



Universidad
Zaragoza



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Identificación de residuos implicados en la formación del sitio activo de la OMEGA-3 desaturasa reticular FAD3 de *Arabidopsis thaliana*

Autor:

Jorge Peinado Izaguerri

Director:

Miguel Alfonso Lozano

Centro:

Estación Experimental Aula Dei
Consejo Superior de
Investigaciones Científicas

Trabajo Fin
de Máster

Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular y Celular

Máster en Biología Molecular y Celular

Noviembre 2017



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

CERTIFICAN:

Que el Trabajo de Fin de Máster titulado: *“Identificación de residuos implicados en la formación del sitio activo de la OMEGA-3 desaturasa reticular FAD3 de Arabidopsis thaliana.”*, ha sido realizado por D. JORGE PEINADO IZAGUERRI en el Departamento de Nutrición Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) bajo la dirección del Dr. Miguel ALFONSO LOZANO y cumple con los objetivos recogidos en las Directrices para el TFM en Biotecnología, por lo que consideran procedente su presentación.

Zaragoza, a 27 de Noviembre de 2017.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'M. Lozano', with a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo. Dr. Miguel ALFONSO LOZANO

Director

Fdo. Dra. María Luisa PELEATO SÁNCHEZ

Ponente

ÍNDICE

<u>1. RESUMEN</u>	1
<u>ABSTRACT</u>	2
<u>2. INTRODUCCIÓN</u>	3
<u>2.1. Ácidos grasos, principales constituyentes de los lípidos</u>	3
<u>2.2. Clasificación de los lípidos</u>	6
<u>2.3. Lípidos de membrana en plantas</u>	7
<u>2.4. Biosíntesis de lípidos de membrana</u>	8
<u>2.5. Desaturasas de plantas</u>	11
<u>2.6. Estructura y función de las ω3 desaturasas</u>	12
<u>2.7. Las desaturasas de plantas como dianas biotecnológicas</u>	16
<u>2.8. Caracterización de mutantes de FAD3</u>	18
<u>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	21
<u>4. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	23
<u>4.1. Material biológico</u>	23
<u>4.1.1. Manipulación de bacterias</u>	23
4.1.1.1. Cepa de <i>Escherichia (E.) coli</i> utilizada y condiciones de cultivo	23
4.1.1.2. Preparación <i>E. coli</i> quimiocompetentes	23
4.1.1.3. Transformación <i>E. coli</i> quimiocompetentes	24
4.1.1.4. Conservación de cepas bacterianas a largo plazo	24
<u>4.1.2. Manipulación de levaduras</u>	25
4.1.2.1. Cepa de <i>Saccharomyces (S.) cerevisiae</i> utilizada y condiciones de cultivo	25
4.1.2.2. Preparación <i>S. cerevisiae</i> competentes	25
4.1.2.3. Transformación <i>S. cerevisiae</i> competentes	26
<u>4.2. Extracción y análisis de ácidos nucleicos</u>	26
4.2.1. Extracción ADN plasmídico de bacteria	26
4.2.2. Construcción del vector de expresión en levaduras mediante enzimas de restricción	27
4.2.3. Digestión con enzimas de restricción	28
4.2.4. Electroforesis en gel de agarosa	29
4.2.5. Extracción y purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	29
4.2.6. Ligación de fragmentos de ADN al vector pYES2	29
4.2.7. PCR en colonia	30
4.2.8. Determinación de la concentración del ADN	31
4.2.9. Secuenciación de ADN	32
<u>4.3. Inducción de la actividad FAD3 en <i>S. cerevisiae</i></u>	32
<u>4.4. Aislamiento y análisis de ácidos grasos</u>	32
4.4.1. Extracción y metilación en un paso de ácidos grasos totales de levaduras	32

4.4.2. Análisis de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía gas-líquido.....	33
<u>4.5. Procedimientos de análisis y modelado informático.....</u>	34
<u>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</u>	35
<u>5.1. Modelado informático de la desaturasa FAD3.....</u>	35
<u>5.2 Análisis estructura-función de la desaturasa FAD3.....</u>	36
<u>5.3. Clonaje del gen <i>AtFAD3</i> en el vector de expresión en levaduras pYES2.....</u>	41
<u>5.4. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con el vector pYES2 conteniendo el gen <i>AtFAD3</i>.....</u>	46
<u>5.5. Ensayo piloto de la inducción de la actividad FAD3 y análisis de ácidos grasos.....</u>	48
<u>6. CONCLUSIONES.....</u>	51
<u>CONCLUSIONS.....</u>	51
<u>7. BIBLIOGRAFÍA.....</u>	52
<u>8. ANEXOS.....</u>	56

1. RESUMEN

Las desaturasas de ácidos grasos son enzimas que introducen un doble enlace en la cadena alquílica de un ácido graso. Estas proteínas tienen un gran interés biotecnológico por la posibilidad de modificar la resistencia de las plantas al frío o de manipular estas enzimas para producir aceites vegetales enriquecidos en ácidos grasos ω 3, de interés para la industria química o alimentaria, entre otras. Las desaturasas son proteínas transmembrana con carácter hidrofóbico, lo que dificulta su purificación y posterior cristalización, por lo que su estructura tridimensional, así como los aminoácidos que conforman su centro activo es desconocida. En un trabajo previo, se caracterizaron dos mutantes del gen *AtFAD3*, que codifica la ω 3 desaturasa FAD3, con deficiencias en el contenido de ácidos grasos trienoicos y, más concretamente, 18:3. El genotipado de estos mutantes reveló la existencia de dos mutaciones puntuales en el gen *AtFAD3* que serían las responsables de la pérdida de actividad FAD3. Partiendo de esta información previa, en este trabajo se planteó un estudio estructura-función de la ω 3 desaturasa reticular FAD3 de *Arabidopsis thaliana*. Para ello se llevó a cabo un estudio del modelo de plegamiento de la proteína FAD3 de Arabidopsis, utilizando un servidor de modelado, PHYRE2. Este estudio mostró que la C103, es un residuo situado en el sitio activo de la enzima y cuya modificación produce una pérdida total de la actividad de la misma. Por el contrario, el residuo G292 estaría situado en una zona fuera del sitio activo, lo que explicaría que su sustitución no tenga un efecto tan drástico sobre la actividad de la enzima. Se intentó, en una segunda parte del trabajo, determinar los parámetros enzimáticos de la enzima mediante ensayos piloto de expresión de FAD3 en un sistema heterólogo como *Sacharomyces cerevisiae*. A pesar de que se consiguió expresar las distintas formas del gen *AtFAD3* en levaduras, no se consiguieron obtener resultados que indicasen la existencia de actividad ω 3 desaturasa en las levaduras. Los resultados apuntan a un problema derivado de la oxidación del 18:2, sustrato de FAD3, como causa de los problemas observados.

ABSTRACT

Fatty acid desaturases are enzymes that introduce a double bond in the alkyl chain of a fatty acid. These proteins have a great biotechnological interest due to the possibility of modifying the cold resistance of plants or manipulating these enzymes to produce vegetable oils enriched in ω 3 fatty acids, with interest for the chemical or food industry, among others. Desaturases are transmembrane proteins with an hydrophobic nature, which makes their purification and subsequent crystallization difficult, so their three-dimensional structure, as well as the amino acids that make up their active center, is unknown. In a previous work, two mutants of the *AtFAD3* gene were characterized, which encodes the ω 3 desaturase FAD3, with deficiencies in the content of trienoic fatty acids and, more specifically, 18:3. The genotyping of these mutants revealed the existence of two punctual mutations in the *AtFAD3* gene that would be responsible for the loss of FAD3 activity. Based on this previous information, in this work a structure-function study of the ω 3 reticular desaturase FAD3 of *Arabidopsis thaliana* was proposed. With this purpose, a study of the folding model of the FAD3 protein of *Arabidopsis* was carried out, using a modeling server, PHYRE2. This study showed that C103, is a residue located in the active site of the enzyme and whose modification produces a total loss of its activity. On the contrary, residue G292 would be located in an area outside the active site, which would explain why its substitution does not have such a drastic effect on the activity of the enzyme. In a second part of the work, it was attempted to determine the enzymatic parameters of the enzyme through FAD3 expression pilot tests in an heterologous system such as *Sacharomyces cerevisiae*. Although it was possible to express the different forms of the *AtFAD3* gene in yeast, it was not possible to obtain results that indicated the existence of ω 3 desaturase activity in the yeasts. The results point to a problem derived from the oxidation of 18:2, substrate of FAD3, as the cause of the observed problems.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Ácidos grasos, principales constituyentes de los lípidos

Los lípidos son un grupo estructuralmente diverso de moléculas orgánicas cuya característica común es su insolubilidad en solventes acuosos. Están compuestas principalmente por carbono, hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener nitrógeno, fósforo y azufre.

Los lípidos desempeñan diversas funciones biológicas, entre las que podemos destacar una *función estructural* (como los fosfolípidos, principales constituyentes de las membranas biológicas), *función de reserva energética* (como los triacilglicéridos), o *función reguladora* (participando como segundos mensajeros o hormonas en la transducción de señales celulares).

Los principales constituyentes de los lípidos son los ácidos grasos, que son cadenas hidrocarbonadas de tipo alifático compuestas por un número par de átomos de carbono, en cuyo extremo se sitúa un grupo carboxilo (figura 2.1 A). Estos átomos de carbono se encuentran unidos entre sí por medio de enlaces covalentes simples o dobles. Los ácidos grasos sin dobles enlaces se denominan saturados y son lineales (figura 2.1 A). Los ácidos grasos con dobles enlaces se denominan insaturados, pudiendo tener uno (monoinsaturados) o varios (poliinsaturados). Los ácidos grasos con dos dobles enlaces se denominan dienoicos y con tres, trienoicos. Estos dobles enlaces pueden encontrarse en conformación *cis* (mismo plano espacial), dando lugar a ácidos grasos que presentan ángulos en su estructura, o en conformación *trans* (distinto plano espacial), dando lugar a una estructura similar a la de los ácidos grasos saturados (figura 2.1 B). La mayoría de los lípidos vegetales presentan sus dobles enlaces en la conformación *cis* aunque existen excepciones (Somerville *et al.*, 2000).

Los ácidos grasos también pueden ser clasificados según la longitud de su cadena en ácidos grasos de cadena corta (de 4 a 12 átomos de carbono), ácidos grasos de cadena media (de 14 a 18 átomos de carbono) o ácidos grasos de cadena larga (más de 20 átomos de carbono).

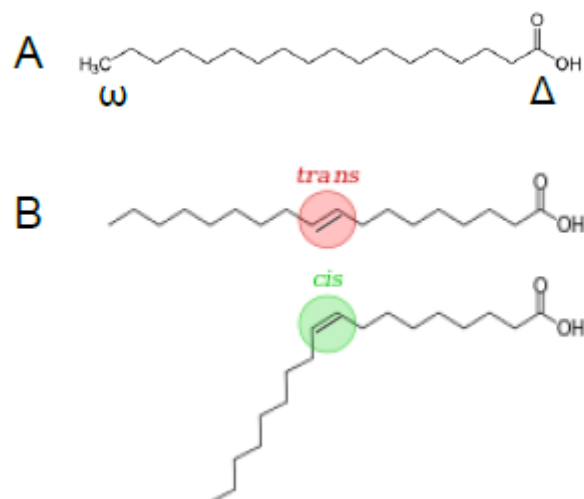


Figura 2.1. Representación esquemática de ácidos grasos. A: Ácido graso saturado (ácido esteárico), en el que se indica la posición de los carbonos Δ y ω . B: Ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico) en sus conformaciones *trans* y *cis*. (Román, 2014)

En cuanto a su nomenclatura, los ácidos grasos se pueden denominar según su nombre común (ej. ácido oleico), según su nombre sistemático de la IUPAC (ej. ácido *cis*-9-octadecenoico) o según la notación abreviada (ej. 18:1 $^{\Delta 9}$). Según esta notación, la primera cifra representa el número de átomos de carbono (18), la segunda el número de dobles enlaces (1) y el superíndice ($\Delta 9$) la posición del doble enlace, contando desde el carbono del grupo carboxilo (carbono $\Delta 1$). Como la mayoría de los ácidos grasos son isómeros *cis*, no se especifica la conformación en su nomenclatura, excepto si son *trans* (ej. 16:1 $^{\Delta 3t}$).

Otra alternativa es indicar la posición de los dobles enlaces desde el grupo metilo terminal o carbono ω o *n* (ej. el 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$ es un ácido graso de la familia $\omega 3$ o *n*-3).

En la tabla 2.1 se muestran los principales ácidos grasos presentes en plantas. Los ácidos grasos que constituyen los lípidos de las membranas están especialmente indicados. La insaturación de estos ácidos grasos es esencial para el correcto funcionamiento de las membranas biológicas, determinando sus propiedades físico-químicas. A temperaturas fisiológicas, los lípidos que están constituidos solamente por ácidos grasos saturados no pueden formar la bicapa lipídica fundamental para la estructura de las membranas (Stubbs y Smith, 1984). Los enlaces insaturados dan lugar

a membranas con la fluidez adecuada y disminuye la temperatura necesaria para alcanzar la fase de líquido-cristalino (Hazel y Williams, 1990).

Nombre común	Estructura	Abreviatura ^a
Ácido láurico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12:0
Ácido palmítico ^b	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	16:0
Ácido esteárico ^b	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	18:0
Ácido araquidónico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	20:0
Ácido behénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	22:0
Ácido lignocérico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	24:0
Ácido oleico ^b	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:1 ^{Δ9}
Ácido petroselénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	18:1 ^{Δ6}
Ácido linoleico ^b	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:2 ^{Δ9,12}
Ácido α-linolénico ^b	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:3 ^{Δ9,12,15}
Ácido γ-linolénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	18:3 ^{Δ6,9,12}
Ácido rugánico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	16:3 ^{Δ7,10,13}
Ácido erúxico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	22:1 ^{Δ13}

Tabla 2.1. Principales ácidos grasos saturados (fondo amarillo) e insaturados (fondo naranja) presentes en las plantas. ^bÁcidos grasos encontrados en la membrana, el resto son lípidos de reserva. Tabla adaptada por Raquel Collados a partir de (Somerville *et al.*, 2000).

La composición de ácidos grasos varía entre unas plantas y otras. Un ejemplo de esto se presenta en la tabla 2.2, que muestra una comparativa de la composición de ácidos grasos en lípidos totales de hojas de *Arabidopsis thaliana* (Bonaventure *et al.*, 2003) y *Glycine max* (soja) (Andreu *et al.*, 2010).

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

Tabla 2.2. Composición de ácidos grasos totales de hojas de *Arabidopsis thaliana* (Bonaventure *et al.*, 2003) y de *Glycine max* (Andreu *et al.*, 2010).

En adelante y para simplificar, los ácidos grasos se nombrarán con la notación abreviada (tabla 2.1), sin la posición de los dobles enlaces. La tabla muestra como los ácidos grasos 16:2 y 16:3 están presentes en *Arabidopsis* pero no en soja, mientras que otros ácidos grasos como el 16:1 y el 18:3 son más abundantes en soja.

2.2. Clasificación de los lípidos

Debido a su carácter diverso, existen varias formas de clasificar los lípidos atendiendo a distintos parámetros como su estructura, función o propiedades químicas. Tradicionalmente, los lípidos se han clasificado según su estructura en saponificables (contienen ácidos grasos) o no saponificables (tabla 2.3). Dentro de los lípidos saponificables, existe una diferenciación entre simples y complejos dependiendo de la presencia (complejos) o ausencia (simples) de elementos ajenos a carbono, hidrógeno y oxígeno.

Lípidos con ácidos grasos (saponificables)	Simples	Acilglicéridos	
		Céridos	
	Complejos	Glucolípidos	Galactolípidos
		Fosfolípidos	Sulfolípidos
Lípidos sin ácidos grasos (insaponificables)	Fosfoglicéridos		
	Esfingolípidos		
Lípidos sin ácidos grasos (insaponificables)	Terpenos o isoprenoides		
	Esteroides		

Tabla 2.3. Clasificación tradicional de los lípidos

Otra clasificación más reciente de los lípidos según su estructura (Somerville *et al.* 2000; Gunstone *et al.*, 2007) considera lípidos complejos los que poseen ácidos grasos en su composición (tabla 2.4). Los lípidos complejos se dividen en función de la naturaleza del alcohol al que se encuentran unidos los ácidos grasos que los componen distinguiéndose dos grandes grupos: los glicerolípidos (compuestos por ácidos grasos esterificados en una molécula de glicerol) y los esfingolípidos (compuestos por una larga cadena de aminoalcohol unida a un ácido graso por un enlace amida).

Lípidos con ácidos grasos o complejos	Glicerolípidos	Acilgliceroles	
		Fosfolípidos	
		Glucolípidos	Galactolípidos
			Sulfolípidos
Lípidos sin ácidos grasos o simples	Esfingolípidos y ceras		
	Terpenos		
	Hidrocarburos		
	Esteroides		
	Prostaglandinas		

Tabla 2.4. Clasificación de los lípidos (Gunstone *et al.*, 2007)

Según sus propiedades químicas, los lípidos se dividen en neutros (acilglicéridos) o polares (galactolípidos y fosfolípidos). Los lípidos polares presentan simultáneamente una zona hidrófoba y una hidrófila, lo que les confiere un comportamiento anfipático.

2.3. Lípidos de membrana en plantas

Las membranas biológicas están constituidas principalmente por glicerolípidos (fosfolípidos, galactolípidos y sulfolípidos) ya que representan hasta un 50% de los lípidos de las hojas (Benning y Ohta, 2005). En las plantas, galactolípidos y sulfolípidos se encuentran principalmente en las membranas cloroplásticas y los fosfolípidos en las membranas extraplastidiales. Estos glicerolípidos están formados por una molécula de glicerol a la que se unen dos ácidos grasos y un grupo polar. Para designar la posición en la que el ácido graso se esterifica en la molécula de glicerol se utiliza la abreviatura *sn* (de sus siglas en inglés *stereospecific nomenclature*). *Sn-3* denota el grupo hidroxilo terminal del glicerol que es fosforilado o al que se une el grupo polar, *sn-2* se refiere al hidroxilo central y *sn-1* al hidroxilo terminal no fosforilado (figura 2.2).

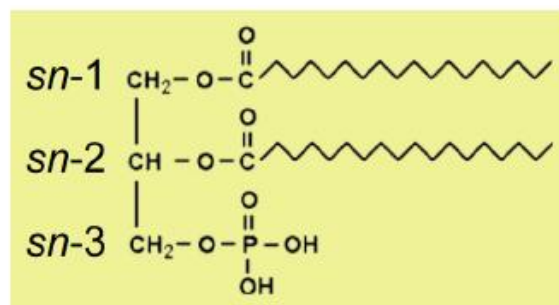


Figura 2.2. Nomenclatura de los glicerolípidos

Los galactolípidos suelen presentar ácidos grasos poliinsaturados esterificados en sus posiciones *sn*-1 y *sn*-2, mientras que en su posición *sn*-3 unen covalentemente una o dos moléculas de galactosa dando lugar al monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y al digalactosildiacilglicerol (DGDG) respectivamente. Se encuentran principalmente en las membranas plastidiales y son vitales para el mantenimiento de la estructura de los fotosistemas I y II (Jones, 2007; Guskov *et al.*, 2009).

El único sulfolípidos encontrado en plantas es el sulfoquinovosildiacilglicerol (SQ), el cual cuenta con un grupo sulfoquinovisil en su posición *sn*-3 y se encuentra principalmente en el cloroplasto.

Los fosfolípidos se caracterizan por tener en su posición *sn*-3 un grupo polar unido a través de un grupo fosfato. Dependiendo de su grupo polar encontramos como principales constituyentes de las membranas vegetales el fosfatidilglicerol (PG) y la fosfatidilcolina (PC), sintetizados a partir del ácido fosfatídico (PA). Estos lípidos son mayoritarios en las membranas extraplastidiales aunque el PG también forma parte de las membranas tilacoidales y la envuelta externa del cloroplasto.

2.4. Biosíntesis de lípidos de membrana

La síntesis de novo de ácidos grasos en plantas comienza en el plastidio donde se sintetizan ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono. En este proceso participan la enzima acetil CoA carboxilasa (ACC) y el complejo enzimático ácido graso sintasa (FAS). Este proceso así como las distintas enzimas que lo llevan a cabo se encuentran detallados en la figura 2.3.

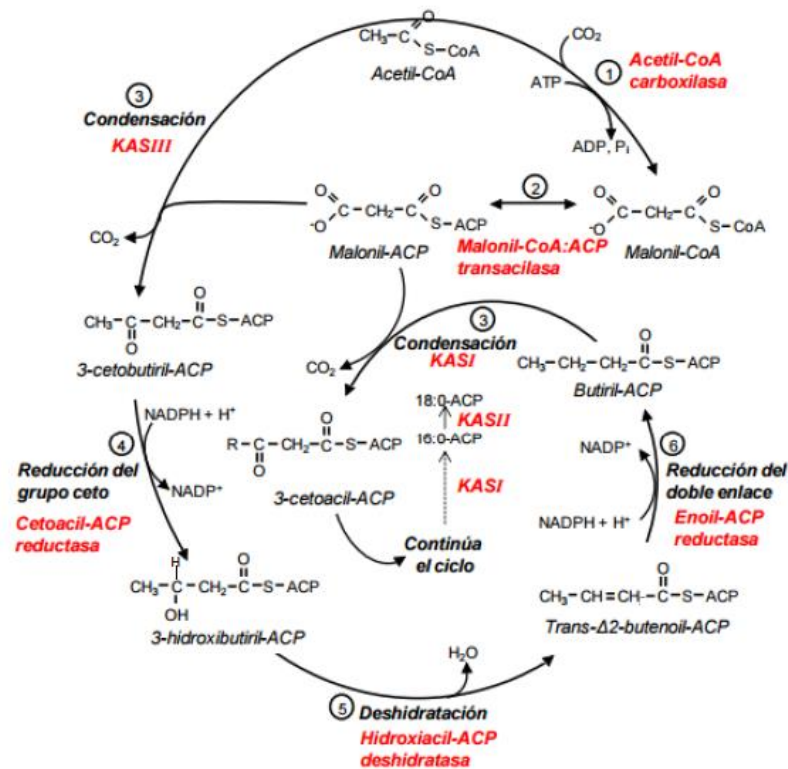


Figura 2.3. Reacciones implicadas en la ruta de síntesis de ácidos grasos en plantas. En rojo se indican las enzimas implicadas en la reacción. Figura adaptada por Raquel Collados a partir de (Ohlrogge *et al.*, 1991).

El proceso comienza con la enzima ACC, que carboxila una molécula de acetil-CoA para sintetizar el malonil-CoA. Posteriormente, el complejo FAS sintetiza la cadena hidrocarbonada mediante la adición sucesiva de dos unidades de carbono cedidas por moléculas de malonil-CoA.

La síntesis de ácidos grasos de cadena larga se hace a partir de los ya citados 16:0 y 18:0 en el citosol, gracias a la participación de las enzimas elongasas de ácidos grasos (FAE) (Somerville y Browse, 1991).

Los ácidos grasos 16:0 y 18:0 junto con el 18:I (desaturado por la enzima soluble SAD, o FAB2 en *Arabidopsis*) (McKeon y Stumpf, 1982) se incorporan a las rutas de síntesis de lípidos pudiendo seguir las denominadas ruta procariota, por su analogía con la de bacterias, o la ruta eucariota, para diferenciarla de la procariota (Figura 2.4).

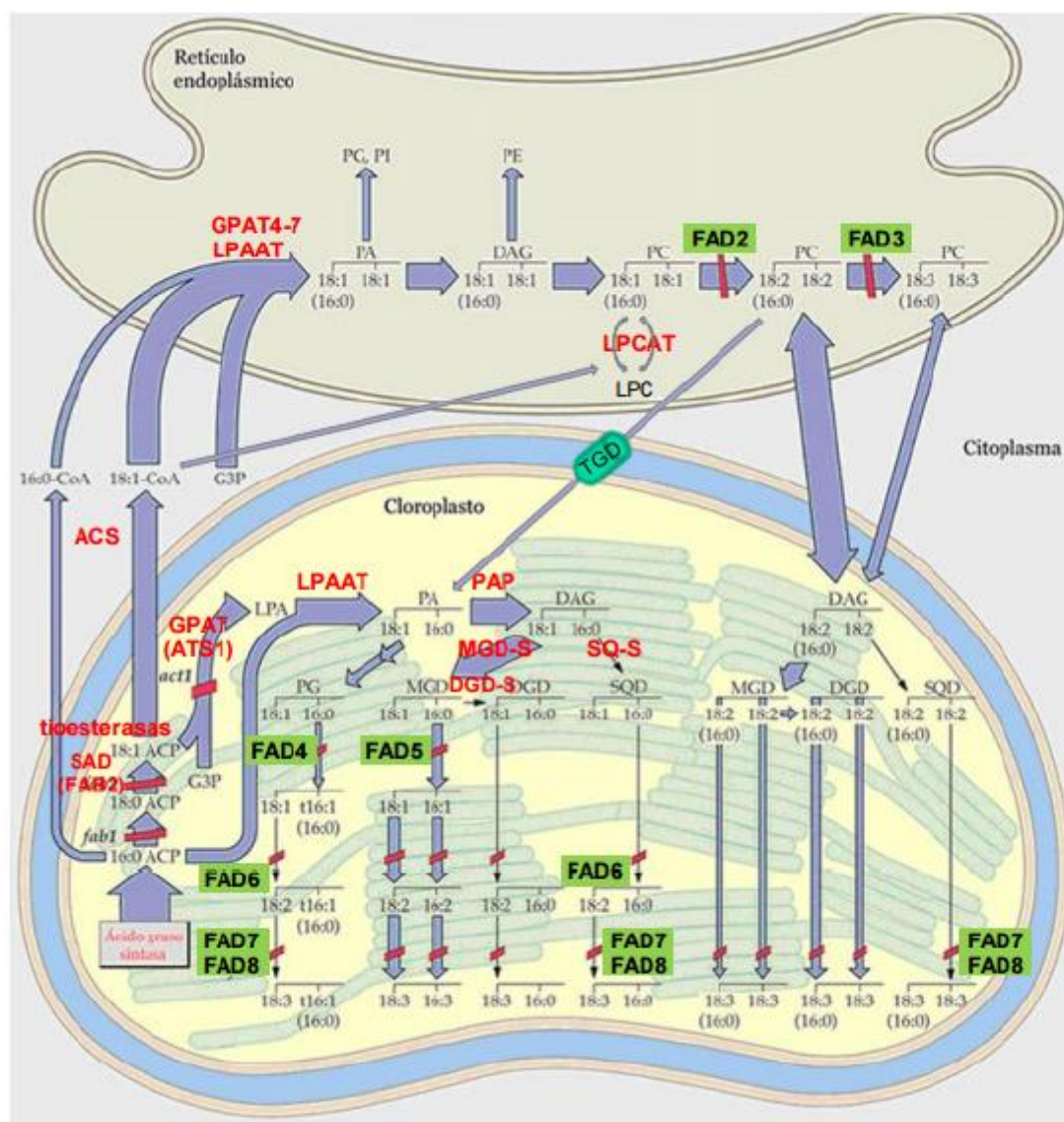


Figura 2.4. Esquema abreviado de la síntesis de lípidos en hojas de *Arabidopsis*: rutas procariota y eucariota. En rojo se indican las enzimas implicadas en la síntesis de glicerolípidos y sobre fondo verde las enzimas desaturasas (FAD). Las barras rojas indican los mutantes deficientes en la función desaturasa. Imagen adaptada de (Somerville *et al.*, 2000).

Los ácidos grasos precursores ya nombrados siguen la ruta procariota para incorporarse a los lípidos del cloroplasto. Unidos a la proteína transportadora de acilos (ACP), el 16:0 y el 18:0 se incorporan a una molécula de glicerol-3-fosfato (G3P), gracias a la acción de la enzima plastidial sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) (Xu *et al.*, 2006). Debido a la especificidad de esta enzima, en la mayoría de los casos se esterifica una molécula de 18:1 en la posición *sn*-1 del glicerol. El producto resultante, ácido lisofosfatídico (LPA), se incorpora a las membranas plastidiales, donde es convertido en

ácido fosfatídico (PA) por la lisofosfatidil aciltransferasa (LPAAT) al esterificar un segundo ácido graso en la posición *sn*-2 (Li-Beisson *et al.*, 2013). El PA puede derivar en PG o convertirse en DAG por acción de la enzima ácido fosfatídico fosfatasa (PAP) que elimina el grupo fosfato. El DAG da lugar a los distintos galactolípidos o al SQ por acción de otras enzimas de la envoltura interna del cloroplasto. Los ácidos grasos de los lípidos sintetizados por esta ruta son desaturados por las desaturasas plastidiales una vez esterificados en el glicerol para dar lugar a los glicerolípidos finales.

En la ruta eucariota, los ácidos grasos precursores son exportados al citoplasma en forma de acil-CoA para ser incorporados a los lípidos del retículo endoplasmático (RE). Se conocen algunos detalles de este mecanismo de exportación, como la participación del transportador TGD4, pero todavía no se conocen la totalidad de enzimas implicadas (Benning, 2009). En el RE siguen una ruta similar a la que siguen los ácidos grasos de la ruta procariota hasta formar el DAG que, de nuevo vuelve a dar lugar a los distintos lípidos finales o bien retorna al cloroplasto para contribuir en la síntesis de galactolípidos, en un proceso que a día de hoy no está totalmente caracterizado (Kjellberg *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004; Li-Beisson *et al.*, 2013). Una vez en el cloroplasto los lípidos reticulares son modificados mediante reemplazo del grupo polar y desaturación.

2.5. Desaturasas de plantas

Las desaturasas de ácidos grasos (FAD) son las enzimas que convierten un enlace simple entre átomos de carbono en un doble en la cadena de los ácidos grasos generalmente, esterificados en lípidos de membrana. Este doble enlace se denomina enlace insaturado.

En *Arabidopsis* se han descrito 8 genes que codifican 8 proteínas desaturasas: FAB2, FAD2, FAD3, FAD4, FAD5, FAD6, FAD7 y FAD8. Según su localización, utilizan distintos donadores de electrones y actúan sobre distintos sustratos. La FAB2 es una desaturasa soluble localizada en el estroma del cloroplasto (Somerville *et al.*, 2000). Sin embargo, la mayoría de las desaturasas son proteínas de membrana. FAD2 y FAD3 se localizan en el RE (Dyer y Mullen, 2001) y utilizan el citocromo *b*₅ como donador de electrones. El resto se localizan en el cloroplasto y utilizan la ferredoxina reducida como donador de electrones. FAB2, FAD4 y FAD5 introducen un primer doble enlace en

distintas posiciones de los ácidos grasos. FAD2 y FAD6 introducen un segundo doble enlace en posición $\omega 6$, por lo que son denominadas $\omega 6$ desaturasas. Por último, FAD3, FAD7 y FAD8 introducen el tercer doble enlace en posición $\omega 3$, por lo que se denominan $\omega 3$ desaturasas.

2.6. Estructura y función de las $\omega 3$ desaturasas

La única desaturasa de plantas que ha sido purificada y cristalizada es la $\Delta 9$ estearoil-ACP desaturasa (FAB2) de *Ricinus comunis*. Esta proteína es soluble y se compone de un homodímero en el que cada uno de los monómeros consta de 11 hélices α (Lindqvist *et al.*, 1996) (figura 2.5).

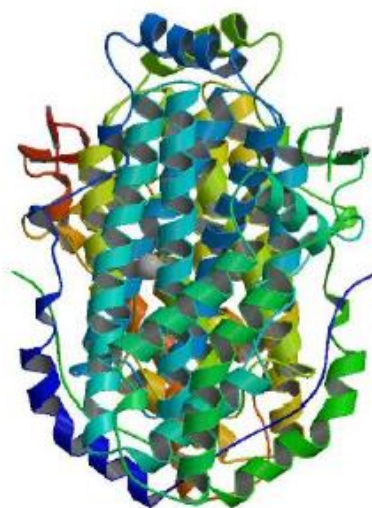


Figura 2.5. Estructura del homodímero de la enzima $\Delta 9$ estearoil-ACP desaturasa (FAB2) de *Ricinus Communis* (Lindqvist *et al.*, 1996). Imagen obtenida de la base de datos *Protein Data Bank* (PBD: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Por el contrario, las desaturasas de membrana no han podido ser purificadas ni cristalizadas, por lo que su estructura secundaria y terciaria es desconocida. Los modelos de estructura de estas desaturasas predicen cuatro hélices transmembrana y sitúan los extremos N-terminal y C-terminal, así como las cajas funcionales, en el lado citoplasmático de la membrana (figura 2.6) (Los y Murata, 1998; Dyer y Mullen, 2001).

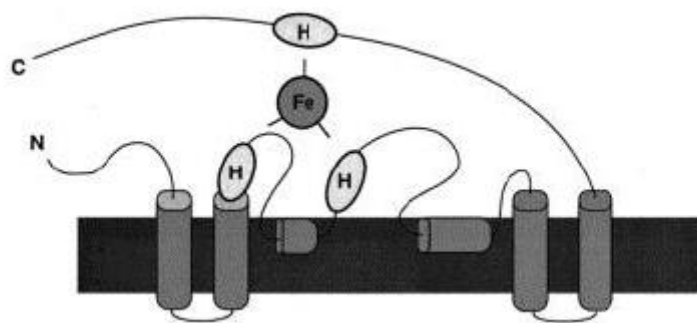


Figura 2.6. Modelo de estructura secundaria de la $\Delta 9$ desaturasa de membrana (Los y Murata, 1998).

El análisis de las secuencias de aminoácidos de las $\omega 3$ desaturasas reveló que estas no contenían los motivos de unión a hierro $-D/EX_2H-$ descritos en la desaturasa soluble FAB2 (Shanklin y Cahoon, 1998). Sin embargo, se identificaron 8 residuos de histidina conservados en todas las desaturasas de membrana que se han descrito como esenciales para la función catalítica de las desaturasas (Roman *et al.*, 2012). El análisis de secuencias reveló que estas cajas de histidina están altamente conservadas, conservando no sólo el número y la posición de los residuos de histidina, sino también los aminoácidos que los acompañan (figura 2.7). Las secuencias de aminoácidos de estas cajas de histidina son las siguientes: Ia: HDCGH, Ib: HRTTH, y II: HVIHH. Se ha propuesto que estas cajas de histidina son las responsables de la coordinación de los átomos de hierro necesarios para catalizar la reacción de desaturación en las desaturasas de membrana (Los y Murata, 1998; Somerville *et al.*, 2000).

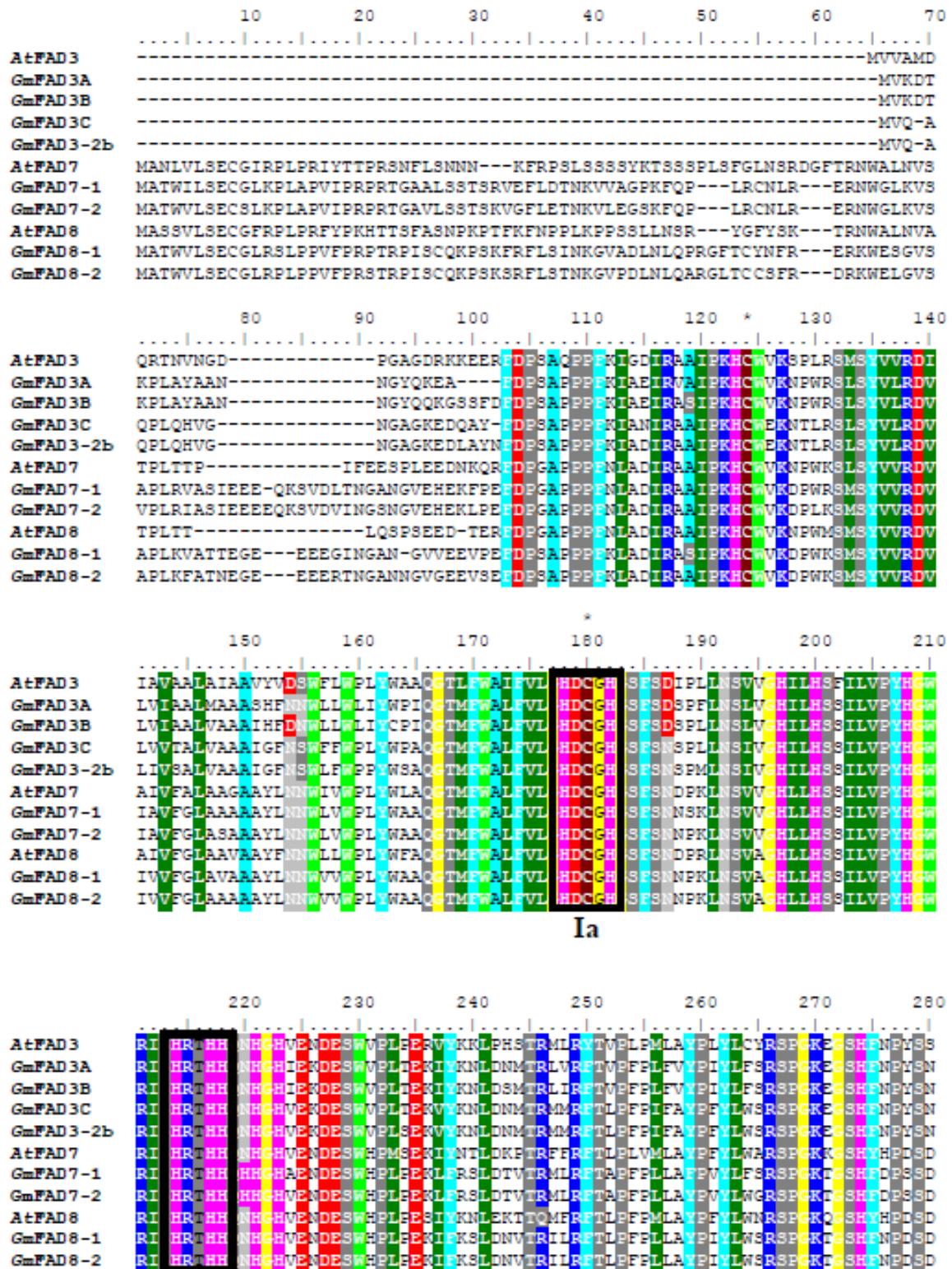


Figura 2.7. (Pie de figura en siguiente página)

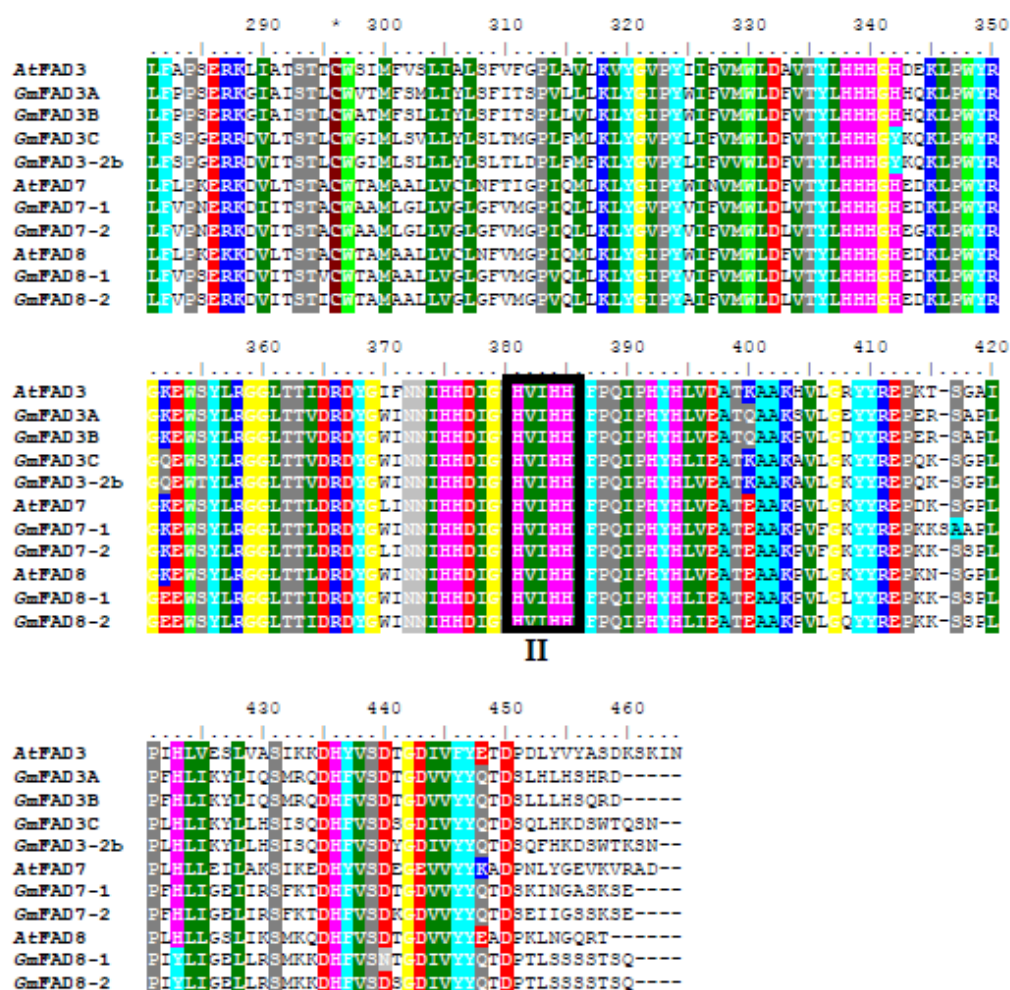


Figura 2.7. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las ω 3 desaturasas de *Arabidopsis* y soja. Los recuadros negros indican las cajas de histidinas conservadas en todas las ω 3 desaturasas. Los asteriscos (*) indican las cisteínas conservadas en todas las ω 3 desaturasas.

La reacción de desaturación requiere el concurso de dos electrones y de una molécula de oxígeno (Behrouzian y Buist, 2002), sin embargo no se conoce en su totalidad el mecanismo enzimático de esta reacción.

El mecanismo propuesto (Figura 2.8) parte de un estado basal en el que un centro dihierro se encuentra en estado oxidado $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$. El citocromo b_5 actúa como donador de electrones en las desaturasas reticulares reduciendo al centro dihierro $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O-Fe}^{\text{II}}$, al que posteriormente se une una molécula de oxígeno generando un intermediario peroxo (2Fe-2O). A continuación el enlace entre los átomos de oxígeno se rompe dando lugar a un centro dihierro activado que es capaz de actuar como oxidante y puede atraer de forma sucesiva dos átomos de hidrógeno de dos grupos metileno dando lugar

primero a un intermediario alquilo y después a una especie con dos electrones desapareados que se combinan para constituir el doble enlace. En esta reacción se libera una molécula de agua y se regenera el centro dihierro oxidado $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$. La recuperación del citocromo b_5 se debe a la acción de la enzima NADH-citocromob5oxidorreductasa. En el caso de las desaturasas plastidiales el donador de electrones es la ferredoxina y el NADPH₂ aporta el poder reductor necesario para la reacción.

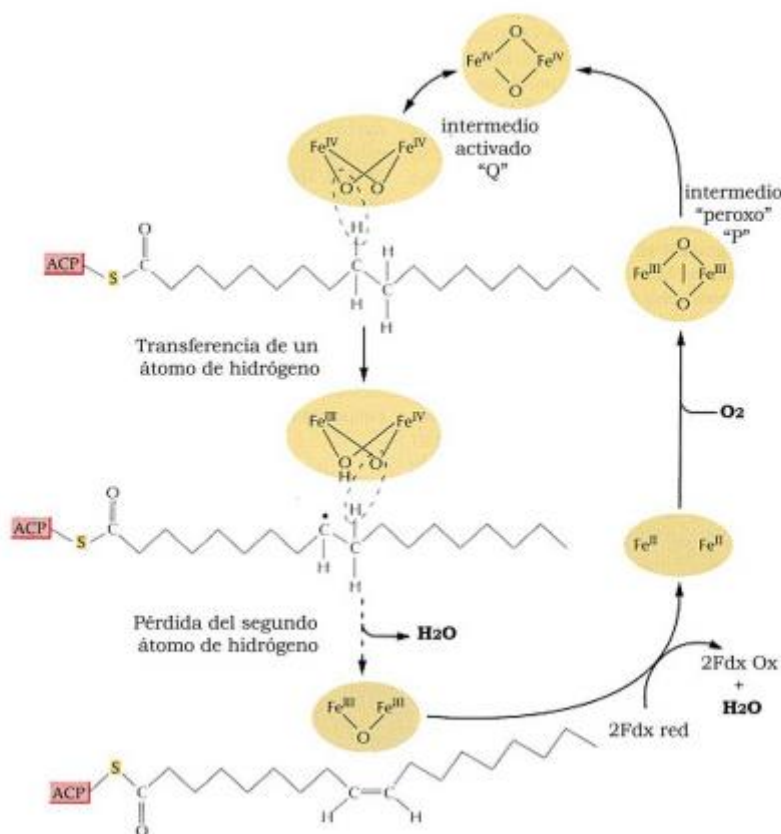


Figura 2.8. Mecanismo propuesto para la reacción de desaturación de ácidos grasos en plantas. Imagen adaptada de (Somerville *et al.*, 2000).

2.7. Las desaturasas de plantas como dianas biotecnológicas

Existen varios ámbitos en los que la manipulación biotecnológica de las desaturasas de plantas tiene un elevado interés industrial. La modificación del grado de insaturación de los lípidos de membrana es uno de los mecanismos clave para la respuesta al frío de las plantas. Esta modificación consiste en el incremento de la producción de ácidos grasos poliinsaturados, ya que estos mantienen la fluidez de la membrana debido a su baja temperatura de fusión (Iba, 2002). Este incremento se debe, principalmente, al aumento

de ácido α -linolénico (18:3) (Kargiotidou *et al.*, 2008). Tras la exposición a bajas temperaturas, en la mayoría de las especies de plantas analizadas se han descrito incrementos en los niveles de ácidos grasos trienoicos. La manipulación biotecnológica de la actividad ω 3 en plantas podría permitir la aparición de variedades con una mejor capacidad de adaptación a las bajas temperaturas.

Los aceites vegetales derivados de las semillas de las plantas son un recurso renovable y fácilmente extraíble, con múltiples aplicaciones industriales, sin embargo su utilidad está sujeta a los ácidos grasos presentes en su composición. El 60% del mercado mundial de aceite vegetal está representado por el aceite de soja, que sin embargo no es interesante para estas aplicaciones. Los aceites vegetales interesantes industrialmente han de estar enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados (baja temperatura de fusión, estabilidad oxidativa) o con grupos funcionales interesantes, concretamente se calcula que para que sean rentables se debería alcanzar un 95% de estos ácidos grasos del total de la semilla (Jaworski y Cahoon, 2003). Además estos aceites deberían producirse a partir de plantas que no formen parte significativa de la dieta humana en la actualidad (Zhu *et al.*, 2016). Algunas de las aplicaciones de estos aceites son la sustitución de los combustibles fósiles, uso como lubricantes, alimento para acuicultura o la industria alimenticia (con particular énfasis en los ácidos grasos ω 3) (Cahoon *et al.*, 2007).

Se están realizando numerosos estudios con el objetivo de aumentar la riqueza de los aceites vegetales en estos ácidos grasos, en la mayoría de los casos intentando dirigir el flujo del metabolismo hacia determinados “cuellos de botella metabólicos” (Cahoon *et al.*, 2007) mediante la sobreexpresión o silenciamiento de distintos genes del metabolismo lipídico (Yurchenko *et al.*, 2017) pero sus esfuerzos han sido infructuosos. Parte de estos estudios se han centrado en las desaturasas vegetales, intentando modificar su expresión (Kinney *et al.*, 2002) pero tampoco han obtenido resultados relevantes.

El conocimiento de la estructura de las desaturasas vegetales podría abrir el camino para estudios con enfoques distintos a los que se están llevando a cabo actualmente. Con la caracterización de su sitio activo sería posible modular la actividad de estas proteínas mediante el diseño de inhibidores, haciendo posible de esta manera una estrategia distinta a la alteración de la expresión génica para modificar la producción de determinados ácidos grasos.

2.8. Caracterización de mutantes de FAD3

FAD3 es una ω 3 desaturasa, la única ω 3 desaturasa que es reticular y no plastidial, está codificada por el gen *AtFAD3* y es la responsable de la producción de ácidos grasos trienoicos en tejidos no fotosintéticos. También es la responsable de la acumulación de ácidos grasos trienoicos en las semillas de *Linum usitatissimum* (lino) y *Camelina sativa*, las únicas plantas que acumulan estos ácidos grasos en semillas.

En un trabajo previo realizado por el grupo de investigación del Dr. Alfonso en la EEAD-CSIC, se caracterizaron diferentes mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en la actividad desaturasa. Estos mutantes de *Arabidopsis* fueron creados bien por acción de EMS (un agente mutágeno que crea mutaciones al azar) o mediante la inserción de un T-ADN (que también genera mutaciones al azar). Entre los mutantes estudiados, dos de ellos resultaron particularmente interesantes para un estudio más profundo; el mutante simple *fad3-1* que presenta una mutación puntual en el gen *AtFAD3*, y un triple mutante *fad3-2 fad7-2 fad8-1* que además de presentar una mutación puntual en *AtFAD3*, también presenta mutaciones puntuales en los genes que codifican para FAD7 y FAD8. Estos dos últimos genes tienen un codón stop prematuro antes de la tercera caja de histidinas que produce una forma truncada no funcional de las proteínas. Sin embargo, las mutaciones en *AtFAD3*, tanto en el mutante *fad3-1* como en el triple mutante *fad3-2 fad7-2 fad8-1*, no producen una proteína truncada, por lo que los residuos mutados podrían formar parte del centro activo de la enzima o participar en el correcto plegamiento de la misma, proporcionando información clave desde el punto de vista estructural que a día de hoy es desconocida.

Estos mutantes hicieron posible un estudio funcional de la proteína FAD3 en planta (Pastor, 2015). Se crecieron tres líneas vegetales de *Arabidopsis thaliana*, un ecotipo Col-0 (WT), un mutante simple *fad3-1* y un triple mutante *fad3-2, fad7-2, fad8-1* (figura 2.9).



Figura 2.9. Plantas pertenecientes a las líneas vegetales Col-0 (WT), *fad3-1* (*fad3*) y *fad3-2*, *fad7-2*, *fad8-1* (Pastor, 2015).

La extracción de los lípidos de las hojas de estas plantas y el análisis de la composición de ácidos grasos evidenció diferencias en la actividad ω 3 desaturasa (figura 2.10).

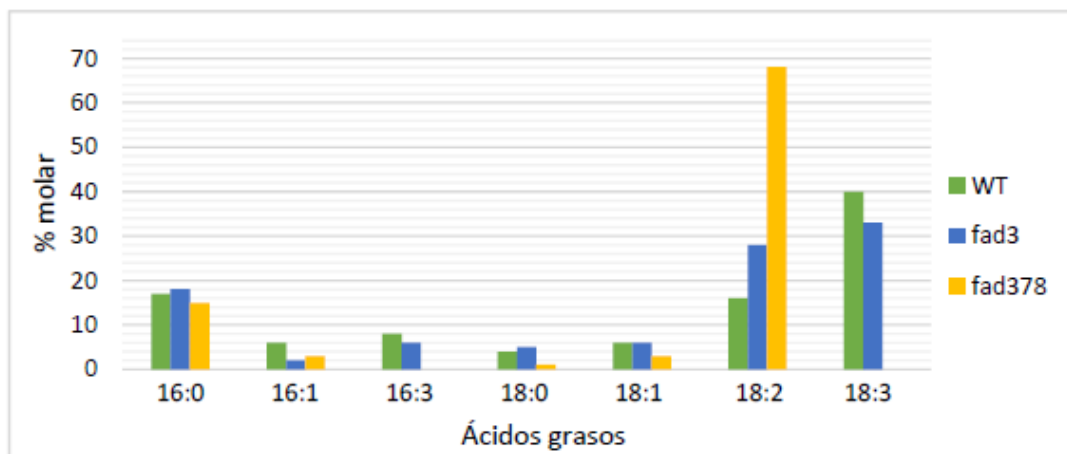


Figura 2.10. Composición de ácidos grasos en hojas de las líneas vegetales Col-0 (WT), *fad3-1* (*fad3*) y *fad3-2*, *fad7-2*, *fad8-1* (*fad378*) (Pastor, 2015).

Se observó una ligera disminución de ácidos grasos trienoicos 16:3 y 18:3 en la línea *fad3-1* y una ausencia de los mismos en la línea mutante *fad3-2*, *fad7-2*, *fad8-1*. Este hecho se acompaña de una acumulación de sus precursores 16:2 y 18:2.

El aislamiento y secuenciación del gen *AtFAD3* en estos mutantes, permitió la caracterización de estas mutaciones tras un alineamiento de las secuencias de aminoácidos resultantes de los genes secuenciados (figura 2.11).

El genotipado de ambos mutantes mostró que el gen *AtFAD3* de la línea *fad3-1* posee un cambio en la posición 292 de glicina a glutámico, mientras que la de la línea mutante *fad3-2*, *fad7-2*, *fad8-1* posee un cambio en la posición 103 de cisteína a tirosina.



3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La estructura tridimensional de las desaturasas de membrana de plantas es desconocida debido a su condición de proteínas de membrana y su carácter hidrofóbico que dificulta su purificación y posterior análisis bioquímico.

Las dificultades para purificar estas enzimas complican enormemente la realización de un estudio estructura-función tradicional. Sin embargo, la identificación de dos mutaciones en el gen *AtFAD3* de *Arabidopsis thaliana*, con diferentes efectos en la función de la enzima FAD3 constituye un buen material de partida para llevar a cabo un estudio estructura-función.

La estructura tridimensional de las desaturasas de membrana, y más concretamente las ω 3 desaturasas es a día de hoy desconocida. Sin embargo, existen una serie de herramientas bioinformáticas que permiten, a partir de una simple secuencia de proteína, establecer un modelo de plegamiento de la enzima de estructura desconocida por similitud a otras proteínas de estructura conocida. Estos modelos, aunque no proporcionan una estructura fiable de la proteína, pueden proporcionar información útil para comprender el efecto que determinadas mutaciones pueden tener sobre la actividad de una proteína de estructura desconocida.

A diferencia de las desaturasas plastidiales, que necesitan electrones procedentes de la ferredoxina reducida durante la fotosíntesis y poder reductor en forma de NADPH, las desaturasas reticulares utilizan el citocromo *b*₅ como donador de electrones y NADH como fuente de poder reductor, respectivamente. Esta diferencia hace que se pueda abordar el estudio de la actividad ω 3 desaturasa mediante su expresión en levaduras, de tal modo que proporcionando los sustratos adecuados, en este caso 18:2, se puede determinar de forma específica la actividad ω 3 de una determinada enzima FAD3 (Román et al., 2012). El hecho de que las levaduras, carezcan de ácidos grasos 18:2 o 18:3 simplifica el análisis posterior de los resultados.

Teniendo en cuenta estas dos cuestiones, los objetivos de este Trabajo Fin de Master han sido:

- 1.- Llevar a cabo un análisis mediante modelos de predicción bioinformáticos de las alteraciones en la estructura del sitio activo de la ω 3 desaturasa FAD3 de *Arabidopsis thaliana* en los mutantes caracterizados en la EEAD-CSIC.
- 2.- Realizar un estudio de complementación en levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*) de las proteínas FAD3 tanto de la línea silvestre como del mutante *fad3-1* y del triple mutante *fad3-2*, *fad7-2*, *fad8-1* de *Arabidopsis thaliana*, determinando sus parámetros enzimáticos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

4.1.1. Manipulación de bacterias

4.1.1.1. Cepa de *Escherichia (E.) coli* utilizada y condiciones de cultivo

Las células de *E. coli* utilizadas en este estudio pertenecen a la cepa DH5 α (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) la cual se caracteriza por sus mutaciones recA1, que inactiva la recombinación homóloga, y endA1, que inactiva una endonucleasa que podría digerir el futuro plásmido insertado.

Las bacterias se cultivaron en medio LB (*Lysogenic Broth*) (Bertani, 1951) líquido o sólido, ajustado a pH 7.2. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C durante toda la noche (con agitación a 200 rpm en un agitador Rotabit -J. P Selecta, Barcelona, España- en el caso de los cultivos líquidos).

Los medios para la selección de bacterias transformantes se suplementaron con 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ampicilina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU).

Medios de cultivo:

Medio LB líquido: 1% (p/v) triptona; 0,5% (p/v) extracto de levadura; 1% (p/v) NaCl; pH 7,2.

Medio LB sólido: 1% (p/v) triptona; 0,5% (p/v) extracto de levadura; 1% (p/v) NaCl; 1,5% (p/v) agar bacteriológico (Conda, Madrid, España); pH 7,2.

4.1.1.2. Preparación *E. coli* quimiocompetentes

El método utilizado fue el que hace uso de cloruro de rubidio, por ser más eficiente que el tradicional que utiliza solamente cloruro de calcio. Para ello, se sembró una placa de LB sólido con la cepa DH5 α y se cultivó a 37 °C durante toda la noche. Se inoculó un cultivo previo de 2 ml de medio LB con una colonia individual y se cultivó durante toda la noche a 37 °C con agitación. Se utilizaron 500 μl de este cultivo previo para inocular 50 ml de LB y se cultivó a 37 °C con agitación hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó un valor de 0,6 en cubetas de 1 cm de paso de luz. A continuación, las células se recogieron por centrifugación en tubos falcon fríos a 3000 x g durante 10 minutos a 4

°C y se resuspendieron cuidadosamente en 15 ml de tampón de transformación I frío. Posteriormente, se centrifugaron a 3000 x g durante 10 minutos a 4 °C y el sedimento se resuspendió cuidadosamente en 2 ml de tampón de transformación II frío. Finalmente, se dividió en alícuotas de 100 µl, que se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta su utilización.

Tampones:

Tampón de transformación I: 30 mM acetato potásico; pH 5,8; 50 mM MnCl₂; 100 mM RbCl₂; 15% (p/v) glicerol.

Tampón de transformación II: 10 mM MOPS; pH 7,0; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl₂; 15% (p/v) glicerol.

4.1.1.3. Transformación *E. coli* quimiocompetentes

Se descongelaron las células competentes en hielo durante 15 minutos, se añadieron 1-2 µl de ADN plasmídico y se mantuvieron otros 15 minutos en hielo. A continuación, se incubaron en un baño húmedo a 42 °C durante 1 minuto y posteriormente, otros 15 minutos en hielo. Se añadieron 850 µl de LB líquido a las células y se cultivaron a 37 °C durante 1 hora. Se centrifugaron a 1300 x g durante 3 minutos a 4 °C y finalmente, el sedimento se resuspendió en 200 µl de LB para después sembrarse en una placa de LB sólido con ampicilina con el objetivo de seleccionar las bacterias transformantes.

4.1.1.4. Conservación de cepas bacterianas a largo plazo

Se cultivaron las cepas bacterianas en 5 ml de LB (con ampicilina si era necesario) a 37 °C durante toda la noche. Se mezclaron 800 µl de este cultivo con 200 µl de glicerol estéril, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C para su almacenamiento.

4.1.2. Manipulación de levaduras

4.1.2.1 Cepa de *Saccharomyces (S.) cerevisiae* utilizada y condiciones de cultivo

Las células de *S. cerevisiae* utilizadas en este estudio pertenecen a la cepa UTL-7A (donada por el Dr. José Manuel Martínez Rivas –Instituto de la Grasa, CSIC, Sevilla-) que presenta una auxotrofia para el uracilo, característica que permite la selección de levaduras transformantes.

Las levaduras fueron cultivadas en medio completo YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) o medio mínimo completo SD (*Synthetic Defined*) sin uracilo, líquido o sólido. Las levaduras se cultivaron a 30 °C durante 1-2 días con agitación a aproximadamente 200 rpm en el caso de los cultivos líquidos.

Medios de cultivo:

Medio YPD líquido: 1% (p/v) extracto de levadura; 2% (p/v) peptona bacteriológica; pH 6,5; 2% (p/v) glucosa.

Medio YPD sólido: 1% (p/v) extracto de levadura; 2% (p/v) peptona bacteriológica; pH 6,5; 2% (p/v) glucosa; 2% (p/v) agar bacteriológico.

Medio SD-Ura líquido: 0,67% (p/v) YNB (*Yeast Nitrogen Base*); 0,077% (p/v) CSM-Ura (*Complete Supplement Mixture -Uracil*); pH 5,8; 2% (p/v) glucosa.

Medio SD-Ura sólido: 0,67% (p/v) YNB; 0,077% (p/v) CSM-Ura; pH 5,8; 2% (p/v) glucosa; 2% (p/v) agar bacteriológico.

En determinadas ocasiones se añadió al medio SD-Ura como fuente de carbono 2% (p/v) rafinosa o 2% (p/v) galactosa en lugar de glucosa (especificado en el apartado correspondiente).

4.1.2.2. Preparación *S. cerevisiae* competentes

Para la preparación de levaduras competentes y su posterior transformación se usó el método descrito por Dohmen y colaboradores (Dohmen *et al.*, 1991).

Se sembró una placa de YPD sólido con *S. cerevisiae* y se cultivó durante 2 días a 30 °C. Se inoculó un cultivo previo de 5 ml de YPD líquido con una colonia individual y se cultivó durante toda la noche a 30 °C con agitación. Se utilizó este cultivo previo para inocular 100 ml de medio YPD y se cultivó hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó

0,6 en cubetas de 1 cm de paso de luz. Se centrifugó a 2000 x g durante 10 minutos a 4 °C y posteriormente, las células se resuspendieron cuidadosamente en 20 ml de tampón de transformación I frío. Las células se centrifugaron a 2000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 2 ml de tampón de transformación I. Finalmente, se dividió en alícuotas de 200 µl que se guardaron a -80 °C.

Tampones:

Tampón de transformación I: 0 mM bicina-KOH; pH 8,35; 1 M sorbitol; 3% (v/v) etilenglicol.

4.1.2.3. Transformación *S. cerevisiae* competentes

Se añadieron a las células de *S. cerevisiae* competentes 1-2 µg de plásmido y 50 µg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y se incubaron a 37 °C durante 5 minutos en un baño húmedo. A continuación, se añadió 1 ml de tampón de transformación II y se cultivaron durante 1 hora a 30 °C con agitación suave. Las levaduras se centrifugaron a 2000 x g durante 2 minutos y el sedimento se lavó dos veces con 800 µl de tampón de transformación III. Finalmente, se centrifugaron a 2000 x g durante 2 minutos y las levaduras se sembraron en placas de medio SD-Ura para la selección de levaduras transformantes.

Tampones:

Tampón de transformación II: 200 mM bicina-KOH; pH 8,35; 40% (p/v) polietilenglicol 1000.

Tampón de transformación III: 10 mM bicina-KOH; pH 8,35; 150 mM NaCl.

4.2. Extracción y análisis de ácidos nucleicos

4.2.1. Extracción ADN plasmídico de bacteria

Se tomaron colonias individuales que habían crecido en el medio selectivo LB con ampicilina y se inoculó un cultivo de 5 ml de LB líquido con ampicilina que se cultivó durante toda la noche a 37 °C con agitación. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 12000 x g durante 1 minuto y el ADN plasmídico se extrajo utilizando

el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen, Hilden, Alemania) y siguiendo las instrucciones del fabricante siendo finalmente eluido el material genético en un volumen de 30 µl.

4.2.2. Construcción del vector de expresión en levaduras mediante enzimas de restricción

El vector de expresión en levaduras elegido fue el pYES2 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). Este es un vector de sobreexpresión en levaduras que posee un promotor inducible por galactosa (*GAL1*), una región de clonaje múltiple, los orígenes de replicación pUC (permite la replicación en *E.coli*) y 2µ (permite la replicación en levaduras), el gen *URA3* (permite la selección de colonias transformadas en un medio deficiente en uracilo) y el gen que confiere resistencia a ampicilina (figura 4.1).

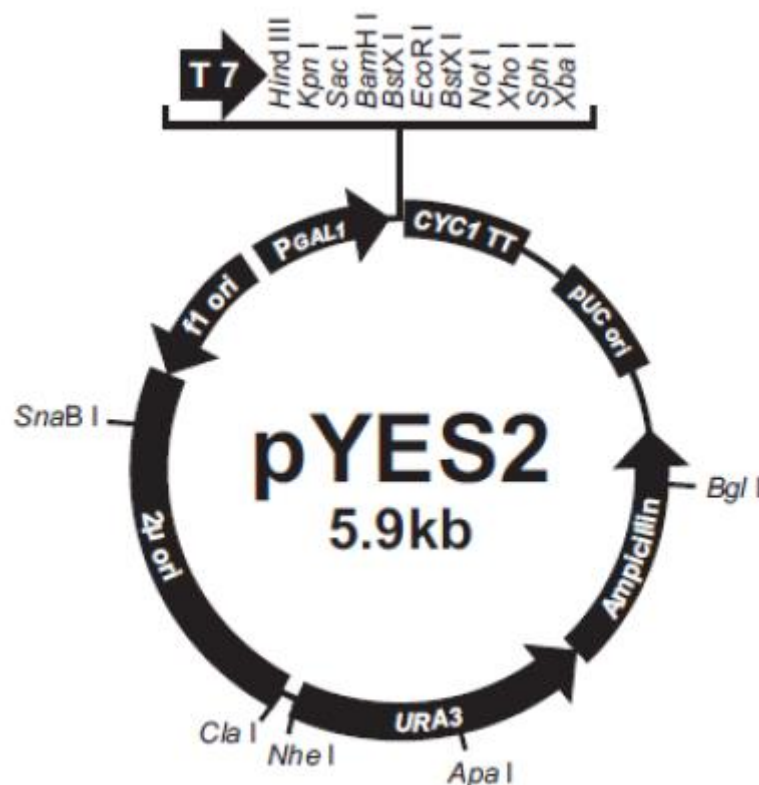


Figura 4.1. Organización de las regiones del vector pYES2 (Invitrogen).

Los genes a clonar en nuestro vector de expresión se encontraban previamente clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega, Wisconsin, EEUU) el cual posee una región de

clonaje múltiple, el origen de replicación *ori* (permite la replicación en *E. coli*) y el gen *Amp^r* que confiere resistencia a la ampicilina (figura 4.2).

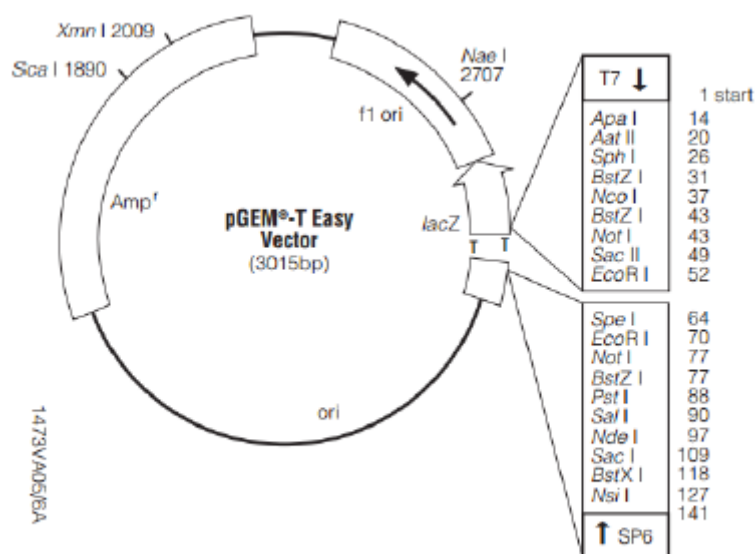


Figura 4.2. Organización de las regiones del vector pGEM-T Easy (Promega).

Los genes clonados en el vector pGEM-T Easy se digirieron con las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* y se ligaron, con la enzima T4 ligasa al vector de destino pYES2 previamente digerido con las mismas enzimas.

4.2.3. Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas para la digestión de los vectores pYES2 y pGEM-T Easy fueron *BamHI* y *XhoI*. Se llevó a cabo una doble digestión utilizando estas enzimas, las condiciones de esta doble digestión se calcularon usando la aplicación DoubleDigest Calculator (www.thermofisher.com).

Se utilizaron 3µl de ADN plasmídico, 1 µl de *BamHI*, 0,5µl de *XhoI* y 1,5µl del tampón G (Fermentas, ThermoFisher Scientific, Waltman, MA, EEUU) en un volumen final de 15µl. La reacción se incubó 1 hora a 37 °C y posteriormente se analizaron los productos mediante electroforesis en gel de agarosa y comparación con marcadores de masa molecular.

4.2.4. Electroforesis en gel de agarosa

El ADN se analizó mediante electroforesis en geles de 1% (p/v) agarosa en tampón TBE, teñidos con 1X SYBR Safe DNA Gel Stain (Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU).

Las muestras de ADN se mezclaron con tampón de carga 6X DNA Loading Dye (Fermentas, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y se cargaron 5-20 µl de muestra en el gel de agarosa.

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta (BioRad, Hercules, CA, EEUU) con tampón TBE a 100 V (voltaje constante) durante 30 minutos. Las imágenes se tomaron con un transiluminador Gel Doc (BioRad, Hercules, CA, EEUU) utilizando el programa de análisis de imagen Quantity One (BioRad, Hercules, CA, EEUU).

La masa molecular de los fragmentos amplificados fue estimada por comparación con el marcador de masa molecular GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

Tampones:

TBE: 90 mM Tris-HCl; pH 8,0; 90 mM H₃BO₃; 2 mM EDTA.

4.2.5. Extracción y purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Los productos obtenidos de la digestión enzimática del vector pGEM-T Easy se separaron por electroforesis en gel de agarosa y las bandas del tamaño esperado se cortaron utilizando un bisturí. A continuación, se purificaron utilizando el kit GeneJET Gel Extraction (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.2.6. Ligación de fragmentos de ADN al vector pYES2

Los productos obtenidos de la digestión enzimática del vector pGEM-T Easy y posteriormente purificados a partir de un gel de agarosa se ligaron al vector pYES2 previamente digerido mediante la utilización de la enzima T4 ligasa (Promega, Wisconsin, EEUU).

Se utilizaron 0,5 µl del vector digerido, 8 µl de ADN purificado, 1µl de la enzima T4 ligasa y 1µl del tampón T4 10x. La mezcla de ligación permaneció 3 horas a temperatura ambiente para después ser guardada a 8 °C durante toda la noche previa a su transformación.

4.2.7. PCR en colonia

Para comprobar la presencia del plásmido pYES2 en las levaduras transformantes se utilizó el método de PCR en colonia. Para ello, se realizó una amplificación por PCR del gen *AtFAD3* utilizando como molde las propias colonias bacterianas, tomándolas con una punta estéril e introduciéndolas directamente en la mezcla de reacción.

Los cebadores utilizados para la amplificación del gen *AtFAD3* se detallan en la tabla 4.1. El cebador 5´(Forward) incluye el codón de iniciación ATG así como una diana de restricción para *Bam*HI. El cebador 3´(Reverse) incluye el codón Stop y una diana de restricción para *Xho*I. La presencia de dianas de restricción enzimática en estos cebadores se debe a que fueron diseñados para un trabajo anterior (Pastor, 2015).

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

Tabla 4.1. Cebadores para la amplificación del gen *AtFAD3*. Resaltadas en rojo aparecen las dianas de restricción, en morado el codón de inicio y en verde el codón Stop (Pastor, 2015).

En la figura 4.3 se aprecia el lugar donde hibridan los cebadores en la secuencia de ADNc de *AtFAD3*.

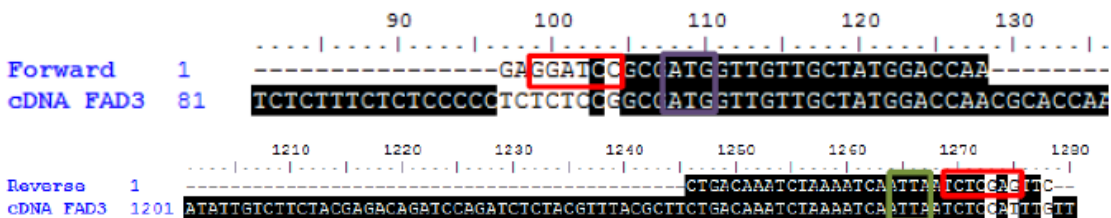


Figura 4.3. Alineamiento del cADN de *AtFAD3* con los cebadores. En rojo aparecen resaltadas las dianas de restricción para *Bam*HI y *Xho*I, en morado el codón de iniciación y en verde el codón Stop (Pastor, 2015).

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador utilizando la enzima BIOTAQ ADN Polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido). La mezcla de reacción se muestra en la Tabla 4.2.

Tampón	10mm dNTPs	Cebador directo	Cebador reverso	MgCL₂	Polimerasa	ADN	H₂O
2 µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	Colonia individual	13µl

Tabla 4.2. Mezcla de reacción para la amplificación del gen *AtFAD3*

El ADN se sometió a una desnaturalización inicial a alta temperatura, 40 ciclos de desnaturalización, hibridación de cebadores y elongación; seguidos de un periodo de elongación final. Las condiciones de PCR utilizadas se detallan en la Tabla 4.3.

Ciclo	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	Elongación final
	95 °C 30 min	95 °C 30 seg	57 °C 45 seg	72 °C 1 min	72 °C 10 min

Tabla 4.3. Condiciones estándar de PCR

La temperatura de annealing se fijó en 57 °C coincidiendo con la recomendada para el cebador directo y siendo la del reverso 62 °C.

4.2.8. Determinación de la concentración del ADN

Se determinó la concentración y pureza de los ácidos nucleicos mediante medida de la absorbancia (A) en un microespectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Waltman, MA, EEUU). Se tuvo en cuenta la absorbancia medida a 260 nm para la determinación de la concentración ya que a esta absorbancia una unidad equivale a una concentración de 50 µg ml⁻¹.

4.2.9. Secuenciación de ADN

Con el objetivo de comprobar la identidad de los plásmidos utilizados, estos se secuenciaron utilizando el cebador T7 en el Servicio de Secuenciación del Centro de Investigaciones Oncológicas.

4.3. Inducción de la actividad FAD3 en *S. cerevisiae*

Una vez seleccionadas las colonias con el plásmido pYES2, conteniendo el gen de interés, se inocularon en 15 ml de medio SD-Ura líquido suplementado con 2% (p/v) rafinosa como única fuente de carbono (Kajiwara *et al.*, 1996). Las levaduras transformadas se cultivaron a 30 °C, con agitación (200 rpm) hasta que la A_{600} alcanzó la unidad. Entonces las células se diluyeron hasta una A_{600} de 0,4 en 25 ml de medio CM-ura suplementado con 2% (p/v) galactosa para inducir la expresión de la proteína. En ese momento se suplementaron también con ácido linoleico 0,5 mM en 0,1% (p/v) tergitol (tipo NP-40) y se cultivaron a 30 °C hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria ($A_{600} = 3-4$). Se recogieron las células por centrifugación a 1500 x g durante 5 minutos a 4 °C y se lavaron con agua destilada. A continuación, fueron almacenadas a -20 °C.

4.4. Aislamiento y análisis de ácidos grasos

4.4.1. Extracción y metilación en un paso de ácidos grasos totales de levaduras

Para el análisis de la composición de ácidos grasos totales de levaduras, estos se transformaron en sus correspondientes ésteres metílicos mediante una reacción de transesterificación en medio ácido.

Para la metilación de las células se añadieron 3,3 ml de mezcla de metilar y 1,7 ml de heptano. Se incubaron las muestras en tubos de vidrio herméticamente cerrados a 80 °C durante 1 hora. Tras su enfriamiento, se recogió la fase superior que contenía el heptano, el tolueno y los ésteres metílicos y se añadieron 5 ml de 6,7% (p/v) Na_2SO_4 . Después de agitar vigorosamente haciendo uso de un vortex, se centrifugaron las muestras a 1500 x g durante 5 minutos y se volvió a recoger la fase superior, en la que

quedan los ésteres metílicos. Estos fueron evaporados a sequedad bajo una corriente de N_2 .

Mezcla de metilar: Metanol:Tolueno: H_2SO_4 , (88:10:2 v/v).

4.4.2. Análisis de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía gas-líquido

Una vez obtenidos los ésteres metílicos de los ácidos grasos, éstos se analizaron mediante cromatografía gas-líquido (GLC), también llamada cromatografía de gases (GC). En esta técnica los compuestos que se quieren separar deben ser volatilizados y transportados por una corriente de gas inerte (fase móvil) a través de una columna que contiene la fase estacionaria líquida unida a un soporte sólido (Christie, 1982). El residuo seco de los ésteres metílicos de ácidos grasos totales se disolvió en 50-100 μ l de heptano y se introdujo en viales con inserto de vidrio. Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases modelo 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU), equipado con una columna capilar de sílice fundida de 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 0,2 μ m de espesor de fase (Supelco, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) y con un detector de ionización de llama (FID). El gas portador utilizado fue el hidrógeno, con un flujo lineal de 1,34 $ml\ min^{-1}$ y una relación de *Split* de 1/50. La temperatura del inyector y del detector era de 220 $^{\circ}C$ y la del horno de 170 $^{\circ}C$. El tiempo para cada análisis individual fue de 8 minutos. Para la identificación de los picos del cromatograma, se utilizó un extracto de espinaca como patrón ya que sus ácidos grasos son conocidos (figura 4.4.). Se compararon los tiempos de retención de los picos de las muestras de levaduras con los identificados anteriormente en el patrón.

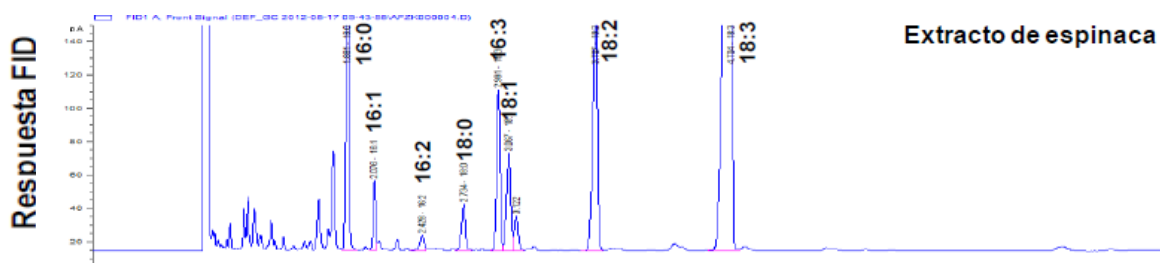


Figura 4.4. Cromatogramas del patrón con composición de ácidos grasos conocida: extracto de espinaca (16:0, 16:1, 16:2, 18:0, 16:3, 18:1, 18:2 y 18:3).

4.5. Procedimientos de análisis y modelado informático

Para el modelado bioinformático se utilizó la herramienta PHYRE2, de acceso gratuito en Internet. Esta herramienta, desarrollada por el Dr. Lawrence Kelley (Imperial College of Science and Technology, Gran Bretaña) y colaboradores (Kelley *et al.*, 2015), modeliza la estructura de una proteína a partir del análisis de 10 millones de secuencias de proteínas mediante un PSI blast. Posteriormente, una vez detectado al mayor grado de homología, analiza el banco de datos de estructuras de proteínas en el que selecciona de entre las 65.000 existentes, aquella que presenta un mayor grado de certidumbre con respecto a la proteína utilizada. El algoritmo de análisis proporciona además información del efecto que tendría sobre la estructura de cada residuo su alteración por cada uno de los veinte aminoácidos que aparecen en las proteínas.

La aplicación informática utilizada para la visualización de las estructuras tridimensionales de proteínas a partir de archivos de coordenadas moleculares, fue JSmol, una versión HTML5 del programa Jmol que puede utilizarse en dispositivos que no poseen Java (<http://www.jmol.org/>).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Modelado informático de la desaturasa FAD3

El modelado informático de la desaturasa FAD3 se realizó por medio del servidor PHYRE2 a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Para comprender los resultados obtenidos por este proceso es necesario conocer el funcionamiento del mismo.

En primer lugar, el servidor realiza una predicción para la posición de cada aminoácido basándose en una gran cantidad de proteínas con cierto grado de homología. En este paso se hace también una predicción de la estructura secundaria más probable. A continuación, este primer modelo es alineado con proteínas homólogas de estructura conocida para generar un modelo inicial que no incluye las cadenas laterales de los aminoácidos y que puede presentar inserciones y deleciones. Estas inserciones y deleciones se completan mediante un análisis comparativo con una librería de fragmentos proteicos y posteriormente se añaden las cadenas laterales al modelo.

En nuestro caso la proteína FAD3 se modeló en base a la estructura de la acil-CoA desaturasa 1 humana. En la figura 5.1 podemos ver las tres proteínas con mayor grado de homología frente a la predicción inicial de nuestra proteína. (Fragmento del Anexo 1).

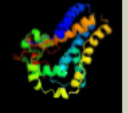
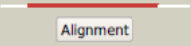
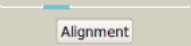
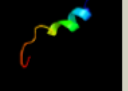
#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% Id.	Template Information
1	c4zvoA	 Alignment		99.8	13	PDB header: oxidoreductase Chain: A: PDB Molecule: acyl-coa desaturase; PDBTitle: crystal structure of human integral membrane stearyl-coa desaturase2 with substrate
2	c4ymkA	 Alignment		99.5	14	PDB header: oxidoreductase Chain: A: PDB Molecule: acyl-coa desaturase 1; PDBTitle: crystal structure of stearyl-coenzyme a desaturase 1
3	c3u1nC	 Alignment		39.5	53	PDB header: hydrolase Chain: C: PDB Molecule: sam domain and hd domain-containing protein 1; PDBTitle: structure of the catalytic core of human samhd1

Figura 5.1. Alineamiento del modelo prededido para FAD3 con las 3 proteínas que presentan mayor homología. De izquierda a derecha: Nombre de la proteína homóloga, amplitud del alineamiento (resaltada en rojo la fracción de nuestra secuencia alineada), modelo 3D de la proteína homóloga, confianza del ajuste, grado de identidad entre las proteínas (residuos iguales) e información de la proteína homóloga.

La confianza del ajuste, de casi el 100%, nos indica la buena calidad del modelo obtenido para nuestra proteína. La identidad del 13% entre las dos secuencias demuestra que los aminoácidos aunque distintos en gran medida, tienden a formar estructuras similares lo cual encaja con el hecho de que las dos proteínas sean desaturasas. La amplitud del alineamiento nos indica que el 63% de nuestra proteína ha sido modelada, lo cual es un porcentaje alto teniendo en cuenta la confianza del 99,8%.

El modelo final para nuestra proteína (figura 5.2) puede ser visualizado con JSmol.

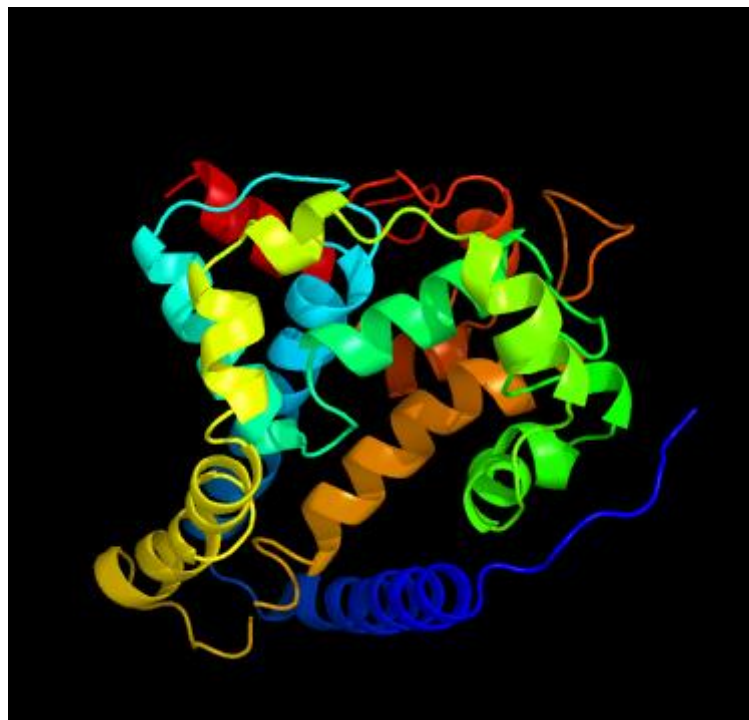


Figura 5.2. Modelo tridimensional teórico de FAD3 obtenido mediante el servidor PHYRE2.

Se pueden observar en el modelo, cuatro grandes hélices α que pueden corresponder con las cuatro hélices α transmembrana que generalmente se proponen para las desaturasas transmembrana. En la parte superior del modelo observamos dos hélices α de menor tamaño, que junto con otros giros, forman una especie de bolsillo que podría conformar el lado citoplasmático de la proteína.

5.2 Análisis estructura-función de la desaturasa FAD3

A la hora de analizar nuestro modelo, es muy importante tener siempre en cuenta que estamos ante un modelo teórico, diseñado a partir de una proteína humana que pese a

sus similitudes con FAD3 tales como en el número de hélices α o la presencia de tres cajas de histidina importantes para su función en su secuencia de aminoácidos, es una proteína soluble mientras que FAD3 es una proteína transmembrana.

Como hemos comentado en el apartado anterior, el modelo teórico de nuestra proteína apunta hacia la existencia de dos partes diferenciadas en la enzima FAD3, una parte transmembrana compuesta por cuatro hélices α , y una parte citoplasmática en la que se puede observar un bolsillo en la estructura formado por hélices α de menor tamaño y pequeños giros. Esto podría llevar a pensar en la correspondencia de este bolsillo (figura 5.3) con el centro activo de la proteína, formando una hendidura hidrofóbica en la parte citoplasmática de la enzima donde los ácidos grasos llegarían para desaturarse.

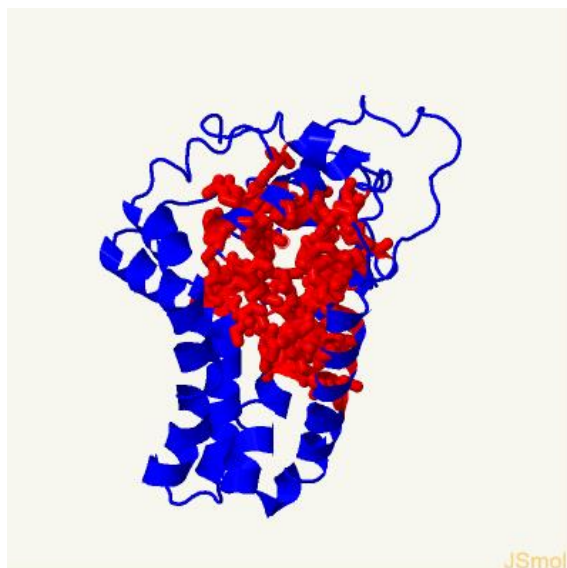


Figura 5.3. Modelo tridimensional teórico de FAD3 obtenido mediante el servidor PHYRE2 y visualizado a través de la aplicación JSmol. Resaltado en rojo se encuentra el bolsillo hidrofóbico propuesto.

La presencia en esta zona de las tres cajas de histidina conservadas evolutivamente en todas las desaturasas de membrana, las cuales son las responsables de la coordinación de los átomos de hierro necesarios para catalizar la reacción de desaturación, apoya la hipótesis de que esta zona corresponda con el sitio activo de la proteína.

Los datos funcionales de la proteína en planta reflejaban una pérdida de la función de la proteína FAD3 en el mutante *fad3-2 fad7-2 fad8-1*. Este mutante posee un cambio en la posición 103 de cisteína a tirosina. Esta posición se encuentra dentro de una de las cajas

de histidina y se encuentra dentro de la zona propuesta como centro activo en nuestro modelo (figura 5.4)

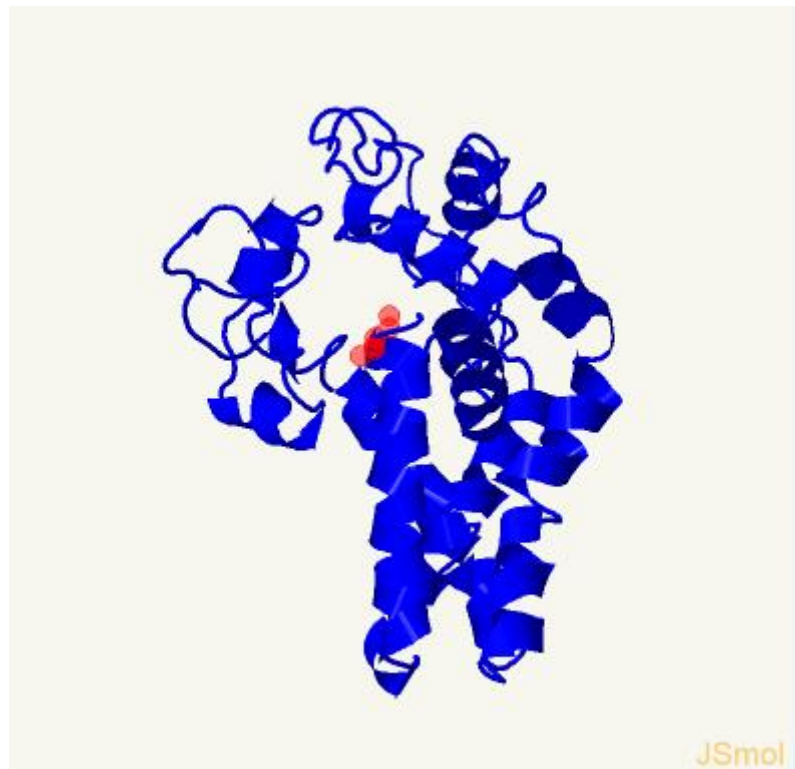


Figura 5.4. Modelo tridimensional teórico de FAD3 obtenido mediante el servidor PHYRE2 y visualizado a través de la aplicación JSmol. Resaltado en rojo se la posición 103 en la cadena de aminoácidos de la proteína.

El análisis del efecto de mutaciones realizado por PHYRE2 para esta posición (figura 5.5), indica que la cisteína es el residuo más apropiado para esta posición en la secuencia y que su cambio por otro aminoácido tiene en la mayoría de los casos (entre los que se encuentra el cambio por tirosina) un gran efecto sobre la estructura de la proteína. Este hecho es lógico si tomamos este residuo como uno importante dentro del sitio activo de la proteína. Además el cambio de una cisteína podría desestabilizar puentes disulfuro que mantengan la estructura de esta zona.

Residue: CYS 103

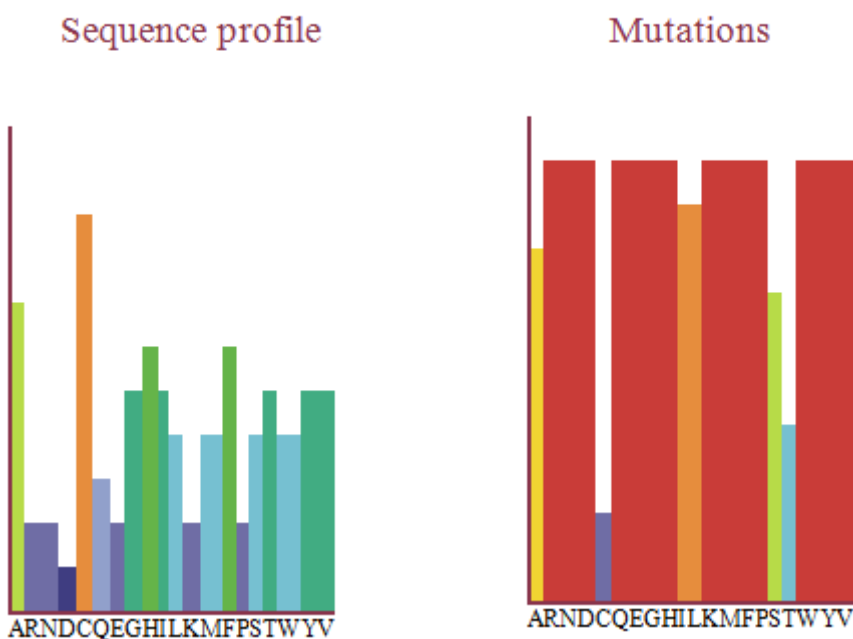


Figura 5.5. Análisis del efecto de mutaciones en la posición 103 de nuestro modelo realizado por PHYRE2. A la izquierda: preferencia de los veinte aminoácidos para esta posición de la proteína. A la derecha: magnitud del efecto que tendría sobre la estructura el cambio de cisteína por otro aminoácido.

Por otro lado, el análisis funcional en planta mostraba una disminución de la actividad FAD3 en el mutante *fad3-1*, pero no la desaparición de esta. Este mutante tenía un cambio en la posición 292 de glicina a glutámico. Esta posición se encuentra según nuestro modelo (figura 5.6) en la propuesta como parte citoplasmática, pero en la parte más externa del bolsillo propuesto como centro activo. Es lógico pues, que una mutación en esta posición de la proteína no cause una pérdida total de función debido a estar fuera del centro activo, pero que si provoque una disminución de esta al desestabilizar la estructura cercana al propuesto como centro activo.

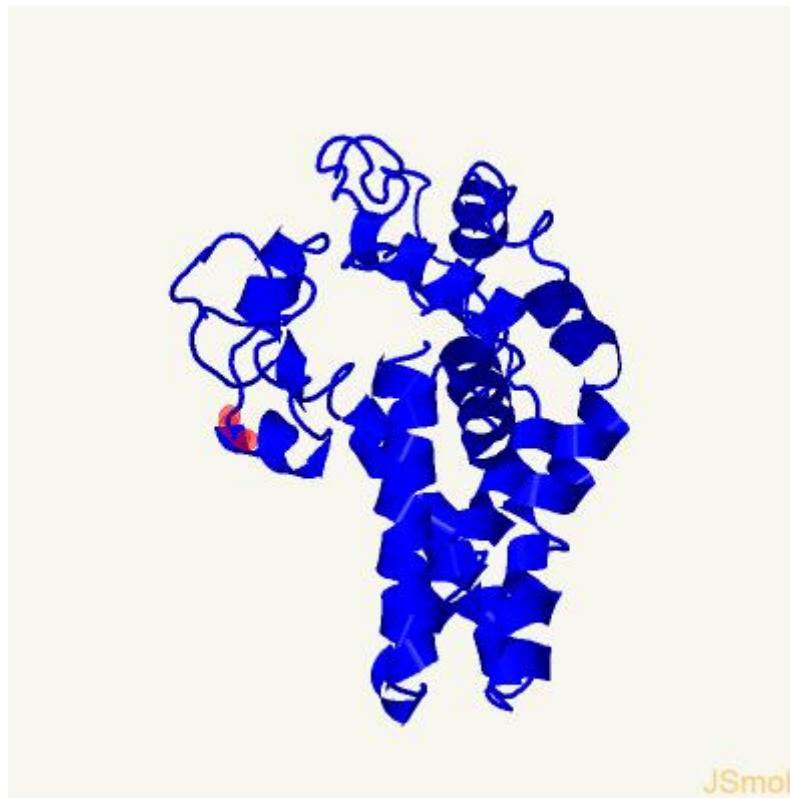


Figura 5.6. Modelo tridimensional teórico de FAD3 obtenido mediante el servidor PHYRE2 y visualizado a través de la aplicación JSmol. Resaltado en rojo se la posición 292 en la cadena de aminoácidos de la proteína.

El análisis del efecto de mutaciones en esta posición (figura 5.7) muestra que la glicina es, de nuevo, el aminoácido más adecuado para esta posición. Sin embargo la diferencia con el resto de aminoácidos no es tan grande como en el caso de la cisteína en la posición 103. Además el cambio de este aminoácido por otro, tiene unos efectos sobre la estructura de la proteína considerablemente menores que en el caso de la C103, apoyando la suposición de estar fuera del centro activo aunque cercano a él. Entre los aminoácidos que causarían un mayor cambio sobre la proteína en esta posición se encuentra el glutámico lo cual puede explicarse por la con la diferencia de tamaño entre la glicina y el glutámico.

Residue: GLY 292

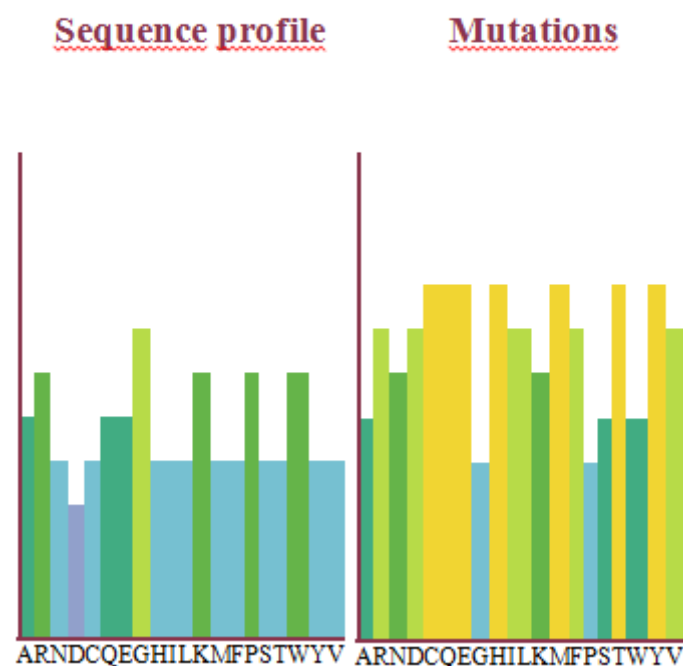


Figura 5.7. Análisis del efecto de mutaciones en la posición 292 de nuestro modelo realizado por PHYRE2. A la izquierda: preferencia de los veinte aminoácidos para esta posición de la proteína. A la derecha: magnitud del efecto que tendría sobre la estructura el cambio de glicina por otro aminoácido.

Este modelo y posterior análisis es una predicción teórica, sin embargo, está basada en datos funcionales obtenidos en planta, lo que nos lleva a pensar que la C103 tiene un papel clave en la conformación del sitio activo de la ω -3 desaturasa reticular FAD3. Esta C103, está situada en el centro activo, hacia el interior del bolsillo hidrofóbico, donde se encuentran las tres cajas de histidina conservadas evolutivamente en todas las desaturasas de membrana.

5.3. Clonaje del gen *AtFAD3* en el vector de expresión en levaduras pYES2

Las levaduras pueden utilizarse como sistema de expresión heterólogo para estudiar los parámetros enzimáticos de las ω 6 y ω 3 desaturasas del retículo endoplásmico de plantas, FAD2 y FAD3, ya que en las levaduras disponen del donador de electrones, el

citocromo b_5 y poder reductor en forma de NADH para llevar a cabo la reacción de desaturación en presencia del sustrato adecuado, 18:2 o 18:3, que se suministra en el medio de cultivo y debe ser incorporado por la propia levadura. Al carecer las levaduras de 18:2 y 18:3, un simple análisis de ácidos grasos permite determinar la actividad de éstos enzimas.

Para poder determinar la actividad de la proteína FAD3 se utilizó el vector pYES2, con un promotor inducible por galactosa, con el objeto de incrementar los niveles de proteína y poder así determinar de forma óptima su actividad.

El material de partida fue el vector pYES2 (de origen comercial) y distintos extractos de ADN plasmídico de *E.coli* que contenían el vector pGEM-T Easy en el que previamente se había clonado el gen *AtFAD3* de las líneas vegetales Col-0 (Wild Type), *fad3* (mutante simple *fad3-1*) y TM (mutante triple *fad3-2*, *fad7-2*, *fad8-1*) (Pastor, 2015).

Ambos vectores fueron transformados en *E.coli* para posteriormente, realizar una extracción de ADN plasmídico con el objetivo de disponer de una cantidad suficiente de estos vectores. Ambos vectores se digirieron con las enzimas *BamHI* y *XhoI* con distinto objetivo. El vector pGEM-T Easy se digirió con el objetivo de obtener el fragmento que contenía el gen *AtFAD3*, el cual se encontraba flanqueado por estos sitios de restricción, mientras que el vector pYES2 se digirió con el objetivo de provocar cortes en su sitio de clonaje múltiple que permitieran más adelante el clonaje de los genes *AtFAD3*.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de ambas digestiones. Se observaron dos bandas mayoritarias en la digestión del vector pGEM-T Easy, una de 3000 pb (pares de bases) que corresponde con el vector pGEM-T Easy y una de algo más de 1000 pb que corresponde con el gen *AtFAD3* (1200pb) (figura 5.8 A). En la digestión del vector pYES2 sólo se observó una banda con un tamaño mayor de 5000 pb que corresponde con el plásmido (figura 5.8 B).

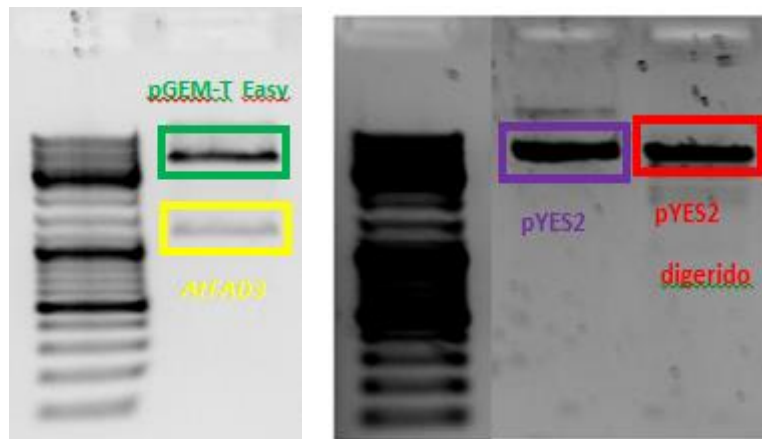


Figura 5.8. Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones enzimáticas de los vectores pGEM-T Easy(A) y pYES2(B). A: Resaltado en verde se observa el vector pGEM-T Easy y en amarillo el gen *AtFAD3* de la línea vegetal *fad3*. B: Resaltado en morado se observa el vector pYES2 y en rojo el vector pYES2 digerido

La banda conteniendo el gen *AtFAD3* fue cortada con bisturí y se purificó su ADN. Se realizó una comprobación en un gel de agarosa con objetivo de asegurar la presencia del gen (figura 5.9).

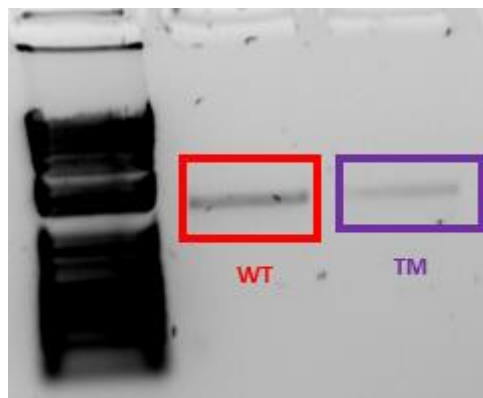


Figura 5.9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos purificados de las digestiones enzimáticas. Resaltado en rojo se observa el gen *AtFAD3* de la línea vegetal Wild Type y en morado el gen *AtFAD3* de la línea vegetal TM (*fad3-2*, *fad7-2*, *fad8-1*).

Una vez obtenidos los genes *AtFAD3* de las tres líneas vegetales se procedió a su ligación con el vector pYES2, esta ligación es posible gracias a que ambos fragmentos

de ADN presentan extremos cohesivos al haber sido digeridos previamente con las mismas enzimas de restricción.

Se transformó *E.coli* con estas ligaciones y, tras obtener colonias transformantes que crecieron en el medio selectivo, se extrajo su ADN plasmídico. A continuación, se realizó una nueva digestión enzimática con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I, para comprobar la presencia del gen clonado en el vector pYES2. Como se observa en la figura 5.10, las bandas que aparecieron tras una electroforesis de las muestras digeridas corresponden con las de pYES2 (5000 pb) y *AtFAD3* (1200 pb).



Figura 5.10. Electroforesis en gel de agarosa del ADN plasmídico de distintas colonias transformantes de *E.Coli* tras una digestión enzimática con *Bam*HI y *Xho*I. La banda superior contiene el vector pYES2 y la inferior (resaltada en verde) el gen *AtFAD3* de la línea vegetal *fad3-1*.

Una vez clonado el gen *AtFAD3* de las tres líneas vegetales en el vector pYES2 se llevaron a cabo distintas acciones. En primer lugar, las distintas cepas de *E.coli* generadas se crecieron en medio líquido y un volumen de cada cultivo se mezcló con glicerol para su conservación a largo plazo.

Se realizó una medida de la concentración de las distintas muestras de ADN plasmídico conteniendo el vector pYES2 (Tabla 5.1), las concentraciones fueron adecuadas considerando una concentración adecuada en torno a los 200 ng/μl.

Muestra	pYES2	pYES2 Col-0	pYES2 <i>fad3</i>	pYES2 TM
ng/μl	180	427	394	464

Tabla 5.1. Concentración de las muestras de ADN plasmídico pYES2, pYES2 Col-0(WT), pYES2 *fad3* (*fad3-1*) y pYES2 TM (*fad3-2*, *fad7-2*, *fad8-1*).

Además, estas muestras fueron secuenciadas para asegurar la presencia de las mutaciones en los genes *AtFAD3* clonados en el vector pYES2. Se comprobó la presencia del gen *AtFAD3* en los 3 plásmidos construidos, así como la presencia de las mutaciones C103Y en el plásmido que contenía el gen de la línea *fad3-2*, *fad7-2*, *fad8-1* y la mutación G292E en el plásmido que contenía el gen de la línea *fad3-1* (figura 5.11).

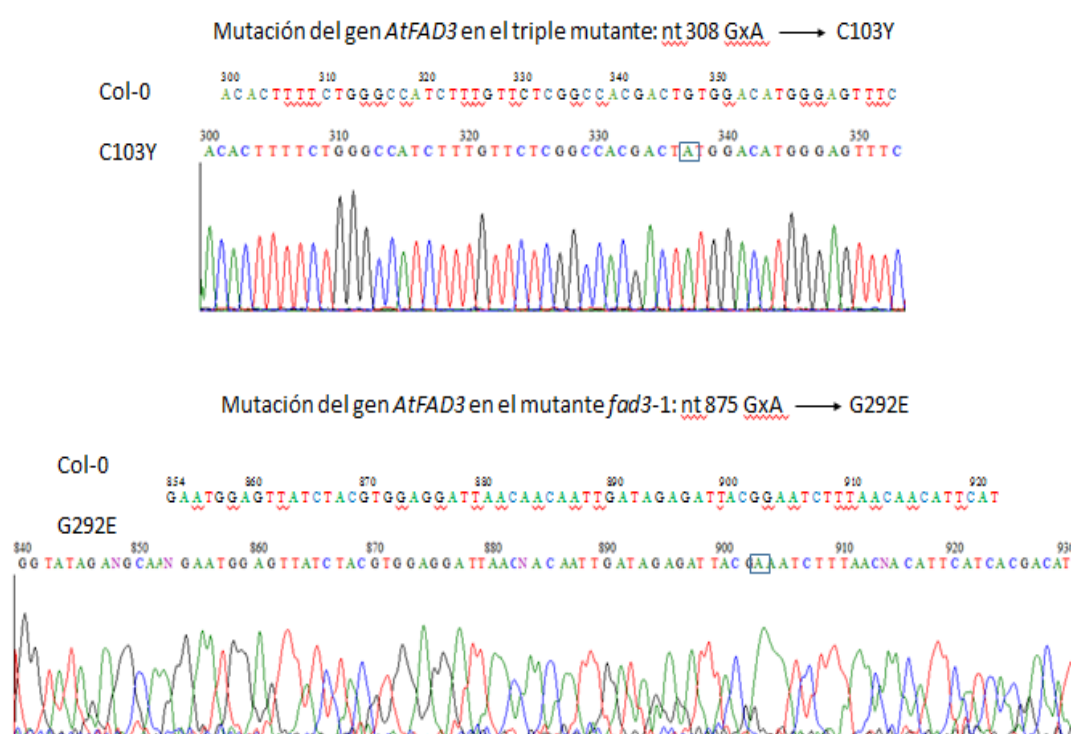


Figura 5.11. Imagen tomada de la secuencia obtenida de nuestras muestras conteniendo los plásmidos pYES2 previamente construidos. Recuadradas en negro se encuentran las mutaciones C103Y y G292E de los genes *AtFAD3* de las líneas vegetales *fad3-2*, *fad7-2*, *fad8-1* y *fad3-1* respectivamente.

5.4. Transformación de *S. cerevisiae* con el vector pYES2 conteniendo el gen *AtFAD3*

Se transformó la cepa UTL-7A de *S. cerevisiae* con los plásmidos pYES2 conteniendo el gen *AtFAD3* y con el plásmido pYES2 sin modificar. Las cepas transformadas con pYES2 permitieron tener un control de los procesos posteriores al poder evaluar el comportamiento de la levadura sin el gen *AtFAD3*.

Tras la transformación se obtuvieron colonias de *S. cerevisiae* en el medio selectivo SD-Ura, lo que indicaba la correcta incorporación del plásmido en la levadura, pero cabe destacar que estas colonias tenían una coloración rojiza (figura 5.12 A).

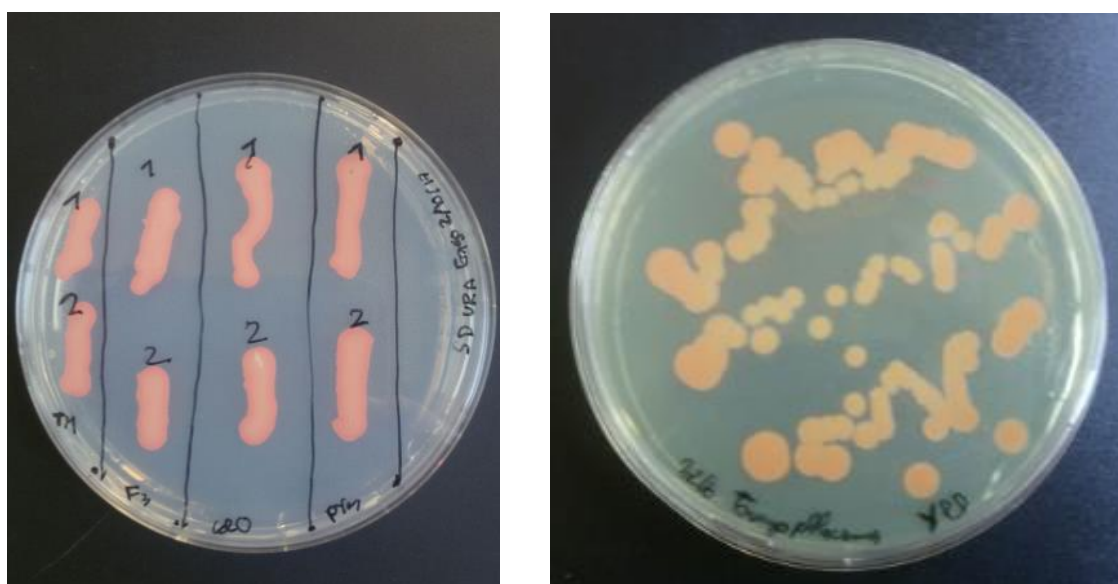


Figura 5.12. A: Cultivo sólido de *S.cerevisiae* transformadas con los distintos vectores pYES2. B: Ensayo de poblaciones.

Con el objetivo de comprobar si la coloración rojiza de las colonias era debida a una contaminación por alguna bacteria que estuviera creciendo en el medio SD-Ura, se sembró en una placa del medio rico YPD una cantidad mínima de cultivo líquido de *S.cerevisiae* transformada, en lo que se denominó como “ensayo de poblaciones”. Si se obtenían colonias tanto blancas como rojas, sabríamos que una bacteria de coloración roja estaba contaminando nuestra muestra, sin embargo todas las colonias tenían una coloración rojiza (figura 5.12 B).

La influencia del gen *AtFAD3* en este fenómeno fue descartado debido a que las levaduras transformadas con el vector pYES2 sin modificar también presentaban esta coloración. La influencia del medio de cultivo también fue descartada debido a que las levaduras transformantes presentaban la pigmentación roja tanto en el medio YPD como en SD-Ura.

La coloración roja es un fenómeno llamativo pero no necesariamente perjudicial para nuestro ensayo. Se ha descrito una mutación en el gen *ADE2* de *S. cerevisiae*, implicado en la ruta de producción de adenina, que causa la acumulación de un intermediario que dota de pigmentación roja a las levaduras (Bharathi *et al.*, 2016). Es posible que nuestra cepa inicial UTL-7A haya sufrido alguna mutación que produzca que durante el proceso de transformación, exprese este intermediario rojizo.

Para comprobar la presencia del gen *AtFAD3* en las levaduras transformantes se realizó una PCR en colonia de las distintas colonias obtenidas. Los cebadores utilizados para esta amplificación fueron los que se usaron para clonar los genes *AtFAD3* en el vector pGEM-T Easy en un trabajo anterior (Pastor, 2015). Los resultados de esta amplificación (figura 5.13) fueron positivos, asegurando la presencia del gen *AtFAD3* de las tres líneas vegetales en *S. cerevisiae* y la ausencia del mismo en las cepas transformadas con el vector pYES2 vacío.

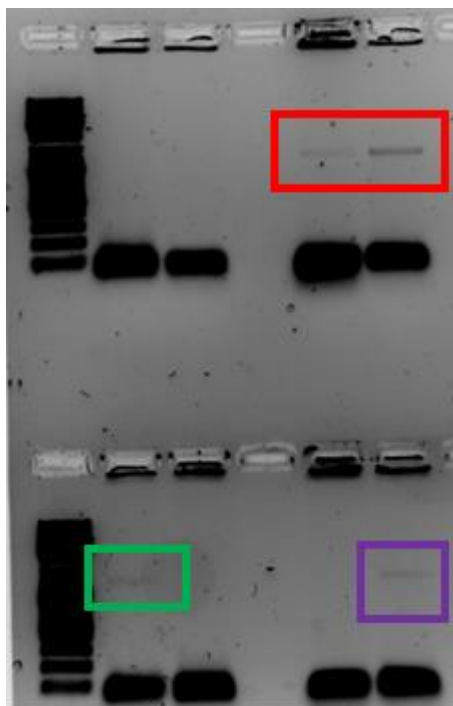


Figura 5.13. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR en colonia de *S. cerevisiae* transformantes. Arriba a la izquierda: producto de la amplificación de colonias transformadas con el vector pYES2 vacío. Arriba a la derecha: producto de la amplificación de colonias transformadas con el vector pYES2 conteniendo el gen AtFAD3 de la línea vegetal Col-0 (Wild-type), con las bandas correspondientes a los genes resaltadas en rojo. Abajo a la izquierda: producto de la amplificación de colonias transformadas con el vector pYES2 conteniendo el gen AtFAD3 de la línea vegetal *fad3* (*fad3-1*), con la banda correspondiente al gen resaltada en verde. Abajo a la derecha: producto de la amplificación de colonias transformadas con el vector pYES2 conteniendo el gen AtFAD3 de la línea vegetal TM (*fad3-2*, *fad7-2*, *fad8-1*), con la banda correspondiente al gen resaltada en morado.

5.5. Ensayo piloto de la inducción de la actividad FAD3 y análisis de ácidos grasos

Se indujo la actividad del gen *AtFAD3* de las distintas cepas de levadura transformantes en un ensayo piloto en el que se suplementó el medio SD-URA con galactosa, para inducir la actividad del promotor *GAL1*, y ácido linoleico (18:2), para dotar a las levaduras del sustrato necesario para la producción de ácido linolénico (18:3) gracias a la actividad FAD3. Tras la inducción con 2% (p/v) galactosa, las células se centrifugaron y se procedió al análisis de ácidos grasos.

Los ácidos grasos se transformaron en sus ésteres metílicos y se extrajeron de las distintas cepas de levadura para posteriormente, ser analizados mediante cromatografía gas-líquido. Los resultados se muestran en la tabla 5.2.

	% 14	% 16:0	% 16:1	% 17:0	% 17:1	% 18:0	% 18:1	% 18:2	% 18:3
pYES2	0,37	14,48	1,26	0,12	0,51	1,33	59,51	19,91	2,52
pYES2 Col-0	0,36	14,2	1,35	0,1	0,37	0,76	60,77	19,53	2,56
pYES2 TM	0,42	15	1,47	0,1	0,41	0,7	60,45	18,67	2,76
pYES2 <i>fad3</i>	0,4	14,71	1,4	0,11	0,39	0,84	62,48	17,15	2,51

Tabla 5.2. Resultados del análisis de la composición de ácidos grasos, expresados en % de ácido graso, de las cepas de *S. cerevisiae* transformadas con los vectores PYES2 silvestre y conteniendo el gen *AtFAD3* de las líneas vegetales Col-0(WT), *fad3* (*fad3-1*) y TM (*fad3-2*, *fad7-2*, *fad8-1*).

En primer lugar observamos que el ácido graso más abundante es el 18:1, con un porcentaje alrededor del 60% en todas las muestras. Este ácido graso se encuentra en levaduras pero no en cantidades tan altas. Observamos presencia de 18:2, el ácido graso que se añadió al medio de cultivo como sustrato, pero en un porcentaje menor, en torno al 18-19%. Curiosamente, observamos presencia de 18:3, el ácido graso indicador de la actividad FAD3, pero este se encuentra en todas las muestras, incluyendo la resultante del vector pYES2 vacío y que no debería mostrar actividad.

La elevada cantidad de 18:1 sugiere que se ha podido producir la incorporación del 18:2 de forma exitosa a la levadura, pero que posteriormente se ha producido una oxidación del 18:2 añadido en alguna de las etapas del proceso. La presencia de 18:3 en todas las muestras hace pensar en la posibilidad de que se haya detectado un producto inespecífico de la levadura o bien algún producto derivado del 18:2 con un tiempo de retención similar al 18:3 del patrón utilizado.

Con el objetivo de intentar aclarar estas dudas, se repitió el ensayo piloto, esta vez añadiendo 3 µg ml⁻¹ del antioxidante BHT (utilizado en los análisis de ácidos grasos

vegetales) a la mezcla de metilar y utilizando 18:2 comercial nuevo. Este ensayo se realizó solamente sobre las cepas que contenían el vector pYES2 vacío y el vector pYES2 con el gen *AtFAD3* Wild-Type. Los resultados se muestran en la tabla 5.3.

	% 14	% 16:0	% 16:1	% 17:0	% 17:1	% 18:0	% 18:1	% 18:2	% 18:3
pYES2	0,32	14,61	0,73	0,16	0,29	0,47	54,05	27,83	1,53
pYES2 Col-0	0,39	15,03	0,36	0,35	0,34	0,74	48,28	32,38	2,14

Tabla 5.3. Resultados del análisis de la composición de ácidos grasos, expresados en % de ácido graso, de las cepas de *S. cerevisiae* transformadas con los vectores PYES2 silvestre y pYES2 conteniendo el gen *AtFAD3* de la línea vegetal Col-0(WT).

Los resultados fueron similares. De nuevo se detectó el 18:1 como ácido graso mayoritario (50%). Sin embargo merece la pena comentar el incremento de 18:2 acompañado de la disminución de 18:1 en ambas muestras respecto al análisis anterior. Este hecho sugiere una posible disminución de la oxidación del 18:2 añadido debido a la incorporación de BHT, que aun así parece seguir produciéndose. Esto indica la necesidad de revisar el protocolo para el análisis de ácidos grasos en levaduras.

Se volvió a detectar cierta cantidad de 18:3 en ambas muestras, aunque teniendo en cuenta los resultados anteriores, este resultado no permite extraer conclusiones de la actividad.

Por último, cabe señalar que la coloración roja de las levaduras podría ser también causa de estas anomalías en los resultados, afectando de algún modo a la actividad FAD3 o siendo responsable de la aparición de picos anormales en los resultados.

6. CONCLUSIONES

1.- Se ha llevado a cabo un estudio de predicción del plegamiento de la ω 3 desaturasa reticular de membrana FAD3. El estudio estructura-función de distintas mutaciones con efecto en la actividad FAD3 de líneas vegetales mutantes de *Arabidopsis thaliana* sugiere que la C103 es un residuo clave en el plegamiento de la proteína y en la conformación del sitio activo de la enzima. Sin embargo, la G292, no parece formar parte del sitio activo de la enzima según el modelo de plegamiento, lo que sería consistente con que esta mutación tiene efectos menos drásticos que la modificación de la C103.

2.- Se han obtenido cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan las distintas formas de la proteína FAD3 de *Arabidopsis*. Sin embargo, las pruebas piloto para determinar los parámetros enzimáticos de las diferentes formas de FAD3 han sido infructuosas. Los resultados apuntan a un problema derivado de la oxidación del 18:2, sustrato de FAD3, como causa de los problemas observados.

CONCLUSIONS

1.- A study was carried out in order to predict the ω 3 reticular membrane desaturase FAD3 folding. The structure-function study of different mutations with effect on the FAD3 activity of *Arabidopsis thaliana* mutant plant lines suggests that C103 is a key residue in the protein folding and in the formation of the active site of the enzyme. However, G292 does not appear to be part of the active site of the enzyme according to the folding model, which would be consistent with the fact that this mutation has less drastic effects than the modification of C103.

2.- Strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the different forms of the FAD3 protein of *Arabidopsis* have been obtained. However, the pilot tests to determine the enzymatic parameters of the different forms of FAD3 have been unsuccessful. The results point to a problem derived from the oxidation of 18: 2, FAD3 substrate, as the cause of the observed problems.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Andreu V, Lagunas B, Collados R, Picorel R, Alfonso M. 2010. The *Gmfad7* Gene Family from Soybean: Identification of Novel Genes and Tissue-Specific Conformations of the FAD7 Enzyme Involved in Desaturase Activity. *J. Exp.Bot.* 61: 3371-3384.
- Behrouzian B, Buist PH. 2002. Fatty Acid Desaturation: Variations on an Oxidative Theme. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 577-582.
- Benning C. 2009. Mechanisms of Lipid Transport Involved in Organelle Biogenesis in Plant Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25: 71-91.
- Benning C, Ohta H. 2005. Three Enzyme Systems for Galactoglycerolipid Biosynthesis Are Coordinately Regulated in Plants. *J. Biol. Chem.* 280: 2397-2400.
- Bertani G. 1951. Studies on Lysogenesis. I. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia Coli*. *J. Bacteriol.* 62: 293-300.
- Bharathi V, Girdhar A, Prasad A, Verma M, Taneja V, Patel BK. 2016. Use of Ade1 and Ade2 Mutations for Development of a Versatile Red/White Colour Assay of Amyloid-Induced Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 33: 607-620.
- Bonaventure G, Salas JJ, Pollard MR, Ohlrogge JB. 2003. Disruption of the *Fatb* Gene in *Arabidopsis* Demonstrates an Essential Role of Saturated Fatty Acids in Plant Growth. *Plant Cell* 15: 1020-1033.
- Cahoon EB, Shockey JM, Dietrich CR, Gidda SK, Mullen RT, Dyer JM. 2007. Engineering Oilseeds for Sustainable Production of Industrial and Nutritional Feedstocks: Solving Bottlenecks in Fatty Acid Flux. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 10: 236-244.
- Christie WW. 1982. A Simple Procedure for Rapid Transmethylation of Glycerolipids and Cholesteryl Esters. *J. Lipid Res.* 23: 1072-1075.
- Dohmen RJ, Strasser AW, Honer CB, Hollenberg CP. 1991. An Efficient Transformation Procedure Enabling Long-Term Storage of Competent Cells of Various Yeast Genera. *Yeast* 7: 691-692.

- Dyer JM, Mullen RT. 2001. Immunocytochemical Localization of Two Plant Fatty Acid Desaturases in the Endoplasmic Reticulum. *FEBS Lett.* 494: 44-47.
- Guskov A, Kern J, Gabdulkhakov A, Broser M, Zouni A, Saenger W. 2009. Cyanobacterial Photosystem II at 2.9-Å Resolution and the Role of Quinones, Lipids, Channels and Chloride. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 334-342.
- Hazel JR, Williams EE. 1990. The Role of Alterations in Membrane Lipid Composition in Enabling Physiological Adaptation of Organisms to Their Physical Environment. *Prog. Lipid Res.* 29: 167-227.
- Iba K. 2002. Acclimative Response to Temperature Stress in Higher Plants: Approaches of Gene Engineering for Temperature Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 225-245.
- Jaworski J, Cahoon EB. 2003. Industrial Oils from Transgenic Plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 178-184.
- Jmol: un visor Java de código abierto para estructuras químicas en tres dimensiones. <http://www.jmol.org/>
- Jones MR. 2007. Lipids in Photosynthetic Reaction Centres: Structural Roles and Functional Holes. *Prog. Lipid Res.* 46: 56-87.
- Kajiwarra S, Shirai A, Fujii T, Toguri T, Nakamura K, Ohtaguchi K. 1996. Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of Ethanol Tolerance and the FAD2 Gene from *Arabidopsis Thaliana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4309-4313.
- Kargiotidou A, Deli D, Galanopoulou D, Tsaftaris A, Farmaki T. 2008. Low Temperature and Light Regulate Delta 12 Fatty Acid Desaturases (FAD2) at a Transcriptional Level in Cotton (*Gossypium hirsutum*). *J. Exp. Bot.* 59: 2043-2056.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. 2015. The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis. *Nat. Protoc.* 10: 845-858.
- Kinney AJ, Cahoon EB, Hitz WD. 2002. Manipulating Desaturase Activities in Transgenic Crop Plants. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 1099-1103.

- Kjellberg JM, Trimbom M, Andersson M, Sandelius AS. 2000. Acyl-CoA Dependent Acylation of Phospholipids in the Chloroplast Envelope. *Biochim. Biophys. Acta* 31: 2-3.
- Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson M.X, Arondel V, Bates P.D, Baud S, Bird D, Debono A, Durrett T.P, Franke R.B, Graham I.A, Katayama K, Kelly A.A, Larson T, Markham J.E, Miquel M, Molina I, Nishida I, Rowland O, Samuels L, Schmid K.M, Wada H, Welti R, Xu C, Zallot R y Ohlrogge J. 2013. Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book*, 11: 161.
- Lindqvist Y, Huang W, Schneider G, Shanklin J. 1996. Crystal Structure of Delta9 Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase from Castor Seed and Its Relationship to Other Di-Iron Proteins. *Embo J.* 15: 4081-4092.
- Los DA, Murata N. 1998. Structure and Expression of Fatty Acid Desaturases. *Biochim. Biophys. Acta* 2: 3-15.
- McKeon TA, Stumpf PK. 1982. Purification and Characterization of the Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase and the Acyl-Acyl Carrier Protein Thioesterase from Maturing Seeds of Safflower. *J. Biol. Chem.* 257: 12141-12147.
- Ohlrogge JB, Browse J, Somerville CR. 1991. The Genetics of Plant Lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 26: 1-26.
- Pastor P. 2015. Efecto de mutaciones genéticas puntuales en la actividad enzimática de FAD3, una enzima implicada en la producción de ácidos grasos $\omega 3$ (Trabajo fin de grado). Estación Experimental Aula Dei, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Zaragoza.
- Román A, Andreu V, Hernandez ML, Lagunas B, Picorel R, Martinez-Rivas JM, Alfonso M. 2012. Contribution of the Different Omega-3 Fatty Acid Desaturase Genes to the Cold Response in Soybean. *J. Exp. Bot.* 63: 4973-4982.
- Román A. 2014. Análisis comparado de los mecanismos moleculares de respuesta a la temperatura de las $\omega 3$ desaturasas en *Glycine max* y *Arabidopsis thaliana* (Tesis doctoral). Estación Experimental Aula Dei, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Zaragoza.
- Shanklin J, Cahoon EB. 1998. Desaturation and Related Modifications of Fatty Acids¹. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 611-641.

-Somerville C, Browse J. 1991. Plant Lipids: Metabolism, Mutants, and Membranes. *Science* 252: 80-87.

-Somerville C., Browse J., Jaworski J.G. y Ohlrogge J.B. 2000. Plant Growth Regulation. Buchanan B.B., Gruissem W. y Jones R. Shewry, P. American Society of Plant Physiology. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 35 (1): 105-106.

-Stubbs CD, Smith AD. 1984. The Modification of Mammalian Membrane Polyunsaturated Fatty Acid Composition in Relation to Membrane Fluidity and Function. *Biochim. Biophys. Acta* 779: 89-137.

-Suzuki K, et al. 2016. In Vivo Genome Editing Via Crispr/Cas9 Mediated Homology-Independent Targeted Integration. *Nature* 540: 144-149.

-Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. 2004. Role of Plant Heat-Shock Proteins and Molecular Chaperones in the Abiotic Stress Response. *Trends Plant Sci.* 9: 244-252.

-Xu C, Yu B, Cornish AJ, Froehlich JE, Benning C. 2006. Phosphatidylglycerol Biosynthesis in Chloroplasts of Arabidopsis Mutants Deficient in Acyl-Acp Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase. *Plant J.* 47: 296-309.

-Yurchenko O, Shockey JM, Gidda SK, Silver MI, Chapman KD, Mullen RT, Dyer JM. 2017. Engineering the Production of Conjugated Fatty Acids in Arabidopsis Thaliana Leaves. *Plant Biotechnol. J* 15: 1010-1023.

-Zhu LH, et al. 2016. Dedicated Industrial Oilseed Crops as Metabolic Engineering Platforms for Sustainable Industrial Feedstock Production. *Sci Rep* 6.

8. ANEXOS

8.1 Reporte de homología del servidor PHYRE2

Phyre²

Email

alfonso@eead.csic.es

Description

Undefined

Date

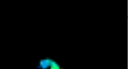
Fri Mar 31 11:13:50 BST 2017

Unique Job ID

50184a15b3ed05d7

Detailed template information

#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% Id.	Template Information
1	c4zyoA	Alignment		99.8	13	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: acyl-coa desaturase; PDBTitle: crystal structure of human integral membrane stearyl-coa desaturase2 with substrate
2	c4ymkA	Alignment		99.5	14	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: acyl-coa desaturase 1; PDBTitle: crystal structure of stearyl-coenzyme a desaturase 1
3	c3u1nC	Alignment		39.5	53	PDB header: hydrolase Chain: C; PDB Molecule: sam domain and hd domain-containing protein 1; PDBTitle: structure of the catalytic core of human samhd1
4	c2dqbB	Alignment		36.5	35	PDB header: hydrolase, dna binding protein Chain: B; PDB Molecule: deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase, putative; PDBTitle: crystal structure of dntp triphosphohydrolase from thermus2 thermophilus hb8, which is homologous to dgtp triphosphohydrolase
5	c3c37B	Alignment		36.1	44	PDB header: hydrolase Chain: B; PDB Molecule: peptidase, m48 family; PDBTitle: x-ray structure of the putative zn-dependent peptidase q74d82 at the2 resolution 1.7 a. northeast structural genomics consortium target3 gsr143a
6	c4bcbB	Alignment		34.3	41	PDB header: hydrolase Chain: B; PDB Molecule: deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase samhd1; PDBTitle: crystal structure of the tetrameric dgtp-bound samhd12 mutant catalytic core
7	c2o6iA	Alignment		33.1	41	PDB header: hydrolase Chain: A; PDB Molecule: hd domain protein; PDBTitle: structure of an enterococcus faecalis hd domain phosphohydrolase
8	d2o6ia1	Alignment		33.1	41	Fold: HD-domain/PDEase-like Superfamily: HD-domain/PDEase-like Family: HD domain
9	c5ao4D	Alignment		31.9	56	PDB header: hydrolase Chain: D; PDB Molecule: deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase samhd1; PDBTitle: crystal structure of in vitro phosphorylated human samhd12 (amino acid residues 115-626) bound to gtp
10	c2o14A	Alignment		29.1	47	PDB header: hydrolase Chain: A; PDB Molecule: phosphohydrolase; PDBTitle: crystal structure of phosphohydrolase (bt4208) from bacteroides2 thetaiotaomicron vpi-5482 at 2.20 a resolution
11	d2heka1	Alignment		29.1	37	Fold: HD-domain/PDEase-like Superfamily: HD-domain/PDEase-like Family: HD domain

12	c5e3xA	Alignment		28.3	27	PDB header: hydrolase Chain: A; PDB Molecule: thermostable carboxypeptidase 1; PDBTitle: crystal structure of thermostable carboxypeptidase (fiscp) from <i>ferrobacterium islandicum</i> aw-1
13	c3cqbB	Alignment		24.3	44	PDB header: hydrolase Chain: B; PDB Molecule: probable protease htpx homolog; PDBTitle: crystal structure of heat shock protein htpx domain from <i>vibrio parahaemolyticus</i> rind 2210633
14	c3pz7A	Alignment		21.5	28	PDB header: signaling protein Chain: A; PDB Molecule: dixin; PDBTitle: crystal structure of ccd1-dlx domain
15	d1oqha	Alignment		21.2	17	Fold: E2 regulatory, transactivation domain Superfamily: E2 regulatory, transactivation domain Family: E2 regulatory, transactivation domain
16	c5mc9C	Alignment		20.8	31	PDB header: cell adhesion Chain: C; PDB Molecule: laminin subunit gamma-1; PDBTitle: crystal structure of the heterotrimeric integrin-binding region of laminin-111
17	c3hq2A	Alignment		20.6	35	PDB header: hydrolase Chain: A; PDB Molecule: bacillus subtilis m32 carboxypeptidase; PDBTitle: bsucp crystal structure
18	d1kufa	Alignment		20.6	31	Fold: Zincin-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Reprolysin-like
19	d1wnla	Alignment		20.5	31	Fold: Zincin-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Reprolysin-like
20	c2daaA	Alignment		20.0	28	PDB header: structural genomics, unknown function Chain: A; PDB Molecule: klaa0733 protein; PDBTitle: solution structure of the n-terminal cue domain in the2 human mitogen-activated protein kinase kinase kinase 73 interacting protein 2 (map3k7ip2)
21	c3pz8A	Alignment	not modelled	19.8	17	PDB header: signaling protein Chain: A; PDB Molecule: segment polarity protein dishevelled homolog dvl-1; PDBTitle: crystal structure of dvl1-dlx(y17d) mutant
22	c7or4B	Alignment	not modelled	19.4	45	PDB header: hydrolase Chain: B; PDB Molecule: peptidase m3b, oligoendopeptidase f; PDBTitle: crystal structure of oligoendopeptidase-f from <i>enterococcus faecium</i>
23	d1k9xa	Alignment	not modelled	18.5	27	Fold: Zincin-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Neurolysin-like
24	c7hwja1	Alignment	not modelled	18.3	29	Fold: ParB/Sulfiredoxin Superfamily: ParB/Sulfiredoxin Family: Atu1540-like
25	c1agpC	Alignment	not modelled	18.2	33	PDB header: hydrolase Chain: C; PDB Molecule: carboxypeptidase 1; PDBTitle: crystal structure of carboxypeptidase 1 from <i>thermus thermophilus</i>
26	d1maaa	Alignment	not modelled	16.5	23	Fold: Zincin-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Reprolysin-like
27	d1habb	Alignment	not modelled	16.4	16	Fold: E2 regulatory, transactivation domain Superfamily: E2 regulatory, transactivation domain Family: E2 regulatory, transactivation domain
28	c1huaG	Alignment	not modelled	15.1	16	PDB header: replication Chain: G; PDB Molecule: regulatory protein e2; PDBTitle: the x-ray structure of the papillomavirus helicase in2 complex with its molecular matchmaker e2
						Fold: E2 regulatory, transactivation domain

29	d2nnua1	Alignment	not modelled	15.0	13	Superfamily: E2 regulatory, transactivation domain Family: E2 regulatory, transactivation domain
30	dlwspa1	Alignment	not modelled	14.2	7	Fold: beta-Grasp (ubiquitin-like) Superfamily: Ubiquitin-like Family: DIX domain
31	d2l47a1	Alignment	not modelled	13.9	38	Fold: Zinc-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: TNF-alpha converting enzyme, TACE, catalytic domain
32	c2leuA	Alignment	not modelled	13.9	24	PDB header: transcription Chain: A: PDB Molecule: regulatory protein e2; PDBTitle: transcription activator structure reveals redox control of 2 a replication initiation reaction
33	c3dwcA	Alignment	not modelled	13.8	21	PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: metallocarboxypeptidase; PDBTitle: trypanosoma cruzi metallocarboxypeptidase 1
34	c2m7aA	Alignment	not modelled	13.6	26	PDB header: unknown function Chain: A: PDB Molecule: uncharacterized protein; PDBTitle: enteropathogenic escherichia coli 0111:h-str. 11128 orf ec0111 11192 similar to bacteriophage lambda ea8.5
35	dlr6na	Alignment	not modelled	13.4	22	Fold: E2 regulatory, transactivation domain Superfamily: E2 regulatory, transactivation domain Family: E2 regulatory, transactivation domain
36	c3skcA	Alignment	not modelled	13.3	43	PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: putative oligopeptidase f; PDBTitle: crystal structure of a putative oligopeptidase f from bacillus2 anthracis str. ames
37	c4nqC	Alignment	not modelled	12.6	57	PDB header: protein transport Chain: C: PDB Molecule: vps4-associated protein 1; PDBTitle: crystal structure of vps4 mit-vfa1 mim2
38	c4nqD	Alignment	not modelled	12.4	57	PDB header: protein transport Chain: D: PDB Molecule: vps4-associated protein 1; PDBTitle: crystal structure of vps4 mit-vfa1 mim2
39	c5fvcC	Alignment	not modelled	12.4	57	PDB header: hydrolase Chain: C: PDB Molecule: vps4-associated protein 1; PDBTitle: crystal structure of vps4-vfa1 complex from s.cerevisiae at 2.1.66 a resolution.
40	c2l47A	Alignment	not modelled	12.3	38	PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: adam 17; PDBTitle: crystal structure of catalytic domain of tace with inhibitor
41	c4d48B	Alignment	not modelled	11.7	21	PDB header: hydrolase/hydrolase inhibitor Chain: B: PDB Molecule: disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein PDBTitle: adam-8 metalloproteinase domain with bound batimastat
42	c4k90A	Alignment	not modelled	11.0	33	PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: extracellular metalloproteinase mep; PDBTitle: extracellular metalloproteinase from aspergillus
43	c5fvcD	Alignment	not modelled	10.9	57	PDB header: hydrolase Chain: D: PDB Molecule: vps4-associated protein 1; PDBTitle: crystal structure of vps4-vfa1 complex from s.cerevisiae at 2.1.66 a resolution.
44	c3nqaA	Alignment	not modelled	10.9	44	PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: secreted metalloproteinase mcp02; PDBTitle: crystal structure of vibriolysin mcp-02 mature enzyme, a zinc2 metalloproteinase from m4 family
45	dlboba	Alignment	not modelled	10.6	44	Fold: Zinc-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Thermolysin-like
46	dlkpa	Alignment	not modelled	10.6	33	Fold: Zinc-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Thermolysin-like
47	dlu4ga	Alignment	not modelled	10.6	44	Fold: Zinc-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Thermolysin-like
48	c3pobA	Alignment	not modelled	10.5	10	PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: endo-beta-n-acetylglucosaminidase f1; PDBTitle: crystal structure of an endo-beta-n-acetylglucosaminidase (bt 3987)2 from bacteroides thetaotaomicron vpi-5482 at 1.55 a resolution
49	c3d7rB	Alignment	not modelled	10.4	22	PDB header: hydrolase Chain: B: PDB Molecule: esterase; PDBTitle: crystal structure of a putative esterase from staphylococcus aureus
50	dlncra	Alignment	not modelled	10.4	44	Fold: Zinc-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Thermolysin-like
51	c3dtrA	Alignment	not modelled	10.0	26	PDB header: gene regulation Chain: A: PDB Molecule: irre protein; PDBTitle: crystal structure of the irre protein, a central regulator2 of dna damage repair in delnoccaceae
52	c2hu9B	Alignment	not modelled	9.9	10	PDB header: metal transport Chain: B: PDB Molecule: mercuric transport protein periplasmic component; PDBTitle: x-ray structure of the archaeoglobus fulgidus copz n-2 terminal domain
53	clvp1A	Alignment	not modelled	9.5	29	PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: fli; PDBTitle: crystal structure of a non-hemorrhagic fibrin(ogen)olytic2 metalloproteinase from venom of agkistrodon acutus
54	dlalga	Alignment	not modelled	9.4	23	Fold: Zinc-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Reprolysin-like
55	c2vqaA	Alignment	not modelled	9.3	56	PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: metalloproteinase; PDBTitle: precursor of proteolysin, metalloproteinase from

						Serratia2 proteamaculans.
56	c2n64B	Alignment	not modelled	9.0	32	PDB header: ligase Chain: B: PDB Molecule: f-box/wd repeat protein 1a; PDBTitle: d domain of b-trcp
57	d1nd1a	Alignment	not modelled	9.0	29	Fold: Zincin-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Reprolysin-like
58	c2pqsA	Alignment	not modelled	8.8	29	PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: putative deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase; PDBTitle: crystal structure of a putative deoxyguanosinetriphosphate2 triphosphohydrolase from pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448a
59	d1at1a	Alignment	not modelled	8.6	21	Fold: Zincin-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Reprolysin-like
60	c3hg2A	Alignment	not modelled	8.5	35	PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: dgtp triphosphohydrolase; PDBTitle: crystal structure of deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase2 from flavobacterium sp. med217
61	d1kcf1	Alignment	not modelled	8.5	23	Fold: LEM/SAP HeH motif Superfamily: SAP domain Family: SAP domain
62	c2trA	Alignment	not modelled	8.2	39	PDB header: signaling protein, transport protein Chain: A: PDB Molecule: sequestosome-1; PDBTitle: nmr structure of p62 pb1 dimer determined based on pcs
63	c2jp7A	Alignment	not modelled	8.0	21	PDB header: translation Chain: A: PDB Molecule: emna export factor mex57; PDBTitle: nmr structure of the mex57 uba domain
64	c2ripC	Alignment	not modelled	7.6	31	PDB header: hydrolase Chain: C: PDB Molecule: adamts-4; PDBTitle: crystal structure of adamts4 with inhibitor bound
65	c2qd1A	Alignment	not modelled	7.6	31	PDB header: unknown function Chain: A: PDB Molecule: uncharacterized protein; PDBTitle: crystal structure of a putative dioxygenase (npun_f5605) from nostoc2 punctiforme pcc 73102 at 2.60 a resolution
66	c4y5wD	Alignment	not modelled	7.4	31	PDB header: transcription/dna Chain: D: PDB Molecule: signal transducer and activator of transcription 6; PDBTitle: transcription factor-dna complex
67	c4y5A	Alignment	not modelled	7.3	45	PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: immune inhibitor a, metalloprotease; PDBTitle: crystal structure of selenomethionine variant of bacillus anthracis2 immune inhibitor a2 peptidase zymogen
68	c4xr0A	Alignment	not modelled	7.1	23	PDB header: oxidoreductase Chain: A: PDB Molecule: ceramide very long chain fatty acid hydroxylase scs7; PDBTitle: full length scs7p (only hydroxylase domain visible)
69	d1xpaA	Alignment	not modelled	7.0	20	Fold: Prealbumin-like Superfamily: Hypothetical protein PA1324 Family: Hypothetical protein PA1324
70	d1r55a	Alignment	not modelled	6.9	29	Fold: Zincin-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Reprolysin-like
71	d1eq2a	Alignment	not modelled	6.9	23	Fold: Histone-fold Superfamily: Histone-fold Family: Nucleosome core histones
72	c2dw1B	Alignment	not modelled	6.9	23	PDB header: apoptosis, toxin Chain: B: PDB Molecule: catrocolastatin; PDBTitle: crystal structure of vap2 from crotalus atrox venom (form 2-2 crystal)
73	c1xkmC	Alignment	not modelled	6.8	10	PDB header: antibiotic Chain: C: PDB Molecule: distinctin chain a; PDBTitle: nmr structure of antimicrobial peptide distinctin in water
74	c1xkmA	Alignment	not modelled	6.8	10	PDB header: antibiotic Chain: A: PDB Molecule: distinctin chain a; PDBTitle: nmr structure of antimicrobial peptide distinctin in water
75	d1oala	Alignment	not modelled	6.7	31	Fold: RuvA C-terminal domain-like Superfamily: UBA-like Family: TAP-C domain-like
76	c2mceA	Alignment	not modelled	6.7	33	PDB header: neuropeptide Chain: A: PDB Molecule: neuropeptide gamma; PDBTitle: membrane induced structure of the mammalian tachykinin neuropeptide2 gamma
77	c2xc4A	Alignment	not modelled	6.7	50	PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: karilysin protease; PDBTitle: structure of karilysin catalytic mmp domain in complex with2 magnesium
78	c4gerB	Alignment	not modelled	6.4	45	PDB header: hydrolase Chain: B: PDB Molecule: gentiase metalloprotease; PDBTitle: crystal structure of gentiase, the neutral metalloprotease of2 paenibacillus polymyxa
79	c3ngzB	Alignment	not modelled	6.2	36	PDB header: hydrolase Chain: B: PDB Molecule: secreted metalloprotease mcp02; PDBTitle: crystal structure of the autoprocessed vibriolysin mcp-02 with e369a2 mutation
80	c3b8zB	Alignment	not modelled	6.2	38	PDB header: hydrolase Chain: B: PDB Molecule: protein adamts-5; PDBTitle: high resolution crystal structure of the catalytic domain2 of adamts-5 (aggrecanase-2)
81	c3k71A	Alignment	not modelled	6.1	23	PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: atrigin; PDBTitle: structures of two elapid snake venom metalloproteases with2 distinct activities highlight the disulfide patterns in the3 d

						domain of adamalysin family proteins
82	c3cs6A	Alignment	not modelled	6.0	50	PDB header: hydrolase Chain: A; PDB Molecule: probable dipeptidyl-peptidase 3; PDBTitle: structure of dpp iii from saccharomyces cerevisiae
83	d3cmnA1	Alignment	not modelled	5.8	17	Fold: Zincin-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Cau0242-like
84	c3lymA	Alignment	not modelled	5.7	17	PDB header: virus Chain: A; PDB Molecule: capsid protein; PDBTitle: backbone trace of the capsid protein dimer of a fungal paritivirus2 from electron cryomicroscopy and homology modeling
85	c2erpA	Alignment	not modelled	5.7	23	PDB header: toxin Chain: A; PDB Molecule: vascular apoptosis-inducing protein 1; PDBTitle: crystal structure of vascular apoptosis-inducing protein-1(inhibitor-2 bound form)
86	c5kd2A	Alignment	not modelled	5.7	25	PDB header: hydrolase Chain: A; PDB Molecule: metallopeptidase; PDBTitle: bt 4244 metallopeptidase from bacteroides thetaiotaomicron
87	d1bwa	Alignment	not modelled	5.5	21	Fold: Zincin-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Reprolysin-like
88	c3ug9A	Alignment	not modelled	5.5	14	PDB header: membrane protein Chain: A; PDB Molecule: archaeal-type opsin 1, archaeal-type opsin 2; PDBTitle: crystal structure of the closed state of channelrhodopsin
89	d1bqm	Alignment	not modelled	5.5	50	Fold: Zincin-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Matrix metalloproteases, catalytic domain
90	c4wp2D	Alignment	not modelled	5.5	17	PDB header: transport protein Chain: D; PDB Molecule: putative mrna export protein; PDBTitle: chaetomium mex67 uba domain
91	c3cmnA	Alignment	not modelled	5.5	17	PDB header: hydrolase Chain: A; PDB Molecule: putative hydrolase; PDBTitle: crystal structure of a putative hydrolase with a novel fold2 from chloroflexus aurantiacus
92	d1s4bp	Alignment	not modelled	5.4	23	Fold: Zincin-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Neurolysin-like
93	c2vshB	Alignment	not modelled	5.4	44	PDB header: hydrolase Chain: B; PDB Molecule: adamts-1; PDBTitle: crystal structure of human adamts-1 catalytic domain and2 cysteine-rich domain (apo-form)
94	d1cva	Alignment	not modelled	5.4	50	Fold: Zincin-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Matrix metalloproteases, catalytic domain
95	c2rioA	Alignment	not modelled	5.3	38	PDB header: hydrolase Chain: A; PDB Molecule: adamts-5; PDBTitle: crystal structure of adamts5 with inhibitor bound
96	d1i76a	Alignment	not modelled	5.2	40	Fold: Zincin-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Matrix metalloproteases, catalytic domain
97	c2h1jA	Alignment	not modelled	5.2	60	PDB header: hydrolase Chain: A; PDB Molecule: oligoendopeptidase f; PDBTitle: 3.1 a x-ray structure of putative oligoendopeptidase f: crystals grown2 by microfluidic seeding
98	d2ovoa1	Alignment	not modelled	5.2	36	Fold: Zincin-like Superfamily: Metalloproteases ("zincins"), catalytic domain Family: Matrix metalloproteases, catalytic domain