



UNIVERSITA POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Scienze Biologiche

Studio sull'aumento di lipidi in foglie di piante ingegnerizzate

Study on the increase of lipids in leaves of engineered plants

Tesi di Laurea di:
di:

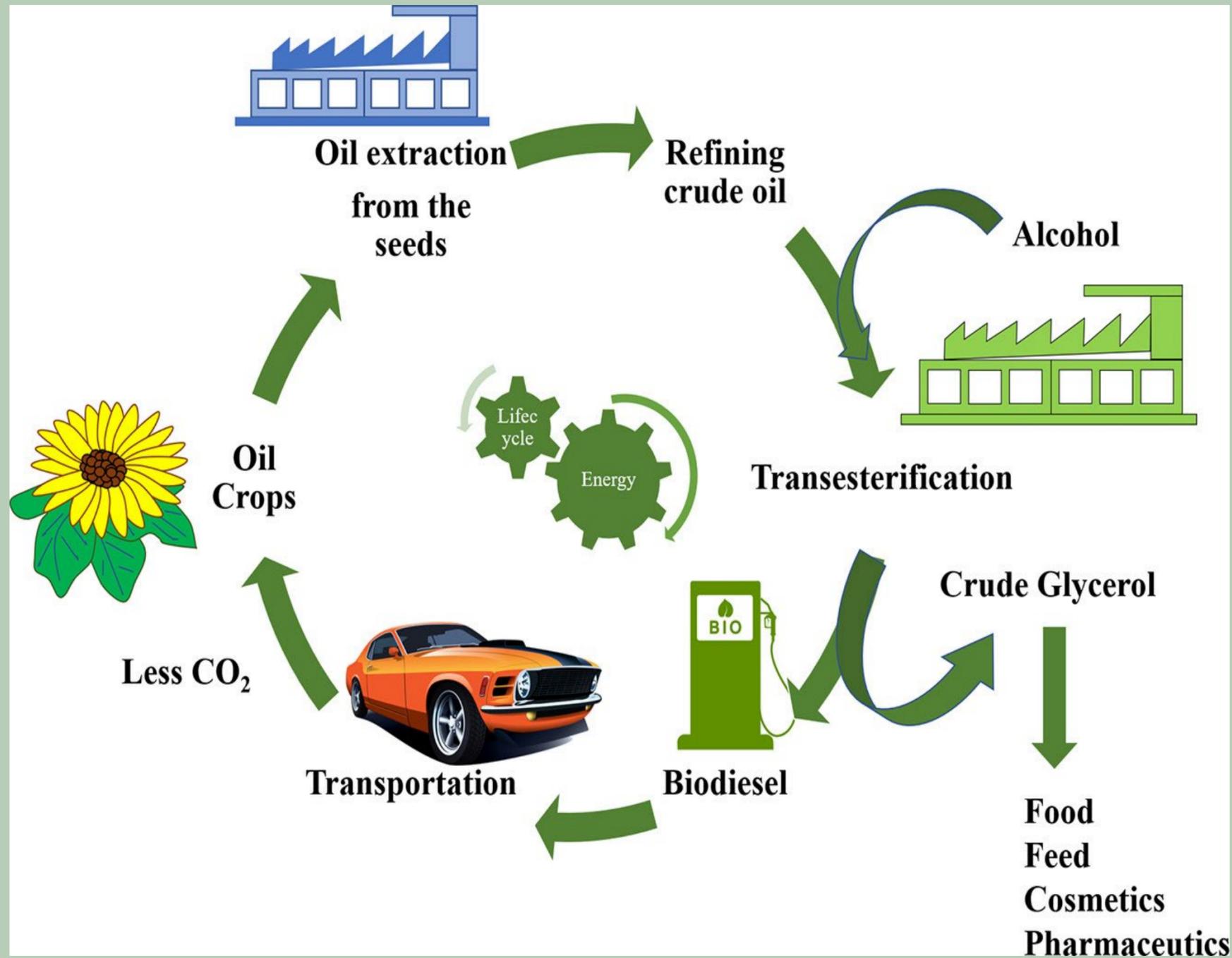
Cordioli Diletta

Docente Referente
Chiar.mo Prof.

Norici Alessandra

Sessione Autunnale ottobre 2024

Anno Accademico 2023/2024



Gli oleochimici derivati dalle piante rappresentano un'alternativa sostenibile per diverse applicazioni, tra cui la produzione di biodiesel che è una miscela di esteri di acidi grassi derivati da triacilgliceroli (TAG). Essi possiedono una densità energetica paragonabile ai prodotti petrolchimici.

Ciononostante, rispetto alla cellulosa il contenuto di olio vegetale è molto basso. Infatti, la maggior parte delle piante accumula elevate quantità di olio in semi e frutti solamente durante l'ultimo terzo di vita della stessa.

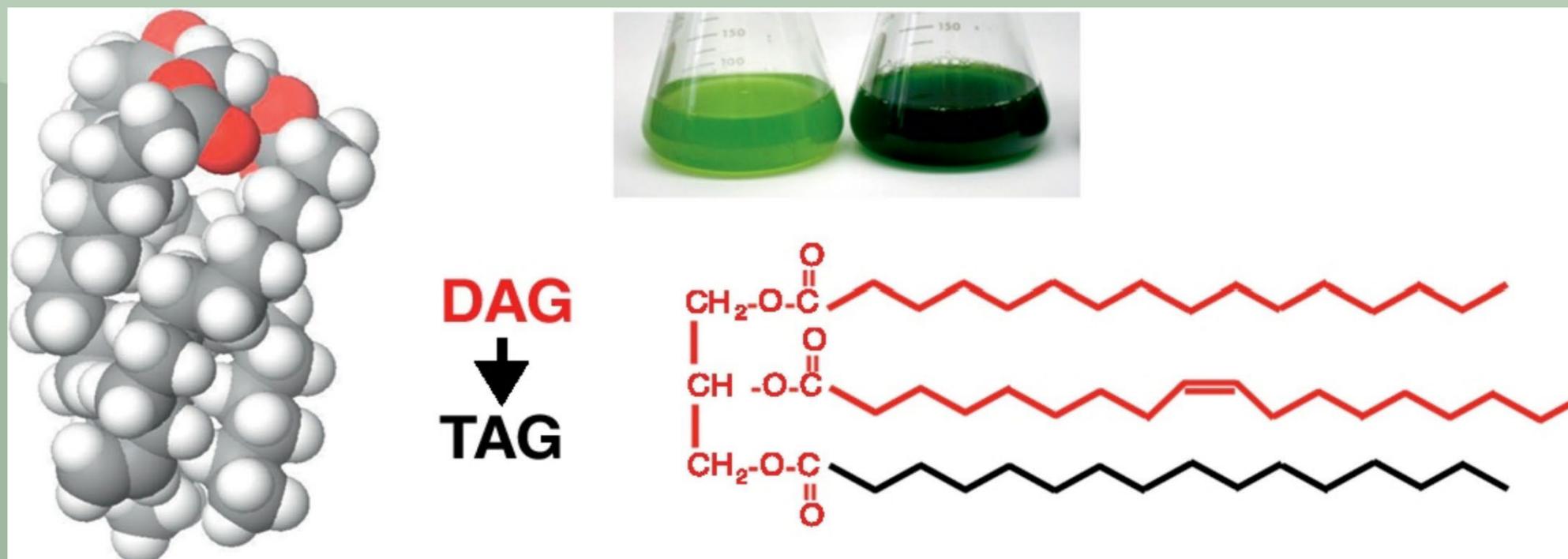
Proprio per questo motivo si stanno affinando le tecniche per la progettazione di foglie ingegnerizzate che producano costantemente oli vegetali.

Per lo studio dell'ingegneria dell'olio fogliare verranno confrontate tre diverse linee di tabacco: la linea WT, HO (High-Oil) e LEC2.

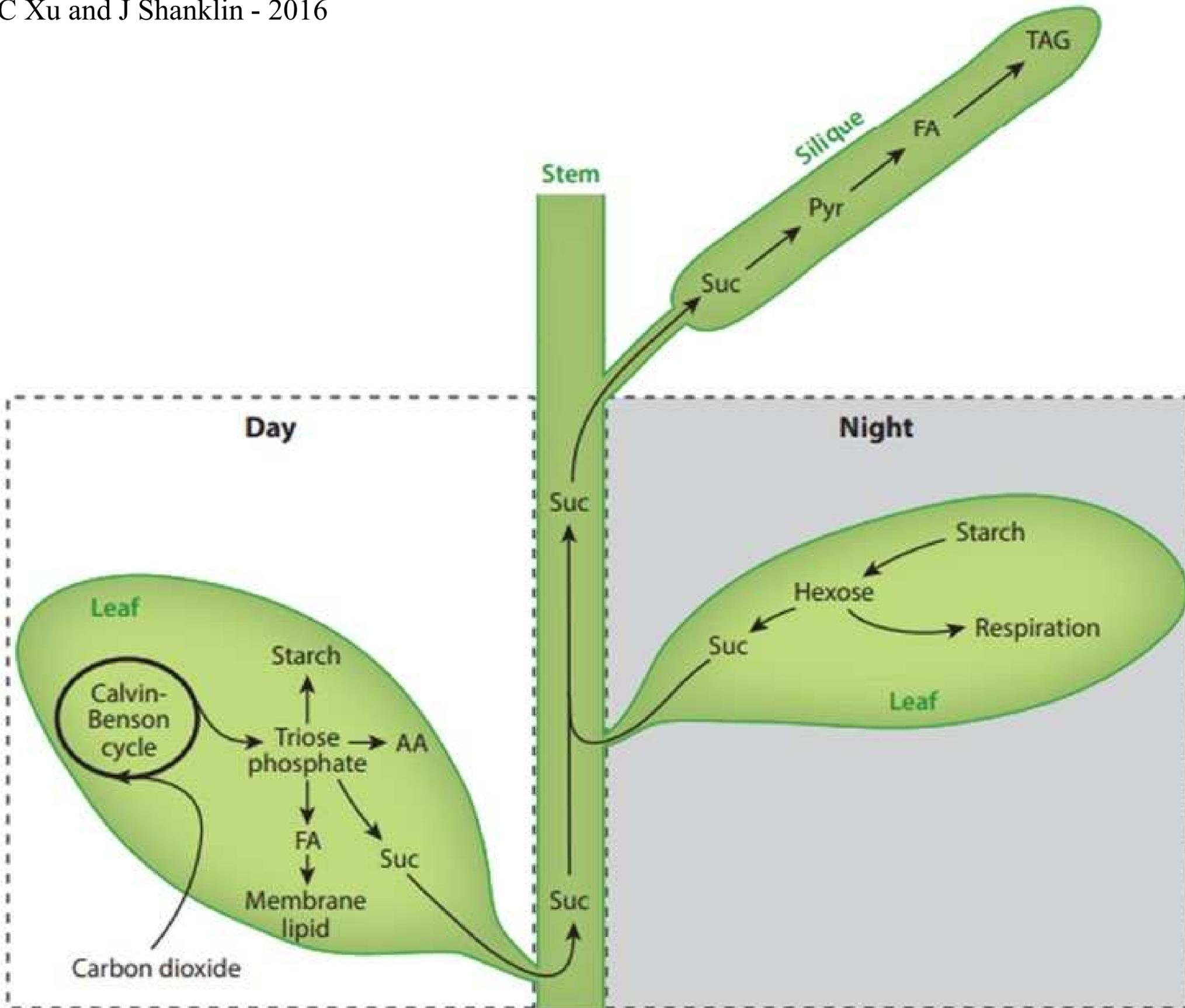
Le piante di tabacco transgeniche con elevato contenuto di olio (High Oil, HO) sono state ingegnerizzate utilizzando la strategia del push-pull-protect:

- **PUSH:** generato dal fattore di trascrizione *WRINKLED 1 (WRI1)* di *Arabidopsis thaliana* che induce un aumento della sintesi di acidi grassi. Definito *WRINKLED* poiché lesioni a carico di questo gene possono ridurre l'accumulo di olio determinando un seme raggrinzito
- **PULL:** generato dal fattore di trascrizione per l'enzima *Diacilglicerolo acetiltrasferasi* di *Arabidopsis thaliana* che induce il "pull" dei gruppi acilici in TAG (conversione di acidi grassi in TAG)
- **PROTECT:** ottenuto grazie alla proteina di imballaggio del corpo oleoso *oleosina (OLE)* che svolge funzione di protezione

Le piante di tabacco della linea HO hanno prodotto il 15% del peso secco della foglia come TAG ma la loro crescita è stata negativamente influenzata. Studi successivi hanno messo in evidenza come sarebbe possibile recuperare tale crescita mediante l'espressione del fattore di trascrizione *Arabidopsis thaliana* LEC2 (leafy-cotyledon-2) implicato nella regolazione dell'embriogenesi e nella maturazione di semi oleosi. È proprio in tali processi che TAG si accumula come principale lipide di riserva. Quando LEC2 è espresso nelle foglie induce un aumento della concentrazione di TAG sottoforma di corpi oleosi contenenti oleosina.



TAG, you're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation, S Merchant, J Kropat, B Liu, J Shaw, J Warakanont- Current Opinion in Biotechnology Volume 23, Issue 3, June 2012.



La linea HO ha anche mostrato un modello inverso del ciclo diurno TAG-amido rispetto alle linee WT e LEC2: nel WT di notte, in assenza di fotosintesi, l'amido accumulato durante il giorno viene degradato per sostenere la sintesi di saccarosio e altri prodotti. Nella linea HO di notte l'amido viene convertito in TAG e di giorno il TAG viene convertito nuovamente in amido. La particolarità di questo fenomeno è che, se nel WT il TAG funge da lipide di riserva, nella linea HO invece viene degradato per essere poi convertito in amido.

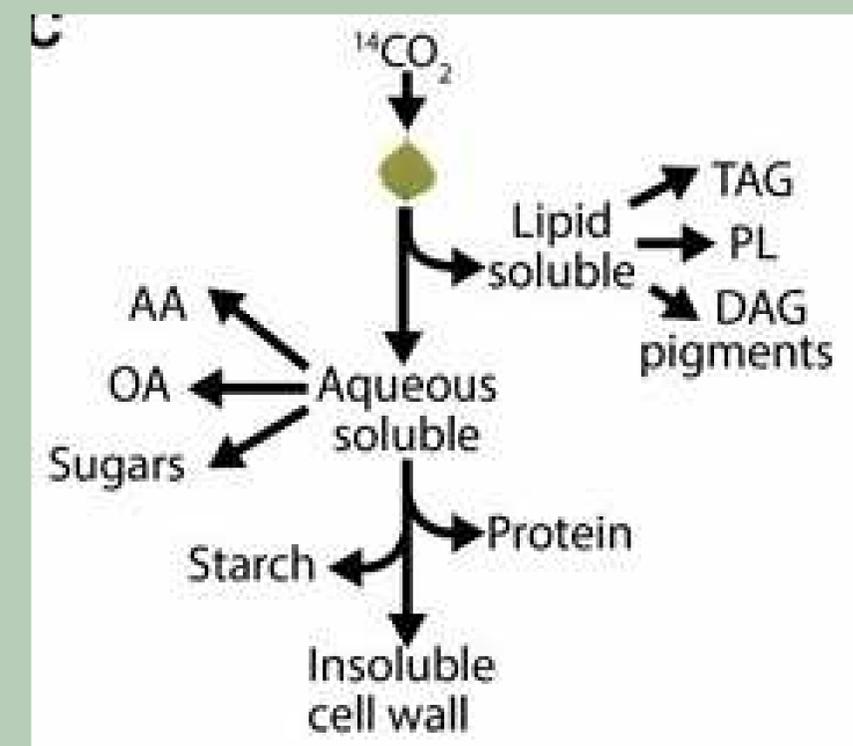
Per visualizzare in planta gli effetti dell'ingegneria dell'olio fogliare, nelle tre linee di tabacco, è stata sfruttata l'etichettatura *pulse-chase* con $^{14}\text{CO}_2$ radioattiva.

Piante di tabacco di 45 giorni (2 WT, 3HO, 3 LEC2) sono state inserite all'interno di un' essiccatore chiuso, esposto alla luce e contenente una eppendorf con bicarbonato marcato ^{14}C . Il bicarbonato viene acidificato con acido solforico con produzione di $^{14}\text{CO}_2$. La $^{14}\text{CO}_2$ marcata è disponibile per le piante all'interno dell' essiccatore per 2h, poi ogni sua traccia è tolta usando KOH (base forte) per riconvertirla nuovamente in bicarbonato liquido.



A questo punto le piante WT e mutanti sono campionate con il primo dischetto fogliare detto al tempo 0 (ovvero al momento dell'acidificazione) e d'ora in poi si campioneranno i dischetti di foglia delle 3 linee per vedere in quali composti organici sia presente la radioattività in modo da ricostruire il percorso del carbonio.

La biomassa del disco fogliare è stata separata in 5 frazioni principali: metaboliti solubili in acqua, proteine totali, parete cellulare, amido e lipidi totali.



Triacylglycerol stability limits futile cycles and inhibition of carbon capture in oil-accumulating leaves, Johnson, Allen, Bates

Confrontando la distribuzione dei lipidi di membrana (polari) e di TAG nel WT (neutri) e nella linea HO è emerso che: la maggior parte di CO₂ marcata nel WT era associata ai lipidi di membrana e solo 1% al TAG, nella linea HO invece il 17% del carbonio radioattivo era associato al TAG. Questo suggerisce che il flusso del carbonio sia stato deviato verso la produzione di TAG nella linea HO. Ciononostante, però il segnale di TAG nel corso del tempo è diminuito indicando che tale lipide sia stato dinamicamente metabolizzato invece che essere accumulato come prodotto stabile.

I risultati indicano che entrambe le linee produttrici di olio mostrano un'attività fotosintetica inferiore con HO circa 50% e LEC2 circa 80% rispetto al WT. Inoltre, la stabilizzazione del pool di TAG gioca un ruolo importante nel suo accumulo nelle foglie e contribuisce ad aumentare la produttività fotosintetica.

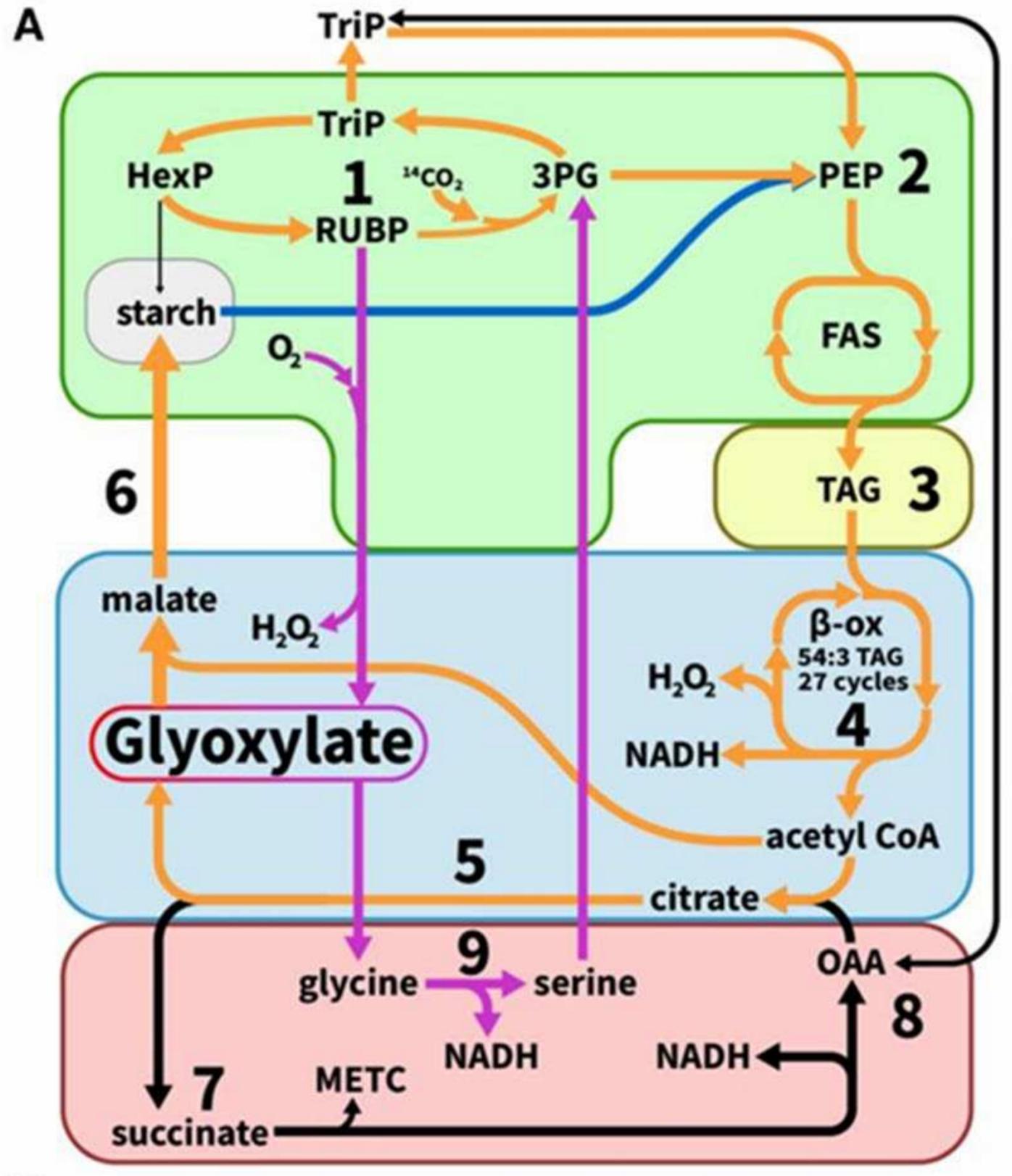
L'ingegneria del metabolismo fogliare ha impatti significativi sul metabolismo centrale e a tal proposito gli autori propongono tre ipotetiche vie:

1 La beta-ossidazione degli acidi grassi e il ciclo del gliossilato, che coincidono con la fotorespirazione nei perossisomi fogliari, possono ridurre l'assimilazione di CO_2 nella linea HO giustificandone la crescita ridotta. L'inibizione tramite gliossilato e NADH su fotorespirazione e fotosintesi riduce la quantità di carbonio fissato; poichè il gliossilato è un potente inibitore della Rubisco e degli enzimi della fotorespirazione.

2 Il turnover di TAG può alimentare la sintesi di amido e ridurre così la fissazione di CO_2 nella linea HO: se parte del carbonio proviene dal TAG si riduce la forza di assorbimento di CO_2 esterna e conseguentemente anche l'attività fotosintetica.

3 LEC2 può stabilizzare l'accumulo di TAG impedendo così il ciclo futile TAG-amido e aumentando la fissazione di CO_2 : rispetto alla linea HO, quella LEC2 ha accumulato il doppio di TAG alleviando i difetti di crescita di HO. Prove recenti dimostrano che la co-espressione di LEC2 e WRI1 promuova la sintesi e la stabilità di TAG, oltre a quella del solo WRI1 che promuove un aumento nella sintesi di acidi grassi.

Beta-ossidazione degli acidi grassi e via del gliossilato



Il flusso del carbonio attraverso il ciclo futile TAG-amido (freccie arancioni e blu) e la fotorespirazione (freccie viola) iniziano nel cloroplasto (verde) con la carbossilazione o ossigenazione del Ribulosio 1,5-bisfosfato da parte della Rubisco. Dal ciclo di Calvin si ottengono i triosi fosfati, utilizzati in parte per la sintesi di saccarosio e amido e in parte per la sintesi degli acidi grassi (FAS) a partire dal PEP, principale precursore nella sintesi di acidi grassi.

I TAG appena sintetizzati entrano nel perossisoma (blu) dove subiscono Beta-ossidazione con conseguente produzione di AcetilCoA e NADH. L'Acetil-CoA si combina con l'ossalacetato per formare citrato il quale, nella via del gliossilato, viene convertito a gliossilato e succinato.

Il gliossilato accetta l'Acetil-CoA per formare malato che viene esportato nel cloroplasto per la sintesi dell'amido.

Riassunto

L'ingegneria dell'olio fogliare ha un grande potenziale, anche se i risultati fin qui ottenuti indicano che abbia un impatto esteso a tutto il metabolismo centrale, oltre alla sintesi di acidi grassi e all'assemblaggio dei lipidi.

Utilizzando due linee di tabacco, HO e LEC2, si è scoperto che la stabilità dell'olio fogliare accumulato sottoforma di TAG costituisce la chiave per ridurre risposte metaboliche avverse a carico del metabolismo centrale del carbonio; risposte che ridurrebbero l'assimilazione di CO₂ e la crescita della pianta stessa. Il ciclo futile presente nella linea HO e alleviato nella linea LEC2, ne è la dimostrazione. Tale ciclo ha limitato la resa di TAG attraverso lo scambio di carbonio fissato con l'amido, ha alterato il flusso di carbonio e favorito l'interferenza del ciclo del gliossilato sull'assimilazione di CO₂, ridotta del 50%. La linea HO infatti ha mostrato meno carbonio ripartito in amido e più nella parete cellulare. Al contrario l'inclusione del fattore di trascrizione LEC2 ha migliorato la stabilità di TAG riducendo il ciclo futile TAG-amido, recuperato l'assimilazione di CO₂ e la crescita della pianta che è stata paragonabile a quella del WT ma con livelli lipidici molto più elevati nelle foglie.

Sitografia

Recent advances in biodiesel production: Challenges and solutions, *Gincy Marina Mthew, Diska Raina, Vivek Narisetty, Vinod Kumar, Saurabh Saran, Arivalagan Pugazhendi, Raveendran Sindhu, Ashok Pandey, Parameswaran Binod*- Science of The Totale Environment Volume 794, 10 November 2021.

TAG, you're it! Chalamydomonas as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation, *Sabeeha S Merchant, Janette kropat, Bensheng Liu, Johnathan Shaw, Jaruswan Warakanont*- Current Opinion in Biotechnology Volume 23, Issue 3, June 2012.

The complex consequences of engineering oil leaf production in plants, *HenningKirst*

Triacylglycerol metabolism, function and accumulation in plant vegetative tissues, Changcheng Xu and John Shanklin – 2016.

Triacylglycerol stability limits futile cycles and inhibition of carbon capture in oil- accumulating leaves, *Brandon S. Johnson, Doug K. Allen, Philip D. Bates*