Las especies incluidas en este árbol son: Al; *Arabidopsis lyrata*, At; *Arabidopsis thaliana*, Bd; *Brachypodium distachyon*, Cs; *Cucumis sativus*, Fv; *Fragaria vesca*, Gm; *Glycine max*, Ha; *Helianthus annuus*, Mt; *Medicago truncatula*, Os; *Oryza sativa*, Pp; *Physcomitrella patens*, Rc; *Ricinus communis*, Sl; *Solanum lycopersicum*, Sm; *Selaginella moellendorffii*, Vv; *Vitis vinífera*, Zm; *Zea mays*, *Danio rerio* (Pez cebra). Monocotiledoneas (----).

La presencia de copias de *LACS* homologas a *HaLACS1* y *HaLACS2* en el genoma de girasol se examinó mediante un estudio de hibridación de ADN genómico (*Southern blot*) empleándose sondas sintetizadas como se describe en Materiales y Métodos 3.2.11, utilizando los oligonucleótidos de la Tabla 13. El resultado de la transferencia se muestra en la Figura 43, indicándonos la presencia de una única copia de cada gen en el genoma de girasol. Este resultado está en concordancia con lo observado en otras especies cuyo genoma ha sido secuenciado (*Ricinus communis*, *Vitis vinifera* o *Arabidopsis thaliana*) incluidas en el árbol filogenético de la Figura 42.

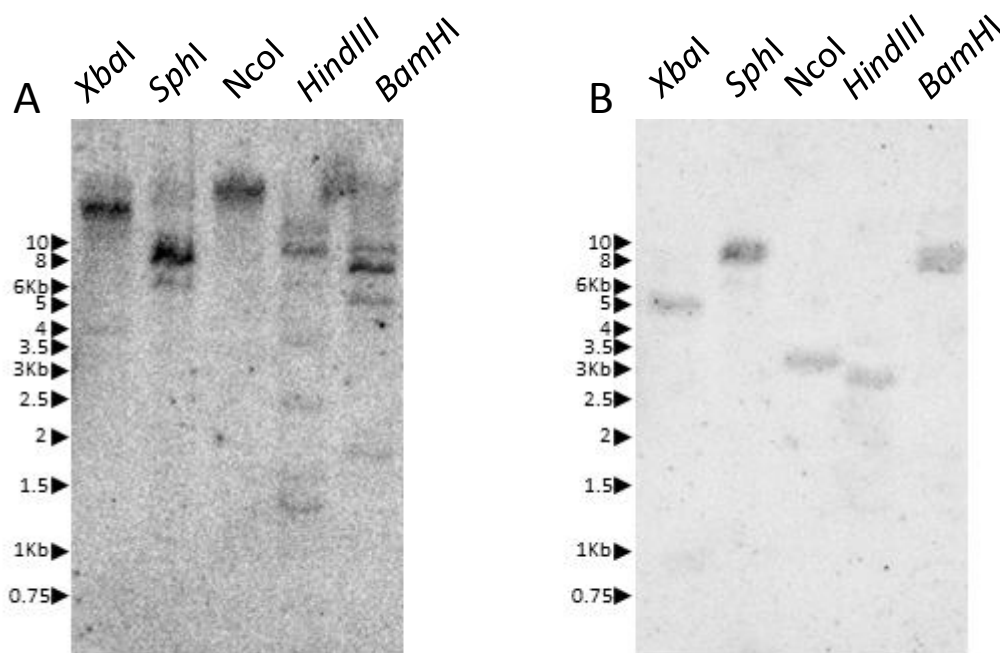


Figura 43. Estudio del número de copias de *LACS* en girasol mediante *southern blot*. El ADN genómico fue digerido con las enzimas de restricción indicadas en la figura. Se hibridaron con sondas amplificadas para los genes *HaLACS1* (A) y *HaLACS2* (B). La posición de los marcadores de tamaño se indica en la parte izquierda de cada imagen.

### 4.3.3 Niveles de expresión de los genes *HaLACS1* y *HaLACS2*.

Con el fin de determinar la posible función e implicación de ambos genes en el metabolismo lipídico, se estudiaron los niveles de expresión de los dos genes *LACS* de girasol en hoja, raíz, tallo, semillas en desarrollo y cotiledones de semilla en germinación (Figura 44).

Los datos indicaron que *HaLACS1* se expresa a niveles muy altos en semillas en desarrollo, sugiriendo un papel de la misma en la síntesis de TAG. Además, los niveles de expresión de este gen se mantenían altos durante todo el periodo estudiado del desarrollo de la semilla, desde los 15 hasta los 30 DDF. La enzima *HaLACS2* también se expresó en semillas en desarrollo, pero a niveles inferiores a los que se observaron en *HaLACS1*. En el caso de *HaLACS1* el nivel de expresión fue alto durante todo el periodo estudiado, mientras que para *HaLACS2* se detectó un máximo de expresión a los 20-25 DDF, periodo en el cual también se produce la mayor acumulación de aceite. Esto relaciona de nuevo la expresión de estos genes con la síntesis de TAG y apuntan a dos mecanismos de regulación distintos para cada gen. Estudios de expresión en *Arabidopsis* de *AtLACS8* y *AtALACS9* también mostraron valores altos de expresión durante la formación de la semilla (Shockey et al., 2002).

En el caso de la germinación, la movilización y la degradación de los ácidos grasos almacenados en las semillas durante la germinación conlleva la activación de los ácidos grasos a sus correspondientes acil-CoA, que son degradados a través de la  $\beta$ -oxidación.

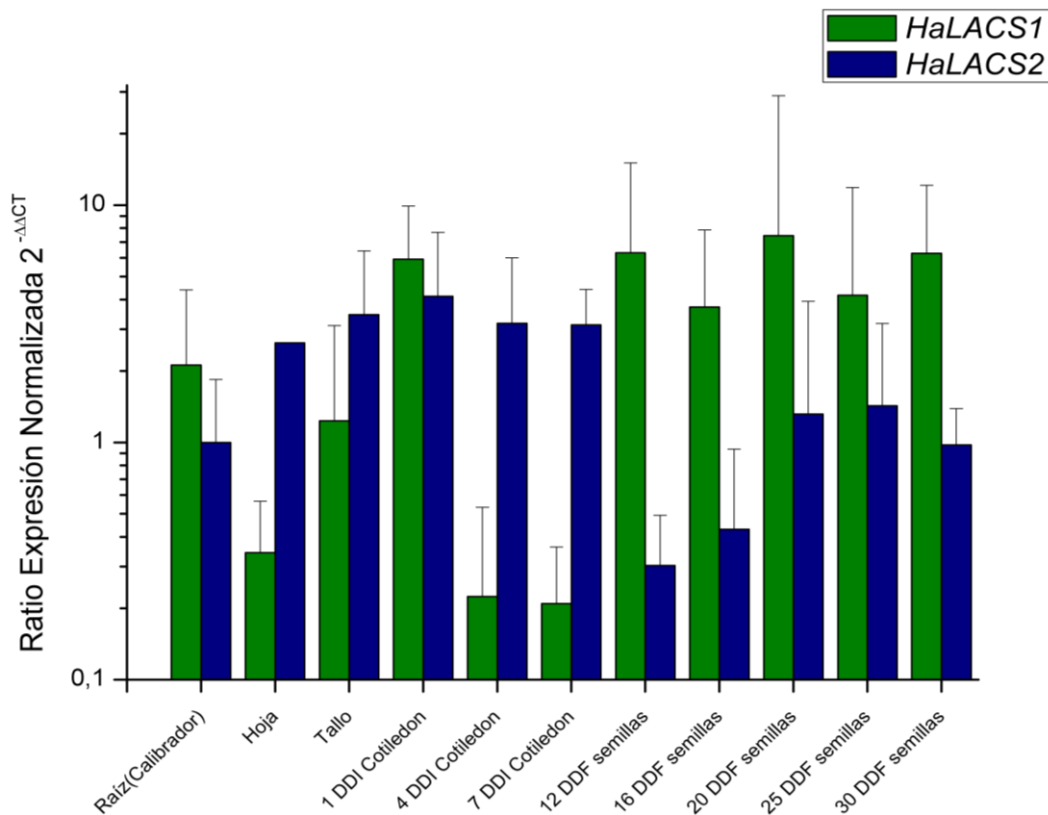


Figura 44. Perfiles de expresión de los genes *HaLACS1* (color verde) y *HaLACS2* (color azul) en tejidos vegetativos y semillas en desarrollo de girasol determinado mediante RT-qPCR. Se representan medias más/menos desviaciones estándar a partir de tres muestras independientes.

En el primer estadio de la germinación se observó una alta expresión de los dos genes *HaLACS* estudiados. Sin embargo, a medida que avanza este proceso los niveles de *HaLACS1* decrecen bruscamente mientras que la expresión de *HaLACS2* se mantiene. Por lo tanto, podemos concluir que *HaLACS1* presenta un papel más importante durante la formación de la semilla, mientras que *HaLACS2* se expresa a mayores niveles en tejidos vegetativos y semillas en germinación. Estos datos coinciden con los obtenidos con sus homologas en Arabidopsis, presentando la isoforma *AtLACS9* expresión tanto en el desarrollo de la semilla como en cotiledón en germinación mientras que la isoforma *AtLACS8* presento valores menores de expresión en el primer caso (Shockey et al., 2002).

Las enzimas *HaLACS1* *HaLACS2* no están probablemente implicadas en la activación de los ácidos grasos que tiene lugar en el proceso de  $\beta$ -oxidación, ya que estudios previos en Arabidopsis mostraron que las formas de LACS involucradas en dicha ruta fueron del tipo *AtLACS6* y *AtLACS7*, las cuales se localizan en los peroxisomas de los cotiledones en germinación (Fulda et al., 2002).

En los demás tejidos vegetativos estudiados, *HaLACS2* se expresó a mayor nivel en hojas y tallos, mientras que *HaLACS1* fue predominante en las raíces.

#### **4.3.4 Expresión heteróloga y especificidad de las proteínas *HaLACS*.**

Las enzimas *HaLACS1* y *HaLACS2* se expresaron heterológamente en la estirpe de *E. coli* K27 deficiente en actividad LACS (Overath et al., 1969), y fueron recuperadas y ensayadas en la fracción membranosa de la bacteria (Materiales y Métodos 3.4.1). Ambas proteínas se expresaron con una cola de (6xHis) en el extremo *N*-terminal para así facilitar su purificación y su detección mediante inmunoensayos. Así, en la Figura 45 se muestra un ensayo *western blot* (Materiales y Métodos 3.3.5.3) donde se confirmó la expresión de ambas proteínas en la fracción membranosa del microorganismo hospedador mediante reacción con el anticuerpo anti polihistidina.

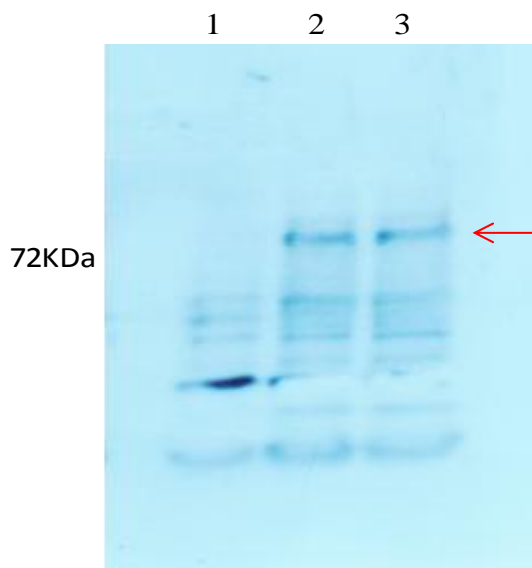


Figura 45. Análisis de la expresión de las *HaLACS* en las fracciones de membrana de *E. coli* mediante *western blot*: 1; Control negativo (Plásmido pQE80 vacío), 2; His-*HaLACS1*, 3; His-*HaLACS2*. La flecha indica el peso correspondiente a las proteínas *HaLACS*.

Sin embargo, no fue posible purificar dichas proteínas en columnas de afinidad NTA-Ni debido a que las enzimas activas unidas a la membrana no se retuvieron en la columna. A este respecto se realizaron estudios de solubilización de estas proteínas empleándose detergentes como el Triton X-100, Tween-80 o Tween-20. Estos experimentos no tuvieron éxito debido a que se produjo una severa inactivación de las enzimas y a que la actividad residual que pudo ser solubilizada tampoco se retuvo en la columna de afinidad. Por lo tanto, se decidió realizar los estudios a partir de la fracción membranosa como se ha hecho en anteriores trabajos (Shockey et al., 2002).

En la Figura 46 se muestra la especificidad de sustrato de ambas enzimas. Se observó una alta actividad de *HaLACS1* hacia los ácidos grasos monoinsaturados, siendo el ácido palmitoleico y el ácido oleico los ácidos grasos activados a mayor velocidad. Los ácidos grasos polinsaturados como el ácido linoleico y el ácido linolénico fueron también esterificados pero a menor velocidad que los ácidos grasos monoinsaturados. En el caso de los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico, la actividad de *HaLACS1* hacia ellos fue bastante más baja. Estos datos apoyan la hipótesis de la participación de esta enzima en la síntesis y la activación de los ácidos grasos sintetizados *de novo* en la semilla, entre los que predomina el ácido oleico liberado por la FatA después de la acción de la enzima SAD (Serrano-Vega et al., 2005).

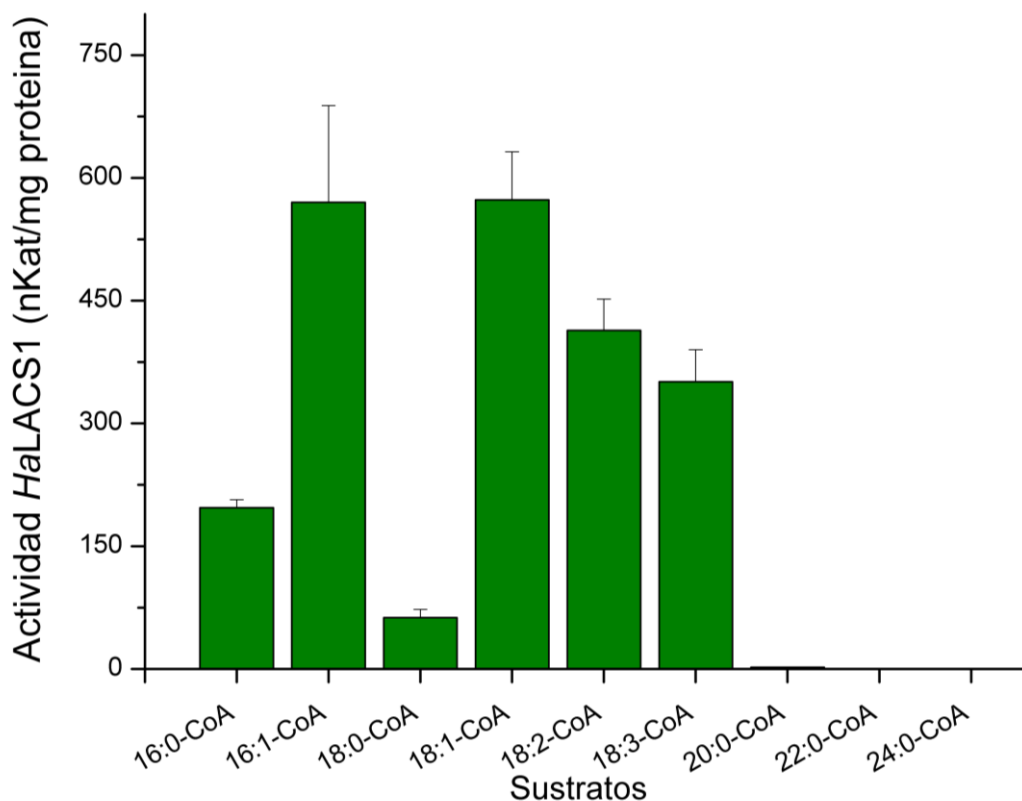


Figura 46. Especificidad de sustrato de la proteína *HaLACS1*. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones independientes.

Por otra parte, la enzima *HaLACS2* presentó una actividad total más baja en el extracto de membrana, mostrando preferencia por los ácidos grasos palmítico y linolénico (Figura 47). En este caso, también se observó una actividad baja para el ácido esteárico. Esta especificidad de *HaLACS2* estaría acorde con una función en la activación de los ácidos grasos liberados por las acil-hidrolasas de membrana, contribuyendo al intercambio de los grupos acilos entre los lípidos polares, el conjunto de acil-CoA y los TAG. De esta forma, los ácidos grasos palmítico y linoleico son los más abundantes en las especies de PC de semilla de girasol (Alvarez-Ortega et al. 1997), que son los principales fosfolípidos presentes en las membranas plasmáticas y en el retículo endoplasmático. Estos perfiles de actividad son similares a los publicados en anteriores estudios sobre las enzimas LACS de *Arabidopsis*, donde estas enzimas mostraron altas actividades hacia los ácidos oleico y linoleico, y actividades bajas para el ácido esteárico (Shockey et al., 2002).

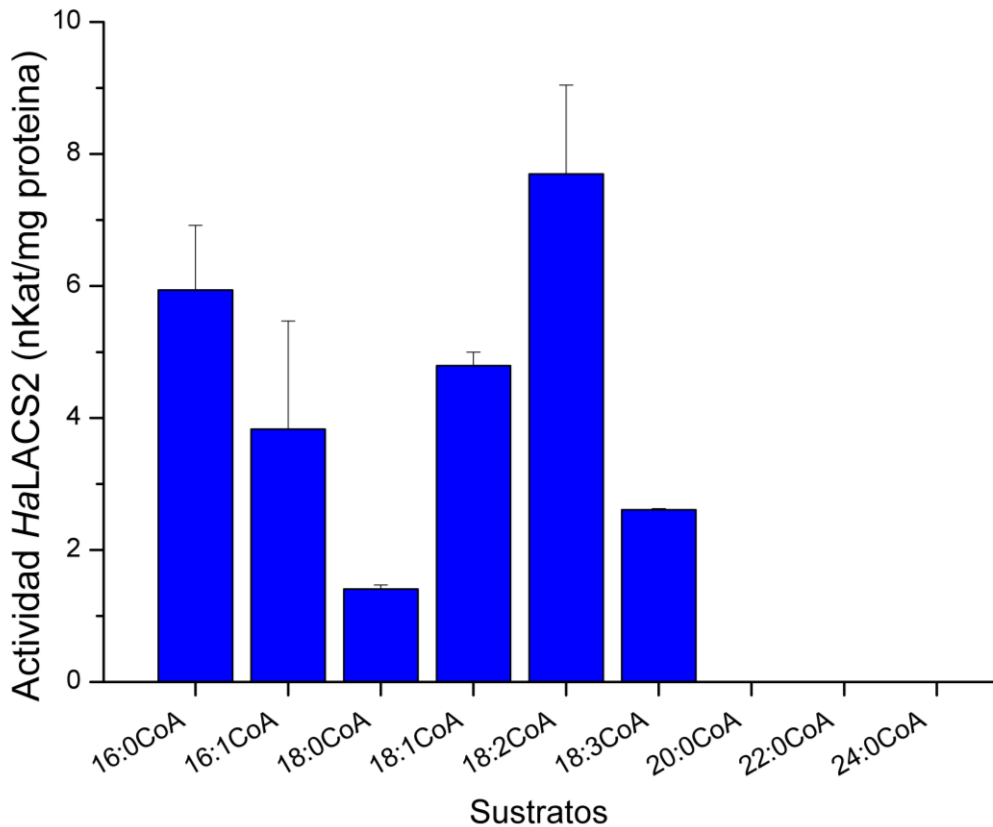


Figura 47. Especificidad de sustrato de la proteína *HaLACS2*. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  la desviación estándar de tres determinaciones independientes.

A este respecto y como veremos en el apartado de Resultados 4.5.3, algunas líneas mutantes de girasol de interés comercial presentan aceites enriquecidos en ácido esteárico. Así, la baja actividad de las enzimas LACS hacia el ácido esteárico podría ser un aspecto limitante durante la metabolización y acumulación de dicho ácido graso en los TAG. Los estudios realizados en este trabajo sobre las diferentes líneas mutantes de girasol (Resultados 4.5.3), revelaron que la línea CAS-3 la cual presentó un perfil alto esteárico, acumulaba menos TAG durante el desarrollo de la semilla con respecto a las líneas control CAS-6 (Figura 68). Este fenómeno se ha asociado a una baja eficiencia de la maquinaria enzimática de girasol para aceptar estearil derivados como sustratos. Esta hipótesis es compatible con las especificidades de sustrato de *HaLACS* caracterizadas en este trabajo, ya que ambas enzimas mostraron baja actividad hacia el ácido esteárico lo cual podría provocar una alteración del flujo metabólico que causara los efectos anteriormente descritos.

#### 4.3.5 Estudios de localización de *HaLACS1* y *HaLACS2*.

En vista de que los programas y bases de datos comúnmente empleados para la estimación de la localización de proteínas no predijeron resultados claros con *HaLACS1* y *HaLACS2*, se realizaron estudios de localización con el objetivo de aportar mayor evidencia sobre la función de las mismas. La técnica empleada fue la expresión transitoria de las proteínas *HaLACS1* y *HaLACS2* unidas a proteínas fluorescentes, en el extremo C-terminal de cada proteína para que no se viera afectada la localización de las mismas. A continuación, estas proteínas fueron expresadas en células transformantes de tabaco BY-2 y su localización determinada en un microscopio confocal (Materiales y Métodos 3.5.1) La localización de *HaLACS-GFP* se llevó a cabo como se describió en el apartado anterior (Resultados 4.2.1), empleándose distintos controles, unos marcados con proteína roja fluorescente (RFP) y otros utilizando una reacción antígeno-anticuerpo frente a la proteína control ConA (Tartakoff y Vasalli, 1983). Así, en la Figura 48, se observa la expresión de la proteína *HaLACS1* y como control se utilizó el translocón de membrana interna de cloroplasto 40 marcado con la RFP (Tic40-RFP) (Heins et al., 2002), pudiéndose apreciar que la *HaLACS1-GFP* colocalizó con la proteína TIC en las membranas de los cloroplastos, formando un halo verde alrededor del rojo correspondiente al marcador, lo cual confirmó la localización de esta proteína en las membranas de estos orgánulos, localización similar a la de su homóloga *AtLACS9* en *Arabidopsis* (Schnurr et al., 2002). En la Figura 49 se aprecia que *HaLACS1-GFP* estuvo unida a membrana, no observándose presencia de la misma en el citosol (Figura 49, filas 4 y 5) que en este caso fue marcado mediante la expresión de la RFP. Además, en estas imágenes se observa que la enzima se asoció a estructuras membranosas circulares que anteriormente fueron confirmadas como plastidios. Sin embargo, cuando se empleó como marcador la ConA, que se localiza en el retículo endoplasmático, se observó un cierto solapamiento con una parte de la *HaLACS1-GFP* (Figura 49, fila 1, 2 y 3). Esta tendencia a ser localizada en el retículo endoplasmático podría ser un artefacto causado por la sobreexpresión de la proteína, que se produciría después de que las membranas del plastidio quedaran saturadas y no pudieran albergar mayores cantidades de esta proteína. Sin embargo, este fenómeno se da también a tiempos cortos de expresión de las proteínas marcadas, lo que parece indicar que esta enzima se encuentra tanto en la membrana de los plastidios como en ciertos dominios del retículo endoplasmático. Este resultado implicaría a esta enzima en el proceso de tráfico de



membranas entre estos dos orgánulos. A este respecto se han descrito proteínas con localizaciones similares. Es el caso, por ejemplo, de la ent-kaureno oxidasa, que se localiza tanto en membranas plastidiales como en el retículo endoplasmático enlazando dos ramas de la ruta de síntesis de las giberelinas con distinta localización (Helliwell et al., 2001). En este sentido, la *HaLACS1* podría desempeñar esa función dentro de la ruta de síntesis de lípidos en girasol.

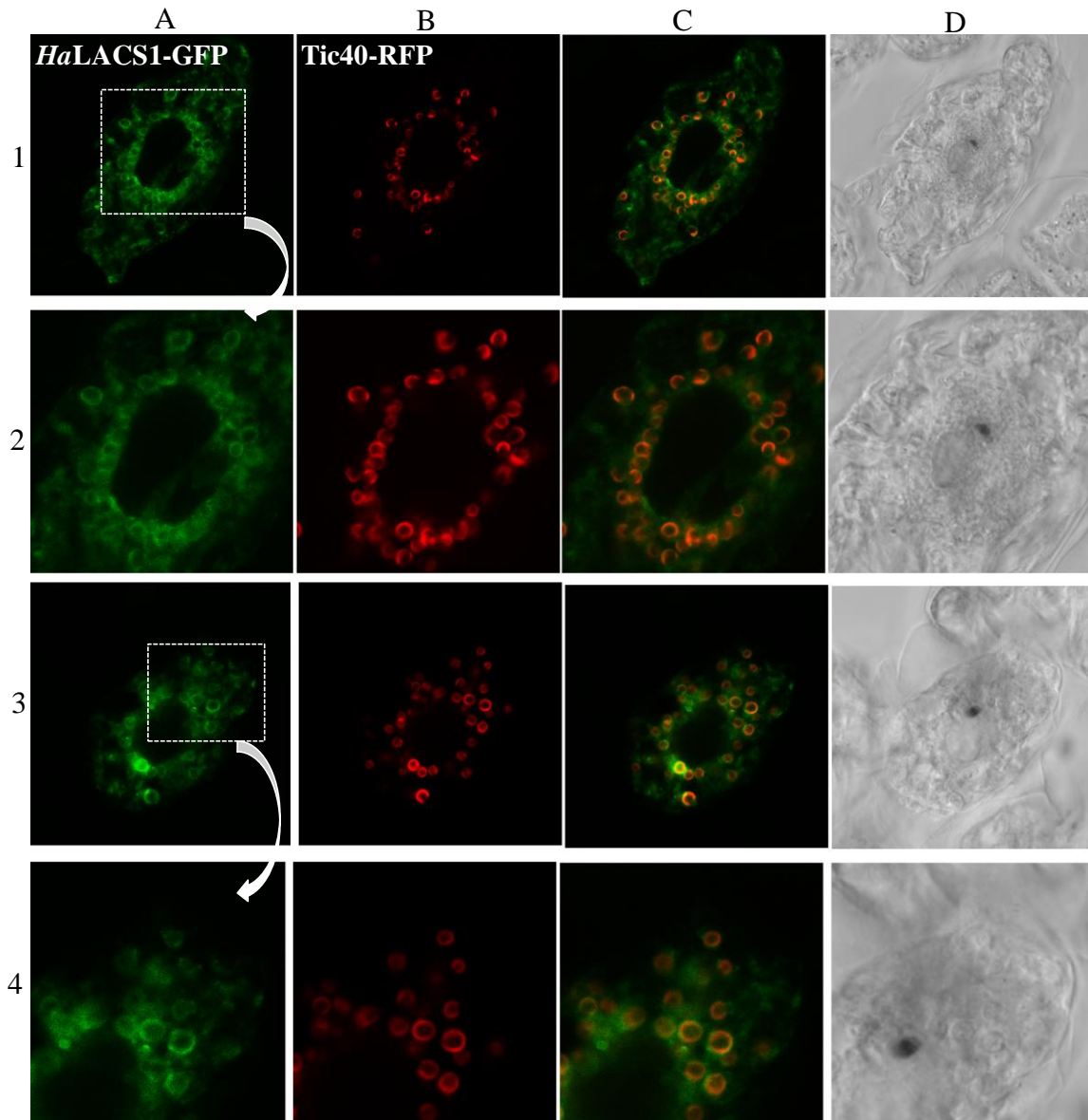


Figura 48. Imágenes de microscopía confocal de la proteína *HaLACS1* fusionada con la molécula fluorescente GFP, expresadas en células de tabaco BY-2 y co-expresadas con el control Tic40-RFP. Columna A; Se representa las imágenes de expresión *HaLACS1*-GFP (color verde). Columna B; Imágenes utilizada como control positivo de Tic40-RFP (color rojo). Columna C; Superposición de las columnas A y B. Columna D; Imagen confocal.

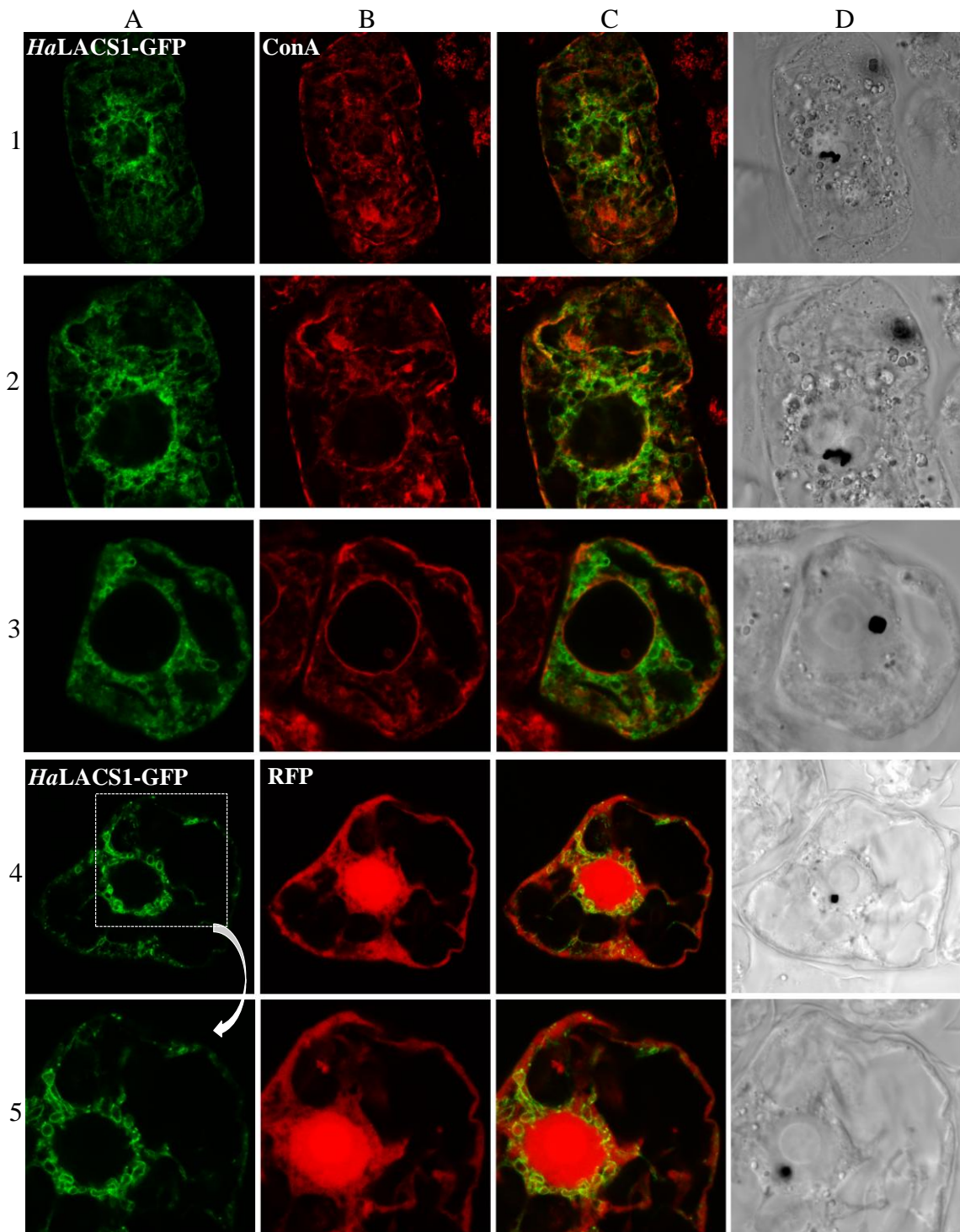


Figura 49. Imágenes de microscopía confocal de la proteína *HaLACS1* fusionadas con la molécula fluorescente GFP, expresadas en células de tabaco BY-2. Columna A; Se representa las imágenes de expresión *HaLACS1*-GFP (color verde). Columna B; Imágenes de proteínas control (color rojo) como conjugado fluorescente de la Concanavalina A (proteína marcador del retículo endoplasmático, filas 1,2 y 3) o mediante co-expresión con RFP (marcador del citosol, filas 4 y 5). Columna C; Superposición de las columnas A y B. Columna D; Imagen confocal.

En el caso de *HaLACS2*, se observó una clara localización en el retículo endoplasmático. Como en el caso anterior, se realizó también un estudio de localización comparativo con Tic40-RFP, obteniéndose marcas fluorescentes completamente segregadas que descartan la presencia de *HaLACS2* en membranas plastidiales (Figura 50, filas 1 y 2). Por otra parte, la ConA se utilizó como control de localización en el retículo endoplasmático en estos experimentos, confirmándose la localización de *HaLACS2* en el retículo al superponerse los marcajes obtenidos con ambas proteínas (Figura 50, filas 3, 4 y 5). Esta localización es similar a la publicada para *AtLACS8*, la forma de LACS en *Arabidopsis* homóloga a *HaLACS2* (Zhao et al., 2010).

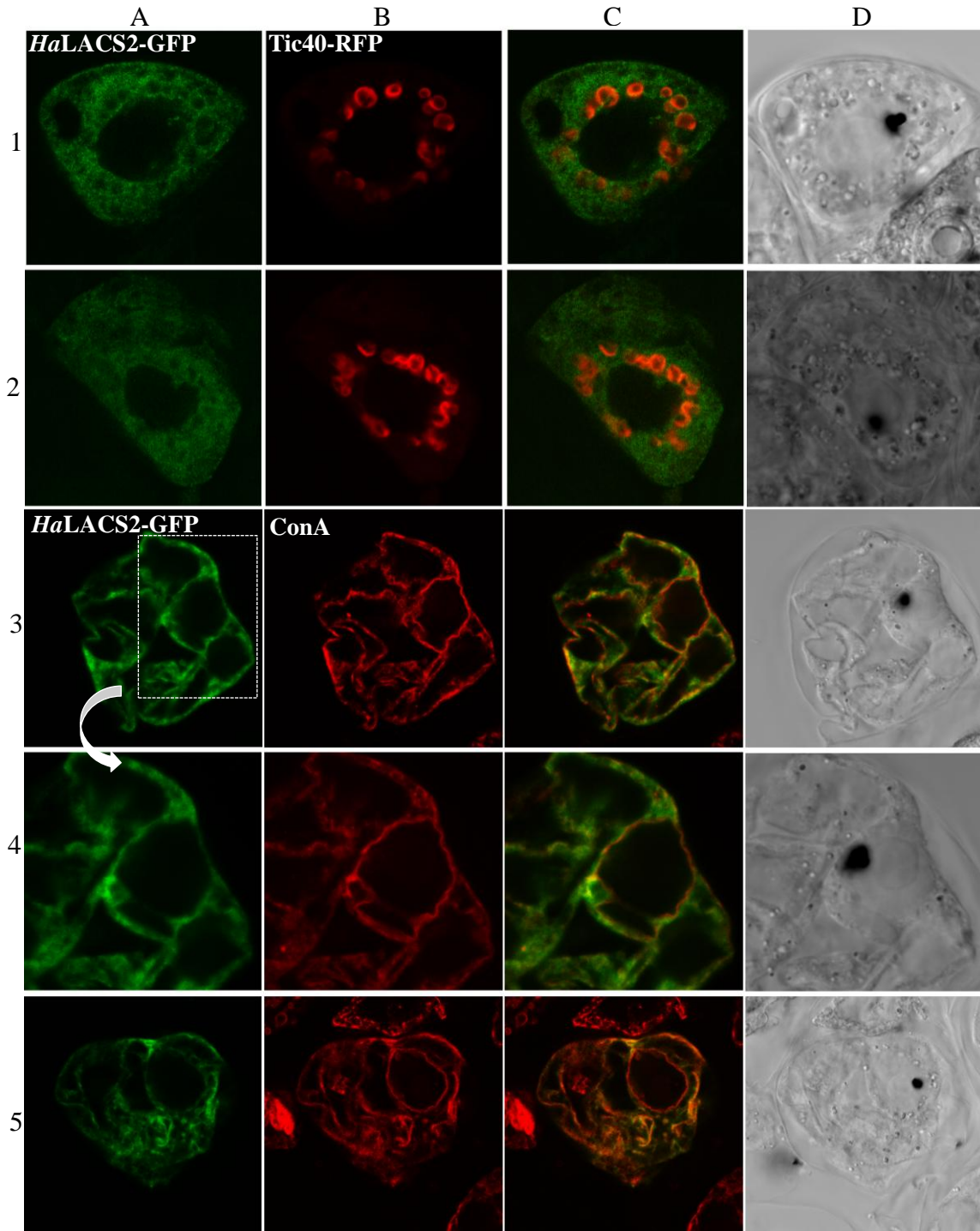


Figura 50. Imágenes de microscopía confocal de la proteína *HaLACS2* fusionada con la molécula fluorescente GFP, transformadas en células de tabaco BY-2 mediante bombardeo biobalístico. Columna A; Se representa las imágenes de expresión *HaLACS2*-GFP (color verde). Columna B; Imágenes de varias proteínas control (color rojo) mediante co-expresión con Tic40-RFP (fila 1 y 2) o como conjugado fluorescente de la Concanavalina A (filas 3, 4 y 5). Columna C; Superposición de las columnas A y B. Columna D; Imagen confocal.

## 4.4 ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A LOS ACIL-CoA EN GIRASOL.

### 4.4.1 Clonación de tres genes *ACBP* en girasol.

A partir de las secuencias conocidas de *ACBP1*, *ACBP4* y *ACBP6* de *Arabidopsis thaliana* (At5g53470, At3g05420 y At1g31812 respectivamente) disponibles en bases de datos públicas (<http://aralip.plantbiology.msu.edu/pathways/pathways>), se realizó una búsqueda de ESTs en *Helianthus annuus* que codificaran proteínas homólogas a estas. Utilizando las secuencias de estos ESTs, se diseñaron los oligonucleótidos necesarios para amplificar un fragmento de ADN que codificaba una *ACBP* de girasol que presentaba homología con la secuencia proteica del gen de *Arabidopsis AtACBP6*. Para mayor claridad, en el presente trabajo se dio a este gen el nombre de *HaACBP6*. Además, entre estos ESTs de girasol se hallaron secuencias parciales codificantes para otras *ACBP*, que se amplificaron mediante la técnica RACE (Materiales y Métodos 3.2.5.1) a partir de ADNc de semillas de 20 DDF pertenecientes a la línea control CAS-6 de girasol. Los fragmentos amplificados fueron clonados en el plásmido pMBL-T-Easy® (Dominion, España) y varios clones fueron secuenciados en ambos sentidos (Materiales y Métodos 3.2.12). El alineamiento mediante el programa Bioedit de las secuencias amplificadas mostró que dichos fragmentos presentaban secuencias homólogas a las secuencias conocidas de *Arabidopsis AtACBP1* y *AtACBP4*, a las que se nombrará a su vez *HaACBP1* y *HaACBP4*, respectivamente. Una vez ensamblados los fragmentos y amplificada por completo la secuencia mediante el uso de los oligonucleótidos descritos en la Tabla 10, las secuencias finalmente determinadas fueron de 1050 pb para *HaACBP1*, 1989 pb para *HaACBP4* y 273 pb para *HaACBP6*, con pautas abiertas de lectura que codificaban proteínas de 350, 663 y 91 aa respectivamente. Las secuencias completas se clonaron en el plásmido de expresión pQE80 que se usó para transformar la cepa BL21 como se describe en los Materiales y Métodos 3.2.3.2 con el fin de sobreexpresar estas proteínas.

### 4.4.2 Estudio estructural de las *HaACBP*.

El alineamiento de *HaACBP6* con otras ACBP6 de diferentes especies (Figura 51) muestra que todas presentan pequeño tamaño (unos 90 aa, no más de 137 aa) y una única zona activa correspondiente a la unión de acil-CoA presente en todas la proteínas de esta familia. La homología entre *HaACBP6* y sus homólogos de *Arabidopsis*, arroz o ricino fue del 77 %, 72 % y 71 %, respectivamente. Otras especies incluidas en la Figura 51, que no se correspondían ni con plantas Dicotiledóneas ni Monocotiledóneas mostraron homología menores al 70 %.

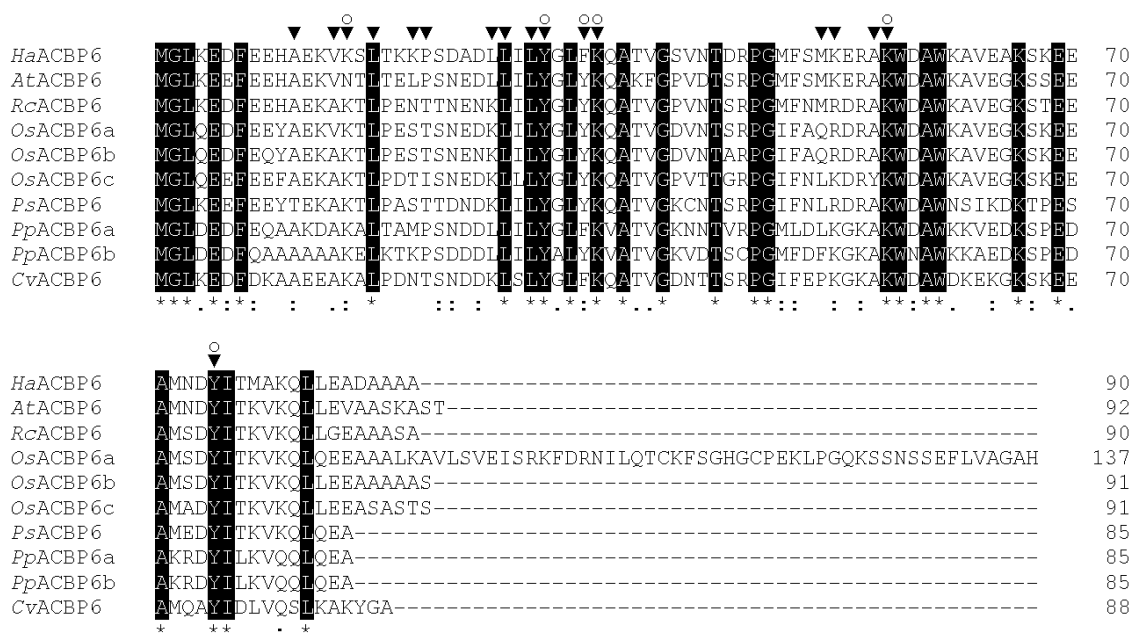


Figura 51. Alineamiento de *HaACBP6* con otras ACBP6 de diferentes especies: Ha; *Helianthus annuus*, At; *Arabidopsis thaliana*, Rc; *Ricinus communis*, Os; *Oryza sativa*, Ps; *Picea sitchensis*, Pp; *Physcomitrella patens*, Cv; *Chorella variabilis*, ○ residuos implicados en el empaquetamiento de acil-CoA, ▼ residuos involucrados en la unión al CoA.

Las proteínas ACBP1 son proteínas asociadas a membrana, que presentan en su secuencia un dominio transmembrana en la región *N*-terminal (Xiao, et al., 2008). Al alinear la secuencia de *HaACBP1* con otras ACBP1 de otras especies (Figura 52), se pudieron observar tres zonas bien diferenciadas: (i) la zona de unión al acil-CoA (sombreada en gris), (ii) la correspondiente al motivo *ankiryn repeat* (en verde), y (iii) los 30 primeros aa (en amarillo) que forman una hélice transmembrana que fija la proteína a la membrana del retículo endoplasmático (Figura 52). Los dominios *ankiryn repeat* han sido descritos como zonas de interacción entre proteínas (Li et al., 2004) lo que sugiere para las ACBP una función como cofactor facilitando la interacción entre los acil-CoA y otras proteínas.

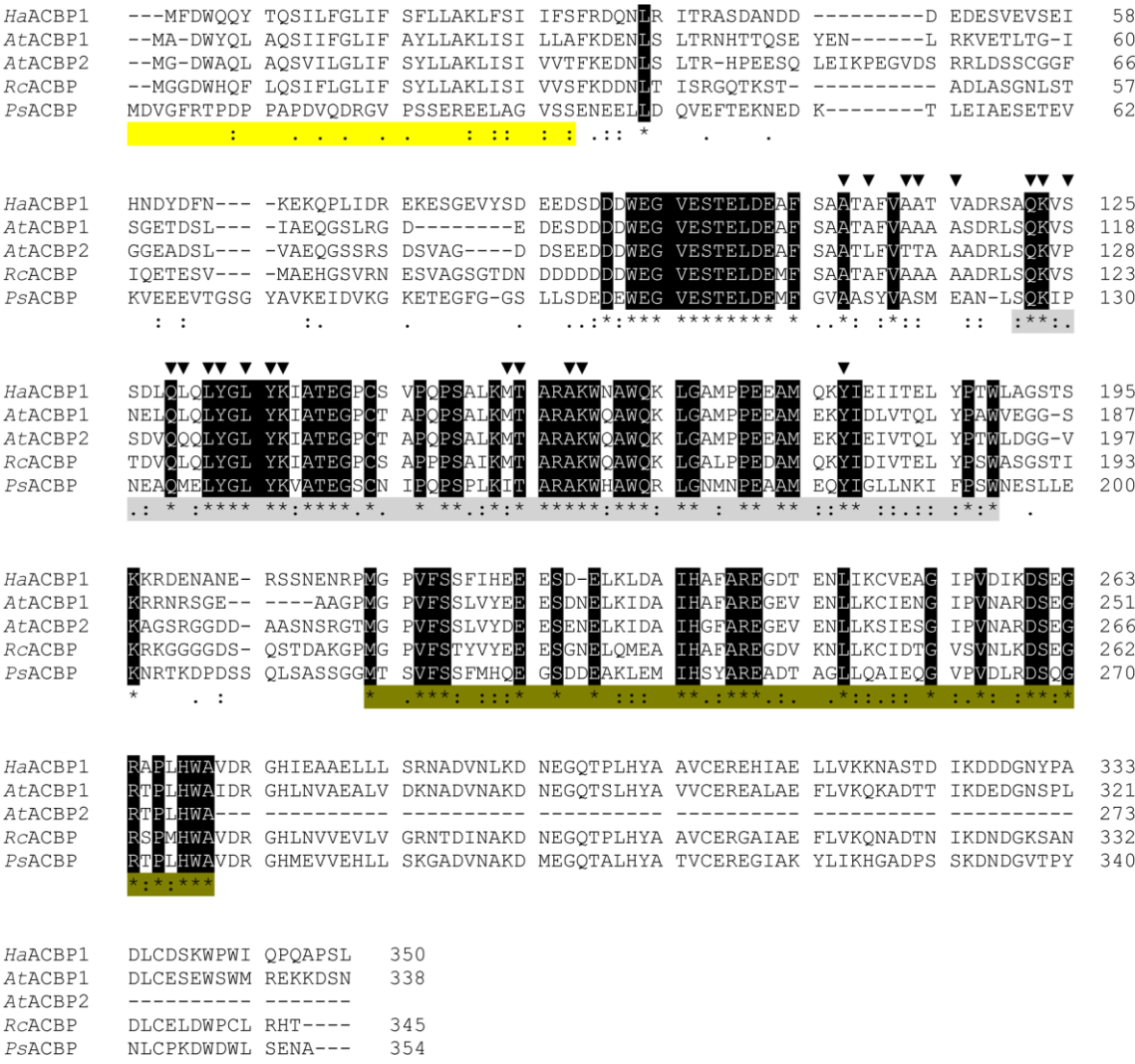


Figura 52. Alineamiento de *HaACBP1* con otras ACBP1 de diferentes especies, Ha: *Helianthus annuus*, Rc: *Ricinus communis*, At: *Arabidopsis thaliana*, Ps: *Picea sitchensis*, ▼ residuos involucrados en la union de acil-CoA, □: Dominio transmembrana, □: ACBP motif, □: Ankiryn repeat.

Las isoformas de ACBP4, son proteínas de mayor tamaño y como se explica a continuación, contienen dominios con distinta función o actividad. Al alinear la secuencia *HaACBP4* con ACBP4 de otras especies, se pudieron observar además del dominio de unión de los acil-CoA (Figura 53, sombreado color gris), otros dos dominios bien diferenciados: una zona que se corresponde con un motivo *Kelch* (residuos del 183 al 507 de *HaACBP4*, sombreados en rojo) y otra identificada como un motivo *prefoldin* (residuos del 645 al 683, sombreados en azul).

Resultados y Discusión

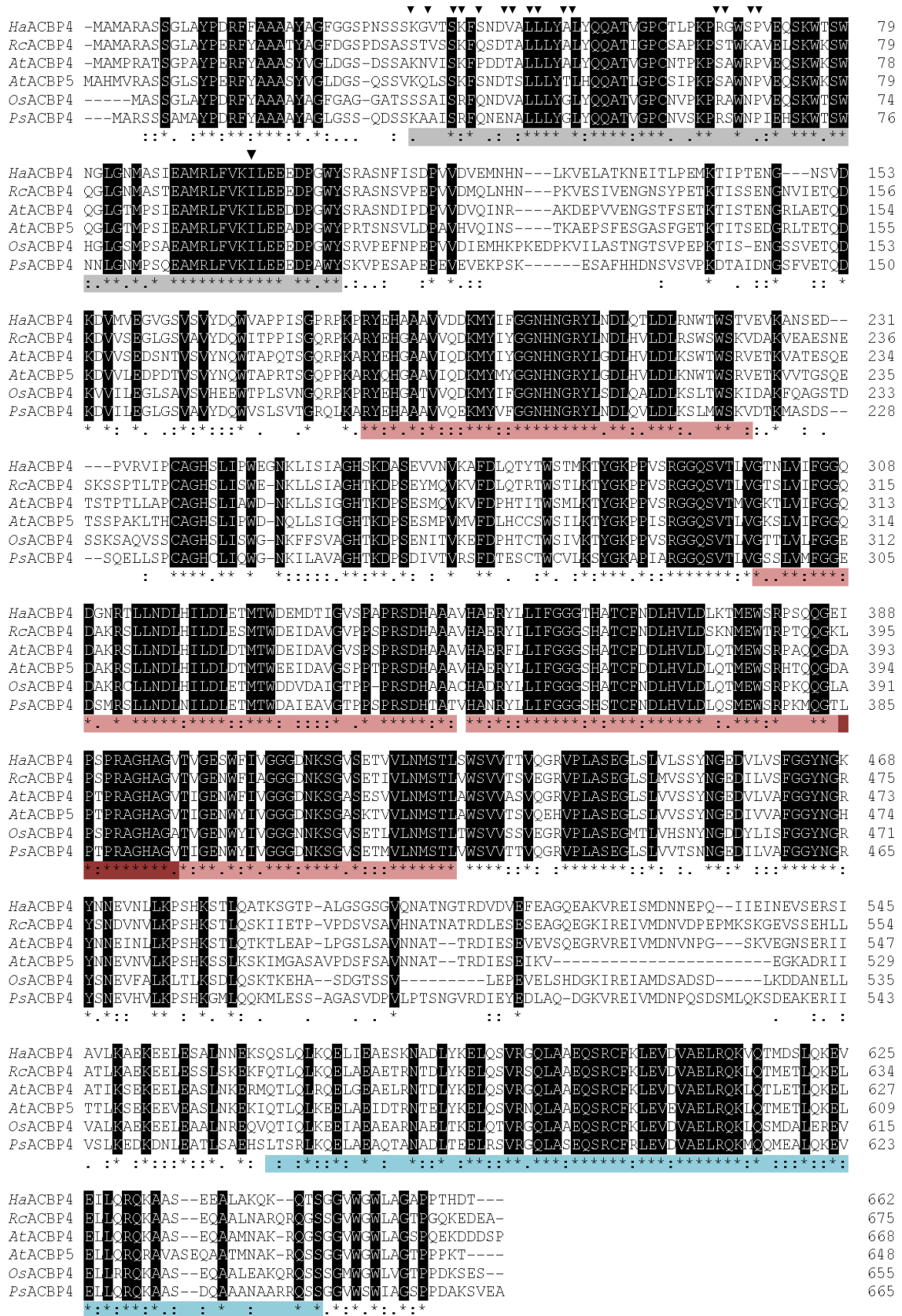


Figura 53. Alineamiento de HaACBP4 con otras ACBP4 de diferentes especies: Ha: *Helianthus annuus*, Rc: *Ricinus communis*, At: *Arabidopsis thaliana*, Os: *Oryza sativa*, Ps: *Picea sitchensis*, ▼ residuos implicados en la unión de acil-CoA, [grey] : ACBP motif, [red] : kelch motif, [dark red] : superposición de kelch motifs, [blue] : prefoldin motif.



Como en el caso anterior de los dominios *ankyrin repeat*, los *kelch motif* han sido descritos como zonas de interacción entre proteínas participantes en múltiples procesos metabólicos (Adams et al., 2000) como puede ser en la expresión génica (Philips y Herskowitz, 1998; Diaz et al., 1997) o la organización celular (Kim et al., 1998; Oettinger et al., 1990). Esta observación sobre los *kelch motif* confirma la propiedad de este grupo de proteínas ACBP de actuar como cofactor, facilitando la interacción entre los acil-CoA con otras moléculas (Leung et al., 2004). La zona *prefoldin* presenta además homología con la familia de las chaperonas (Cowan et al., 1998). Ésta es una estructura compleja cuya función es la de unir y estabilizar las nuevas cadenas polipeptídicas sintetizadas permitiendo un correcto plegamiento de las mismas. En este caso, la secuencia *HaACBP4* mostro una homología del 73 y 71 % respectivamente para su homóloga *RcACBP* y *AtACBP4* respectivamente. En los demás casos, *AtACBP5*, *OsACBP* y *PsACBP* la homología fue menor del 70 %.

Las secuencias de *HaACBP* muestran gran similitud con sus homólogos de *Arabidopsis* y de otras especies. Este grado de homología permitió el uso del programa de modelado de proteínas (Swiss-Model, Schwede et al., 2003) basado en estructuras cristalinas conocidas como por ejemplo la de la proteínas aisladas de *Plasmodium falciparum* (VanAalten et al., 2001), levaduras (Teillum et al., 2005), *Moniliophthora perniciosa* (Monzani et al., 2010; Modig, et al., 2007) o humanos (Taskinen et al., 2007) que permitió la obtención de los modelos estructurales de las *HaACBP* (Figura 54) (Materiales y Métodos 3.3.1). En todos los casos, podemos observar una estructura de unión a los acil-CoA de cuatro  $\alpha$ -hélices (Figura 54, 1-A, 2-A, 3-A y 3-B).

En el caso de *HaACBP6*, la proteína más pequeña y que únicamente presenta la región ACB, se observa una zona de unión a acil-CoA marcada en amarillo y otra de color azul representando el bolsillo de la proteína donde encajaría el sustrato (Figura 54, 1-C). *HaACBP6* es una proteína de 90 aa, un peso molecular de 10,1 kDa, un pI 5,29 y presentó el 74 % de su estructura expuesta al exterior como región soluble.

El estudio tridimensional de la secuencia proteica *HaACBP4* muestra también una estructura de cuatro  $\alpha$ -hélices correspondientes a la zona de unión a grupos acil-CoA (Figura 54, 2-A). Esta proteína, presenta una región *kelch motif* (Figura 54, 2-B) con 5 hojas  $\beta$  orientadas de forma paralela formando un bucle en el interior. Además, en la Figura 54 (2-C), se representa la región *prefoldin motif* observándose una estructura de cuatro  $\alpha$ -hélices. *HaACBP4* es una proteína de 662 aa, con un peso molecular de 72,1 kDa, un pI 5,03 y presentó el 67 % de estructura expuesta al exterior de forma soluble.

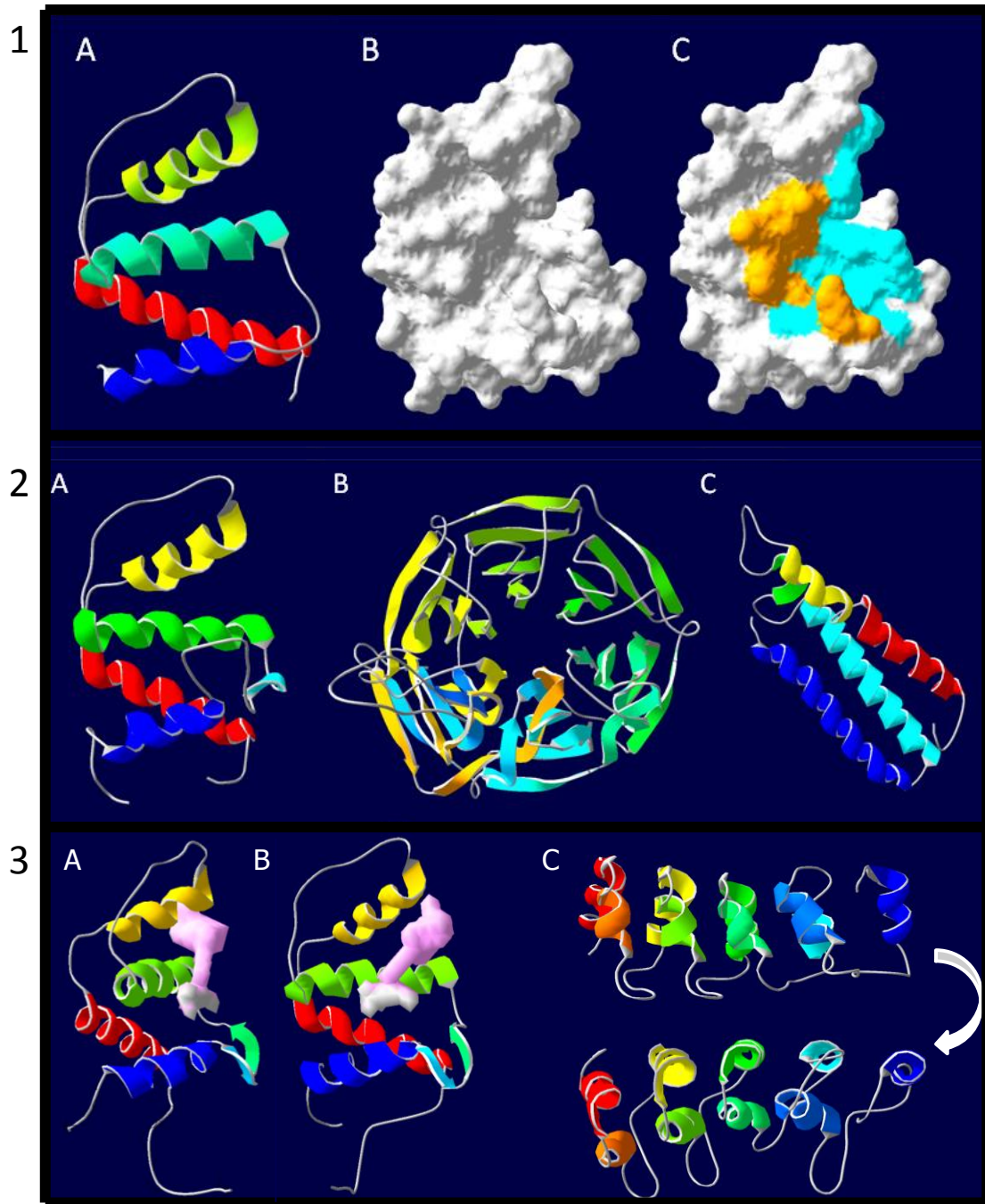


Figura 54. Representación tridimensional de las proteínas *HaACBP*. 1, corresponde a la estructura tridimensional de *HaACBP6* (A, B y C corresponden a la zona ACB de la proteína *HaACBP6*, la región *N*-terminal se presenta en color azul y la *C*-terminal en rojo); 2, estructura tridimensional de *HaACBP4* (A; región ACB de la proteína *HaACBP4* desde el aminoácido 7 al 105, la región *N*-terminal se presenta en color azul y la *C*-terminal en rojo, B; modelo representando la región *kelch motif* desde el aminoácido 213 al 508, C; modelo representando la región *prefoldin motif* desde el aminoácido 536 al 642); 3, estructura tridimensional de *HaACBP1* (A y B representa la zona ACB de *HaACBP1* presentando la región *N*-terminal en color azul y la *C*-terminal en rojo, C; región *ankyrin motif* de la proteína *HaACBP1*).

Al igual que las estructuras anteriores, la secuencia *HaACBP1* presentó la región característica de este grupo de proteínas con sus 4  $\alpha$ -hélices (Figura 54, 3-A y 3-B) correspondientes al sitio de unión de los acil-CoA, que se representa en la Figura en color rosa. La zona de los *ankyrin motifs* corresponde a nueve pequeñas  $\alpha$ -hélices e intervienen en la interacción de la proteína con otras enzimas (Figura 54, 3-C). *HaACBP1* es una proteína de 349 aa, con un peso molecular de 39,3 kDa, un pI 4,57 y una solubilidad del 54 %.

#### 4.4.3 Análisis filogenético de las *HaACBP*.

Se llevó a cabo un estudio filogenético de las secuencias polipeptídicas derivadas de los ADNc de las *HaACBP* clonadas con otros genes *ACBP* de diferentes organismos. A este respecto en la Figura 55 podemos observar tres grupos bien diferenciados de estas proteínas. Para mayor claridad, el árbol se enraizó con el organismo pluricelular *Danio rerio* (Pez cebra). Uno de estos grupos englobaría a las *AtACBP1*, *AtACBP2* y *AtACBP3*, como proteínas que están asociadas a membrana. En este grupo se incluye la proteína *HaACBP1*. Además, *AtACBP3* se diferencia dentro de este grupo de las dos primeras. Como se comentó en la Introducción (apartado 1.3.3), la isoforma *AtACBP3* está localizada en el espacio extracelular (Leung et al., 2005). Además, analizando las secuencias, *AtACBP1/2* contenían los dominios *ankyrin repeat*, los cuales no estaban presentes en la isoforma *AtACBP3*, presentando únicamente el dominio ACB característico de la especie. En otro grupo se encontraría la *AtACBP6*, proteína soluble pero mucho más pequeña que las incluidas en el grupo anteriores presentando únicamente el dominio ACB de esta familia de proteínas. En el tercer grupo se encontrarían las proteínas *AtACBP4/5*, proteínas solubles que presentan varios dominios (*prefondin motif*, *kelch motif*) además del dominio ACB. En todos los casos podemos observar una alta homología entre las *ACBP* de girasol (*HaACBP1*, *HaACBP4* y *HaACBP6*) y la de otras especies de plantas dicotiledóneas como *Arabidopsis* o ricino. Dentro de cada grupo, todas ellas quedan separadas de las *ACBP* de Bryophytas (*Physcomitrella patens*) y Lycopodiophyta (*Selaginella moellendorffii*).

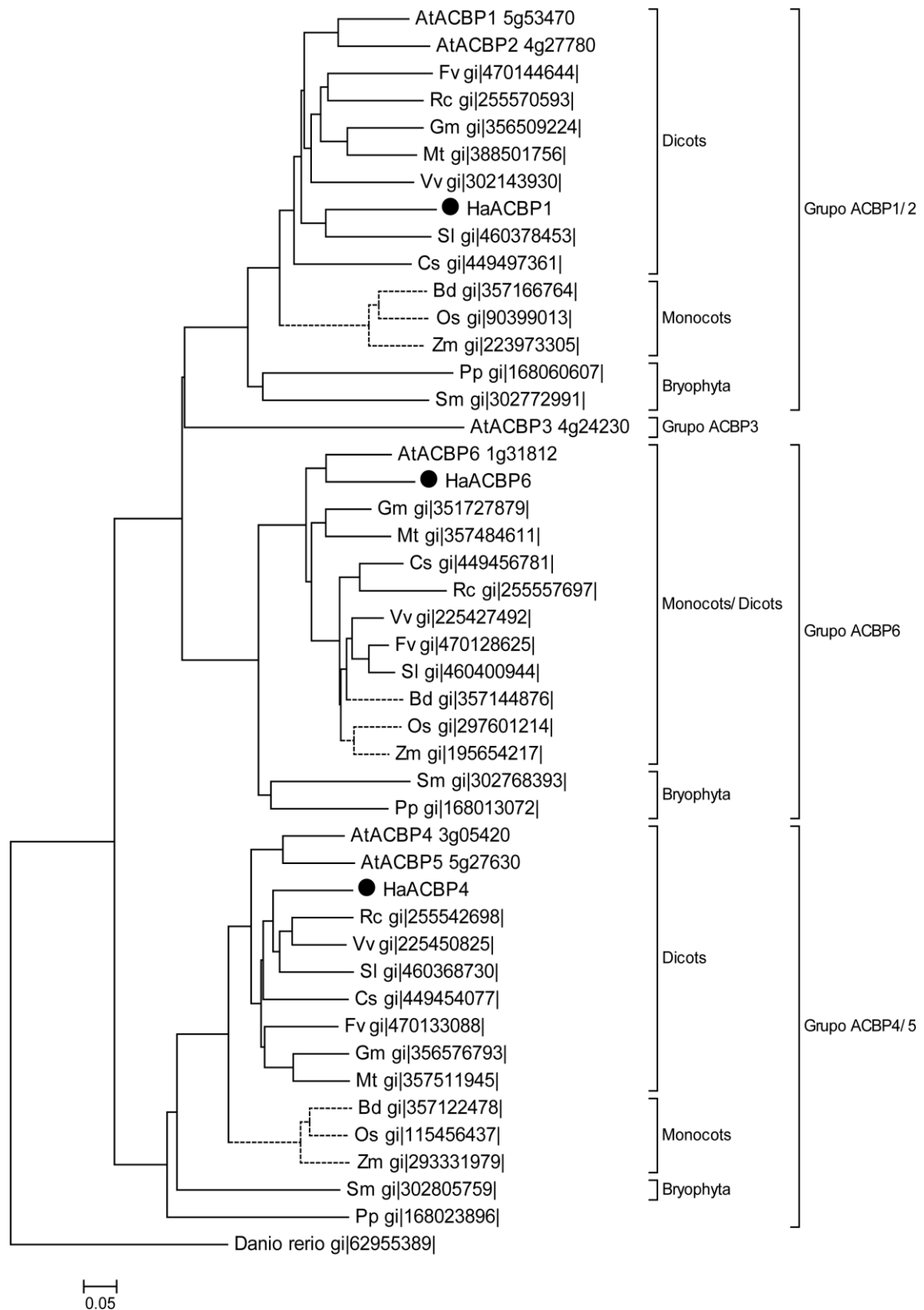


Figura 55. Comparación filogenética de las proteínas de unión a grupos acilo con sus homólogas de otras especies. Las especies incluidas en este árbol son: At; *Arabidopsis thaliana*, Bd; *Brachypodium distachyon*, Cs; *Cucumis sativus*, Fv; *Fragaria vesca*, Gm; *Glycine max*, Ha; *Helianthus annuus*, Mt; *Medicago truncatula*, Os; *Oryza sativa*, Pp; *Physcomitrella patens*, Rc; *Ricinus communis*, Sl; *Solanum lycopersicum*, Sm; *Selaginella moellendorffii*, Vv; *Vitis vinífera*, Zm; *Zea mays*, *Danio rerio* (Pez cebra). Monocotiledoneas (----).

#### 4.4.4 Niveles de expresión génica de *HaACBP1*, *HaACBP4* y *HaACBP6*.

Los niveles de expresión de las *ACBP* de girasol en los tejidos de hoja, raíz, tallo, cotiledones en germinación y de semillas en desarrollo se estudiaron mediante RT-qPCR (Materiales y Métodos 3.2.6). Como muestra la Figura 56, durante el desarrollo de la semilla, los niveles de expresión de las *HaACBP* no se modifican significativamente, no observándose ninguna tendencia clara entre los 12 y los 30 DDF. En la mayor parte de los estadios estudiados, podemos observar una mayor expresión del gen *HaACBP1* en comparación con *HaACBP4* y *HaACBP6*, con la excepción de *HaACBP6* en semillas más desarrolladas (30 DDF).

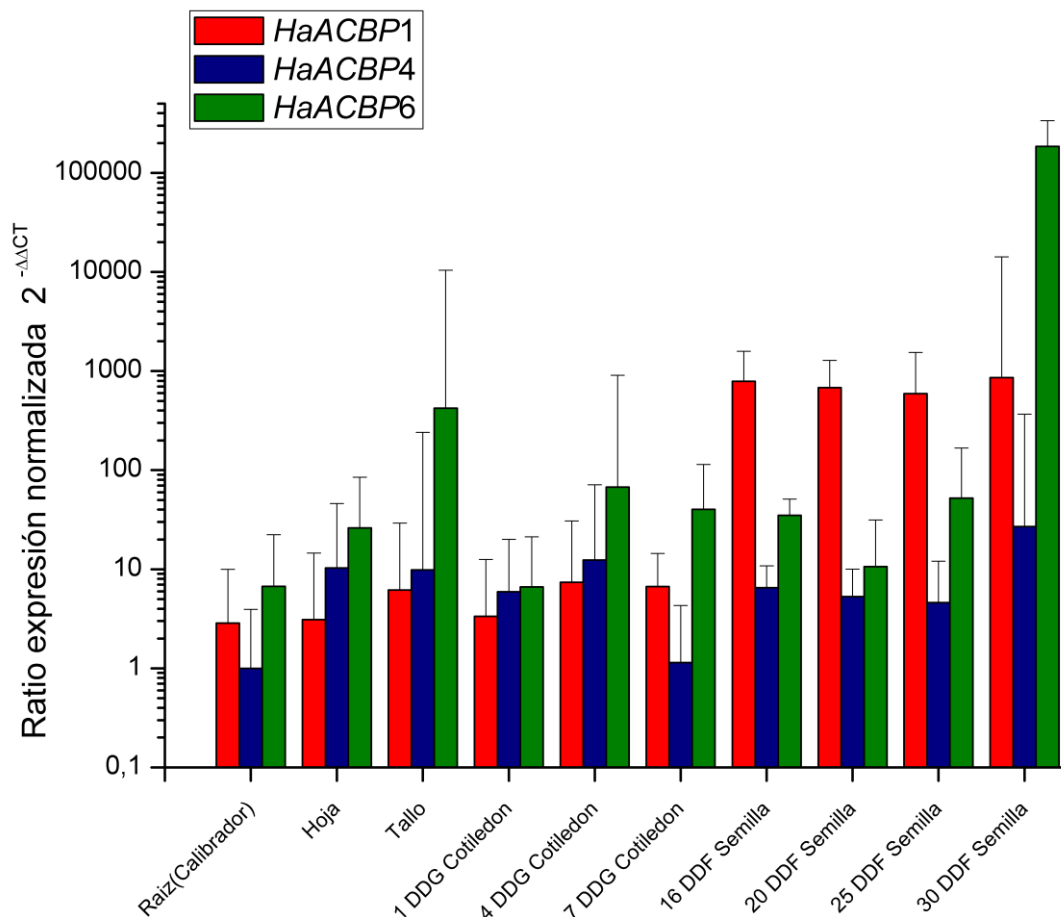


Figura 56. Análisis de los niveles de expresión de los ARNm de *HaACBP* en diferentes tejidos de girasol pertenecientes a la línea CAS-6. En rojo se representan los niveles de expresión de *HaACBP1*, en azul *HaACBP4* y en verde *HaACBP6*. Se representan medias más/menos desviaciones estándar calculadas a partir de tres experimentos independientes.

Este resultado estuvo acorde con otros publicados con anterioridad, donde se describe la importancia de *AtACBP1* en la formación de semillas en *Arabidopsis* (Du et al., 2013; Chen et al., 2010). En cotiledones en germinación, los niveles de expresión para las tres *HaACBP*, presentan un máximo a los 4 días después de la imbibición, siendo *HaACBP6*, la que presentaba un mayor nivel de expresión. La forma *HaACBP1* presentó por otra parte niveles de expresión más bajos en este tejido que durante la formación de la semilla.

#### 4.4.5 Expresión heteróloga de las proteínas *HaACBP*.

Para la expresión heteróloga de *HaACBP* en *E. coli*, los correspondientes genes se clonaron en vectores de expresión bajo la regulación del operón de la lactosa (vector pQE80) y se expresaron en la cepa BL-21 (Materiales y Métodos 3.3.2). En el caso de *HaACBP1*, se eliminaron los primeros 30 aa correspondientes al dominio transmembrana para facilitar la expresión de la proteína en la fracción soluble. En todos los casos, a las proteínas resultantes se les añadió una extensión de seis histidinas en el extremo *N*-terminal para facilitar su purificación. Las fracciones solubles recolectadas después de la inducción de las células contenían las proteínas recombinantes en cada caso (Figura 57).

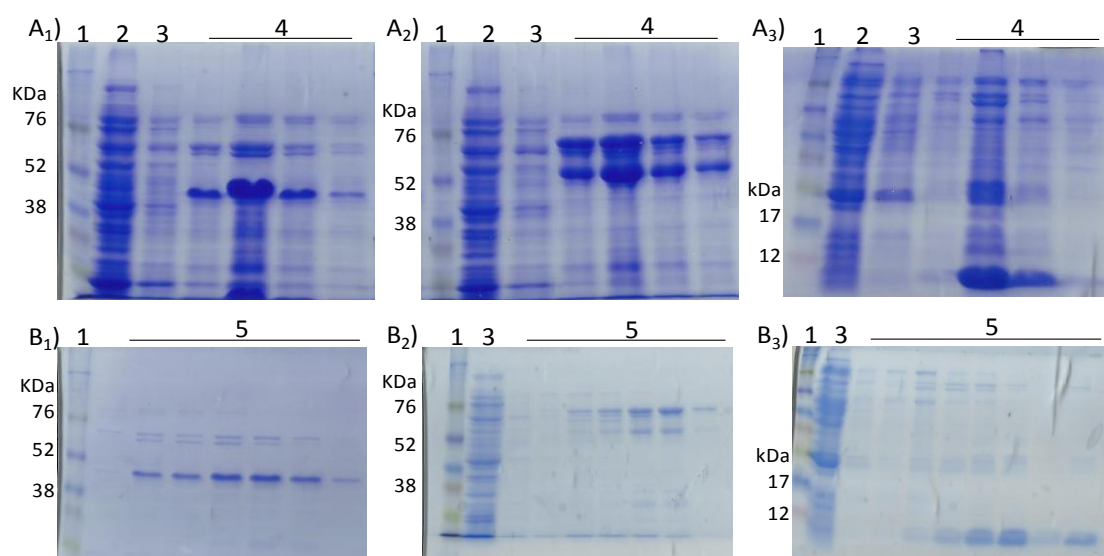


Figura 57. Análisis mediante SDS-PAGE de distintas fracciones obtenidas durante la purificación de las proteínas recombinantes *HaACBP*. A<sub>1</sub>yB<sub>1</sub>) (*His*<sub>6</sub>)-*HaACBP1*, A<sub>2</sub>yB<sub>2</sub>) (*His*<sub>6</sub>)-*HaACBP4*, A<sub>3</sub>yB<sub>3</sub>) (*His*<sub>6</sub>)-*HaACBP6*. 1; marcador molecular, 2; sobrenadante, 3; fracción a través de la columna, 4; primer paso de purificación, 5; segundo paso de proteína purificada.

Las proteínas *HaACBP1*, *HaACBP4* y *HaACBP6* fueron purificadas en columnas de afinidad NTA-Ni, presentando los tamaños esperados de 39 kDa para *HaACBP1*, 72 kDa para *HaACBP4* y 10 kDa para *HaACBP6*. Sin embargo, en las purificaciones correspondientes a *HaACBP4*, siempre presentaron bandas correspondientes a proteínas de menor tamaño (de aproximadamente 60 kDa, Figura 57). Al realizar los estudios de *western blot* (Materiales y Métodos 3.3.5.3) con anticuerpos anti-(His)<sub>6</sub> (Figura 58), se observó que ambas proteínas presentan una cola de histidina, indicando que pueden ser resultado de la digestión de la proteína *HaACBP4* por parte de alguna proteasa endógena de la bacteria (Figura 58-B4).

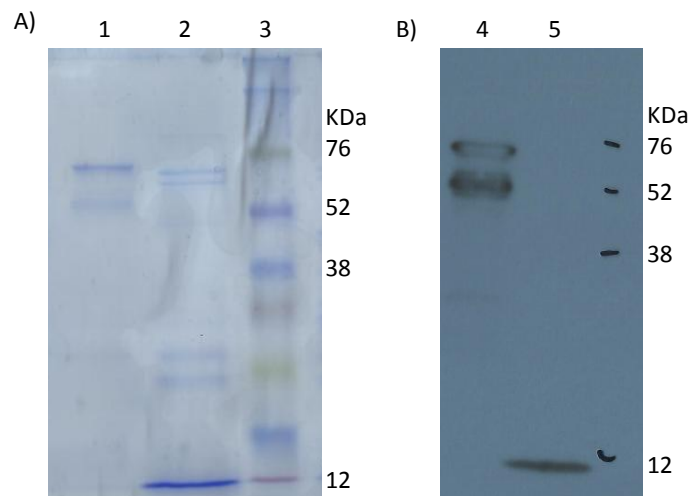


Figura 58. Análisis *Western blot* de la proteína purificada *HaACBP4* y *HaACBP6*. A) Gel de proteína de la fracción purificada de las proteínas, 1, his-*HaACBP4*, 2, his-*HaACBP6*, 3, marcador; B) Membrana *western blot*, 4, *HaACBP4*, 5, *HaACBP6*.

Por ello, se decidió purificar la proteína a partir de un gel desarrollado como se describe en los Materiales y Métodos 3.3.5, nombrando a la proteína de mayor peso molecular *HaACBP4* y la de inferior *HaACBP4c*. A partir de esta purificación se tiene proyectado realizar un estudio de MS de las secuencia de ambas proteínas (*HaACBP4* y *HaACBP4c*), para dilucidar el lugar donde la proteína ha sufrido el corte. Para ello se desarrollaron dos geles SDS-PAGE (Materiales y Métodos 3.3.5.1), uno se tomó como control para localizar las bandas y sobre el otro se cortó la zona correspondiente a las proteínas *HaACBP4* y *HaACBP4c*. En la Figura 59, se muestra un gel donde se aprecia la calidad de la purificación de estos fragmentos. Los análisis de MS están siendo realizados durante la escritura de este trabajo.

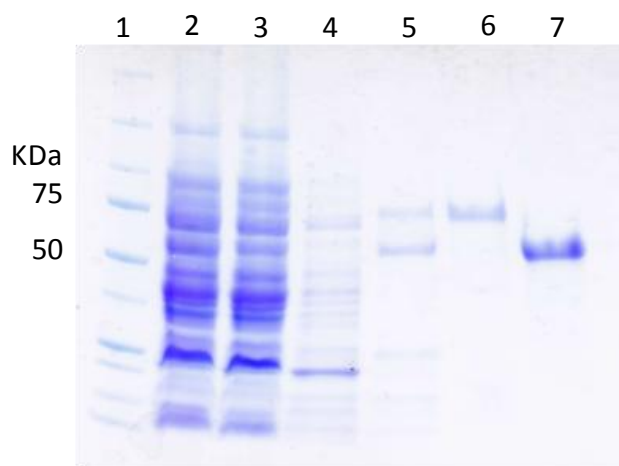


Figura 59. Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas recombinantes *HaACBP4* y *HaACBP4c*. 1; Marcador, 2; Fracción total, 3; Fracción flujo de la columna, 4; Fracción de lavado, 5; Fracción eluida, 6; Fracción purificación de *HaACBP4*, 7; Fracción purificación de *HaACBP4c*.

#### 4.4.6 Estudio de afinidad de las proteínas *HaACBP* recombinantes.

##### 4.4.6.1 Estudio de afinidad hacia diferentes fosfolípidos.

Una de las características más interesantes de las ACBP es que son capaces de interactuar con fosfolípidos, por lo que se las relaciona con los procesos de acilación dependientes de acil-CoA de los mismos (Chen et al., 2008). A este respecto, se realizaron ensayos de afinidad en filtro con diferentes fosfolípidos usando las proteínas *HaACBP* previamente purificadas (Figura 57) en colaboración con el laboratorio de la profesora Mee-Len Chye (Hong Kong). En el caso de *HaACBP4* se utilizaron para el ensayo las fracciones purificadas donde se observó una menor cantidad de proteína *HaACBP4c*. En la Figura 60, se observa la afinidad de *HaACBP1* y *HaACBP4* por distintas especies de PC, LPC, PA y ácido lisofosfatídico (LPA). *HaACBP 1* y *4* mostraron perfiles similares con interacciones más intensas hacia 14:0-PC, 18:1-PC y 18:2-PC. La proteína *HaACBP6*, presentó afinidad para los fosfolípidos insaturados 18:1-PC, 18:2-PC, pero en vez de tener afinidad hacia el derivado saturado 14:0-PC, mostró afinidad por 16:0-PC. En ningún caso, las *HaACBP*, presentaron afinidad significativa por los derivados del LPA o el LPC. Además, respecto a las diferentes especies de PA ensayadas, solo interaccionaron con la especie 18:1-PA. En este caso, solo las isoformas *HaACBP 1* y *4* mostraron afinidad, siendo esta muy baja.



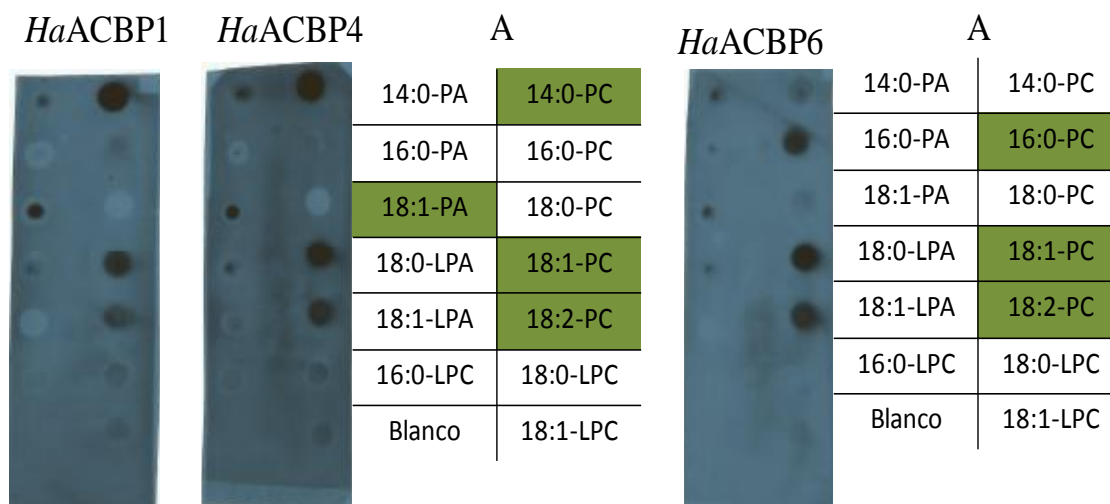


Figura 60. Análisis de afinidad de las proteínas recombinantes *HaACBP* por distintos fosfolípidos. A; Tabla de disposición de los fosfolípidos en la membrana, PA; ácido fosfatídico, LPA; ácido lisofosfatídico, PC; fosfatidilcolina, LPC; lisofosfatidilcolina. , : Fosfolípidos a los que presentan afinidad.

Una vez que se determinaron los fosfolípidos por los que las proteínas *HaACBP* presentaban alguna afinidad, se completó el estudio analizando la influencia de la concentración de sustrato (Figura 61), determinando que grado de afinidad presentaban las *HaACBP* hacia los fosfolípidos. A partir de los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que tanto *HaACBP1* como *HaACBP4* presentan un mayor grado de interacción con las distintas especies de PC que con las de PA. Dentro de estos, *HaACBP4* mostró mayor afinidad sobre los fosfolípidos 18:1-PC y 18:2-PC, mientras que en el caso de *HaACBP1*, la mayor afinidad la presenta hacia el 18:1-PC. En el caso de *HaACBP6*, solo presento afinidad sobre los derivados de PC, teniendo mayores valores sobre los PC insaturados (18:1-PC y 18:2-PC) que sobre el saturado 16:0-PC.

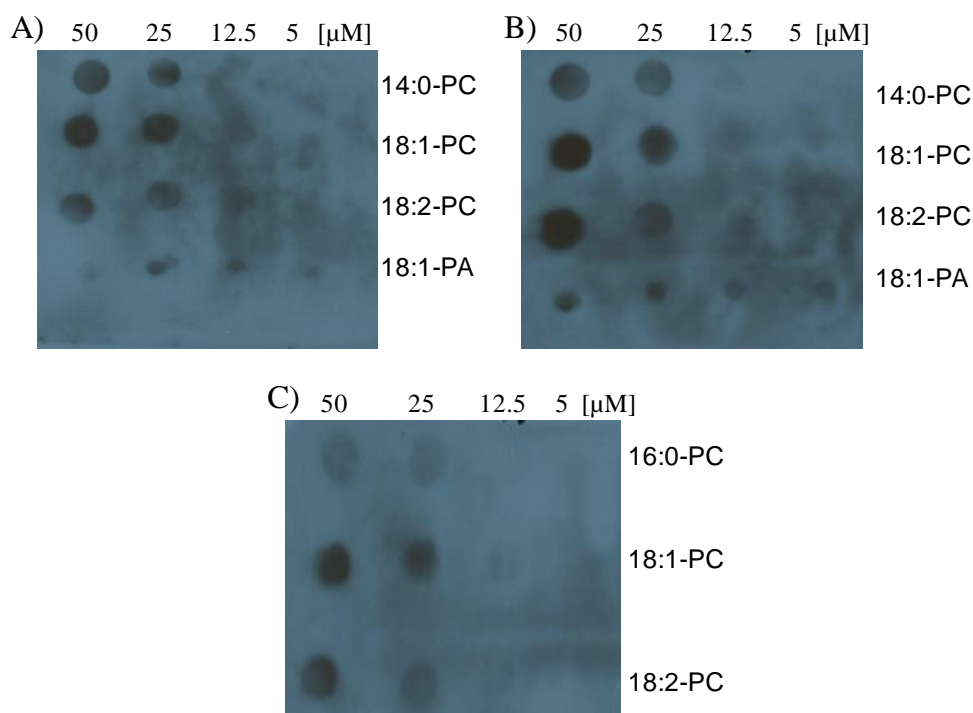


Figura 61. Análisis de afinidad de las proteínas recombinantes *HaACBP* por distintos fosfolípidos. Efecto de la concentración. A, *HaACBP1*, B, *HaACBP4*, C, *HaACBP6*. PA; ácido fosfatídico, PC; fosfatidilcolina.

#### 4.4.6.2 Estudios de afinidad hacia diferentes acil-CoA.

Para llevar a cabo un estudio más a fondo de las funciones de las ACBP *in vitro*, se decidió realizar el estudio de afinidad a diferentes grupos acil-CoA mediante el análisis de ITC como se describe en los Materiales y Métodos 3.4.2.2. En la Figura 62 se representan los registros de microcalorimetría de las tres isoformas *HaACBP* frente al palmitil-CoA (16:0-CoA).

Cuando se realizaron los ensayos, se observó que *HaACBP1* y *HaACBP6* presentaban afinidad por varios acil-CoA, mientras que *HaACBP4* no interaccionó con ninguno de ellos. Esta falta de interacción podría ser debida a la degradación que sufría la proteína y que fue descrita en el apartado 4.4.5. Sin embargo, la misma proteína purificada sí presentó actividad cuando se ensayó frente a diferentes fosfolípidos en el apartado 4.4.6.1, lo cual parece indicar que la degradación sufrida por la proteína afectó principalmente a su dominio de interacción con los acil-CoA. No obstante, este dato ha de ser confirmado por los estudios de MS que se mencionaron anteriormente. Con respecto *HaACBP1*, presento una afinidad de mayor a menor por 16:0≈18:0>>18:1≈20:0≈18:3>>18:2, mientras que la afinidad de *HaACBP6* fue 18:3>16:0≈18:1≈18:0>>18:2≈20:0 (Tabla 19).

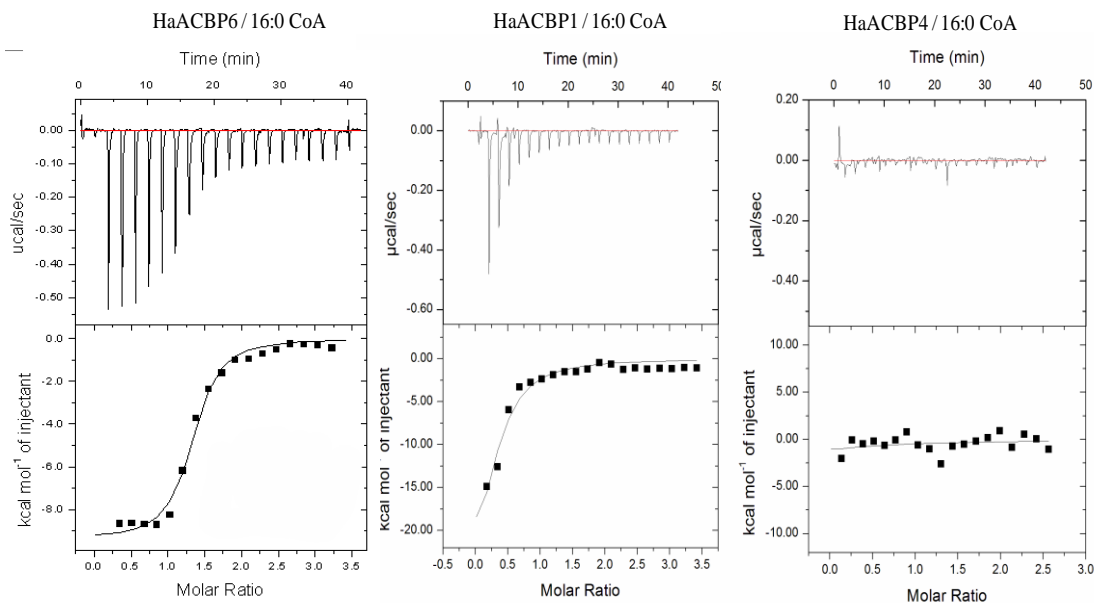


Figura 62. Estudio de afinidad por microcalorimetría (ITC) de las proteínas recombinantes *HaACBP1*, *HaACBP4* y *HaACBP6* hacia el 16:0-CoA.

Se observa una preferencia de *HaACBP1* por los acil-CoA saturados de cadena larga (18:0-CoA y 16:0-CoA). En el caso de *HaACBP6*, presento la mayor afinidad hacia el linolenil-CoA (18:3-CoA), ácido graso poliinsaturado de cadena larga, siendo también alta la afinidad por los grupos acilos 16:0-CoA, 18:1-CoA y 18:0-CoA. Estos resultados parecen confirmar la relación de estas proteínas con la síntesis de ácidos grasos ya que estos grupos acilos (palmitoil, estearil y oleil) son los que una vez sintetizados en el plastidio se exportan al citosol para alimentar distintas rutas metabólicas (Ohlrogge y Browse, 1995). Por último, destacar que en el caso de *HaACBP6*, los resultados obtenidos sobre los ácidos poliinsaturados (18:2-CoA y 18:3-CoA) son diferentes a los obtenidos para *AtACBP6* donde mostró mayor afinidad hacia el 18:2 que hacia el 18:3-CoA (Xiao et al., 2011).

Acil-CoA	<i>HaACBP1</i>				<i>HaACBP6</i>			
	Kd( $\mu\text{M}^{-1}$ )	N	$\Delta\text{H}$	$\Delta\text{S}$	Kd( $\mu\text{M}^{-1}$ )	N	$\Delta\text{H}$	$\Delta\text{S}$
16:0-CoA	1,65E <sup>7</sup>	1,09	-5351	14,6	2,9E <sup>7</sup>	0,56	-3732	21,9
18:0-CoA	1,3E <sup>7</sup>	0,58	-5823	13,3	1,4E <sup>7</sup>	0,49	-4880	16,6
18:1-CoA	6,3E <sup>6</sup>	0,83	-1583	25,9	1,5E <sup>7</sup>	0,87	-3128	22,5
18:2-CoA	2,1E <sup>5</sup>	1,12	-5799	5,26	5,6E <sup>6</sup>	0,63	-3592	19,0
18:3-CoA	4,1E <sup>6</sup>	0,47	-9965	-2,62	7,5E <sup>7</sup>	0,86	-1917	29,7
20:0-CoA	4,8E <sup>6</sup>	1,02	-3707	18,4	1,3E <sup>6</sup>	1,02	-3043	18,0

Tabla 19. Parámetros de afinidad de las proteínas recombinantes His-*HaACBP1* y His-*HaACBP6* con distintos acil-CoA. Kd; constante de afinidad, N; sitios de unión,  $\Delta\text{H}$ ; Entalpia,  $\Delta\text{S}$ ; Entropia, His-*HaACBP4* no presenta unión a ninguno de los acil-CoA ensayados.

#### 4.4.7 Localización de *HaACBP4* y *HaACBP6*.

La caracterización de las proteínas *HaACBP4* y *HaACBP6* se completó con un estudio de sus localizaciones mediante marcaje con péptidos fluorescentes y expresión transitoria en hojas de tabaco tal y como se describe en Materiales y Métodos, apartado 3.5.2. Los resultados del estudio de localización se muestran en la Figura 63.

La proteína *HaACBP4*-GFP aparece localizada en el citosol de las células de tabaco, mientras que *HaACBP6*-GFP, además de ser localizada en el citosol, aparece también en el núcleo al igual que la proteína control, GFP. Estos resultados son similares a los reportados para las formas de ACBP de *Arabidopsis* (Chen et al., 2008b). Esta doble localización tanto del control positivo GFP como de la proteína *HaACBP6*-GFP puede ser explicado por el pequeño tamaño de la proteína. Estas proteínas pueden pasar mediante difusión pasiva a través de los poros nucleares ya que son más pequeñas que el límite de exclusión nuclear (Görlich y Mattaj, 1996). Así, podemos concluir que ambas proteínas son citosólicas, y en el caso de *HaACBP6*-GFP, debido a su pequeño tamaño puede además ser localizada en el núcleo.

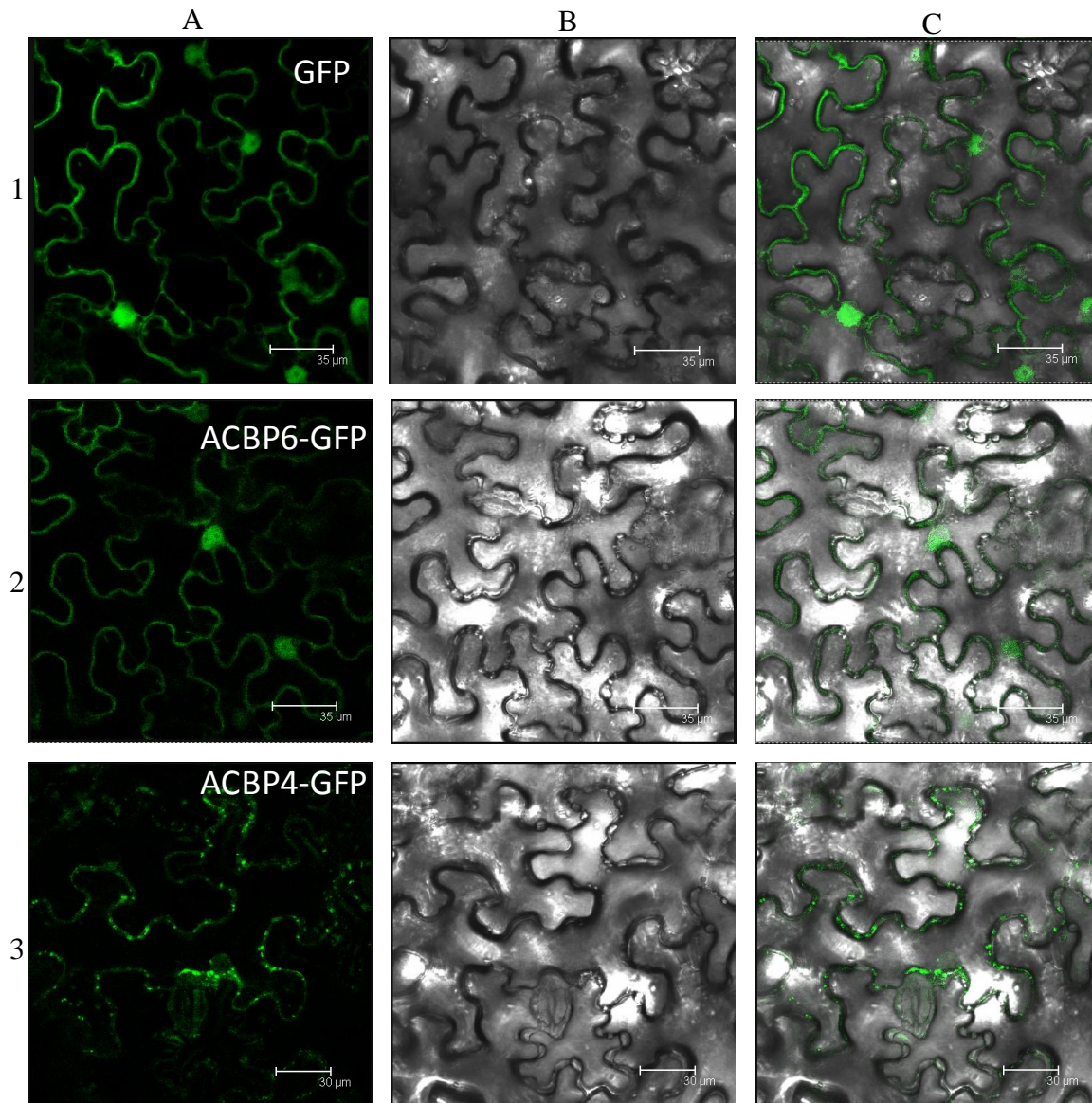


Figura 63. Imágenes de microscopía confocal de la localización de las proteínas *HaACBP4* y *HaACBP6* fusionadas con la molécula fluorescente GFP expresadas en hojas de tabaco: Columna A; se representa las imágenes de expresión del control GFP (fila 1), *HaACBP4*-GFP (fila 2) y *HaACBP6*-GFP (fila 3). Columna B; Imagen de contraste. Columna C; superposición de las imágenes de las columnas A y B.

## 4.5 ESTUDIO DEL CONJUNTO DE ACIL-CoA EN GIRASOL.

### 4.5.1 Síntesis de acil-eteno derivados y de los acil-CoA no comerciales.

Los acil-CoA son compuestos no fluorescentes. Sin embargo, pueden derivatizarse fácilmente a sus eteno derivados fluorescentes mediante la formación de un nuevo heterociclo en su molécula (Larson y Grahan, 2001). Esto se lleva a cabo mediante la reacción de los compuestos acil-CoA con el reactivo químico cloroacetaldehído a 80 °C durante 20 min (Figura 64; Materiales y Métodos 3.6.2)

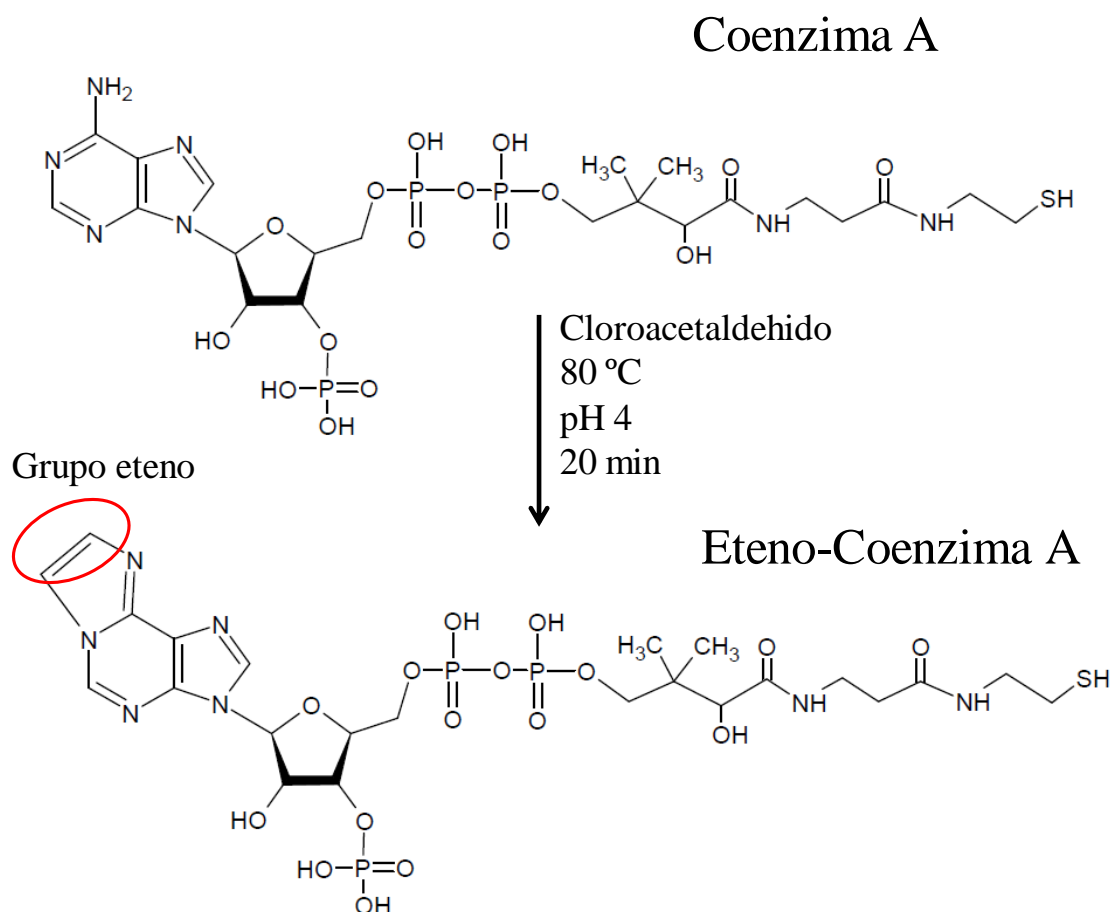
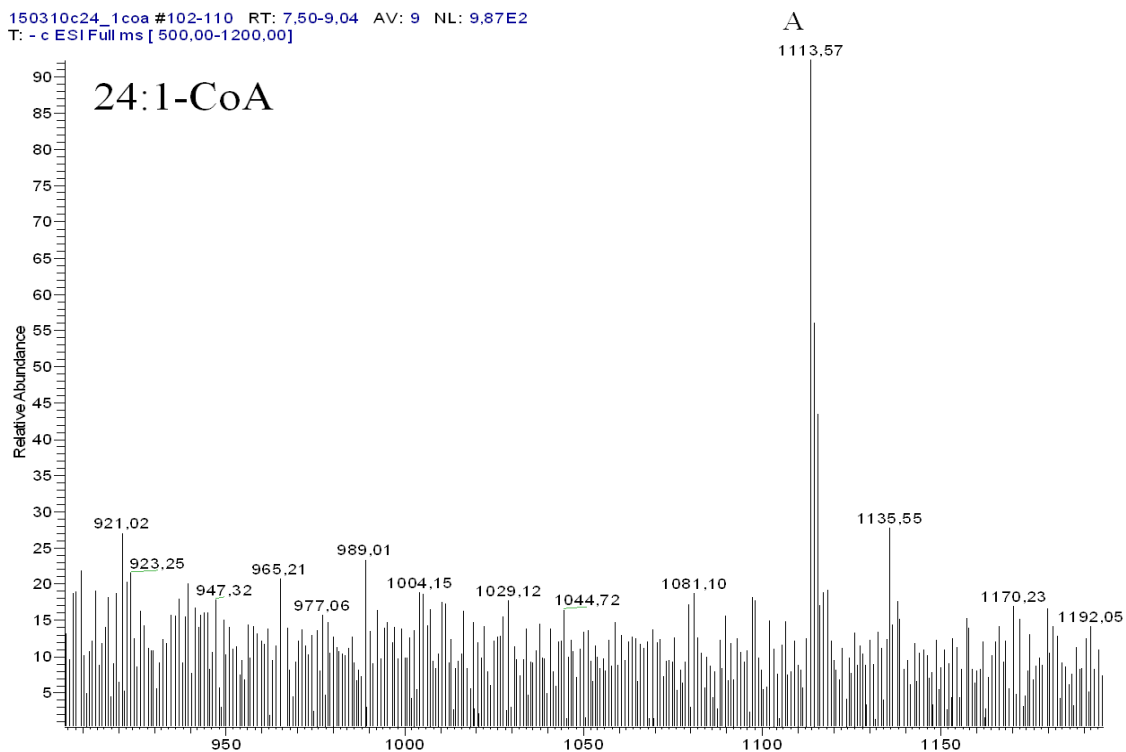


Figura 64. Reacción de formación de un acil-eteno-CoA. En rojo se rodea el nuevo grupo eteno sintetizado aportando un nuevo heterociclo a la molécula.

La mayor parte de los acil-CoA usados como patrones fueron adquiridos comercialmente y derivatizados como se indica en el apartado anterior. Sin embargo, los acil-CoA de cadena muy larga no se encontraban disponibles comercialmente, sin embargo, sí se disponía de los ácidos grasos libres gondoínico (20:1), erúxico (22:1) y nervónico (24:1). A partir de estos ácidos grasos libres se sintetizaron sus acil-CoA aplicando dos reacciones químicas tal y como se describe en los Materiales y Métodos 3.6.3. La naturaleza de estos compuestos fue confirmada mediante MS (Figura 65). Podemos observar como el pico correspondiente al ión molecular del 24:1-CoA (pico A, 1.113,57) aumenta en 24 unidades tras la reacción de derivatización. Este aumento en unidades corresponde a la adición de los dos átomos de carbono en la síntesis del 24:1-CoA-eteno derivado (pico B, 1137,12). Además del pico B característico del 24:1-CoA-eteno derivado, en el espectro se sigue observando el pico A del compuesto 24:1-CoA lo que nos indica que la reacción no se había producido al cien por cien de rendimiento. Los compuestos sintetizados se analizaron en HPLC y se determinaron los tiempos de retención de cada uno de ellos. Por otra parte, se preparó una pequeña cantidad de 26:1 (no comercial) a partir de 24:1 mediante dos reacciones sucesivas de elongación de cadena (Materiales y Métodos 3.6.4).

150310c24\_1coa #102-110 RT: 7,50-9,04 AV: 9 NL: 9,87E2  
T: - c ESI Full ms [ 500,00-1200,00]



150310c24\_1coader #284-291 RT: 57,42-58,78 AV: 8 SB: 25 35,98-40,63 NL: 1,32E3  
T: - c ESI Full ms [ 500,00-1200,00]

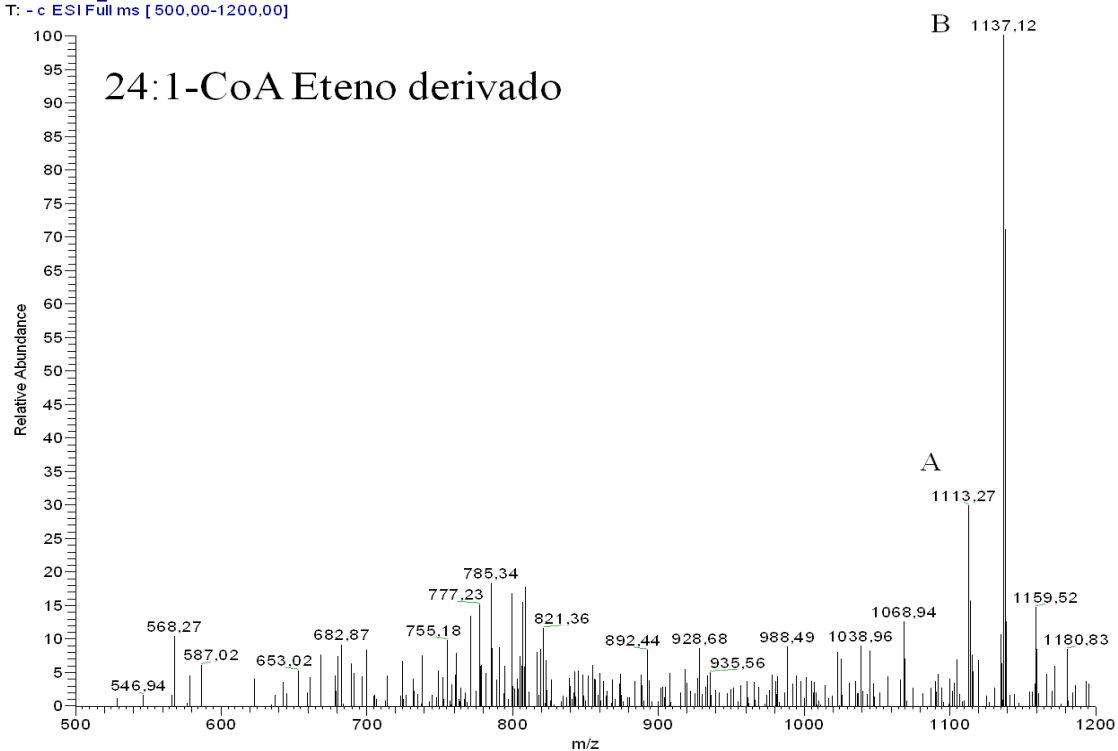


Figura 65. Espectro de masas donde se confirma la síntesis y derivatización del nervonil-CoA (24:1-CoA), así como la derivatización del mismo. A) pico correspondiente al 24:1-CoA. B) pico correspondiente al 24:1-CoA eteno derivado.



#### 4.5.2 Análisis de acil-CoA mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Los acil-CoA fueron extraídos de semillas y cotiledones en desarrollo y transformados en sus correspondientes eteno derivados (Materiales y Métodos 3.6.1 y 3.6.2). Este método permitió la detección de los derivados de acil-CoA de cadena media y larga de manera muy selectiva y con gran sensibilidad. El sistema de HPLC permitió la separación de la mayor parte de los patrones de acil-CoA y la cuantificación en las muestras mediante la adición de un patrón interno (derivado eteno del 17:0-CoA). Sin embargo, no fue posible la separación de ciertos pares de acil-CoA de cadena larga: 20:0/22:1-CoA, 22:0/24:1-CoA y 24:0/26:1-CoA (Figura 66). Para determinar en qué proporción se encontraban los compuestos acil-CoA derivados que se superponían en el análisis de HPLC, los picos se aislaron y el estudio se completó mediante MS de los picos superpuestos.

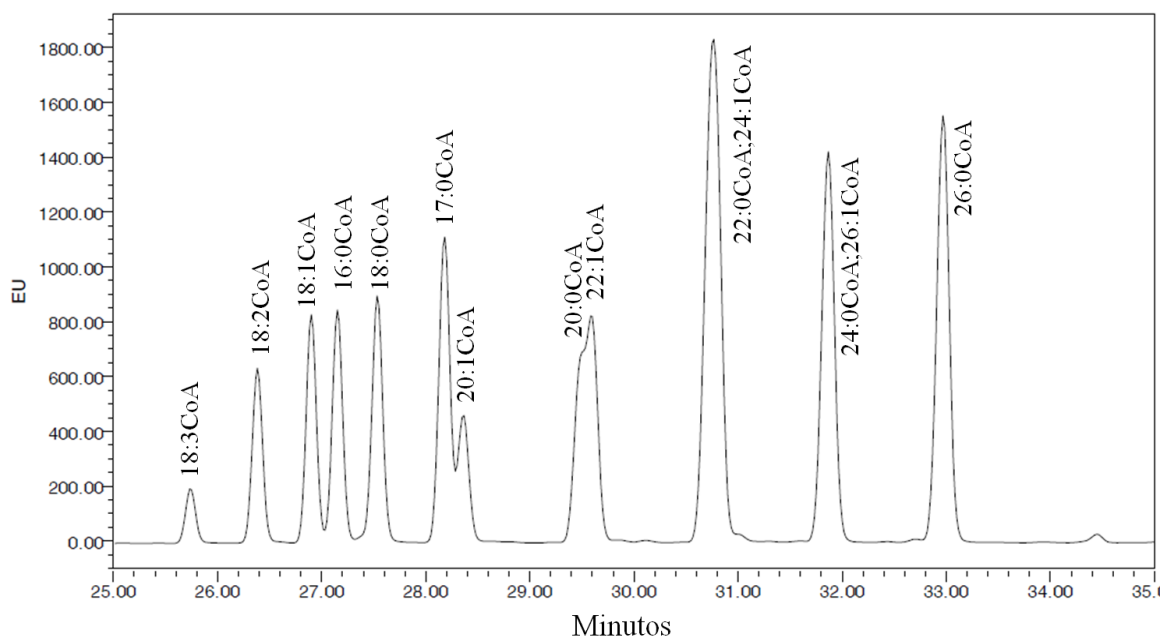


Figura 66. Separación cromatográfica de los patrones de acil-CoA-eteno derivados.

Estos picos fueron recolectados a la salida del detector de fluorescencia del HPLC, e inyectados en el MS (Materiales y Métodos 3.6.7). Los acil-CoA eteno derivados aislados a partir de las muestras de girasol mostraron registros de MS característicos de los derivados saturados, sin encontrarse las señales propias de los insaturados (Figura 67). Por lo tanto, los picos correspondientes a los acil-CoA de

cadena larga 20:0/22:1, 22:0/24:1 y 24:0/26:1 que aparecían superpuestos con el mismo tiempo de retención, correspondían solamente a los derivados saturados de los acil-CoA, concluyendo que en las muestras estudiadas no se encuentran los derivados insaturados correspondientes de los ácidos grasos analizados.

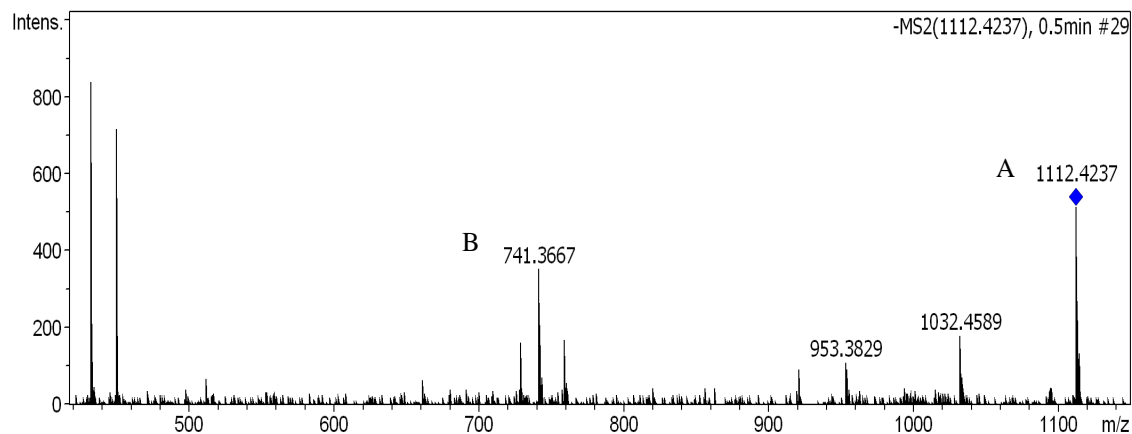


Figura 67. Espectro de masa del ácido graso behénico (22:0-CoA-eteno derivado). A) Ión molecular (M-1), B) Pérdida del adenosin-eteno derivado (M-371).

### 4.5.3 Caracterización del conjunto de acil-CoA en diferentes mutantes de girasol.

#### 4.5.3.1 Caracterización de semillas en desarrollo.

En este trabajo se estudiaron líneas mutantes de girasol con fenotipos con un alto contenido en ácido oleico (CAS-9), esteárico (CAS-3) y palmítico (CAS-5). La línea CAS-6, de composición normal, fue empleada como control (Tabla 3). Estos mutantes han sido descritos en anteriores trabajos (Garcés y Mancha, 1989; Martínez-Force y Garcés, 1999b; Fernández-Moya et al., 2005). La línea alto oleico (CAS-9) contiene una duplicación invertida de la ODS del retículo endoplasmático que actúa como anti-ARNm (Schuppert, et al., 2006). Esta mutación reduce drásticamente el nivel de expresión de dicha enzima durante el desarrollo de la semilla, siendo responsable del fenotipo alto oleico (Martínez-Rivas et al., 2001). El fenotipo alto esteárico de la línea CAS-3 es debido a una reducción en la actividad SAD localizada dentro del plastidio. En el caso de la línea CAS-5, el fenotipo alto palmítico, es debido a una delección en el gen codificante de la enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa II (KAS II), que cataliza el último paso de la elongación intraplasmática de los acil-ACP, correspondiente al paso de 16:0-ACP a 18:0-ACP (Cantisán et al., 1999; Salas et al., 2004).

En la presente tesis se estudiaron la composición de los ácidos grasos y de los conjuntos de acil-CoA de estos mutantes durante los procesos de formación y germinación de las semillas y se determinó el impacto de dichas mutaciones en la acumulación de estos intermediarios de la síntesis y degradación de glicerolípidos en girasol. El proceso de desarrollo de las semillas oleaginosas puede ser dividido en tres fases (Turnham y Northcote, 1983). La primera implica la división y diferenciación celular. En la segunda se produce la síntesis de la mayor parte de los TAG acumulados como reserva para alimentar al embrión, y en una tercera etapa se produce una considerable pérdida de actividad biosintética, acompañada de la deshidratación de la semilla. Este estudio se desarrolló tomando muestras de semillas y analizando los acil-CoA en las tres fases, dentro de un intervalo de tiempo que abarcó desde los 15 hasta 50 DDF. En la Figura 68, se muestra la composición de ácidos grasos y el contenido en TAG de los aceites producidos a partir de cada línea. Tal y como era de esperar, la línea mutante alto oleico CAS-9, presento valores mayores en el contenido de ácido oleico frente al ácido linoleico, a diferencia del resto de líneas estudiadas que presentaron valores contrarios, mostrando valores más altos de ácido linoleico frente al ácido oleico.

Si se observa el contenido en TAG, los perfiles de los tres mutantes no se corresponden con el mostrado por la línea control CAS-6. Aunque en todas las líneas se observo una continua acumulación de TAG, únicamente la línea control CAS-6 mostró un incremento notable en la síntesis de TAG durante los 25 y 35 DDF, volviéndose a moderar la acumulación de TAG después de los 35 DDF. Además, en CAS-6 se obtuvieron unos 450 mg TAG/g de tejido (45 %), los valores más altos entre todas las líneas estudiadas. En el caso de CAS-9 y CAS-5, los valores de TAG obtenidos fueron 350 mg TAG/g de tejido, mientras que los valores más bajos fueron de 300 mg TAG/g de tejido en el caso de CAS-3.

Los cambios en el conjunto de acil-CoA pueden aportar información de cómo la planta adapta su metabolismo a los cambios producidos por las distintas mutaciones. A este respecto, en un estudio en semillas de colza que expresan una Fat que induce la acumulación de ácidos grasos de cadena corta (Larson et al., 2002), se detectaron altas concentraciones de 10:0-CoA durante el desarrollo de las semillas, sugiriendo limitaciones metabólicas en la incorporación del 10:0-CoA a los TAG.

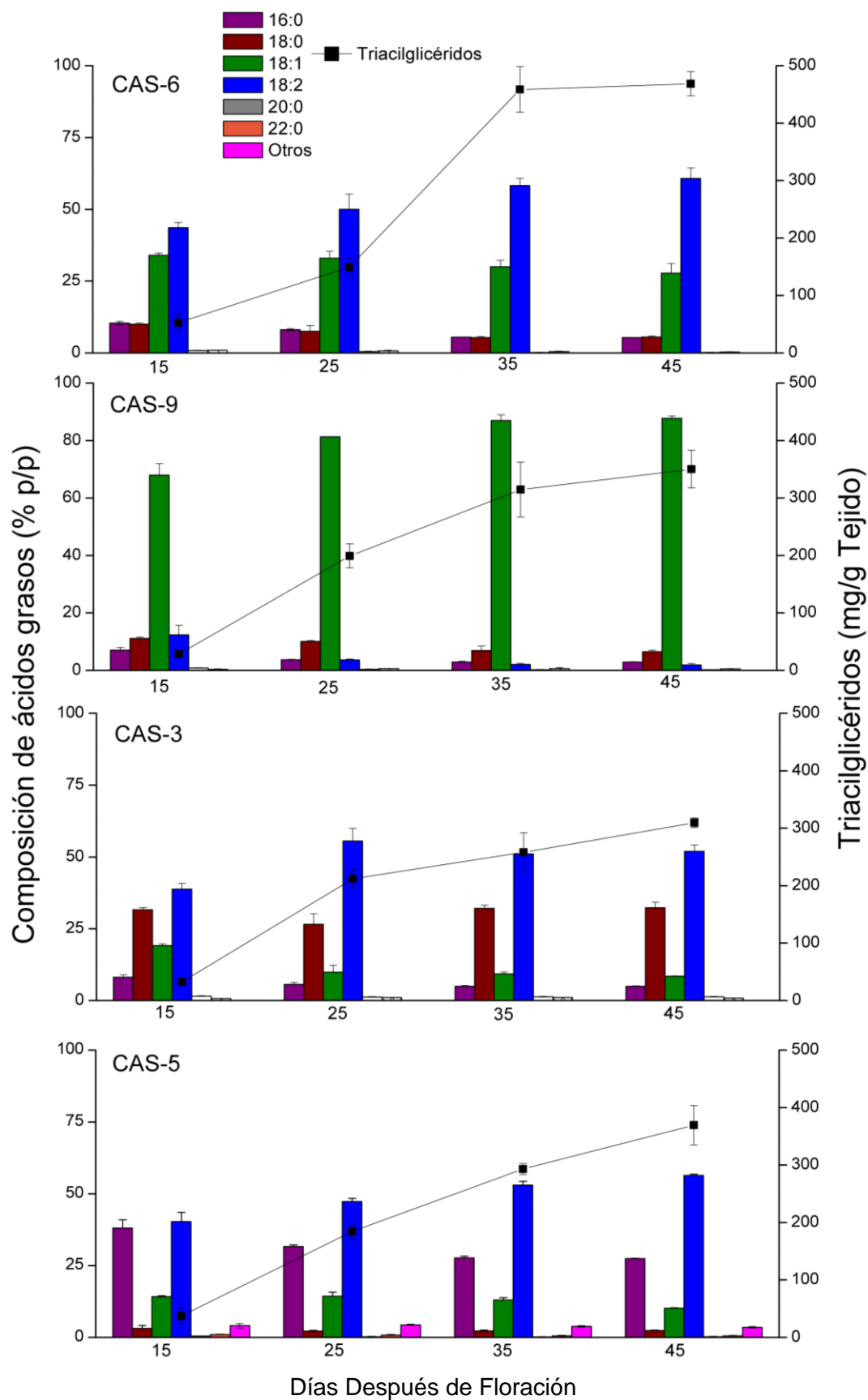


Figura 68. Composición de ácidos grasos y contenido de triacylglicéridos en semillas en desarrollo de las cuatro líneas de girasol estudiadas en este trabajo. CAS-6; girasol común, CAS-9; línea alto oleico, CAS-3; estirpe alto esteárico, CAS-5: estirpe alto palmítico.

La cuantificación del conjunto de acil-CoA en las cuatro líneas de girasol se muestra en la Figura 69. En todos los casos observamos un pico de acumulación de acil-CoA durante la formación de la semilla. Este pico coincide con el momento máximo de la síntesis de TAG en las mismas. La estirpe control (CAS-6) mostró este máximo a los 25-30 DDF, decreciendo posteriormente. Los perfiles de acil-CoA totales que mostraron las líneas alto oleico CAS-9 y alto palmítico CAS-5 fueron similares, indicando que la maquinaria enzimática en las semillas de girasol con perfil lipídico diferente no había sufrido importantes alteraciones. En el caso de la línea mutante alto esteárico CAS-3, se observó un retraso en el máximo de acumulación de acil-CoA totales, apareciendo este a los 35-40 DDF. Además, este mutante no mostró un pico de acumulación de acil-CoA total tan agudo como se observó en las demás líneas, (Figura 69), lo que podría indicar una alteración en la ruta de acumulación de TAG.

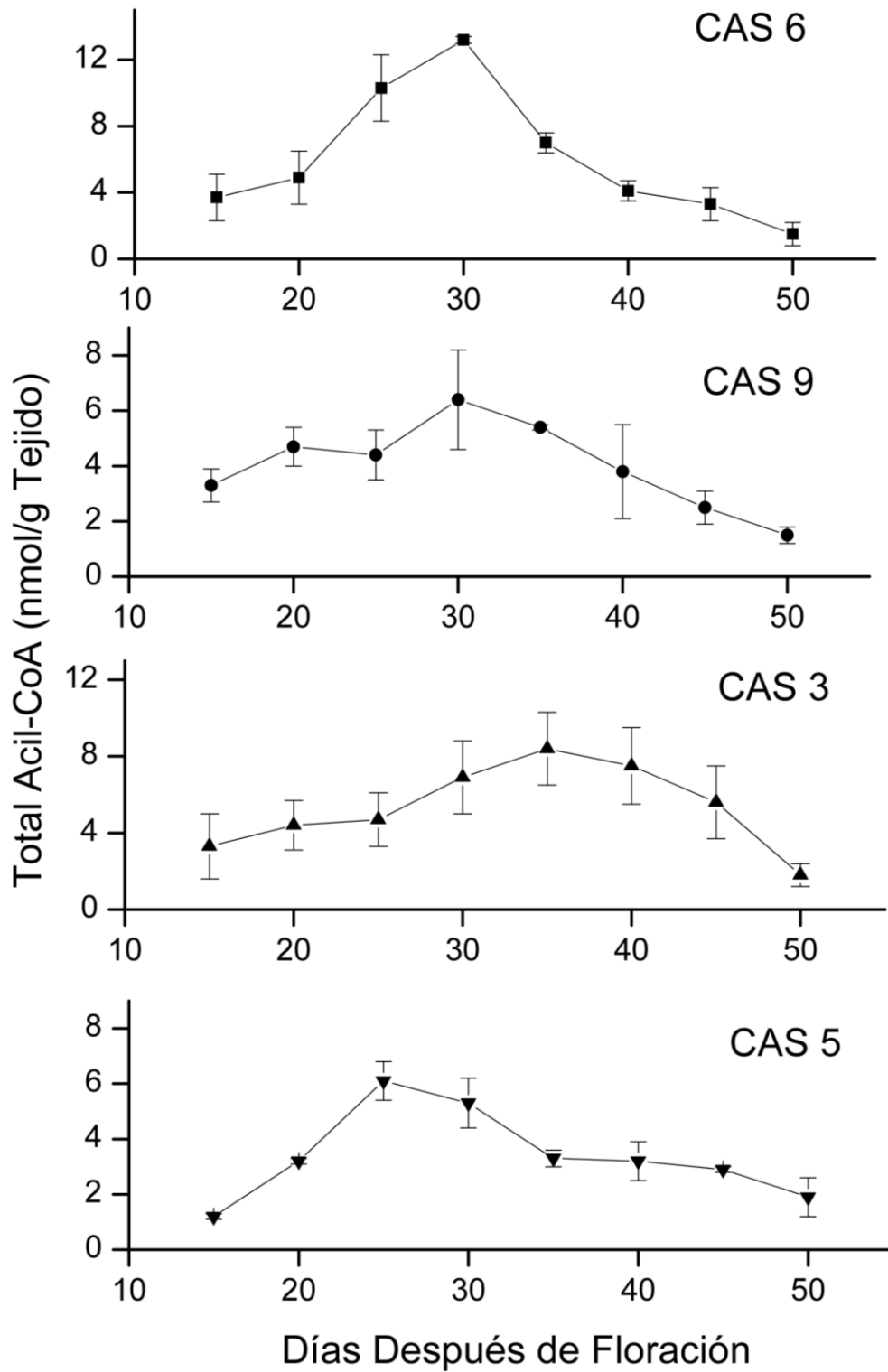


Figura 69. Cantidad total de acil-CoA en las semillas de girasol en desarrollo.

Los acil-CoA derivados que se identificaron en cada línea mutante de girasol tuvieron una fuerte correlación con los fenotipos de cada planta (Figura 70). La línea control CAS-6 acumuló 18:1-CoA y 18:2-CoA como principales componentes de su conjunto de acil-CoA. El 18:1-CoA es directamente exportado del plastidio y puede ser incorporado a los TAG. También puede ser transformado en el retículo endoplasmático a linoleato, en un paso catalizado por la enzima ODS, que actúa preferentemente en la posición *sn*-2 de la PC. A este respecto, está bien establecido que existe un intercambio de grupos acilos muy activo entre los fosfolípidos del retículo endoplasmático y el conjunto de acil-CoA del citosol (Sperling y Heinz, 2003), lo que asegura una eficaz canalización de los ácidos grasos poliinsaturados hacia la síntesis de glicerolípidos a través de los acil-CoA. La línea alto oleico CAS-9 contenía como principal componente en el conjunto de acil-CoA al 18:1-CoA, con un nivel bajo del 18:2-CoA. Como era de esperar, se observó un aumento de 16:0-CoA y 18:0-CoA en las líneas mutantes CAS-5 y CAS-3 respectivamente. En todos los conjuntos de acil-CoA de los mutantes estudiados los acilos provenientes de la síntesis plastidial (ácido palmitico, esteárico y oleico) predominaron sobre el linoleico, independientemente de la composición final de los TAG acumulados en la semilla. De este modo, en CAS-6 que produce aceites ricos en ácido linoleico, el 18:1-CoA fue el metabolito más abundante dentro del conjunto de acil-CoA. La baja presencia del 18:2-CoA podría indicarnos una rápida canalización e incorporación del 18:2 a la fracción de TAG, lo cual reduciría la presencia de 18:2-CoA dentro del conjunto total de acil-CoA.

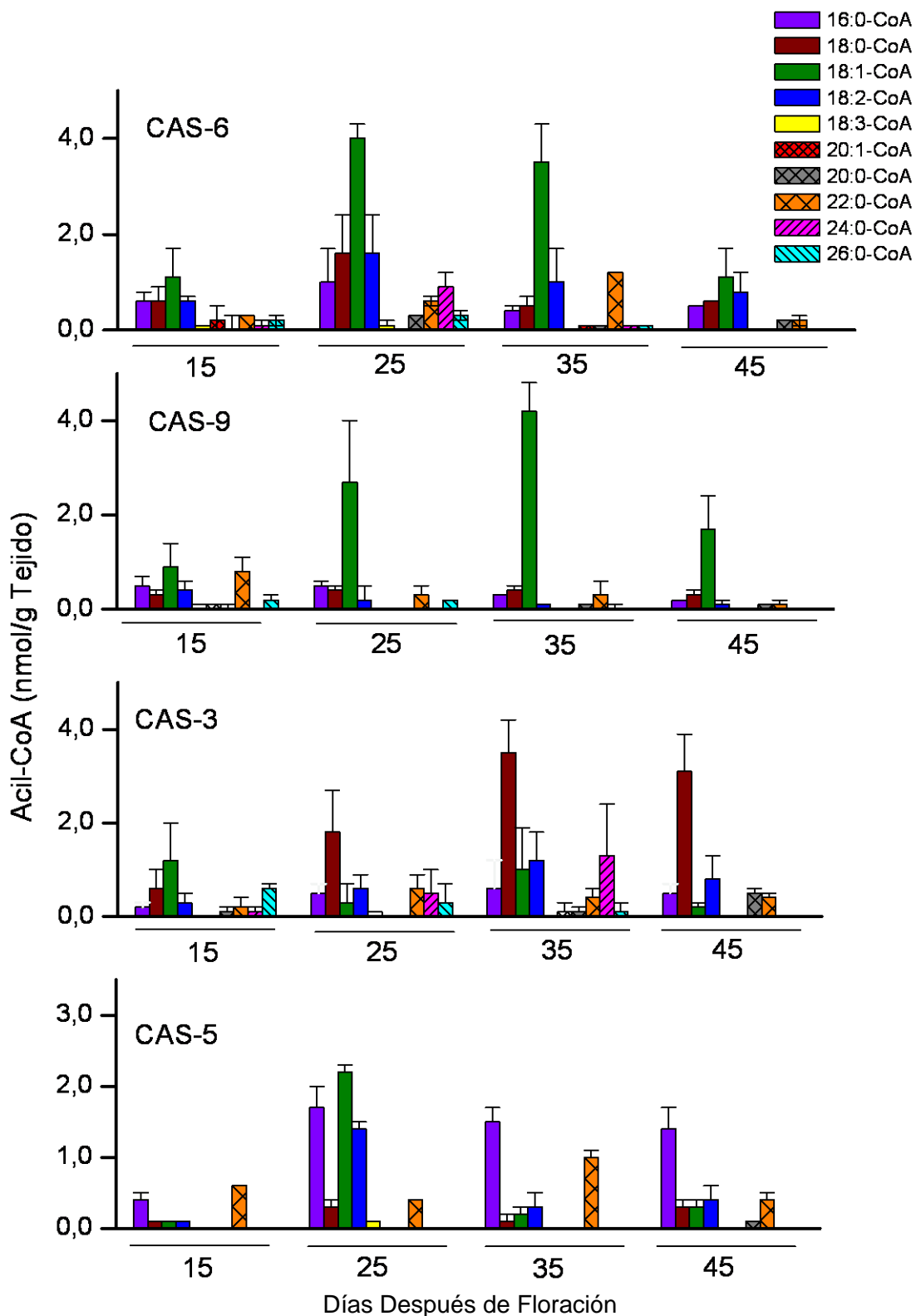


Figura 70. Composición de acil-CoA en las semillas en desarrollo de de la línea control de girasol CAS-6 y las líneas mutantes CAS-9 (alto oleico), CAS-3 (alto esteárico) y CAS-5 (alto palmítico).



En la línea CAS-3 se produce el mismo efecto, existiendo una mayor proporción de 18:0-CoA frente a 18:2-CoA que en el aceite final. Este fenómeno también se observó en la línea CAS-5 pero en menor proporción que en las dos anteriores. El importante aumento de 18:0-CoA en el mutante CAS-3 podría además ser la causa de las diferencias observadas en su perfil de acil-CoA totales con respecto a las demás líneas (Figura 69). Por otra parte, en la síntesis de TAG, los ácidos grasos saturados son transferidos por las enzimas GPAT y DAGAT a las posiciones *sn*-1 o *sn*-3 del esqueleto de glicerol, respectivamente. Estas enzimas mostraron una baja especificidad hacia el 18:0-CoA en semillas de girasol (Ruíz-López et al., 2010; Wiberg et al., 1994), lo cual podría contribuir a la mayor acumulación de 18:0-CoA en la línea CAS-3, así como a la menor cantidad total de TAG acumulados por esta línea. La línea CAS-9 presenta una disminución en la actividad de la ODS, de esta forma se observa una baja proporción de ácido linoleico tanto en los TAG como en el conjunto de acil-CoA.

Los acil-CoA de cadenas muy largas detectados en las muestras, fueron 20:0, 20:1, 22:0, 24:0 y 26:0-CoA (Figura 70), generalmente en proporciones bajas, descartándose mediante los análisis de MS anteriormente descritos (Resultados 4.5.2) la presencia de los compuesto monoinsaturados 22:1, 24:1 y 26:1-CoA. Estos ácidos grasos se producen a partir de los ácidos grasos exportados del plastidio, por acción del complejo ácido graso elongasa que cataliza la elongación de los acil-CoA presentes en el citosol. Estas enzimas han sido bioquímicamente caracterizadas en girasol (Salas et al., 2005), mostrando una alta especificidad por los acil-CoA saturados, especialmente por el 18:0-CoA. Según los resultados presentados en la Figura 71, solo aparecieron trazas de acil-CoA monoinsaturados, principalmente el 20:1-CoA.

Las líneas que presentaron un mayor contenido de estos ácidos grasos fueron CAS-6 y CAS-3. Los altos niveles de SAD encontrados en la línea CAS-9 (Salas et al., 2004) son probablemente responsables de la menor cantidad de esteárico exportado desde el plastidio en esta línea lo que conllevó una menor presencia de acil-CoA derivados de cadena larga. Las líneas que presentaron un mayor contenido de ácidos grasos de cadena larga fueron aquellas con mayor contenido de ácido esteárico (CAS-6 y CAS-3).

La proporción relativa de los ácidos grasos de cadena muy larga en el conjunto de acil-CoA fue mayor que en la composición de TAG final, lo que significa que son selectivamente excluidos de la incorporación en los TAG y así es probable que estén destinados a otras funciones como la formación de esfingolípidos, ceras o lípidos de superficie (Carelli et al., 2002; Salas et al., 2011).

### **4.5.3.2 Caracterización en cotiledones durante la germinación.**

Durante el desarrollo de esta Tesis se llevó a cabo el estudio del conjunto de acil-CoA en los cotiledones de semillas en germinación de las cuatro líneas anteriormente descritas. Durante la germinación de la semilla se produce la hidrólisis y degradación de los TAG que se han ido sintetizando y acumulando en las mismas. Esta degradación se realiza en los peroxisomas a través de la  $\beta$ -oxidación. Los grupos acilos hidrolizados de los TAG por las lipasas deben ser transportados al peroxisoma a través de un transportador ABC y activados a acil-CoA por acción de LACS específicas de dicho orgánulo (Fulda et al., 2004). Las semillas en germinación no mostraron ninguna alteración o disminución en el desarrollo del cotiledón. Así, en trabajos anteriores, se demostró que todas las líneas mutantes de girasol pueden asimilar los TAG acumulados en la formación de las semillas, aunque estos muestren unos perfiles distintos al girasol común en la composición de sus ácidos grasos (Fernández-Moya et al., 2000). En el presente trabajo se caracterizó el conjunto de acil-CoA durante la germinación, tomando muestras del cotiledón en cuatro estadios diferentes que se muestran en la Figura 71. En el primer estadio, la semilla acaba de empezar a germinar y muestra sólo la radícula, en el segundo estadio, se aprecian los dos cotiledones, que se han desprendido ya de la cáscara. En el tercer estadio, los cotiledones ya muestran un color verde y en el cuarto y último estadio aparecen ya hojas verdaderas junto con los cotiledones verdes.



Figura 71. Estadios utilizados en el estudio de la composición de acil-CoA de cotiledones de girasol en germinación.

Al igual que en los estudios de desarrollo, se determinó la composición de ácidos grasos y el contenido de TAG en los cotiledones de forma paralela al análisis de acil-CoA. En todas las líneas estudiadas, el contenido de TAG decrece durante la formación del cotiledón hasta alcanzar valores traza en el estadio 4 (Figura 72). En este estadio, la composición del conjunto de grupos acilos fue la propia de un tejido fotosintético, con altos niveles de ácido linoléico. En el estadio 3, la composición de ácidos grasos en el cotiledón fue similar a la presentada en el aceite inicial. Sin embargo, en la línea CAS-6, durante la germinación y formación del cotiledón se observó una disminución en el contenido de ácido linoleico, lo cual nos indica de nuevo la preferencia de esta línea por la movilización de este ácido graso. Las líneas mutantes estudiadas no presentaron esta reducción del ácido linoleico. Como era de esperar, la línea CAS-9 presentó valores muy bajos de ácido linoléico en los tres primeros estadios, sin embargo se observó un incremento de este grupo acilo en el último. Este incremento podría ser debido a la inducción de  $\omega$ -6 desaturasas durante el proceso de germinación.

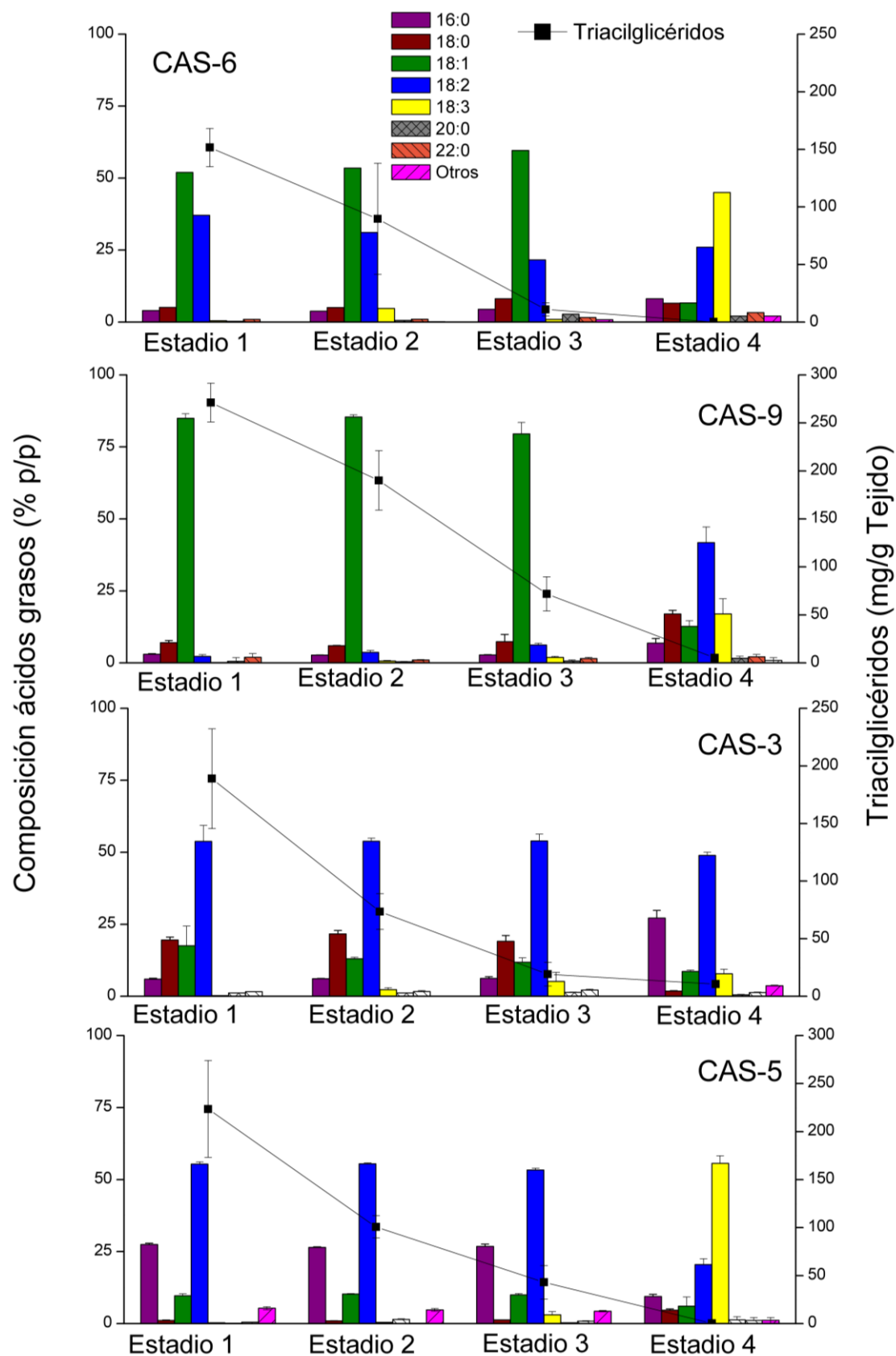


Figura 72. Composición de ácidos grasos y contenido en triacilglicéridos en cotiledones de distintas líneas de girasol en germinación.

Los cotiledones mostraron un pico máximo en el contenido total de acil-CoA en el estadio segundo, o en el primer estadio en el caso de la línea alto palmítico CAS-5 (Figura 73). Después del pico máximo, en los estadios 3 y 4 se observó que la cantidad de acil-CoA decreció rápidamente. Esto no fue observado en el caso del mutante CAS-3, el cual necesitó más tiempo para metabolizar los grupos acilos. Este resultado vuelve a confirmar la dificultad de metabolizar los derivados de 18:0-CoA por parte de la maquinaria enzimática del girasol.

Las especies mayoritarias de los acil-CoA que presentan el conjunto de las muestras de cotiledón, corresponden como era de esperar a las encontradas en los TAG correspondientes a cada línea aunque se observó en todas las líneas una mayor proporción del 18:2-CoA durante todo el proceso de germinación, lo cual indica la fuerte presencia de la enzima ODS en el desarrollo del cotiledón en las cuatro líneas de este estudio. Como indicamos anteriormente, esta actividad estuvo relacionada con la necesidad de la producción del 18:3-CoA, ácido graso relacionado con los procesos fotosintéticos propios de los tejidos verdes de la planta (Figura 73). En las líneas CAS-3 y CAS-5 se observaron además niveles altos de los derivados saturados 18:0-CoA y 16:0-CoA hasta el estadio 3 de germinación, lo que podría indicar una menor velocidad de degradación de estos metabolitos saturados (Figura 73). Por otra parte, solo se encontraron trazas del 18:3-CoA en las muestras de cotiledón, indicando una baja actividad linoleato desaturasa del retículo endoplasmático. Este ácido graso se sintetiza mayoritariamente a través de desaturasas cloroplásticas que actúan sobre galactolípidos, los cuales no entran en el intercambio del conjunto de los acil.CoA.

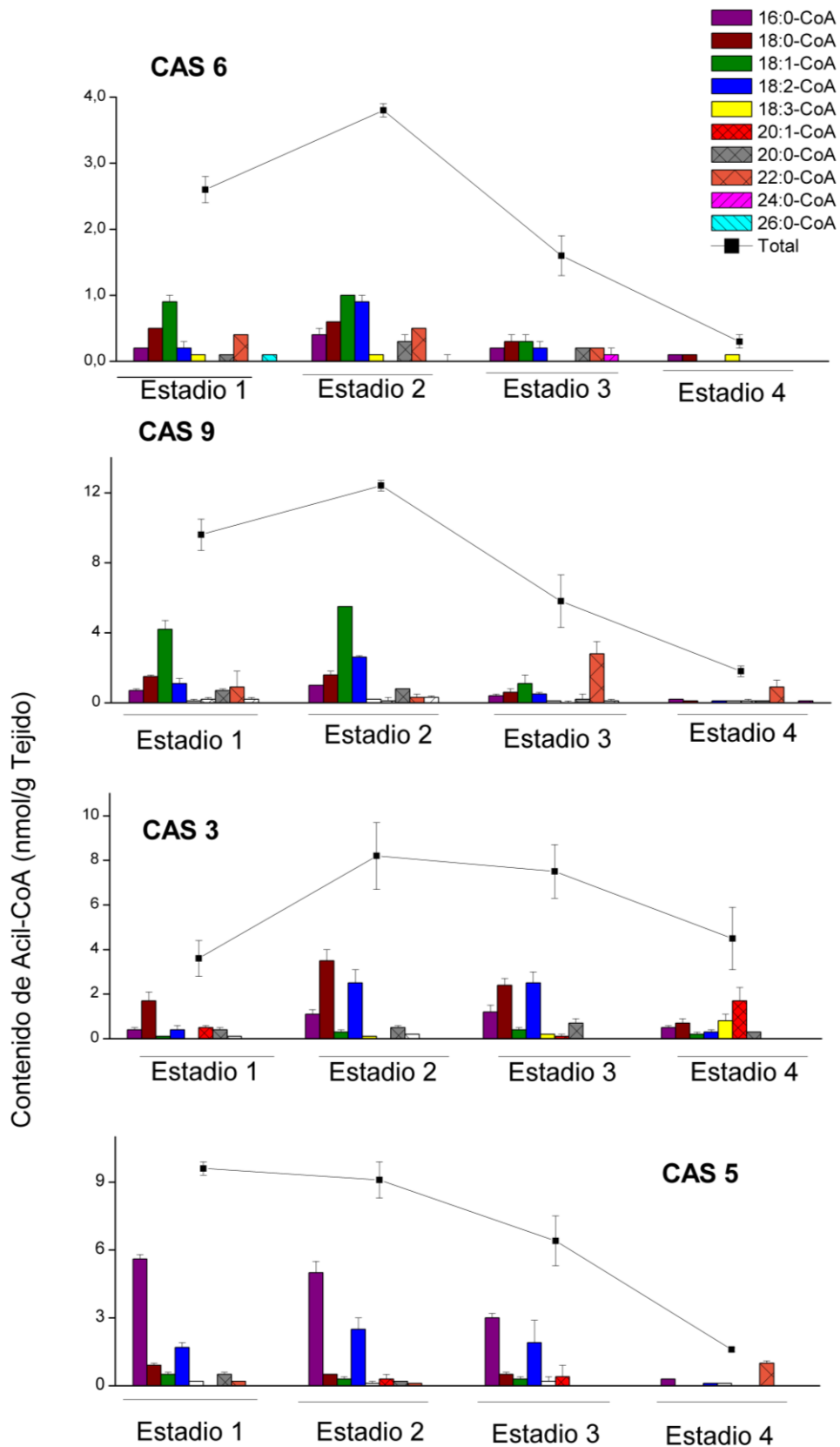


Figura 73. Composición del conjunto de acil-CoA en cotiledones en germinación de cuatro líneas de semillas de girasol.

#### 4.5.3.3 Caracterización en hojas.

Las cuatro líneas mutantes de girasol estudiadas en este trabajo, no presentaron ninguna diferencia morfológica, indicando que las mutaciones aparentemente no habían producido modificaciones en sus tejidos vegetativos (Cantisán et al., 1999). Así, se caracterizó el conjunto de los acil-CoA en hojas de los cuatro mutantes. Los resultados mostrados en la Figura 74, indican que no existen diferencias entre la línea común y las líneas mutantes de girasol alto oleico y alto palmítico, mostrando la misma cantidad y composición en el conjunto de acil-CoA, siendo el contenido en 18:3-CoA la única diferencia, ya que presentaba unos mayores niveles en la línea control. El mayor contenido de 18:3-CoA en hoja que en cotiledón, indica una diferenciación en el metabolismo lipídico entre ambos tejidos. Las mayores diferencias con respecto al control se observaron de nuevo en el mutante CAS-3. Así, en este mutante tuvo lugar un aumento de entre 3,5 y 5,5 veces del contenido total de acil-CoA con respecto a las otras líneas investigadas, apuntando de nuevo a la existencia de una alteración del metabolismo lipídico causada por el fenotipo alto esteárico. Este resultado indica que la baja actividad observada en SAD en las semillas de la línea mutante CAS-3, también afecta al conjunto de acil-CoA en las hojas. La deficiencia en ácidos grasos insaturados probablemente hace aumentar la síntesis de lípidos para tratar de alcanzar los niveles de estos ácidos grasos, necesarios para los procesos vitales de la planta. Sin embargo, estas últimas hipótesis deberían ser confirmadas con experimentos adicionales.

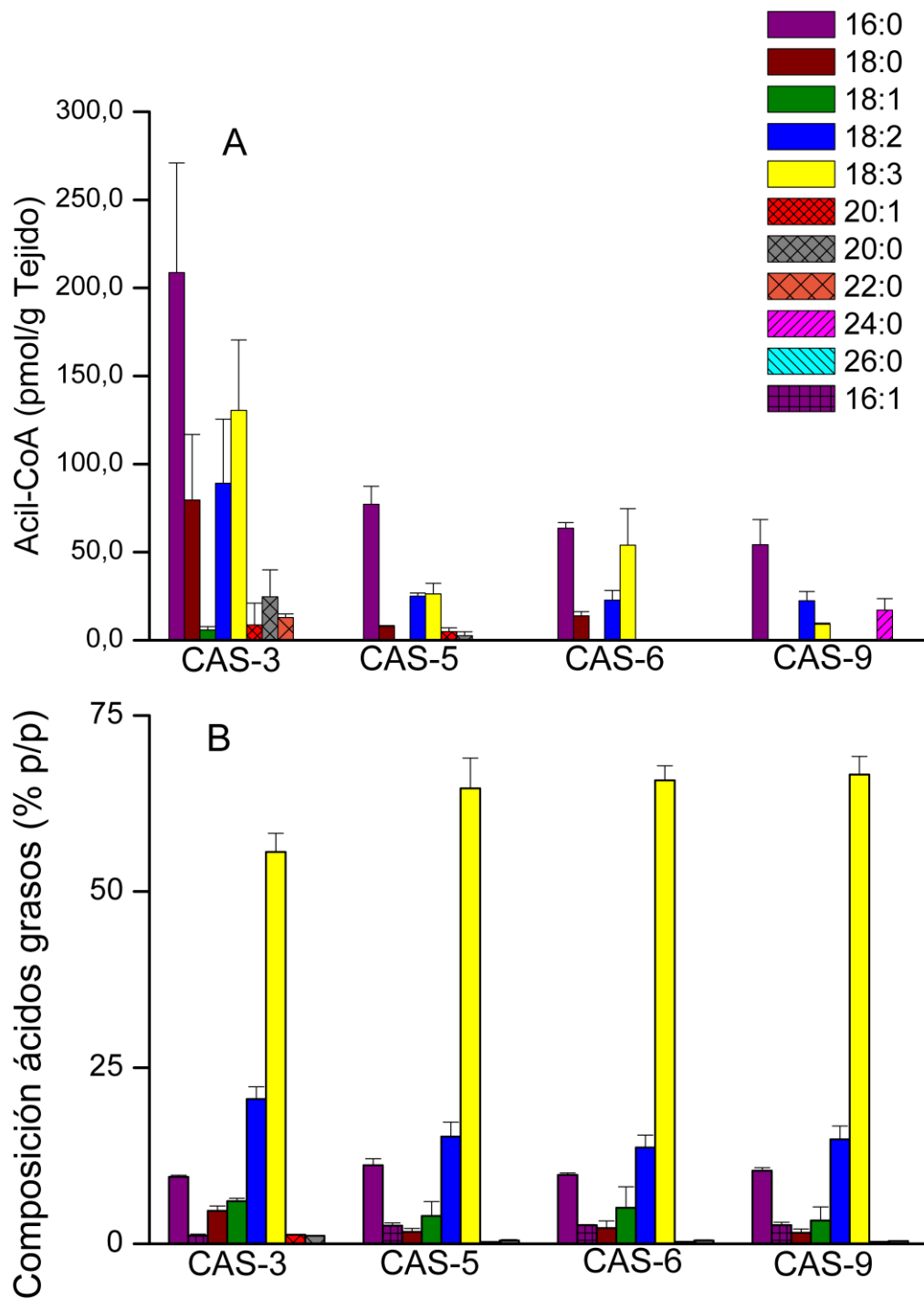


Figura 74. Composición del conjunto de acil-CoA (A) y de los ácidos grasos (B) en las hojas de distintas líneas de girasol.



## **V. CONCLUSIONES**



**PRIMERA:** Se clonaron y caracterizaron tres formas de ACP de girasol. Se llevaron a cabo estudios de sus niveles de expresión concluyéndose que estas enzimas se expresaban de manera similar en los distintos tejidos analizados (semillas en desarrollo, cotiledón, hoja, raíz y tallo). Estas enzimas pudieron activarse a su forma holo empleándose la holo-ACP sintasa de *E. coli*.

**SEGUNDA:** Se estudió el efecto del ACP en las actividades de las tioesterasas FatA y FatB de girasol. El perfil de especificidad de *HaFatA* con las 3 ACP de girasol fue similar, y similar a su vez al mostrado por esta enzima hacia los acil-ACP sintetizados con *EcACP*. La enzima *HaFatA* mostró altos valores de  $V_{\max}$  y afinidad por todos los 18:1-*HaACP* derivados.

**TERCERA:** Los perfiles de especificidad de la enzima *HaFatB* hacia los acil-*HaACP* derivados difieren considerablemente del mostrado por la misma enzima hacia los acil-*EcACP*, siendo mucho más activa con los derivados saturados que con los monoinsaturados, lo cual refuerza el papel de esta enzima en la exportación del plastidio de ácidos grasos saturados de manera específica durante el proceso de síntesis *de novo*.

**CUARTA:** Se llevaron a cabo estudios mediante microscopia confocal en células mutadas de tabaco BY-2 de la localización de las enzimas *HaFatA* y *HaFatB*. Mientras que en todos los casos *HaFatA* fue localizada en el interior del plastidio, *HaFatB* mostró una localización diferente en función del control utilizado. Así apareció en el estroma cuando se empleó un marcador de citosol y unida a la membrana del plastidio cuando se empleó el marcador Tic40-RFP, concluyéndose que el método utilizado no fue apropiado para estudiar la localización de esta enzima.

**QUINTA:** Para determinar la localización de *HaFatB* sin la sobreexpresión de otras proteínas, se realizaron ensayos antígeno-anticuerpo sobre las fracciones soluble y membranosa de plastidios de semillas de girasol en desarrollo. La proteína *HaFatB* se localizó en la fracción membranosa de estos orgánulos concluyendo que la enzima *HaFatB* es una enzima que se encuentra unida a membrana.

**SEXTA:** Se han clonado y caracterizado dos enzimas LACS de girasol que intervienen en el metabolismo lipídico. Mediante microscopia confocal en células mutadas de tabaco BY-2, se confirmó que *HaLACS1* es una enzima localizada en la membrana del plastidio y algunas zonas del retículo endoplasmático, mientras que *HaLACS2* se localiza exclusivamente en el retículo endoplasmático.

**SEPTIMA:** La proteína *HaLACS1* mostro una mayor afinidad hacia los acil-CoA monoinsaturados. Estos datos concuerdan con la hipótesis del papel de esta enzima en la síntesis de TAG en semillas, ya que el ácido graso mayoritariamente exportado de los plastidios, en la síntesis *de novo* de estos compuestos, es el ácido oleico.

**OCTAVA:** En el caso de *HaLACS2*, enzima localizada en el retículo endoplasmático, su especificidad hacia los acil-CoA se corresponde más con la activación de los ácidos grasos liberados por acil-hidrolasas y acil-CoA hidrolasas, contribuyendo al proceso de edición de ácidos grasos presentes en los lípidos de membrana.

**NOVENA:** La baja actividad de las enzimas LACS hacia el ácido esteárico podría ser un aspecto limitante durante la metabolización y acumulación de dicho ácido graso en los TAG, como se observa en la línea mutante CAS-3.

**DECIMA:** Mientras que la expresión de *HaLACS1* fue mayoritaria en la formación de la semilla, en el caso de *HaLACS2* se observaron mayores niveles de expresión en cotiledones en germinación.

**UNDECIMA:** Se clonaron tres proteínas ACBP de girasol. Mientras que la estructura de *HaACBP6* correspondía únicamente al dominio ACB, las otras dos secuencias, *HaACBP1* y *HaACBP4*, además del dominio ACB, presentaron en su estructura secuencias del tipo *ankyrin repeat* y *kelch motif* respectivamente. Estos dominios han sido descritos como zonas de interacción proteína-proteína.

**DUODECIMA:** De las tres enzimas clonadas, la que presentó mayor nivel de expresión durante la formación de la semilla de girasol fue la forma *HaACBP1*, mientras que en cotiledones en germinación la proteína expresada a mayor nivel fue *HaACBP6*.

**DECIMOTERCERA:** Ninguna de las proteínas *HaACBP1*, *HaACBP4* y *HaACBP6* interaccionaron con los lisofosfolípidos ensayados en el presente trabajo (lisofosfatidícolina y ácido lisofosfatídico).

**DECIMOCUARTA:** Las tres isoformas presentaron afinidad para unirse a especies insaturadas de PC, (18:1-PC y 18:2-PC). En cuanto a especies saturadas, las proteínas *HaACBP1* y *HaACBP4* presentaron afinidad hacia 14:0-PC, mientras que *HaACBP6* se unió más específicamente a 16:0-PC. Únicamente las formas *HaACBP1* y *HaACBP4* presentaron afinidad al 18:1-PA. Esta afinidad fue muy baja en comparación con los obtenidos para PC.

**DECIMOQUINTA:** En los ensayos de microcalorimetría, la isoforma *HaACBP4* no presentó unión a ninguno de los acil-CoA ensayados, pudiendo deberse a la degradación que sufría la enzima durante su expresión en bacterias. Las isoformas *HaACBP1* y *HaACBP6* mostraron afinidad a los diferentes acil-CoA ensayados. En ambos casos la afinidad fue alta hacia los grupos acilos (16:0-CoA, 18:0-CoA y 18:1-CoA) que son sintetizados y exportados desde el plastidio al citosol. *HaACBP6* fue la isoforma que presentó mayor afinidad hacia los acil-CoA insaturados, 18:2-CoA y 18:3-CoA, mientras que la isoforma *HaACBP1* presentó mayor afinidad hacia el 18:1-CoA.

**DECIMOSEXTA:** Se llevaron a cabo estudios de localización de las isoformas *HaACBP4* y *HaACBP6* mediante agrofiltración en hoja de tabaco y microscopía confocal. Los resultados obtenidos se correspondían en buena concordancia con los reportados para *Arabidopsis*, localizándose ambas enzimas en el citosol. En el caso de *HaACBP6*, al ser una proteína de pequeño tamaño, también se observó en el núcleo.

**DECIMOSEPTIMA:** Se analizaron el conjunto de los acil-CoA de diferentes líneas mutadas de girasol comparándolas con la línea control, observándose una relación entre el perfil de los acil-CoA y el perfil lipídico característico de cada línea mutada en las semillas en formación de girasol. En el caso de CAS-3 se encontraron indicios de una restricción al flujo metabólico causada por la acumulación de estearato en el conjunto de acil-CoA.

**DECIMOCTAVA:** En las semillas en germinación se observó la misma relación entre el conjunto de acil-CoA y el perfil lipídico característico de cada línea mutada analizada. No se encontraron variaciones en el conjunto de acil-CoA en tejido de hojas de las líneas mutadas de girasol. Únicamente se apreció un aumento de la cantidad de acil-CoA en la línea alto esteárico (CAS-3), lo cual indica que la mutación responsable de este fenotipo altera el metabolismo lipídico en tejidos vegetativos.

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**





- Adams, J., Kelso, R., Cooley, L., 2000. The Kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Cell Biology*. 10: 17-24.
- Alba, A., Llanos, M., 1990. El cultivo del girasol. Colección agroguías mundi-prensa.
- Al-arif, A., Blecher, M., 1969. Synthesis of fatty acyl-CoA and other thiol esters using N-hydroxysuccinimide esters of fatty acids. *J. Lipid Res.* 10, 344-345.
- Alibert, G., Aslane-Chanabe, C., Burrus, M., 1994. Sunflower tissue and cell cultures and their use in biotechnology. *Plant physiology and biochemistry*. Vol 32: 31-44.
- Alvarez-Ortega, R., Catisán, S., Martínez-Force, E., Garces, R., 1997. Characterization of polar and nonpolar seed lipid classes from highly saturated fatty acid sunflower mutants. *Lipids*, 32:833-837.
- An, G.H., Ha, S.B., 1988. Identification of upstream regulatory elements involved in the developmental expression of the Arabidopsis thaliana CAB 1 Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol 85. 21: 8017-8021.
- Auld, D.L., Heikkinen, M.K., Erickson, D.A., Serryk, J.L., Romero, J.E., 1992. Polyunsaturated fatty acids and increased levels of oleic acid. *Crop science Society of America*. Vol 32, 3:657-662.
- Banás, W., Sanchez Garcia, A., Banás, A., Stymne, S., 2013. Activities of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) and phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT) in microsomal preparations of developing sunflower and safflower seeds. *Planta*, 6:1627-1636.
- Barrett, P.B., Harwood, J.L., 1998. Characterization of fatty acid elongase enzymes from germinating pea seeds. *Phytochemistry* 48 (8): 1295-1304.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. y Bourne, P.E., 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28 (1): 235-242.
- Bonaventure, G., Ohlrogge, J.B., 2002. Differential regulation of mRNA levels of acyl carrier protein isoform in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128: 223-235.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72, 248-254.

- Burrell, M.M., Mooney, P.J., Blundy, M., Carter, D., Wilson, F., Green, J., Blundy, K.S., Rees, T., 1994. Genetic manipulation of 6-phosphofruktokinase in potato tubers. *Planta* 194:95-101
- Bustin, S.A., 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29: 23-39.
- Campbell, E.J. 1983. Sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* 60: 387-395.
- Cantisan, S., Martínez-Force, E., Álvarez-Ortega, R., Garcés, R., 1999. Lipid characterization in vegetative tissues of high saturated fatty acid sunflower mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 78-82
- Carelli, A.A., Frizzera, L.M., Forbito, P.R., Crapiste, G.H., 2002. Wax Composition of Sunflower Seed Oils. *JAOCs.* 79, 763–768.
- Carman, G.M. 1997. Phosphatidate phosphatases and diacylglycerol pyrophosphate phosphatases in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and lipid metabolism* 1348 (1-2): 45-55.
- Chan, D.I., Vogel, H.J., 2010. Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochem. J.*, 430:1-19.
- Chapman, G.W. Jr. 1980. A conversion factor to determine phospholipid content in soybean and sunflower crude oils. *Journal of the American Oil Chemists Society* 59:299-302.
- Chen, Y.M., Ferrar, T.S., Lohmeier-Vogel, E.M., Morrice, N., Mizuno, N., 2006. The PII signal transduction protein of *Arabidopsis thaliana* forms an arginine-regulated complex with plastid N-acetyl glutamate Kinase. *J. Biol. Chem.* 281: 5726-5733.
- Chen, Q.F., Xiao, S., Chye, M.L. 2008. *Arabidopsis* ACBP6 is an acyl-CoA-binding protein associated with phospholipid metabolism. *Plant Signaling and behaviour*, 3: 1019-1020.
- Chen, Q.F., Xiao, S., Chye, M.L. 2008b. Overexpression of the *Arabidopsis* 10-Kilodalton Acyl-Coenzyme A-Binding Protein ACBP6 Enhances Freezing Tolerance. *Plant Physiology*. Vol 148. 1: 304-315.
- Chen, Q.F., Xiao, S., Qi, W., Mishra, G., Ma, J., Wang, M., Chye, M.L. 2010. The *Arabidopsis acbp1 acbp2* double mutant lacking acyl-CoA-binding proteins ACBP1 and ACBP2 is embryo lethal. *New Phytologist*. 186: 843-855.
- Christie, W.W., 1987. High-performance liquid chromatography and Lipids: A Practical Guide (Pergamon Press, Oxford).

- Chye, M.L., Huang, B.Q., 1999. Isolation of a gene encoding Arabidopsis membrane-associated acyl-CoA binding protein and immunolocalization of its gene product. *The plant journal*. Vol 18. 2: 205-214.
- Chye, M.L., Li, H.Y., Yung, M.H., 2000. Single amino acid substitutions at the acyl-CoA-binding domain interrupt <sup>14</sup>[C]palmitoyl-CoA binding of ACBP2, an *Arabidopsis* acyl-CoA-binding protein with ankyrin repeats. *Plant Molecular Biology*. 44: 711-721.
- Cicchillo, R.M., Nesbitt, N.M., Iwig, D., Baker, M., Booker, S.J., 2005. Synthesis and purification of various acyl-ACP derivatives. *The American Chemical Society*. 229: U368-U368.
- Coulter, T.P., 1996. Lipids. En: *Food: the chemistry of its components*. Coulter, T.P. (ed.) The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 54-93.
- Cowan, N.J., Vainberg, I.E., Lewis, S.A., 1998. Prefolding, a Chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell*. 93: 863-873.
- Dahlqvist, A., Stahl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H., Stymne, S., 2000. Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 6487-6492.
- Davis, B.J., 1964. Disc Electrophoresis. 2, Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* 121: 404-427.
- Dhanao, K.P., Richardson, L.G.L., Smith, M.D., Gidda, S.K., Henderson, M.P.A., Andrews, D.W., Mullen, R.T., 2010. Distinct pathways mediate the sorting of tail-anchored proteins to the plastid outer envelope. *PLoS ONE* Vol. 5, Issue 4.
- Díaz, E., Schimmoller, F., Pfeffer, S.R., 1997. A novel Rab9 effector required for endosome to TGN transport. *J. Cell Biol.* 138: 283-290.
- Doermann, P., Voelker, T.A., Ohlrogge, J., 2000. Accumulation of palmitate in *Arabidopsis* mediated by the acyl-acyl carrier protein thioesterase FATB1. *Plant Physiology*. 123: 637-643.
- Dubacq, J.P., Mazliak, P. y Tremolieres, A. 1976. Subcellular localization of oleyl-CoA desaturase activity in pea leaves. *FEBS Letters* 66 (2): 183-186.
- Du, Z-Y., Chen, M-X., Chen, Q-F., Xiao, S., Chye, M.L., 2013. Arabidopsis acyl-CoA-binding protein ACBP1 participates in the regulation of seed germination and seedling development. *The Plant journal*. 74(2): 294-309

- Engeseth, N.J., Pacovsky, R.S., Newman, T., Ohlrogge, J.B., 1996. Characterization of an Acyl-CoA-Binding Protein from *Arabidopsis thaliana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol 331 1:55-62.
- Facciotti M.T., Yuan L., 1998. Molecular dissection of the plant acyl-acyl carrier protein thioesterases. *Fett-Lipid* 100: 167-172.
- Faergeman, N.J., Knudsen, J., 2002. Acyl-CoA binding protein is an essential protein in mammalian cell lines. *Biochem. J.* 368:679–82.
- Fernández-Martínez, J.M., Mancha, M., Osorio, J. y Garcés, R. 1997. Sunflower mutant containing high levels of palmitic acid in high oleic background. *Euphytica* 97: 113-116.
- Fernández-Moya, V., Martínez-Force, E., Garcés, R. 2000. Metabolism of triacylglycerol species during seed germination in fatty acid sunflower (*Helianthus annuus*) mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (3): 770-774.
- Fernández-Moya, V., Martínez-Force, E., Garcés, R., 2005. Oils from Improved High Stearic Acid Sunflower Seeds. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5326-5330.
- Fulda, M., Shockey, J., Werber, M., Wolter, F.P., Heinz, E., 2002. Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Plant J.* 32, 93–103.
- Fulda, M., Schnurr, J., Abbadí, A., Heinz, E., Browse, J., 2004. Peroxisomal Acyl-CoA Synthetase Activity is essential for seedling Development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. Vol 16 2:394-405.
- Garcés, R., García, J.M., Mancha, M., 1989. Lipid characterization in seeds of a high oleic acid sunflower mutant. *Phytochemistry* 28 (10): 2597-2600.
- Garcés, R., Mancha, M. 1993. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Analytical Biochemistry* 211: 139-143.
- Goepfert, S., Poirier, Y., 2007.  $\beta$ -oxidation in fatty acid degradation and beyond. *Current Opinion in Plant Biology*. Vol 10 3:245-251.
- González-Mellado, D., Wettstein-Knowles, P., Garcés R., Martínez-Force, E., 2010. The role of ketoacyl-acyl carrier protein synthase III in the condensation steps of fatty acid biosynthesis in sunflower. *Planta*, 231: 1277-1289.
- Görlich D., Mattaj, I.W., 1996. Nucleocytoplasmic transport. *Science*, 271: 1513-1518.
- Graef, G.L., Miller, L.A., 1985. Fatty acid development in a Soybean mutant with high stearic acid. *JAACS*. Vol 62 n° 4.

- Graham, I.A., 2008. Seed Storage Oil Mobilization. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 115-42.
- Gueguen, V., Macherel, D., Jaquinod, R. 2000. Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* 270: 5016-5025.
- Guex, N., Peitsch, M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18 (15): 2714-2723.
- Guidotti, A., Forchetti, C.M., Corda, M.G., Konkei, D., Bennett, C.D., Costa, E., 1983. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *PNAS*. Vol. 80 11:3531-3535.
- Gunstone, F.D., Harwood, J.L. y Padley, F.B., 1994. *The Lipid Handbook*. Chapman and Hall, London. U.K.
- Hammer, M.F., Murphy, J.B., 1994. Lipase activity and in vivo triacylglycerol utilization during *Pinus edulis* seed germination. *Plant Physiology and Biochemistry* 32 (6): 861-867.
- Harwood, J.L., 1975. Lipid synthesis by germinating soya bean. *Phytochemistry* 14 (9): 1985-1990.
- Harwood, J.L., 1979. The synthesis of acyl lipids in plant tissues. *Prog Lipid Res*, 18: 55-86.
- Harwood J.L. 1988. Fatty-Acid Metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 101-138.
- Harwood, J.L., 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 1031: 7-56.
- Harwood, J.L., 2005. Fatty acid biosynthesis. En: *Plant Lipids*. Murphy, D.J. (ed). Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp: 27-101.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J, Williams, P.M., 1996 Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-94.
- Heins, L., Mehrle, A., Hemmler, R., Wagner, R., Kuchler, M., 2002. The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids. *EMBO Journal*. 21: 2616-2625.
- Helliwell, C.A., Sullivan, J.A., Mould, R.M., Gray, J.C., Peacock, J., Dennis, E.S., 2001. A plastid envelope location of Arabidopsis ent-Kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellins biosynthesis pathway. *The Plant Journal*. 28: 201-208.

- Herman, E.M. 1994. Cell and molecular biology of seed oil bodies. En, Seed development and germination. Kigel, H. and Gailili, G. (eds) New York: Marcel Dekker, pp 195-214.
- Hills, M.J., Murphy, D.J., 1988. Characterization of lipases from the lipid bodies and microsomal membranes of erucic acid free oilseed rape (*Brassica napus*) cotyledons. *Biochemical Journal* 249 (3): 687-693.
- Hills, M.J., Dann, R., Lydiate, D., Sharpe, A., 1994. Molecular cloning of a cDNA from *Brassica napus* L. For a homologue of acyl-CoA-binding protein. *Plant Molecular Biology*. 25: 917-920.
- Holak, T.A., Frederick, A.F., Prestegard, J.H., 1987. Purification and NMR characterization of acyl carrier protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 262: 3685-3689.
- Ichihara, K. 1991. The action of phosphatidate phosphatase on the fatty-acid composition of safflower triacylglycerol and spinach glycerolipids. *Planta*, 183: 353-358.
- Jackowski, S., Rock, C.O. 1983. Ratio of active to inactive forms of acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *JBC* 258: 15186-15191.
- Jain, R., Katavic, V., Agrawal, G.K., Guzov, V.M., Thelen, J.J., 2008. Purification and proteomic characterization of plastids from *Brassica napus* developing embryos. *Proteomics* 8, 3397-3405.
- Jaworski, J.G., Clough, R.C., Barnum S.R., 1989. A cerulenin insensitive short chain 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase in *Spinacia oleracea* leaves. *Plant Physiol*, 90: 41-44.
- Jensen, B.M., Sorensen, J., Mortensen, G., Sorensen, M.B., 2011. Effect of Antioxidants on Oxidation during the production of Whey Fat Concentrate. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 59 24:13012-13017.
- Jones, A., Davies, H.M., Voelker, T.A., 1995. Palmitoyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and the evolutionary origin of plant acyl-ACP thioesterases. *Plant Cell*, 7: 359-371.
- Jyoti, K.J., Saheli, S., Mrinal, K.M., Asitava, B., Ujjal, K.M., Soumitra, K.S. 2007. Functional expression of an acyl carrier protein (ACP) from *Azospirillum brasilense* alters fatty acid profiles in *Escherichia coli* and *Brassica juncea*s. *Plant Physiology and Biochemistry* (45): 490-500.

- Kennedy, E.P. 1961. Biosynthesis of complex lipid. *Federation Proceedings* 20: 934-940.
- Kesseli, R.V., Michelmore, R.W., 1997. The compositae: systematically fascinating but specifically neglectes. *En genome mapping in Plants*. 179-191.
- Kim, T.A., Lim, J., Ota, S., Raja, S., Rogers, R., Rivnay, B., Avraham, H., Avraham, S., 1998. NRP/B, a novel nuclear matrix protein, associates with p110(RB) and is involved in neuronal differentiation. *J. Cell Biol.* 141: 553-566.
- Kim, Y., Kovrigin, E.L., Eletr, Z. 2006. NMR studies of *E. coli* acyl carrier protein: dynamic and structural differences of the apo and holo-form. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 341: 776-783.
- Knudsen J, Neergaard T.B., Gaigg B., Jensen M.V., Hansen J.K. 2000. Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA metabolism and acyl-CoA-mediated cell signaling. *J Nutr*; 130:294S–8S.
- Kohler, R.H., Horn, R., 1991. A mitochondrial 16-KDa protein is associated with cytoplasmic male-sterility in sunflower. *Plant Molecular Biology*. Vol. 7, 1:29-36.
- Koncz, C., Schell, J., 1986. The promoter of T1-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet.* 204: 383-396.
- Kornberg, A., Pricer, W.E., 1953. Enzymatic synthesis of the coenzyme A derivatives of Long Chain Fatty Acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 204: 329-343.
- Laemmli, U.K., 1979. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227.
- Lajara, J.R., Diaz, U. y Quidiello, R.D. 1990. Definite influence of location and climatic conditions on the fatty acid composition of sunflower seed oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* 67 (10): 618-623.
- Landers, R.E., Rathmann, D.M., 1981. Vegetable oils – Effects of processing, storage and use on nutritional values. *Journal of the American Oil Chemists Society* 58 (3): 255-259.
- Lapidot, Y., Groot, N.D., Weiss, M., Peled., Wolmanm Y., 1967. The synthesis of glycyl-L-phenylalanyl-sRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 138: 241-248.
- Larson, T.R., Grahan, I.A., 2001. Technical Advance: A novel technique for the sensitive quantification of acyl CoA esters from plant tissues. *Plant J.* 25: 115-125.

- Larson, T.R., Edgell, T., Byrne, J., Dehesh, K., Graham, I.A., 2002. Acyl CoA profiles of transgenic plants that accumulate medium-chain fatty acids indicate inefficient storage lipid synthesis in developing oilseeds. *Plant J.* 32: 519-527.
- Lehner, R., Kuksis, A. 1993. Triacylglycerol synthesis by an *sn*-1,2(2,3)-diacylglycerol transacylase from rat intestinal microsomes. *Journal of Biological Chemistry* 268 (12): 8781-8786.
- Leibundgut, M., Jenni, S., Frick, C., Ban, N., 2007. Structural basis for substrate delivery by acyl carrier protein in the yeast fatty acid synthase. *Science.* 316: 288-290.
- Leung, K.C., Li, H.Y., Mishra, G., Chye, M.L., 2004. ACBP4 and ACBP5, novel *Arabidopsis* acyl-CoA-binding proteins with kelch motifs that bind oleoyl-CoA. *Plant Molecular Biology.* 55: 297-309.
- Leung, K.C., Li, H.Y., Xiao, S., Tse, M.H., Chye, M.L., 2005. *Arabidopsis* ACBP3 is an extracellularly targeted acyl-CoA-binding protein. *Planta.* 223: 871-881.
- Li, H.Y., Chye, M.L. 2003. Membrane localization of *Arabidopsis* acyl-CoA binding protein ACBP2. *Plant Molecular Biology* 51: 483-492.
- Li, H.Y., Chye, M.L. 2004. *Arabidopsis* Acyl-CoA-binding protein ACBP2 interacts with an ethylene-responsive element-binding protein, AtEBP, via its Ankyrin repeats. *Plant Molecular Biology.* Vol 45. 2:233-243.
- Lin, Y.H., Yu, C. y Huang, A.H.C. 1986. Substrate specificities of lipases from corn and other seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 244 (1): 346-356.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25(4): 402-8.
- Lomakin, I.B., Xiong, Y., Steitz, T.A., 2007. The crystal structure of yeast fatty acid synthase, a cellular machine with eight active sites working together. *Cell.* 129: 319-332.
- López-Lara, I.S., Geiger, O., 2000. Expression and purification of four different rhizobial acyl carrier proteins. *Microbiology.* 146: 839-849.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 192: 265.



- Lu, S., Song, T., Kosma, D.K., Parson, E.P., Rowland, O., Jenks, M.A., 2009. Arabidopsis CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *The Plant Journal* 59:553-564.
- Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C.O., Cronan, J.E. 1993. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 57: 522-542.
- Maiti, M.K., Ghosh, S., 1996. Acyl carrier protein of *Azospirillum brasilense*: Properties of the purified protein and sequencing of the corresponding genes, *acpP*. *MICROBIOLOGY-UK*, vol 142. 2097-2103.
- Mancha, M., Stymne, S., 1997. Remodelling of triacylglycerols in microsomal preparations from developing castor bean (*Ricinus communis* L) endosperm. *Planta* 203 (1): 51-57.
- Mangino, M.J., Zografakis, J., Murphy, M.K., Anderson, C., 1992. Improved and simplified tissue extraction method for quantitating long-chain acyl-coenzyme A thioesters with picomolar detection using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 577: 157-162.
- Martínez-Force, E., Álvarez-Ortega, R., Garcés, R., 1999. Enzymatic characterisation of high-palmitic acid sunflower (*Helianthus annuus* L.) mutants. *Planta* 207: 533-538.
- Martínez-Force, E., Garcés, R. 1999b. New oilseed varieties with modified fatty acid composition in the oil. *Trends in Agronomy* 2: 13-21.
- Martínez-Rivas, J.M., Sperling, P., Lühs, W., Heinz, E., 2001. Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (FAD2) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Molecular Breeding*. 8, 159-168.
- Mayer, K.M., Shanklin, J., 2005. A structure model of the plant acyl-acyl carrier protein thioesterase FatB comprises two helix/4-stranded sheet domains, the N-terminal domain containing residues that affect specificity and the C-terminal domain containing catalytic residues. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 3621-3627.
- McCourt, P., Kunst, L., Browse, J., Somerville, C.R., 1987. The effects of reduced amounts of lipid unsaturation on chloroplast ultrastructure and photosynthesis in a mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. Vol 84. 2:353-360.

- Mekhedov, S., Martínez de Ilárduya, O., Ohlrogge, J.B. 2000. Toward a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis. *Plant Physiol.* 122: 389-402.
- Merrien, A. 1996. Oleaginous seeds in temperature climates and their oils. *Oils & Fats Manual*, vol 1, Karlenskid, A. (ed), Properties Production Applications Lavoisier publishing. 118-125.
- Mhaske, V., Beldjilali, K., Ohlrogge, J., Pollard, M. 2005. Isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* knockout line for phospholipid: diacylglycerol transacylase gene (At5g13640). *Plant Physiology and Biochemistry* 43 (4): 413-417.
- Modig, K., Jürgensen, V.W., Lindorff-Larsen, K., Fieber, W., Bohr, H.G., Poulsen, F.M., 2007. Detection of initiation sites in protein folding of the four helix bundle ACBP by chemical shift analysis. *FEBS letters* 581: 4965-4971.
- Monzani, P.S., Pereira, H.M., Melo, F.A., Meirelles, F.V., Oliva, G., Cascardo, C.M. 2010. A new topology of ACBP from *Moniliophthora perniciosa*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804, 115-123.
- Moreno-Pérez, A.J., Sanchez-García, A., Salas, J.J., Garces, R., Martínez-Force, E., 2011. Acyl-ACP thioesterases from macadamia (*Macadamia tetraphylla*) nuts: cloning, characterization and their impact on oil composition. *Plant Physiology and Biochemistry.* 49: 82-87.
- Murata, N., Wada, H. 1995. Acyl lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochemical Journal* 308: 1-8 P.
- Murphy D.J., Woodrow, I.E. y Mukherjee, K.D. 1985. Substrate specificities of the enzymes of the oleate desaturase system from photosynthetic tissue. *Biochemical Journal* 225 (1): 267-270.
- Murphy, D.J. 1993. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Progress in Lipid Research* 32 (3):247-280.
- Murray, M.G., Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research.* Vol. 8 19:4321-4326.
- Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., Baltimore, D., 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science.* 248: 1517-1523.

- O'Hara P., Slabas A.R., Fawcett T., 2002. Fatty acid and lipid biosynthesis genes are expressed at constant molar ratios but different absolute levels during embryogenesis. *Plant Physiol*, 129: 310-320.
- Ohlrogge, J.B., Browse, J., 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 957-970.
- Ohlrogge, J.B., Jaworski, J.G., 1997. Regulation of fatty acid synthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48: 109-136.
- Osorio, J., Fernández-Martínez, J.M., Mancha, M. y Garcés, R. 1995. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Science* 35: 739-742.
- Overath, P., Pauli, G. and Schairer, H.U., 1969 Fatty acid degradation in *Escherichia coli*. An inducible acyl-CoA synthetase, the mapping of old-mutations, and the isolation of regulatory mutants. *Eur. J. Biochem.* 7, 559-574.
- Pearce, M.L., Slabas, A.R. 1998. Phosphatidate phosphatase from avocado (*Persea americana*) - purification, substrate specificity and possible metabolic implications for the Kennedy pathway and cell signalling in plants. *Plant Journal* 14 (5): 555-564.
- Philips, J., Herskowitz, I., 1998. Identification of Kellp, a kelch domain-containing protein involved in cell fusion and morphology in *saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 143: 375-389.
- Ploskon, E., Arthur, C.J., Evans, S.E., Williams, C., Crosby, J., Simpson, T.J., Crump, M.P., 2008. A mammalian type I fatty acid synthase acyl carrier protein domain does not sequester acyl chain. *Journal Biology Chemistry.* 283: 518-528.
- Ramli, U.S., Salas, J.J., Quant, P.A., Harwood, J.L., 2005. Metabolic control analysis reveals an important role for diacylglycerol acyltransferase in olive but not in oil palm lipid accumulation. *FEBS J.* 272, 5764–5770.
- Röbbelen, G., Spanier, G., Spanier, K., 1989. Genetic manipulation in oil crop improvement. *VORTRAGE FUR PFLANZENZUCHTUNG.* Vol:16 Pag: 411-422.
- Rock, C.O., Garwin, J.L., 1979. Preparative enzymatic synthesis and hydrophobic chromatography of acyl-acylcarrier protein. *The Journal of Biological Chemistry.* 254:7123-7128.
- Rock, C.O., Cronan, J.E. Jr, Armitage, I.M. 1981. Molecular properties of acyl carrier protein derivatives. *JBC* 256: 2669-2674.

- Roujeinikova, A., Baldock, C., Simon, W.J., Gilroy, J., Baker, P.J., Stuitje, A.R., Rice, D.W., Slabas, A.R., Rafferty, J.B., 2002. X-Ray crystallographic studies on butryl-ACP reveal flexibility of the structure around a putative acyl chain binding site. *Structure*. 10: 825-835.
- Rücker, B., Röbbelen, G., 1995. Mutants of *Brassica Napus* with altered seed lipid fatty acid composition. *Physiology, Biochemistry and Molecular of Plant Lipids*. Pag. 316.
- Ruiz-López, N., Garcés, R., Harwood, J.L., Martínez-Force, E., 2010. Characterization and partial purification of acyl-CoA:glycerol 3-phosphate acyltransferase from sunflower (*Helianthus annuus* L.) developing seeds. *Plant Physiol. and Biochem.* 48, 73-80.
- Salas, J.J., Ohlrogge, J.B., 2002. Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 403: 25-63.
- Salas, J.J., Martínez-Force, E., Garcés, R., 2004. Biochemical characterization of a high-palmitoleic acid *Helianthus annuus* mutant. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 373-381.
- Salas, J.J., Martínez-Force, E., Garcés, R., 2005. Very Long Chain Fatty Acid Synthesis in Sunflower Kernels. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2710–2716.
- Salas, J.J., Markham, J.E., Martínez-Force, E., Garcés, R., 2011. Characterization of Sphingolipids from Sunflower Seeds with Altered Fatty Acid Composition. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12486–12492.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Sánchez-García, A., Moreno-Pérez, A.J., Muro-Pastor, A.M., Salas, J.J., Garcés, R., Martínez-Force, E., 2010. Acyl-ACP thioesterase from castor (*Ricinus communis* L.): An enzymatic system appropriate for high rates of oil synthesis and accumulation. *Phytochemistry*. 71: 860-869.
- Schaffer, A.A., Petreikov, M., 1996. Inhibition of fructokinase and sucrose synthase by cytosolic levels of fructose in young tomato fruit undergoing transient starch synthesis. *Physiologia Plantarum*. Vol 101 4:800-806.

- Schaeffer, M.L., Agnihotri, G., Kallender, H., Brennan, P.J., Lonsdale, J.T., 2001. Expression, purification, and characterization of the mycobacterium tuberculosis acyl carrier protein, AcpM. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1532: 67-78.
- Schnurr, J.A., Shockey, M., de Boer, G-J., Browse, J., 2002. Fatty acid export from the chloroplast. Characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129:1700-1709.
- Schnurr, J., Shockey, J., Browse, J., 2004. The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 629-42.
- Schuppert, G.F., Tang, S., Slabaugh, M.B., Knapp, S.J., 2006. The sunflower high-oleic mutant Ol carries variable tandem repeats of FAD2-1, a seed-specific oleoyl-phosphatidyl choline desaturase. *Molecular Breeding.* 17: 241-256.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M.C., 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31:3381-3385.
- Seiler GJ (1997). Anatomy and morphology of sunflower. En *Sunflower technology and production.* (Schneiter AA). Madison, Wis. USA, American Society of Agronomy: 67-111.
- Serrano-Vega, M.J., Venegas-Calderón, M., Garces, R., Martínez-Force, E., 2003. Cloning and expression of fatty acids biosynthesis key enzymes from sunflower (*Helianthus annuus L.*) in *Escherichia coli*. *Journal of Chromatography B.* 786: 221:228.
- Serrano-Vega, M.J., Garces, R., Martínez-Force, E., 2005. Cloning, characterization and structural model of a FatA-type thioesterase from sunflower sedes (*Helianthus annuus L.*). *Planta* 221: 868:880.
- Shintani, D.K., Ohlrogge, J.B. 1994. The characterization of a mitochondrial acyl carrier protein isoform isolate from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 104: 1221-1229.
- Shockey, J.M., Fulda, M.S., Browse, J.A., 2002. *Arabidopsis* Contains Nine Long-Chain Acyl-Coenzyme A Synthetase Genes That Participate in Fatty Acid and Glycerolipid Metabolism. *Plant Physiol.* 129, 1710-1722.
- Slabas, A.R., Hanley, Z., Schierer, T., Rice, D., Turnbull, A., Rafferty, J., Simon, B. y Brown, A. 2001. Acyltransferases and their role in the biosynthesis of lipids opportunities for new oils. *Journal of Plant Physiology* 158 (4): 505-513.

- Slack, C.R., Campbell, L.C., Browse, J.A., Roughan, P.G., 1983. Some evidence for the reversibility of the cholinephosphotransferase-catalysed reaction in developing linseed cotyledons in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 754: 10-20.
- Soldatov, K. 1976. Proc. 7<sup>th</sup> Int. Sunflower Conf. Krasnodar USSR. In Sunflower Association, Vlaardingen, The Netherlands. 352-357.
- Sperling, P., Heinz, E., 2003. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta*. 1632, 1-15.
- Stobart, A., Stymne, S., Glad, G. 1983. The synthesis of linoleate and phosphatidic acid and its relationship to oil production in the microsomes of developing seeds of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Biochimica et Biophysica Acta* 754 (3): 292-297.
- Stobart K., 1986: The effect of temperature on the activity of 2 oleoyl sn phosphatidylcholine desaturase in modified microsomal membranes from the cotyledons of maturing safflower *carthamus tinctorius* seed. *Physiologie Vegetale*: 45-52.
- Stobart, A.K., Mancha, M., Lenman, M., Dahlqvist, A., Stymne, S., 1997. Triacylglycerols are synthesised and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Planta*, 203: 58-66.
- Stobart, A.K., Stymne, S., Shewry, P.R., Napier, J., 1998. Triacylglycerol biosynthesis. En: *Plant lipid biosynthesis. Fundamentals and agricultural applications*. Harwood JL (ed). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp: 223-245.
- Stymne, S., Appelqvist, L.A., 1978. The biosynthesis of linoleate from oleoyl-CoA via oleoyl-phosphatidylcholine in microsomes of developing safflower seeds. *Eur J Biochem*, 90: 223-229.
- Stymne S., Stobart K. 1986. The effect of temperature on the activity of 2-oleoyl-sn-phosphatidylcholine desaturase in modified microsomal membranes from the cotyledons of maturing safflower seed. *Physiologie Vegetale* 24 (1): 45-51.
- Tartakoff, A.M., Vasalli, P., 1983. Lectin-binding sites as markers of golgi subcompartments: proximal-to-distal maturation of oligosaccharides. *Jornal Cell Biology*. 97: 1243-1248.
- Taskinen, J.P., vanAalten, D.M., Knudsen, J., Wierenga, R.K., 2007. High resolution crystal structures of unliganded and liganded human liver ACBP reveal a new mode of binding for the acyl-CoA ligand. *Proteins*. 66: 229-238.

- Teilum, K., Thormann, T., Caterer, N.R., Poulsen, H.I., Jensen, P.H., Knudsen, J., Kragelund, B.B., Poulsen, F.M., 2005. Different secondary structure elements as scaffold for protein folding transition states of two homologous four-helix bundles. *Proteins*. 59: 80-90.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Towner, P. 1991. Purification of DNA. En TA Brown (Ed), *Essential Molecular Biology, a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, vol 1, pp 47-68.
- Turnham, E., Northcote, D.H., 1983. Changes in the activity of acetyl-CoA carboxylase during rape-seed formation. *Biochem J*. 212, 223-229.
- VanAalten, D.M.F., Milne, K.G., Zou, J.Y., Kleywegt, G.J., Bergfors, T., Ferguson, M.A.J., Knudsen, J., Jones, T.A., 2001. Binding site differences revealed by cristal structures of Plasmodium falciparum and bovine acyl-CoA binding protein. *J. Mol. Biol.* 309: 181-192.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J*. 33, 949-956.
- Vranceanu, A.V., 1977. *El Girasol*. Mundi Prensa Libros S.A., ISBN: 84-7114-065-9.
- Waggoner, D.W., Xu, J., Singh, I., Jasinska, R., Zhang, Q.X., Brindley, D.N. 1999. Structural organization of mammalian lipid phosphate phosphatases: implications for signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids* 1439 (2): 299-316.
- Warner, K., Mounts, T.L. 1990. Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable oils by HPLC with evaporative light-scattering detection. *Journal of the American Oil Chemists Society* 67 (11): 827-831.
- Wiberg, E., Tillberg, E., Stymne, S. 1994. Substrates of diacylglycerol acyltransferase in microsomes from developing oil seeds. *Phytochem.* 36: 573- 577.
- Wilcox, J.R., Cavins, J.F., 1985. Inheritance of low linolenic acid content of the seed oil of a mutant in glycine-max. *Theoretical and Applied Genetics*. Vol 71, 1:74-78.
- Wilson, R.F., Kwanyuen, P., 1986. Triacylglycerol synthesis and metabolism in germinating soybean cotyledons. *Biochimica et Biophysica Acta* 877 (2): 231-237.

- Xiao, S., Li, H-K., Zhang, J-P. 2008. Arabidopsis acyl-CoA binding proteins ACBP4 and ACBP5 are subcellular localized to the cytosol and ACBP4 depletion affects membrane lipid composition. *Plant Mol Biol* 68:571-583.
- Xiao, S., Chye M.L., 2009. An Arabidopsis family of six acyl-CoA-binding proteins has three cytosolic members. *Plant Physiol Biochem*; 47:479–84.
- Xiao, S., Chye, M.L., 2011. New roles for acyl-CoA-binding proteins (ACBP) in plant development, stress responses and lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*. Vol 50. 2: 141-151.
- Yoshida, H. 1984. Molecular species and fatty acid distributions of triacylglycerols from germinating soybean cotyledons. *Lipids* 19 (12): 936-941.
- Yuan, L., Nelson, B.A., Gwyndolyn, C., 1996. The catalytic cysteine and histidine in the plant acyl-acyl carrier protein thioesterases. *J Biol Chem*, 271: 3417-3419.
- Zhao, L., Katavic, V., Li, F., Haughn, G.W. and Kunst, L., 2010. Insertional mutant analysis reveals that long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1), but not LACS8, functionally overlaps with LACS9 in Arabidopsis seed oil biosynthesis. *Plant J*. 64, 1048-1058.
- Zimmerman, D.C., Fick, G.N. 1973. Fatty acid composition of sunflower (*Helianthus annuus* L) oil as influenced by seed position. *Journal of the American Oil Chemists Society* 50 (8): 273-275.
- Zornetzer, G.A., Fox, B.G., Markley, J.L., 2006. Solution structures of spinach acyl carrier protein with decanoate and stearate. *Biochemistry*. 45: 5217-5227.