

Bitácora@Divulga

Descifrando el metabolismo de la vitamina e en tomate

Autores: Ramón Asis¹, Fernando Carrari²

¹Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI. rasis@fcq.unc.edu.ar

² Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (IB-INTA), and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), PO Box 25, B1686WAA Castelar, Argentina. Departamento de Botánica, Instituto de Biociencias, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, 277, 05508-090, São Paulo, Brazil. carrari.fernando@inta.gob.ar

Resumen

El conocimiento acerca de los mecanismos fisiológicos y moleculares que determinan la calidad de alimentos de origen vegetal es de fundamental importancia para el diseño de estrategias racionales que permitan el agregado de valor a los sistemas de producción. Con esta perspectiva, en este trabajo se presentan las contribuciones que nuestros laboratorios han realizado con investigaciones que buscan identificar los determinantes genéticos y a entender los mecanismos moleculares que regulan los contenidos de Vitamina E en tomate.

Abstract

Understanding the molecular and physiological mechanisms that determine the quality of vegetables-derived foods is of fundamental importance to add value to the primary and the secondary production systems. With this perspective, we present the contributions that our laboratories have made with research aimed towards identifying the genetic determinants and the molecular mechanisms that regulate the contents of Vitamin E in tomatoes.

Introducción

El consumo de vegetales es fundamental para la salud humana como principal fuente de múltiples moléculas esenciales. Los tocoferoles (también conocidos como tococromanoles) constituyen colectivamente la vitamina E (VTE), el mayor antioxidante lipofílico en la dieta humana. Todos son moléculas anfipáticas, que contienen una cabeza polar cromanol que deriva del ácido homogentísico y una cola lipofílica que deriva del fitol. Existen cuatro formas de tocoferoles (α , β , γ and δ), que ocurren naturalmente y que difieren en la posición y número de metilos en el anillo cromanol (Figura 1). Estos compuestos son sintetizados por la condensación de un anillo cromanol que proviene de la vía del shikimato (SK) con una cadena prenilo que proviene de la vía del metil-eritriol fosfato (MEP) (Figura 2). Estas vías metabólicas son centrales en el metabolismo de los cloroplastos de las plantas y están involucradas en la biosíntesis de moléculas importantes como la clorofila, los carotenoides, los aminoácidos aromáticos y las prenilquinonas.

Aunque todos los tococromanoles tienen una potente actividad antioxidante *in vitro*, α -tocoferol es el más activo en términos de actividad de VTE debido, en parte, a que es la forma retenida y transportada más eficaz en células de mamíferos (1). Se han registrado síntomas específicos de la deficiencia de VTE (ej: resorción fetal, distrofia muscular, y encefalomalacia) en experimentos con animales y dietas deficientes en VTE (2). El consumo de tocoferol recomendado en humanos (RDA) en la dieta de un adulto es de 15 mg/día (definido como 2R- α -tocoferol). Particularmente, el fruto de

tomate es una importante fuente de antioxidantes en la dieta debido a su alto contenido en éstos compuestos y a su elevado consumo en las dietas occidentales. Los principales antioxidantes presentes en el fruto de tomate son el ácido ascórbico (VTC), licopenos, carotenos, compuesto fenólicos y los tocoferoles (VTE). El avance logrado en el conocimiento sobre la regulación de estos compuestos, así como la aplicación de estrategias de ingeniería metabólica, han permitido obtener frutos de tomate con mayores concentraciones de flavonoides y ácidos fenólicos (3, 4, 5). Contrariamente a las numerosas publicaciones acerca de la regulación de los principales antioxidantes de tomate (VTC, licopenos y polifenoles), el conocimiento acerca de la regulación de la biosíntesis de tocoferoles en este fruto es escaso.

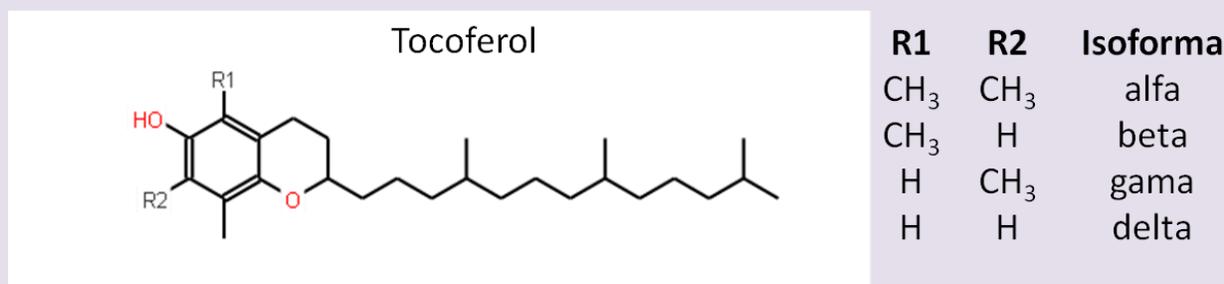


Figura 1 Estructura química de tocoferoles.

En los últimos años, nuestros laboratorios se han centrado en identificar los determinantes genéticos y entender los mecanismos moleculares que regulan los contenidos de VTE en tomate.

Regiones genómicas y mapeo de genes que regulan Tocoferoles en tomate

Inicialmente, comenzamos mapeando regiones específicas de cromosomas que regulan un carácter cuantitativo (quantitative trait loci o QTL en inglés) para contenidos de VTE en los frutos maduros de tomate (6). En este estudio se empleó una población de líneas introgresadas (*S. lycopersicum* x *S. pennellii*) obtenida por el cruzamiento una línea del tomate cultivado y una especie silvestre (*Solanum pennellii*). Las 76 líneas que componen esta población albergan una única región cromosómica de la especie silvestres (de localización conocida en el genoma) en el trasfondo genético de la especie cultivada. Los cambios en el contenido de tocoferoles en estas líneas respecto de los de la especie cultivada, son atribuidos al efecto de la región introgresada de la especie silvestre, estableciendo así cada QTL. De los doce cromosomas de tomate, se identificaron QTL para VTE en los cromosomas 6, 7, 8 y 9 (Figura 3). En paralelo se mapearon todos los genes de la síntesis de VTE donde se pudo evidenciar que esos QTL co-localizan con 16 genes de esta vía (Figura 3). La mayoría de estos genes codifican para enzimas que intervienen en las etapas finales de la ruta de síntesis poniendo en evidencia que la regulación de los tocoferoles podría generarse principalmente en la vía central de tococromanoles (Figura 2).

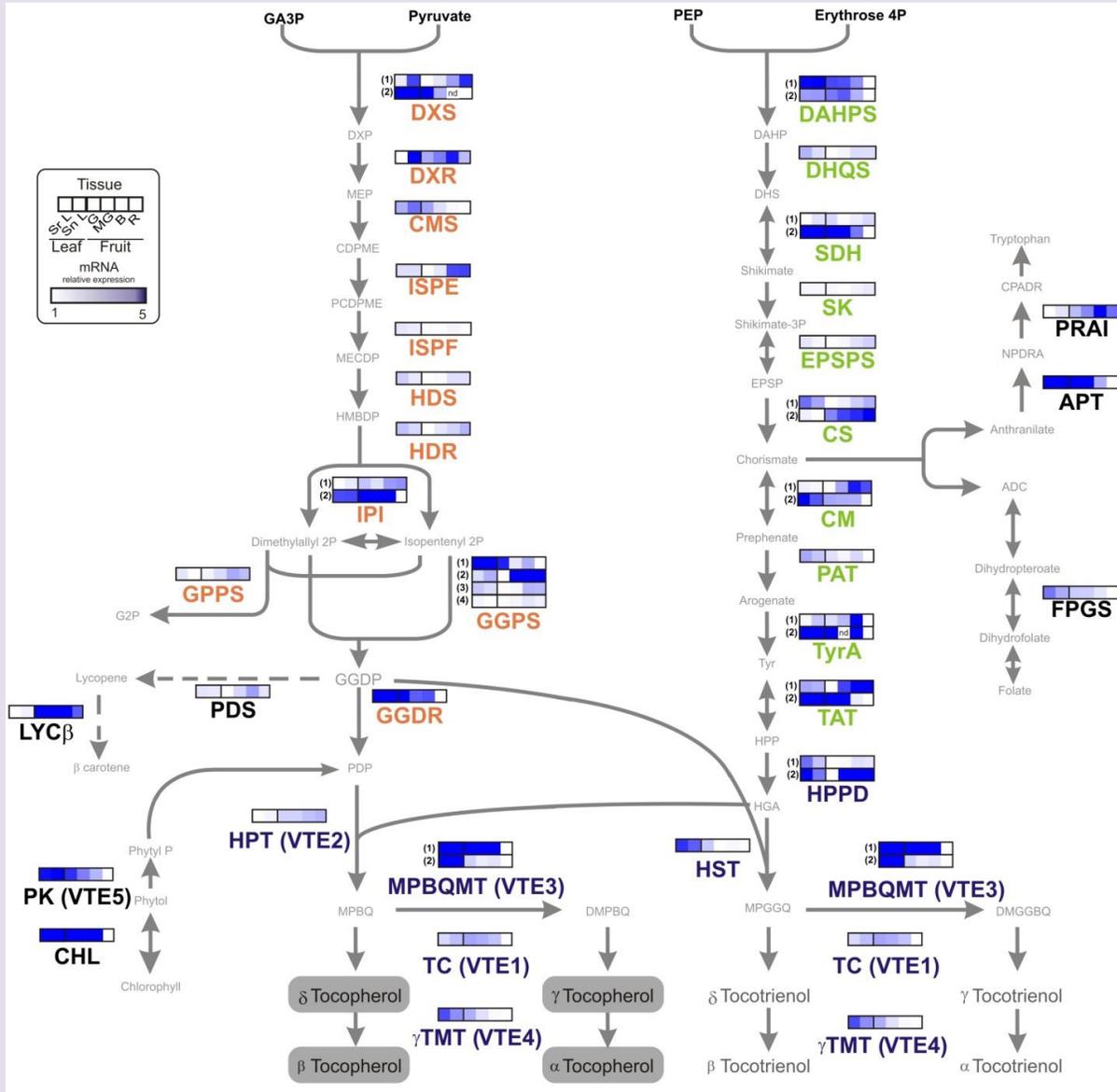


Figura 2 Vista esquemática del metil eritritol (MEP), shikimate (SK), vitamina E-core y vías relacionadas con las correspondientes enzimas indicadas en rojo, verde, azul y negro, respectivamente. En los casilleros se representan el perfil de expresión de los genes de la ruta biosintética de VTE en tomate durante el desarrollo y maduración del fruto y hoja. Publicado con permiso de los autores de la cita 8: Quadrana y col. 2013, Plant Mol. Biol.

Análisis funcional de los genes mapeados

Para comprobar la funcionalidad de los genes de la vía central en la síntesis de tocoferoles en tomate, se desarrolló un sistema de silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS) por infiltración en los pedúnculos de la inflorescencia en la etapa de pre-antesis para activar el silenciamiento temprano en el desarrollo de la fruta. El protocolo de VIGS se estableció en plantas transgénicas que expresan constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP) y permite el análisis espacio-temporal de la funcionalidad de genes específicamente expresado en frutos (Figura 4) (7).

el contenido de VTE a lo largo del desarrollo del fruto, los datos indican que en el suministro de fitil difosfato limita la biosíntesis de tocoferol en las última etapas de maduración del fruto. Esto se debe en parte a la disminución de los niveles de transcripción del gen que codifica para geranylgeranyl reductasa (GGDR) que restringe la disponibilidad del precursor isoprenoide (8).

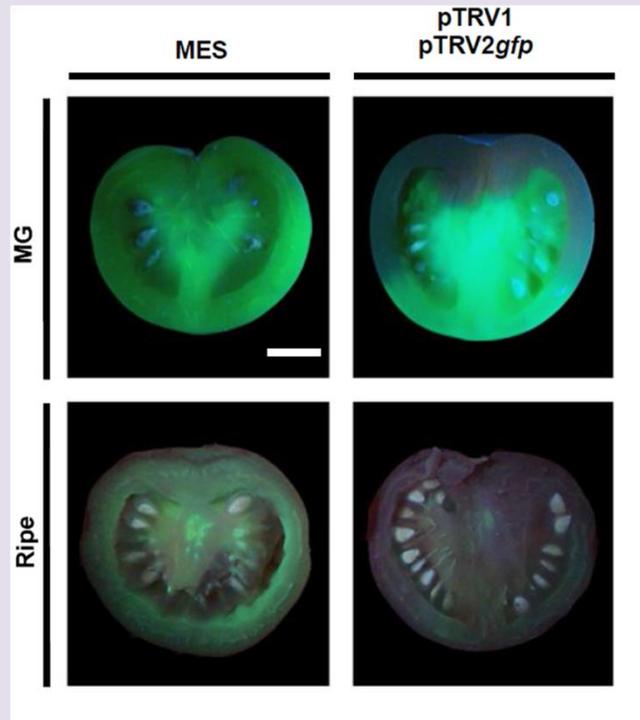


Figura 4. Silenciamiento del gen *gfp* como reportero en frutos de tomate infiltrados con el virus de tabaco (TRV) o el vehículo (buffer MES). Secciones transversales de frutos de tomate procedentes de plantas transgénicas GFP. En las secciones sin fluorescencia el virus está silenciando el gen. Publicado con permiso de los autores de la cita 7: Quadrana y col. 2011, *Plant Physiol.*

La carencia de fitil difosfato generados por la limitación de la vía de MEP en los últimos estadios de maduración podría cubrirse desde el catabolismo de clorofilas. Para abordar esta hipótesis se exploró la red metabólica que vincula la biosíntesis y el reciclaje de isoprenoides durante la maduración en mutantes de color (producto de una maduración o senescencia alteradas o insensibles al jasmonato) (9). La diferencia más llamativa en la topología de las redes construidas es que en todos los genotipos mutantes, los tocoferoles aparecen altamente conectados con los otros componentes de las otras vías de síntesis, pero este no es el caso con el genotipo control. Estos resultados revelan una notable plasticidad de las rutas metabólicas de clorofilas, carotenoides y tocoferol interconectadas que modulan la composición de tocoferol en las mutantes con un metabolismo isoprenoide alterado, manteniendo así la capacidad antioxidante constante. Los análisis de redes también mostraron que en genotipos en los que la degradación de clorofila está alterada, GGDR está conectada con el clúster tocoferol pero no al clúster clorofila, lo que respalda un papel potencial de esta enzima en el suministro de la cadena lateral de prenilo para la biosíntesis de VTE.

Los resultados sugieren que el mantenimiento de la síntesis fitil difosfato para la síntesis de tocoferoles son modulados por la vía de MEP y del reciclaje de las clorofilas. En este último caso, después de que el residuo de fitol se elimina del anillo tetrapirrólico por acción de defitilasas como feofitinasas y

clorofilasas (CLH), se fosforila secuencialmente por dos enzimas, incluida la fitol quinasa (VTE5). Para corroborar esta vía, evaluamos en plantas de tomate deficientes en CLH y VTE5 el perfil de prenilquinonas y clorofilas, y expresión génica (10). Los datos obtenidos muestran que el fitol derivado de la clorofila es la fuente principal del precursor de prenilo para la biosíntesis del tocoferol del tomate, en el que aproximadamente el 80% del contenido de tocoferol depende de VTE5 tanto en hojas como en frutos. En contraste, CLH no parece jugar un papel en la hidrólisis de fitol para la síntesis de vitamina E. Los resultados combinados aportan otro nivel de complejidad a la red reguladora de la VTE del tomate, revelando nuevas estrategias para la ingeniería metabólica

Regulación epigenética de la biosíntesis de tocoferoles

Como se introdujo más arriba, los análisis genéticos realizado mostraron que el mayor QTL para VTE en tomate está localizado en el cromosoma 9 y co-localiza con el gen $VTE3_{(1)}$ uno de los parálogos de VTE3 (dimetil-fitolquinol metil transferasa). VTE3 cataliza el paso de metil-fitolquinol (producto de la condensación de fitil 2 fosfato and homogentisato) a dimetil-fitolquinol, el precursor de las dos isoformas (alfa y gama tocoferol) más abundantes en casi todas las especies vegetales estudiadas. El silenciamiento de este gen por el sistema de VIGS produce una reducción significativa de ambas isoformas. Para identificar si el gen $VTE3_{(1)}$ es responsable de este QTL, se realizó un mapeo fino reduciendo la región introgresada del QTL y verificando que $VTE3_{(1)}$ seguía colocándose con el QTL. Posteriormente, se determinó que la expresión de un alelo silvestre de $VTE3_{(1)}$ introgresado en el QTL, está incrementada respecto a su parental de la especie cultivada. El análisis estructural de $VTE3_{(1)}$ de ambas especies mostraron diferencias principalmente en la región promotora donde se encontraron elementos móviles (del tipo retrotransposones de la familia SINE) que son altamente metilados en tomate. Los estudios de metilación de esta región evidenciaron que el promotor de $VTE3_{(1)}$ silvestre presenta niveles muy bajos de metilación, mientras que el alelo de la especie cultivada o domesticada se encontró altamente metilado. Estos resultados demuestran que el mecanismo molecular del QTL en cuestión está asociado a la metilación diferencial de un retrotransposón del tipo SINE localizado en la región promotora del gen $VTE3_{(1)}$, lo cual determina una mayor expresión del gen y un aumento del contenido de tocoferoles. A su vez, encontramos que el estado de metilación del alelo domesticado de este gen cambia rápidamente cuando las plantas son cultivadas en condiciones de campo (respecto de plantas cultivadas en condiciones controladas de invernáculo) y esto resulta en una acumulación diferencial de su ARNm y en última instancia en los niveles de tocoferol de los frutos (11).

Una escala más de la complejidad en el entendimiento de la regulación de los contenidos de estas moléculas en plantas está dada por la compartimentalización celular y los distintas organelas donde se sintetizan, acumulan y actúan estos compuestos en las células vegetales. En este sentido, últimamente hemos reportado acerca de una proteína que es capaz de unirse al tocoferol y que se localiza las membranas tilacoidales de los cloroplastos. Considerando la naturaleza lipófila de los tocoferoles, el pasaje de las mismas desde el sitio de síntesis hasta los sitios de acción, como las membranas celulares, debería involucrar proteínas transportadoras. En un trabajo reciente, demostramos que la proteína TBP (por sus siglas en inglés: tocoferol binding protein) es capaz de unirse a alfa tocoferol y que el silenciamiento del gen que codifica para TBP en plantas de tomate, produce alteraciones significativas tanto en el metabolismo de tocoferol como de lípidos y en la expresión de los genes de estas vías (12).

Conclusiones

A la luz de los resultados presentados aquí, es posible comprender un poco mejor la regulación de tocoferoles en el fruto de tomate. El fruto de tomate durante su desarrollo y maduración sufre cambios genéticos, metabólicos y fenotípicos drásticos que deben ser estrictamente regulados. La síntesis de tocoferoles no escapa a esa regla, donde es finamente regulado para mantener niveles constantes mostrando su vital importancia en la fisiología del fruto. En esta revisión se mostraron diferentes puntos regulatorios de sus síntesis, que podrían ser de interés biotecnológico para incrementar los niveles de tocoferoles en tomate. También aporta al entendimiento de la baja heredabilidad de los caracteres del tocoferol que ahora puede reinterpretarse debido a la naturaleza epigenética y reversible de uno de sus QTL, donde la inestabilidad de los epialélos produce una dinámica fenotípica que no puede predecirse a partir de modelos estrictamente mendelianos de herencia. Estudios adicionales con el objetivo de comprender los determinantes genéticos de otros rasgos naturales y de baja heredabilidad permitirán el desarrollo de una teoría genética de la población que incorporará la información epigenética y por lo tanto será capaz de predecir los fenotipos de las plantas y sus estabildades de una manera más precisa.

Referencias

- (1) Traber M.G., Sies H. Vitamin E in humans: Demand and delivery *Annu. Rev. Nutr.* (1996) 16:321-47
- (2) Fitzpatrick T., Basset G.J.C., Borel P., Carrari F., DellaPenna D., Fraser P.D., Hellmann H., Osorio S., Rothan C., Valpuesta V., Caris-Veyrat C., Fernie A.R. Vitamin deficiencies in humans: Can Plant Science help? *Plant Cell* (2012) 24:395-414
- (3) Van der Rest B., Danouns Boudet A.M., Rochange S.F. Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) induces dramatic changes in soluble phenolic pools. *J. Exp. Bot.* (2006) 57: 1399–1411
- (4) Muir S.R., Collins G.J., Robinson S., Hughes S., Bovy A., Ric De Vos C.H., van Tunen A.J., Verhoeven M.E. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols *Nat. Biotechnol.* (2001) 19: 470–474.
- (5) Giovinazzo G., D'Amico L., Paradiso A., Bollini R., Sparvoli F., DeGara L. *Plant Biotechnol. J.* (2005) 3: 57-69.
- (6) Almeida J., Quadrana L., Asis R., Setta N., De Godoy F., Bermúdez L., Otaiza S.N., Corrêa Da Silva J.V., Fernie A.R., Carrari F., Rossi M. Genetic dissection of vitamin e biosynthesis in tomato. *J. Exp. Bot.* (2011) 62:3781-98.
- (7) Quadrana L., Rodríguez M.C., López M., Bermúdez L., Nunes-Nesi A., Fernie A.R., Descalzo A., Asis R., Rossi M., Asurmendi S., Carrari F. Coupling virus-induced gene silencing to exogenous green fluorescence protein expression provides a highly efficient system for functional genomics in arabidopsis and across all stages of tomato fruit development. *Plant Physiol.* (2011)156:1278-91.
- (8) Quadrana L., Almeida J., Otaiza S.N., Duffy T., da Silva J.V.C., de Godoy F., Asis R., Bermúdez L., Fernie A.R., Carrari F., Rossi M. Transcriptional regulation of tocopherol biosynthesis in tomato. *Plant Mol. Biol.* (2013) 81:309-25
- (9) Almeida J., Asis R., Molineri V.N., Sestari I., Lira B.S., Carrari F., Pereira eres L.E., Rossi M. Fruits from Ripening Impaired, Chlorophyll Degradation and Jasmonate Insensitive Tomato Mutants have Altered Tocopherol Content and Composition. *Phytochemistry* (2015) 111:72-83
- (10) Almeida J., da Silva Azevedo M., Spicher L., Glauser G., vom Dorp K., Guyer L., Carranza A., Asis R., Pereira de Souza A., Buckeridge M., Demarco D., Bres C., Rothan C., Pereira Peres L., Kessler F.,

Hörtensteiner S., Dörmann P., Carrari F., and Rossi M. Down-regulation of tomato phyto kinase strongly impairs tocopherol biosynthesis and affects prenillipid metabolism in an organ-specific manner. *J. Exp. Bot.* (2016) 67:919-934

- (11) Quadrana L., Almeida J., Asis R., Duffy T., Dominguez P.G., Bermúdez L., Conti G., Corrêa Da Silva JV., Peralta I.E., Colot V., Asurmendi S., Fernie A.R., Rossi M., Carrari F. Natural occurring epialleles determine vitamin e accumulation in tomato fruits. *Nat. Commun.* (2014) 5.
- (12) Bermúdez L., del Pozo T., Lira B., de Godoy F., Boos I., Romanó C., Previtali V., Almeida J., Bréhélin C., Asis R., Quadrana L., Demarco D., Alseekh S., Salinas Gamboa R., Pérez Flores L., Dominguez P., Rothan C., Fernie A., González M., Stocker A., Hemmerle A., Clausen M., Carrari F., Rossi M. A Tomato Tocopherol Binding Protein Sheds Light on Intracellular α -tocopherol Metabolism in Plants. *Plant Cell Physiol.* (2018) en prensa.