

# Identificação de novas enzimas relacionadas ao metabolismo de triglicerídeos em mamona (*Ricinus communis*)

Thomaz Stumpf Trenz<sup>1</sup>; Felipe dos Santos Maraschin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. <sup>2</sup>Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## Introdução

Triacilgliceróis (TAGs) são a principal forma de estoque de lipídeos em sementes de plantas. As propriedades químicas dos TAGs dependem da composição de seus ácidos graxos. As Diacilglicerol Aciltransferases (DGATs) são as principais enzimas para a biossíntese de TAGs. Diferentes tipos de genes de DGATs (nomeados como DGAT1, DGAT2, DGAT3 e DACT) têm sido identificados em plantas. DGAT1 e DGAT2 são bem caracterizados, mas pouco se sabe sobre a DGAT3 e a DACT na maioria das espécies de plantas. O entendimento da rota de biossíntese de TAGs e sua regulação em plantas são importantes para ajudar a melhorar o conteúdo de óleos nutricionais e industriais. DACT, ou diacilglicerol-acetiltransferase, foi primeiramente descoberta em *Euonymus alatus* e parece estar relacionada com enzimas do tipo DGAT. Essa enzima catalisa a condensação do acetil-CoA com diacilglicerol para a formação do 1,2-diacil-3-acetil-sn-glicerol, ou simplesmente “ac-TAGs”. Esses óleos diacilglicerol sn-3-acetilados são abundantes em *Euonymus* e apresentam uma redução na viscosidade de 30%. As DGAT3 foram primeiramente relatadas em amendoim e são únicas devido a sua localização citoplasmática, e pela falta de um domínio transmembrana. Nosso objetivo é identificar e caracterizar a DGAT3 e a DACT de mamona (*Ricinus communis*) e também contribuir com um melhor entendimento sobre a rota metabólica que leva à acumulação de óleo desta oleaginosa.

## Resultados e Discussão

Apenas um gene similar à DGAT3, RcDGAT3 (XM\_002519293), foi identificado no genoma de *Ricinus communis*. DACT é representada por 4 ortólogos que foram nomeados RcDAcTA (XM\_002528977), RcDAcTB (XM\_002528976), RcDAcTC (XM\_002532375) e RcDAcTD (XM\_002527903). Não foi detectada expressão dos genes RcDAcTs nas diferentes fases de desenvolvimento das sementes de mamona (resultado não mostrado), indicando que esses genes não devem contribuir para a síntese de TAG no desenvolvimento da semente de mamona; entretanto, foi detectada alta expressão de RcDGAT3 na fase S2 do desenvolvimento da semente (Fig.1A).

### Perfil de expressão de RcDGAT3 em sementes em desenvolvimento de mamona e localização subcelular de RcDGAT3 e RcDAcTA em protoplastos de *Arabidopsis thaliana*

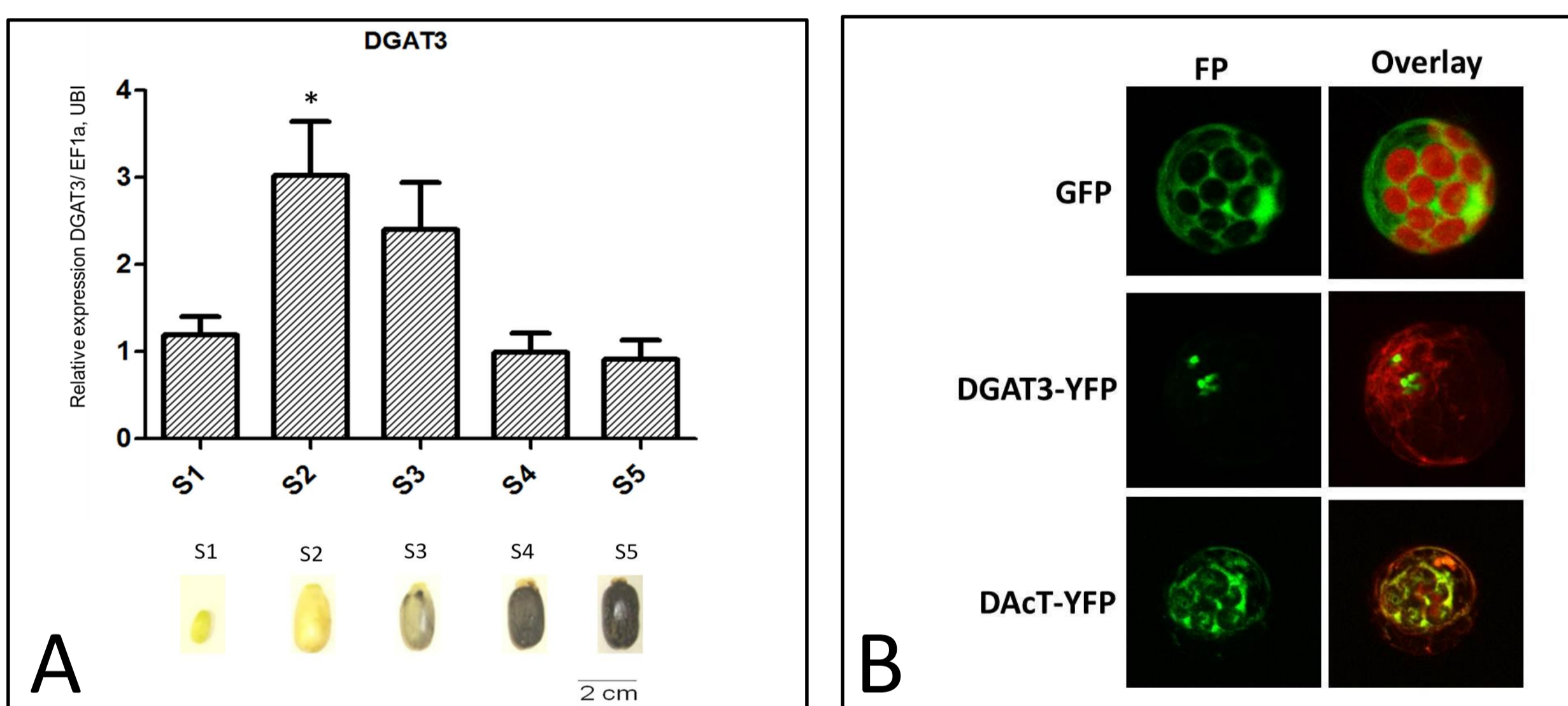


Figura 1: Caracterização dos genes RcDGAT3 e RcDAcT. (A) Perfil de expressão do mRNA da RcDGAT3 em sementes em desenvolvimento de mamona. Expressão relativa média referente ao estágio S1 e aos genes de referência RcUBI e RcEF1a. Barras representam valores de erro padrão e o asterisco indica P<0,05 pelo teste ANOVA. Abaixo estão ilustrados os estágios de desenvolvimento analisados. (B) Protoplastos de mesófilo de *Arabidopsis* expressando transientemente GFP, RcDGAT3-YFP ou RcDAcTA-YFP. O painel da esquerda mostra as imagens da fluorescência da GFP ou YFP (FP), enquanto o da direita mostra a sobreposição da fluorescência vermelha dos cloroplastos na primeira linha (GFP) e da proteína marcadora do Reticulo Endoplasmático RNTL13-RFP (Overlay).

### Superexpressão de RcDGAT3-CFP em plantas de *A. thaliana*

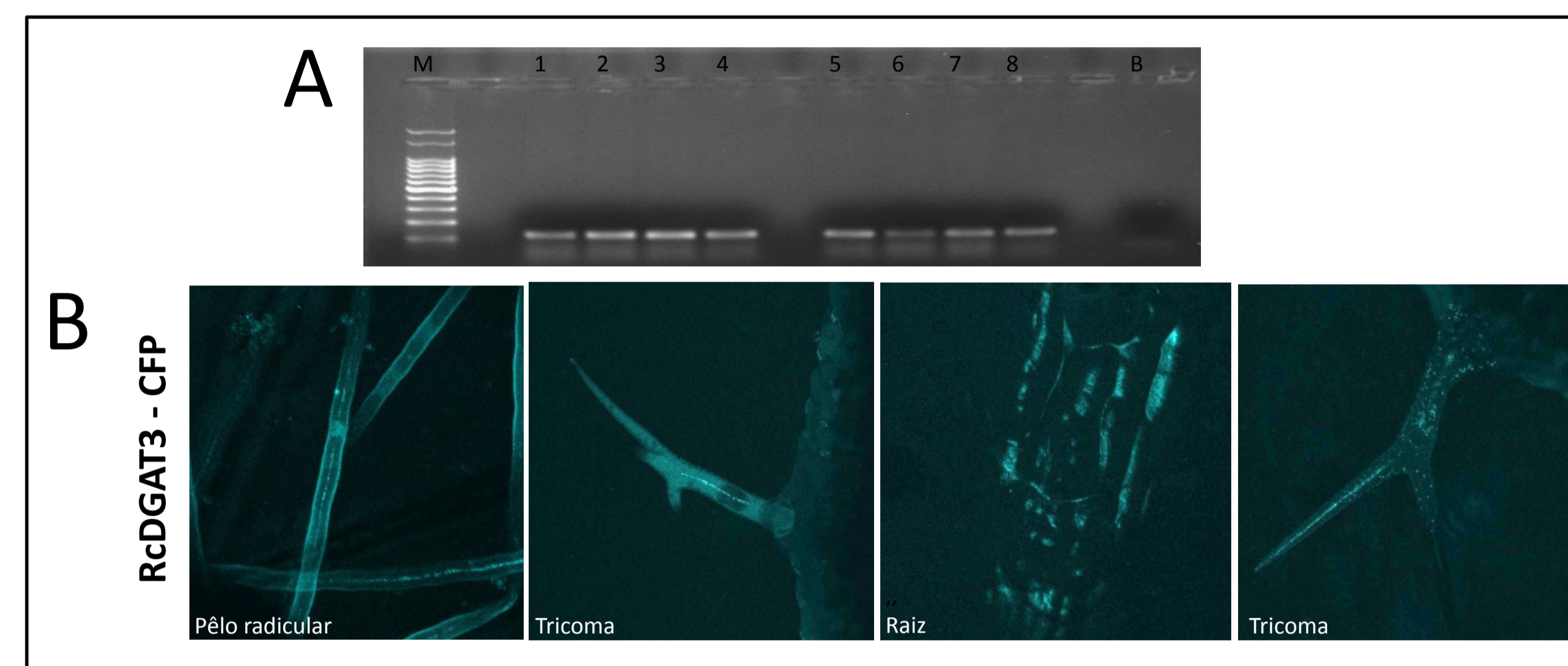


Figura 2: (A) Confirmação por PCR do estado transgênico das plantas de *A. thaliana* transformadas com 35S::RcDGAT3-CFP. M: marcador de tamanho do DNA; 1-8: transformantes; B: Controle negativo da PCR. A banda amplificada corresponde a um fragmento de 130 bp específico do T-DNA. (B) Imagens de microscopia de fluorescência confocal de diferentes tecidos de *A. thaliana* superexpressando RcDGAT3-CFP.

### Expressão de RcDGAT3-CFP em plântulas T3 de *A. thaliana* e seu perfil de ácidos graxos

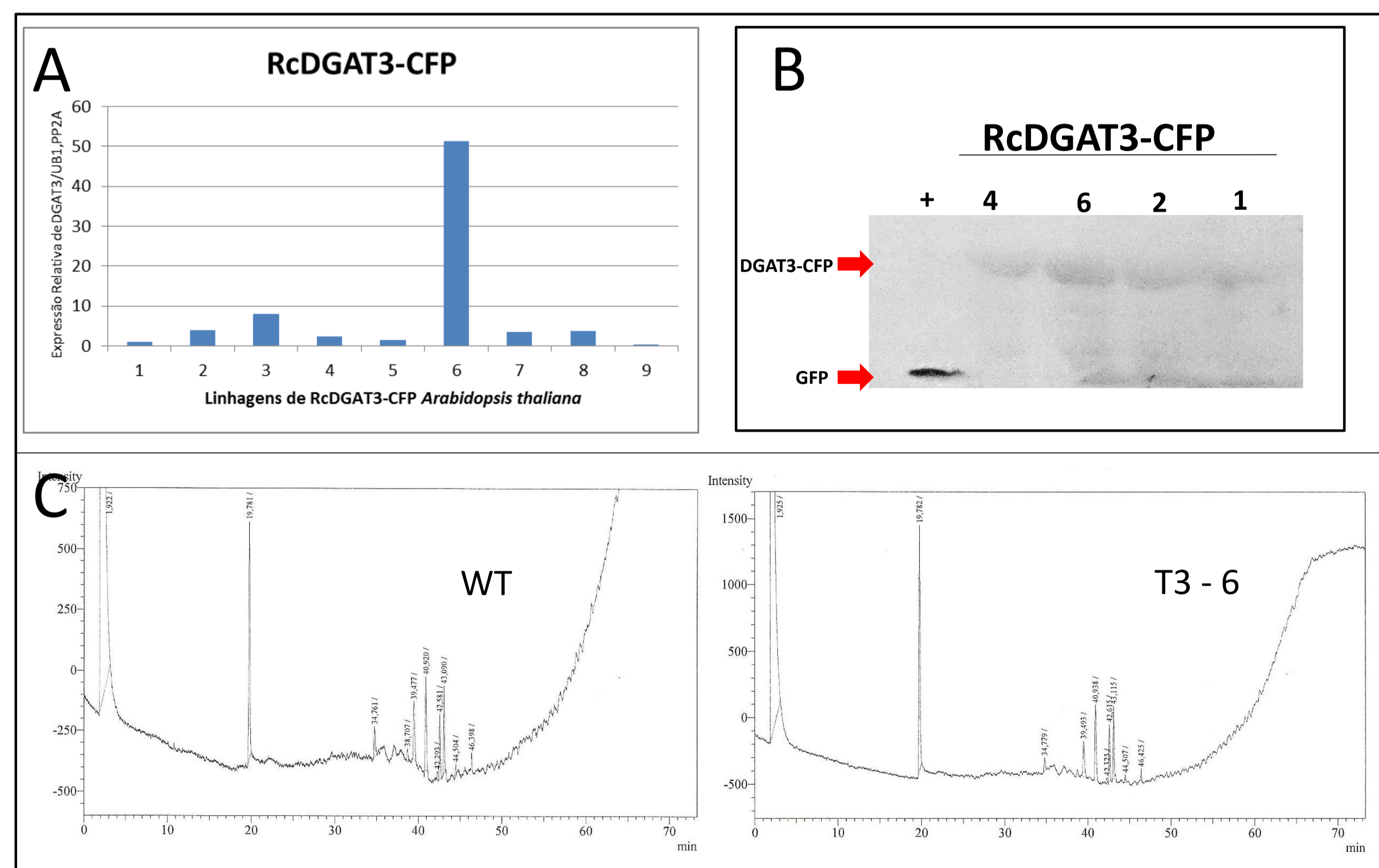


Figura 4: (A) RT-qPCR mostrando a expressão relativa de RcDGAT3-CFP em diferentes linhagens T3 de *Arabidopsis thaliana*. (B) Western blot hibridizado com um anticorpo específico para GFP do extrato proteico das linhagens de *A. thaliana* expressando RcDGAT3-CFP. Números correspondem às linhagens avaliadas na imagem (A) e (+) corresponde à uma planta controle expressando GFP. (C) Perfil de ácidos graxos em sementes de *A. thaliana* do tipo selvagem (WT) e de *A. thaliana* superexpressando RcDGAT3-CFP (T3-6). Ácidos graxos foram derivatizados para formarem ésteres metil de ácidos graxos (FAMES) e, então, separados por cromatografia gasosa (GC-FID).

### RcDGAT3 e RcDAcTA complementam a síntese de TAG em leveduras mutantes

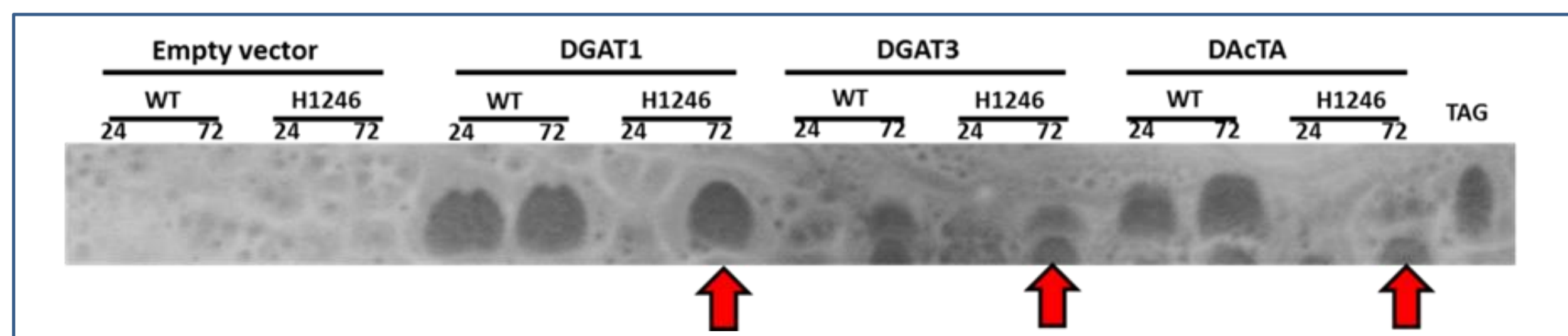


Figura 3: Cromatografia em camada delgada dos extratos lipídicos totais de leveduras selvagens (WT) ou mutantes (H1246) para a síntese de triglicerídeos. Coloração com CoomassieBlue R250. As células foram transformadas com o plasmídeo pVT103U vazio (Empty vector) ou com o plasmídeo contendo os genes RcDGAT1, RcDGAT3 e RcDAcTA (DGAT1, DGAT3 e DACTA respectivamente) e crescidas em meio mínimo sem uracila durante 24h (24) ou 72h (72). A região da migração correspondente aos triglicerídeos é mostrada para todas as amostras e óleo de soja foi utilizado como padrão de migração (TAG). As setas indicam as amostras onde se visualiza a complementação da síntese de TAG no mutante H1246.

Devido à baixa concentração de FAMES, não foi possível detectar diferença no perfil de ácidos graxos entre plantas selvagens de *A. thaliana* e de plantas superexpressando RcDGAT3-CFP (alto ruído na Fig. 4-C). Como alternativa, usaremos uma maior quantidade de sementes para analisar o perfil quantitativo em GC-FID, e para o perfil qualitativo usaremos espectrometria de massas (ESI-qTOF). Com esta metodologia, seremos capazes de detectar o perfil de ácidos graxos presentes nos TAGs das sementes de *Arabidopsis* e das leveduras mutantes que expressam RcDGAT3 e RcDAcT. Paralelamente, também planejamos analisar anatomicamente a distribuição de TAGs em diferentes tecidos de *A. thaliana* superexpressando RcDGAT3.