

Caracterização funcional das enzimas do tipo DGAT3 e DAcT em mamona (*Ricinus communis*)

Thomaz Stumpf Trezn¹; Felipe dos Santos Maraschin²

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. ²Departamento 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 é sabido sobre a DGAT3 e a DAcT na maioria das espécies de plantas. O entendimento da via enzimática da biossíntese de TAG, e sua regulação transcricional em plantas, é importante 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 até o 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*) clonando esses genes e produzindo proteínas recombinantes para ensaios enzimáticos, fusão com YFP para confirmação de sua localização subcelular, complementação da síntese de lipídeos em mutantes de levedura deficientes na atividade de DGATs e caracterização do padrão de expressão destes genes no desenvolvimento da semente de mamona. Este trabalho deve contribuir com um melhor entendimento sobre a rota metabólica que leva à acumulação de óleo em mamona.

Materiais e Métodos

As sequências de cDNA de *Euonymus alatus* e *Arachis hypogaea* foram usadas como entrada nos programas blastx e tblastx para buscar por DAcT (diacilglicerol acetiltransferase) e DGAT3 (Diacilglicerol aciltransferase solúvel) de diferentes espécies de plantas. As sequências identificadas como RcDAcT e RcDGAT3 no genoma de *Ricinus communis* foram usadas para desenhar primers para RT-qPCR, para avaliar seus perfis de expressão em sementes em desenvolvimento. RNA total de sementes em cinco estágios de desenvolvimento foram analisados por RT-qPCR, usando a expressão de RcUBI e RcEF1 α como normalizadores. A fluorescência foi analisada via 2^{- $\Delta\Delta C_t$} , e pelo teste estatístico ANOVA. Para a caracterização funcional dessas proteínas, todas as sequências de cDNAs foram amplificadas com primers gene-específicos e clonados em pENTR-D (Invitrogen). Estes clones de entrada foram fusionados com a sequência codificante de YFP no pART7gatewayYFP via reação LR. Os vetores de expressão carregando 35S::RcDGAT3-YFP e 35S::RcDAcT-YFP foram transfetados em protoplastos de mesófilo de *Arabidopsis thaliana* para acessar a localização subcelular das proteínas codificadas. Células foram transfetadas com PEG e visualizadas depois de 24h no microscópio confocal de fluorescência. Para a confirmação de seu papel *in planta*, o gene RcDGAT3 foi transformado em *Arabidopsis thaliana*, via floral-dip, com o vetor binário pH7CWG2 para sua superexpressão. Nesta construção, a RcDGAT3 foi fusionada a CFP para facilitar sua purificação. Inicialmente, 10 eventos independentes de transformação foram selecionados em higromicina. Para a confirmação da transgenia das plantas, foi realizado PCR utilizando o mesmo conjunto de primers que foram desenhados para RT-qPCR. Leveduras mutantes para síntese de lipídeos foram transformadas com RcDGAT1, RcDGAT3 e RcDAcT, utilizando vetor pVT-103, para o estudo de complementação.

Resultados e discussão

Nós indentificamos apenas um gene codificante para RcDGAT3 (XM_002519293) no genoma de *Ricinus communis*. RcDAcT é representada por 4 cópias diferentes nomeadas como RcDAcTA (XM_002528977), RcDAcTB (XM_002528976), RcDAcTC (XM_002532375) e RcDAcTD (XM_002527903). Quando nós analisamos a expressão dos genes RcDAcTs nas sementes de mamona, não conseguimos detectar expressão nas diferentes fases de desenvolvimento (resultado não mostrado), indicando que esses genes são fracamente expressos durante o desenvolvimento da semente de mamona; entretanto, nós conseguimos detectar alta expressão de RcDGAT3 e sua modulação por todo o desenvolvimento da semente. A expressão é significamente alta no estágio S2 (Fig. 1A) que corresponde ao final da expansão celular e início da maturação da semente. Esse padrão de expressão sugere um relevante papel da RcDGAT3 no metabolismo de reservas da semente, assim como observado em *Arabidopsis*.

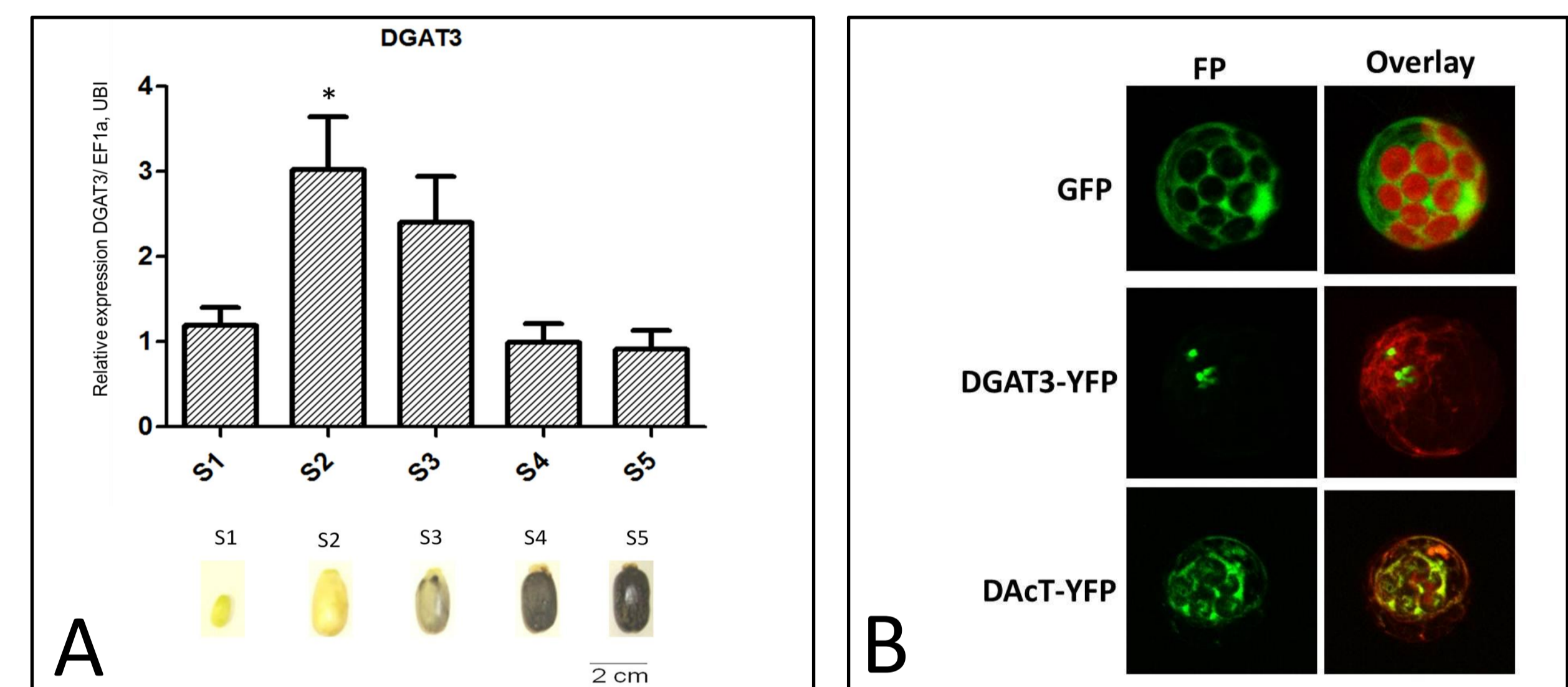


Figura 1: Caracterização dos genes RcDGAT3 e RcDAcT. (A) Perfil de expressão do mRNA da RcDGAT3 em sementes em desenvolvimento de mamona. Expressão relativa média referente ao estágio S1 e aos genes de referência RcUBI e RcEF1 α . Barras representam valores de erro padrão e o asterisco indica $P < 0,05$ 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 RE RNTLB13-RFP (Overlay).

Quando expressa em protoplastos de *Arabidopsis*, a proteína de fusão RcDGAT3-YFP mostrou uma distribuição de fluorescência coerente com sua putativa localização citosólica (Fig. 1B). Quando co-expressa com uma proteína com localização conhecida no RE, a RcDAcTA-YFP mostrou-se estar localizada no RE, assim como as outras RcDGATs.

Para obtermos uma melhor compreensão da localização subcelular da RcDGAT3 e adquirirmos uma quantidade significativa da proteína, superexpressamos RcDGAT3 em plantas de *Arabidopsis*. Atualmente, temos 10 transformantes T1 (Fig. 2) e estamos buscando um genótipo homocigoto para a inserção de T-DNA.

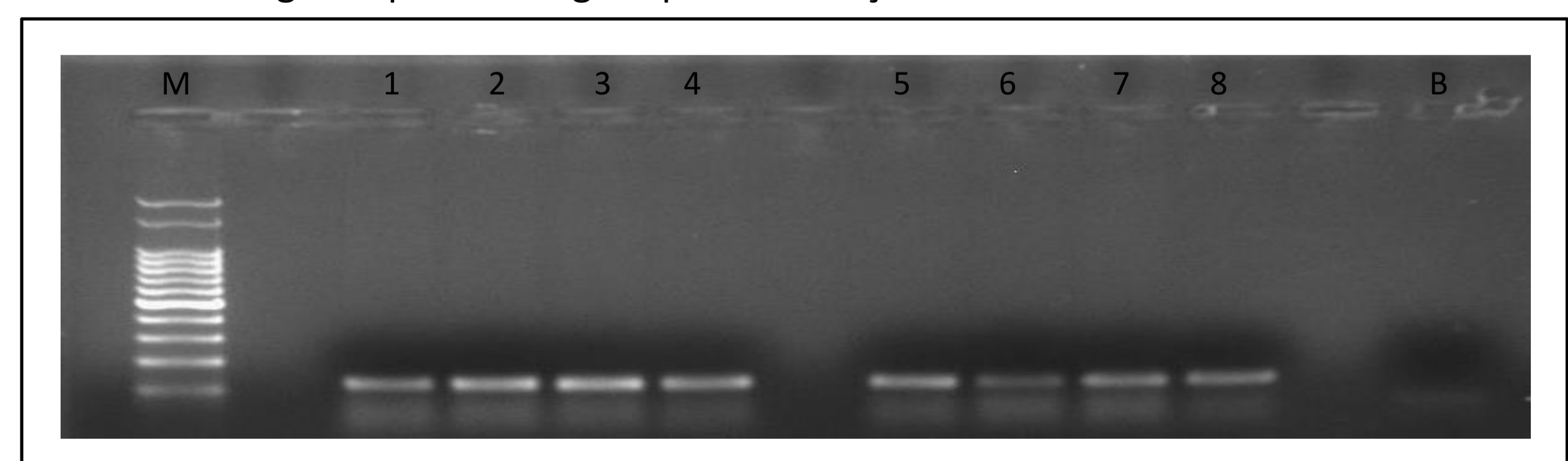


Figura 2: Confirmação das plantas transformadas com RcDGAT3-CFP por PCR. Os primers utilizados para confirmar a transgenia são os mesmos que foram utilizados para o RT-qPCR. M: marcador; 1-8: transformantes; B: Branco. A banda amplificada corresponde a um fragmento de 130 bp específica do T-DNA.

Nossas futuras perspectivas são elucidar a localização subcelular da RcDGAT3 *in planta* nas linhagens de *Arabidopsis* obtidas utilizando microscopia confocal, e testar a complementação da produção de TAGs em leveduras mutantes em ordem de confirmar a funcionalidade de RcDGAT3 e RcDAcT como enzimas responsáveis pela biossíntese de TAGs.