



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0708009-3 B1

(22) Data do Depósito: 30/01/2007

(45) Data de Concessão: 24/04/2024

(54) Título: POLINUCLEOTÍDEO CODIFICANDO TRANSFERASES DE FOSFOPANTETEÍNILA, CONSTRUÇÃO DE DNA, MICRO-ORGANISMO TRANSGÊNICO, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE COMIDA OU ALIMENTO, COMPOSIÇÃO DE COMIDA OU ALIMENTO E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO DOCOSAEXAENOICO OU ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO

(51) Int.Cl.: C12N 9/12.

(30) Prioridade Unionista: 29/01/2007 US 11/668,354; 31/01/2006 US 60/763,644.

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC.

(72) Inventor(es): HENRY VALENTIN; JIEXIN PENG; STEVEN SCREEN.

(86) Pedido PCT: PCT US2007061314 de 30/01/2007

(87) Publicação PCT: WO 2007/090121 de 09/08/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/07/2008

(57) Resumo: TRANSFERASES DE FOSFOPANTETEÍNILA DAS BACTÉRIAS. A invenção refere-se em geral a transferases de fosfopanteteinila que são necessárias para a ativação de um complexo de sintase de pau-cetídeo para sintetizar ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LO-PUFAs) tais como ácido docosaexaenóico e ácido eicosapentaenóico. Em particular, a invenção refere-se a transferases de fosfopanteteinila bacteriana, a constructos de DNA para sua expressão em células hospedeiras, e a sementes, óleo e farinha grossa quando as células hospedeiras compreendem uma planta. Também provido é um método para a produção de um óleo de planta contendo ácido docosaexaenóico e/ou ácido eicosapentaenóico.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"POLINUCLEOTÍDEO CODIFICANDO TRANSFERASES DE FOSFOPANTETEÍNILA, CONSTRUÇÃO DE DNA, MICRO-ORGANISMO TRANSGÊNICO, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE COMIDA OU ALIMENTO, COMPOSIÇÃO DE COMIDA OU ALIMENTO E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO DOCOSAEXAENOICO OU ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO".

Antecedentes da Invenção

[001] Esse pedido reivindica a prioridade do pedido de patente provisório nº de Série US 60/763,644, depositado em 31 de janeiro de 2006, e pedido de patente nº de Série 11/668,354, depositado em 29 de janeiro de 2007, cujas descrições são incorporadas aqui por referência em sua totalidade.

Campo da Invenção

[002] A presente invenção refere-se a transferases de fosfopanteteína que estão envolvidas na ativação de sintase de policetídeo para sintetizar ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (tais como ácido docosaexaenóico e ácido eicosapentaenóico).

Descrição da Técnica Relacionada

[003] Os produtos primários de biossíntese de ácido graxo na maioria dos organismos são compostos de 16 e 18 carbonos. A razão relativa de comprimentos de cadeia e grau de insaturação desses ácidos graxos podem amplamente variar entre as espécies. Mamíferos, por exemplo, produzem ácidos graxos principalmente saturados e monoin-saturados, enquanto a maioria das plantas superiores, produzem ácido graxos com uma, duas, ou três ligações duplas, as últimas duas compreendendo ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). PUFAs de cadeia muito longa tais ácido docosaenóico (DHA, 22:6) e ácido eicopenta-enóico (EPA, 20:5) foram relatados a partir de várias espécies de bactérias marinhas, incluindo *Moritella* (*Vibrio*) marinha e *Shewanella* sp. (a

patente U.S. nº 6.140.486) e a partir de algas marinhas tais como *Schizochytrium* sp. e *Thraustochytrium* sp. (a publicação de patente U.S. 20040235127).

[004] Duas famílias principais de PUFA's são os ácidos graxos ômega-3 (também representados como ácido graxos "n-3"), exemplificadas por ácido docosaexaenóico e os ácido graxos ômega-6 (também representados como ácido graxos "n-6"), exemplificados por ácido araquidônico (ARA, 20:4). PUFA's são componentes importantes da membrana do plasma da célula e de tecido adiposo, onde eles podem ser encontrados em fosfolipídios e triglicerídeos, respectivamente. PUFA's são necessários para desenvolvimento adequado em mamífero, particularmente no desenvolvimento do cérebro infantil, e para a formação e reparo de tecido.

[005] Vários distúrbios respondem ao tratamento com PUFA's. Suplementação com PUFA's demonstrou reduzir a taxa de restenose depois da angioplastia. Os benefícios saudáveis de certos ácidos graxos ômega-3 de dieta para a doença cardiovascular e artrite reumatóide também foram bem documentados (Simopoulos, 1997; James e outros, 2000). Além disso, PUFA's foram sugeridos para o uso em tratamentos para asma e psoríase. Evidência indica que PUFA's podem ser envolvidos em metabolismo de cálcio, sugerindo que PUFA's podem ser úteis no tratamento ou na prevenção de osteoporose e de pedras do trato urinário ou rim.

[006] A maioria da evidência para benefícios saudáveis aplica às gorduras de ômega-3 de cadeia longa, EPA e DHA, que estão em peixe e óleo de peixe. Com essa base de evidência, autoridades e nutricionistas saudáveis no Canadá (Scientific Review Committee, 1990, Nutrition Recommendations, Minister of National Health and Welfare, Canadá, Ottawa), Europe (de Deckerer e outros, 1998), o Reino Unido (The British Nutrition Foundation, 1992, Unsaturated fatty-acids - nutritional and

physiological significance: The report of the British Nutrition Foundation's Task Force, Chapman and Hall, London), e nos Estados Unidos (Simopoulos e outros, 1999) foram recomendados consumo de dieta aumentado recomendado desses PUFAs.

[007] PUFAs de cadeia longa principal de importância incluem DHA e EPA, que são principalmente encontrados em diferentes tipos de óleo de peixe, e ARA, encontrado em fungos filamentosos tal como *Mortierella*. Para DHA, numerosas fontes existem para produção comercial incluindo uma variedade de organismos marinhos, óleos obtidos a partir de peixe marinho de água fria, frações de gema de ovo. No entanto, há várias desvantagens associadas a produção comercial de PUFAs a partir de fontes naturais. Fontes naturais de PUFAs, tais como animais e fungos, tendem ter composições oleosas altamente heterogêneas. Os óleos obtidos a partir dessas fontes, portanto, podem exigir purificação extensiva para separar um ou mais PUFAs desejados ou para produzir um óleo que é enriquecido em um ou mais PUFAs.

[008] Fontes naturais de PUFAs também são submetidos a flutuações incontáveis na disponibilidade. Estoques de peixe podem sofrer variação natural ou podem ser esgotados por sobrepesca. Além disso, ainda com evidência devastadora de seus benefícios terapêuticos, recomendações de dieta em relação a ácidos graxos ômega-3 não são consideradas. Óleos de peixe têm gostos e odores desagradáveis, que podem ser impossíveis de economicamente separar do produto desejado, e podem tornar tais produtos inaceitáveis como suplementos alimentícios. Óleos de animal, e particularmente óleos de peixe, podem acumular poluentes ambientais. Alimentos podem ser enriquecidos com óleos de peixe, mas novamente, tal enriquecimento é problemático por causa de custo e declínio de estoques de peixe mundialmente. Esse problema é também um impedimento para consumo e ingestão de peixe inteiro. Apesar disso, se as mensagens saudáveis para aumentar

ingestão de peixe foram abraçadas pelas comunidades, provavelmente seria um problema na satisfação de demanda para peixe. Além do mais, há problemas com sustentabilidade dessa indústria, que pesadamente contam com estoques de peixe selvagem para alimento de aquacultura (Naylor e outros, 2000).

[009] Outras limitações naturais favorecem uma nova abordagem para a produção de ácidos graxos omêga-3. Tempo e doença podem causar flutuação nos campos de peixe. Fermentação em grande escala de organismos tal como *Mortierella* é oneroso. Tecidos de animal naturais contêm baixas quantidades de ARA e são difíceis de processar. Microorganismos tais como *Porphyridium* e *Mortierella* são difíceis de cultivar em uma escala comercial.

[0010] Numerosos microorganismos marinhos produzem PUFA's de cadeia muito longa tais como DHA e EPA por um mecanismo de sintase de policetídeo (PKS). PKSs são complexos de enzima constituídos por polipeptídeos multifuncionais que catalisam a síntese de moléculas complexas a partir de substratos simples em uma forma iterativa. PKSs são bem-conhecidas na técnica e exemplos numerosos de tais sequências podem ser encontrados na literatura. Em *Moritella marina*, uma PKS sintetiza DHA a partir de malonil-CoA and acetil-CoA. Para ativar essa PKS, uma transferases de fosfopanteteínica é exigida.

[0011] Transferases de fosfopanteteínica (Ppts) catalisam a ativação pós-traducionais de proteínas carreadoras, sintase de ácido graxo, sintase de policetídeo, e sintetases de polipeptídeo não ribossomal pela ligação covalente da porção de 4' -fosfopanteteína de coenzima A a um resíduo de serina conservada, uma reação exigida para a biossíntese de produtos naturais incluindo ácidos graxos, policetídeos e peptídeos não ribossomais. Ppts foram classificadas de acordo com sua especificidade de proteína carreadora. Em organismos contendo trajetórias que exigem fosfopanteteína múltipla, foi sugerido que cada

trajetória tenha sua própria Ppt. Enquanto PKS de *M. marina* foi clonado (na patente U.S. nº 6.140.486 (Facciotti e outros)), a Ppt não foi encontrada. Allen e Bartlett (2002) afirmaram que eles eram incapazes de clonar um gene de Ppt para formar *Moritella*.

[0012] Numerosas abordagens foram tentadas para a produção de DHA e EPA em plantas (WO 05103253A1 (Singh e outros), WO 04071467A2 (Kinney e outros)). Essas abordagens tinham em comum o uso de desaturases/elongases em uma forma por etapas. Essa abordagem tem a desvantagem de uso de 6-8 genes e leva ao acúmulo de intermediários, um resultado potencialmente indesejável. Usando-se uma abordagem de PKS/Ppt, numerosos transgenes exigidos seriam menores (4-5) e o acúmulo de intermediários não é esperado.

[0013] Portanto, seria vantajoso se obter material genético envolvido em biossíntese de PUFA de cadeia longa e para expressar o material isolado em um sistema de planta, em particular, um sistema de planta de colheita de terreno com base em terra, que pode ser manipulado para prover a produção de quantidades comerciais de um ou mais PUFAs. Há também uma necessidade de aumentar ingestão de ácido graxo omêga-3 em seres humanos e animais. Assim há uma necessidade de prover uma ampla faixa de suplementos alimentícios e alimentos enriquecidos com omêga-3 de modo que indivíduos podem escolher alimento, ingredientes alimentícios, comida e ingredientes de comida que se ajustam seus hábitos de dieta usuais. Particularmente vantajosos seria óleos de semente com DHA ou EPA aumentados.

[0014] Atualmente há apenas um ácido graxo omêga-3, ALA, disponível em óleos vegetais. No entanto, há conversão pobre de ingestão de ALA nos ácidos graxos omêga-3 de cadeia mais longa tais como EPA e DHA. Foi demonstrado na publicação co-pendente nº 20040039058 para "Treatment And Prevention Of Inflammatory Disorders," que elevação de ingestão de ALA intake da média da comunidade de 1 g/dia

a 14 g/dia por uso de óleo de linhaça apenas modestamente aumentou níveis de EPA de fosfolipídio no plasma. Um aumento de 14 vezes na ingestão de ALA resultou em um aumento 2 vezes no EPA de fosfolipídio no plasma (Manzioris e outros, 1994). Assim, para aquela finalidade, há uma necessidade de produção comercialmente viável e eficiente de PUFA's usando-se um complexo de síntese de policetídeo e a Ppts que ativam o complexo, genes que codificam a Ppt, e métodos recombinantes de produção delas. Uma necessidade também existe para óleos contendo proporções relativas mais altas de DHA ou EPA, e composições alimentícias e suplementos contendo eles. Uma necessidade também existe para métodos confiável e econômico de produção de PUFA's específicos. Óleos derivados de colheitas de semente oleosa tal como canola, soja, girassol ou linhaça, que expressem um complexo de PKS bacteriano são enriquecidos em um EPA, DHA ou PUFA de cadeia longa. Tais óleos podem ser utilizados para produzir alimentos e suplementos alimentares enriquecidos em ácido graxos ômega-3 e o consumo de tais alimentos eficazmente aumenta níveis de EPA e DHA no tecido. Alimentos e gêneros alimentícios, tais como leite, margarina e salsicha, todos produzidos ou preparados com óleos enriquecidos como ômega-3, resultarão em benefício terapêuticos. Assim, existe uma forte necessidade para novos ácidos nucleicos de transferases de fosfopanteteínica capazes de ativar PKS para o uso em plantas de colheita transgênicas com óleos enriquecidos em PUFA's, bem como os óleos aperfeiçoados produzidos desse modo.

Sumário da Invenção

[0015] Em um aspecto, a invenção provê ácidos nucleicos isolados que codificam um polipeptídeo com atividade de transferase de fosfopanteteínica. Esses podem ser usados para transformar células ou modificar a composição de ácido graxo de uma planta ou do óleo produzido por uma planta. Uma concretização da invenção é uma sequência de

polinucleotídeos selecionada do grupo que consiste em (a) um polinucleotídeo que hibridiza para dar SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8, ou um seu complemento, sob condições de 5X SSC, 50% de formamida e 42°C; (b) um polinucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeos de SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 7; e (c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo com pelo menos 75% de identidade de sequência com um sequência de polipeptídeos de SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO:7. Em certas outras concretizações da invenção, os polinucleotídeos codificam um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, 85% ou 90% de identidade de sequência com a sequência de polipeptídeos de SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO: 7, incluindo pelo menos cerca de 82%, 87%, 89%, 92%, 95%, 98% e 99% de identidade com essas sequências. Aqueles de habilidade na técnica reconhecerão que, uma vez que essas sequências estão relacionadas, um dado polipeptídeo pode simultaneamente partilhar 90% ou mais de homologia para mais do que uma dessas sequência de polipeptídeos. Em uma outra concretização, o polipeptídeo codificado tem atividade de transferase de fosfopanteteínica.

[0016] Em ainda um outro aspecto, a invenção provê uma construção de DNA compreendendo a promotor heterólogo operavelmente ligado a uma molécula de DNA que codifica um polipeptídeo tendo atividade de transferases de fosfopanteteínica, em que a molécula de DNA é selecionada do grupo que consiste em: (a) um polinucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeos de SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 7; (b) um polinucleotídeo que hibridiza para dar SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 8, ou um seu complemento, sob condições de 5X SSC, 50% de formamida e 42°C; e (c) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo com pelo menos 75% de identidade de sequência com uma sequência de polipeptídeos de SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 7. Em outras concretizações, o promotor é funcional em uma célula procariótica ou eucariótica. Em certas concretizações, a célula eucariótica em que o

promotor é funcional é uma célula de planta funcional. Em uma outra concretização, o promotor é um promotor de aumento de semente.

[0017] Em ainda um outro aspecto, a invenção provê uma célula hospedeira transformado com uma construção de DNA compreendendo um promotor heterólogo operavelmente ligado a uma molécula de DNA que codifica um polipeptídeo tendo atividade de transferase de fosfopanteteínica provida pela invenção. Em uma outra concretização, a célula hospedeira ulteriormente compreende um promotor heterólogo operavelmente ligado a uma molécula de DNA que codifica um polipeptídeo de sintase de policetídeo compreendendo um sítio de ligação de fosfopanteteína. Em uma outra concretização, a molécula de DNA que codifica um polipeptídeo de sintase de policetídeo compreendendo um sítio de ligação de fosfopanteteína é de *Moritella marina*. Em ainda uma outra concretização, a molécula de DNA codifica um polipeptídeo de sintase de policetídeo com pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 19, ou qualquer sintase de policetídeo conhecida como descrito aqui mais abaixo. A célula hospedeira pode ser uma célula de planta, fúngica ou bacteriana.

[0018] Em ainda um outro aspecto, a invenção provê uma planta e sua progênie constituída das células hospedeiras transformadas com uma construção de DNA compreendendo um promotor heterólogo operavelmente ligado a uma molécula de DNA que codifica polipeptídeo tendo uma atividade de transferase de fosfopanteteínica provida aqui. Tal planta pode ser definida como a comparação alterada de metabolismo de ácido graxo em relação a uma planta do mesmo genótipo que carece da construção de DNA. Em uma concretização, a planta é selecionada do grupo que consiste em canola, *Brassica campestris*, colza de semente oleosa, semente de colza, soja, crambe, mostarda, grão de rícino, amendoim, gergelim, rama de algodão, linhaça, açafrão, óleo de palma, linho, girassol, milho, arroz, cevada, milho miúdo, centeio, trigo,

aveia, alfalfa e sorgo. A invenção também provê semente, óleo e farelo produzidos a partir da planta, que é definido como compreendendo um polipeptídeo ou uma molécula de DNA detectável provido pela invenção. Adicionalmente, a invenção provê composições alimentícias humanas e ração animal.

[0019] Em ainda um outro aspecto, a invenção provê um método de produção de um óleo de planta contendo ácido docosahexaenóico e/ou eicosapentaenóico compreendendo as etapas de (a) crescimento de uma planta compreendendo a célula hospedeira da invenção ulteriormente compreendendo uma sintase de policetídeo; (b) produção de semente; (c) e processamento da semente para se obter um óleo.

Breve Descrição das Figuras

[0020] Os seguintes desenhos fazem parte do presente relatório e estão incluídos para ulteriormente demonstrar certos aspectos da presente invenção. A invenção pode ser melhor entendida por referência a um ou mais desses desenhos com a descrição detalhada de concretizações específicas apresentadas aqui.

[0021] Figura 1 mostra um mapa de vetor pMON68081.

[0022] Figura 2 mostra um mapa de vetor pMON68080.

[0023] Figura 3 mostra um mapa de vetor pMON94547.

[0024] Figura 4 mostra um mapa de vetor pMON94544.

[0025] Figura 5 mostra um mapa de vetor pMON94534.

[0026] Figura 6 mostra um mapa de vetor pMON68084.

[0027] Figura 7 mostra um mapa de vetor pMON68085.

[0028] Figura 8 mostra um mapa de vetor pMON97063.

[0029] Figura 9 mostra um mapa de vetor pMON94563.

[0030] Figura 10 mostra um mapa de vetor pMON97066.

[0031] Figura 11 mostra um mapa de vetor pMON96401.

[0032] Figura 12 mostra um mapa de vetor pMON78528.

Descrição Detalhada da Invenção

[0033] A invenção supera as limitações da técnica anterior por prover métodos e composições para criação de plantas com teor de DHA e/ou de EPA aperfeiçoado. A modificação de teor de ácido graxo de um organismo tal como uma planta apresenta muitas vantagens, incluindo benefício de saúde e nutrição aperfeiçoados. Modificação de teor de ácido graxo pode ser usado para alcançar níveis benéficos de DHA e/ou de EPA em plantas, partes de planta e produtos de planta, incluindo óleos de semente de planta bem como bactérias e fungos. Por exemplo, quando DHA é produzido no tecido de semente de uma planta, o óleo pode ser isolado das sementes, tipicamente resultando em um óleo contendo DHA, que pode por sua vez ser usado para prover características benéficas em gêneros alimentícios e outros produtos.

[0034] Vários aspectos da invenção incluem métodos e composições para a modificação de teor de PUFA de uma célula, por exemplo, modificação do teor de PUFA de célula(s) de planta. Composições relacionadas com a invenção incluem novas sequências de polinucleotídeos isoladas, construções de DNA e plantas e/ou partes de planta transformados por polinucleotídeos da invenção. Células hospedeiras podem ser manipuladas para expressar um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de transferase de fosfopanteteína que catalisa a panteteinilação de um sítio de ligação de fosfopanteteína de um outro polipeptídeo.

[0035] As seguintes definições são providas como um auxiliar para o entendimento dessa invenção. As frases "sequência de DNA", "sequência de ácidos nucleicos", "molécula de ácido nucleico" e "segmento de ácido nucleico" referem-se a estrutura física compreendendo uma disposição ordenada de nucleotídeos. A sequência de nucleotídeo, sequência ou segmento de DNA podem estar contidos dentro de uma molécula de nucleotídeo maior, vetor, ou semelhantes. Além disso, a disposição ordenada de ácidos nucleicos nessas sequências pode ser mostrada na

forma de uma listagem de sequência, tabela, meio eletrônico ou semelhantes.

[0036] As frases "sequência de codificação", "região de codificação", "sequência estrutural" e "sequência de ácidos nucleicos estrutural" referem-se a totalidade ou um segmento de uma sequência de DNA, sequência de ácidos nucleicos, molécula de ácido nucleico em que os nucleotídeos são dispostos em uma série de tripletos que cada um forma um códon. Cada códon codifica um aminoácido específico. Assim, a sequência de codificação, região de codificação, sequência estrutural e sequência de ácidos nucleicos estruturais codificam uma série de aminoácidos formando uma sequência de peptídeos, polipeptídeos ou proteínas. A sequência de codificação, região de codificação, sequência estrutural e sequência de ácidos nucleicos estrutural podem estar contidas dentro de uma molécula de ácido nucleico maior, vetor ou semelhantes. Além disso, a disposição de nucleotídeos nessas sequências podem ser mostradas na forma de uma listagem de sequência, figura, tabela, meio eletrônico, ou semelhantes.

[0037] O termo "cDNA" refere-se a um DNA de filamento duplo que é complementar a e derivado de mRNA.

[0038] "Expressão" refere-se ao processo pelo qual uma informação codificada por gene é convertida em estruturas presentes e operando na célula. Genes expressos incluem aqueles que são transcritos em RNA e então traduzidos em proteína e aqueles que são transcritos em RNA mas não traduzidos na proteína (por exemplo, RNA de transferência e RNA ribossomal).

[0039] Como usado aqui, "gene" refere-se a um fragmento de ácido nucleico que expressa uma proteína específica, incluindo sequências reguladoras que precedem (sequência de não codificação 5') e seguindo a sequência de codificação (sequências de não codificação 3'). "Gene nativo" refere-se a um gene como encontrado na natureza com

suas próprias sequências reguladoras. "Gene quimérico" refere-se a qualquer gene que não é um gene nativo, compreendendo sequências reguladoras e de codificação que não são encontradas juntas na natureza. Correspondentemente, um gene quimérico pode compreender sequências reguladoras e sequências de codificação que são derivadas de diferentes fontes, ou sequências reguladoras e sequências de codificação derivadas da mesma fonte, mas dispostas de um modo diferente do que aquela encontrada na natureza. "Gene endógeno" refere-se a um gene nativo em sua localização natural no genoma de um organismo. Um gene "exógeno" ou "transgene" refere-se a um gene que foi introduzido para dentro do genoma por um procedimento de transformação. Um transgene inclui DNA genômico introduzido por um procedimento de transformação (por exemplo, um DNA genômico ligado a seu promotor ativo).

[0040] "Heterólogo" refere-se ao relacionamento entre duas ou mais sequências de proteínas ou de ácidos nucleicos que são derivadas de diferentes fontes. Por exemplo, um promotor é heterólogo com relação a uma sequência de codificação se tal combinação não for normalmente encontrada na natureza. Além disso, uma sequência de ácidos nucleicos particular pode ser "heteróloga" com relação a uma célula ou um organismo em que ela é inserida se ela não naturalmente ocorrer naquela célula ou organismo particular.

[0041] "Homologia de sequência" refere-se ao nível de similaridade entre duas ou mais sequências aminoácidos ou de ácidos nucleicos em termos de percentagem de identidade posicional. O termo homologia é também usado para referir-se ao conceito de propriedades funcionais similares entre ácidos nucleicos ou proteínas.

[0042] "Hibridização" refere-se à capacidade de um primeiro filamento de ácido nucleico unir com um segundo filamento por meio de emparelhamento de base de ligação de hidrogênio quando as fitas de

ácido nucléico têm complementaridade de sequência suficiente. Como usado aqui, uma molécula de ácido nucléico é dita ser o "complemento" de uma outra molécula de ácido nucléico se elas exibirem complementaridade completa. Como usado aqui, moléculas são ditas exibirem "complementaridade completa" quando cada nucleotídeo de uma das moléculas é complementar a um nucleotídeo da outra. Assim 2 fitas de ácido nucléico são ditas como tendo complementaridade suficiente quando hibridizam uma com a outra com estabilidade suficiente para permiti-las permanecerem anelados entre si sob condições apropriadas.

[0043] Como usado aqui, o termo "homologia" refere-se ao nível de similaridade ou por cento de identidade entre sequências de polinucleotídeos em termos de por cento de indentidade posicional de nucleotídeo, isto é, similaridade ou identidade de sequência. Como usado aqui, o termo homologia refere-se também ao conceito de propriedades funcionais similares entre diferentes moléculas de polinucleotídeos. Moléculas de polinucleotídeos são homólogas quando sob certas condições elas especificamente hibridizam para formar uma molécula dúplex. Sob essas condições, chamadas de condições rigorosas, uma molécula de polinucleotídeo pode ser usada como uma sonda ou iniciador para identificar outras moléculas de polinucleotídeo que partilham homologia. A frase "condições rigorosas" é funcionalmente definida com relação à hibridização de uma sonda de ácido nucléico para dar um ácido nucléico-alvo (isto é, para dar uma sequência de ácidos nucléicos particular de interesse) pelo procedimento de hibridização específico, por exemplo, discutido em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition Volumes 1, 2, and 3. J. F. Sambrook, D. W. Russell, and N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000 (Sambrook e outros). Correspondentemente sequências de nucleotídeos providas pela invenção podem ser usadas para sua capacidade de seletivamente formar moléculas dúplex com estiramentos complementares dos fragmentos de molécula de

polinucleotídeo. Dependendo da aplicação prevista desejaria-se empregar várias condições de hibridização para alcançar graus variáveis de seletividade da sonda em relação a sequência alvo. Para aplicações que exigem alta seletividade, tipicamente serão desejadas empregar condições rigorosas relativamente altas para formar os híbridos, por exemplo, serão selecionadas condições de baixa salinidade e/ou de alta temperatura, tais como providos por NaCl a cerca de 0,03 M a cerca de 0,15 M a temperatura de cerca de 50°C a cerca de 70°C. Uma condição altamente rigorosa, por exemplo, é para lavar o filtro de hibridização pelo menos duas vezes com tampão de lavagem altamente rigoroso (0,2 x SSC, 0,1% de SDS, 65°C). Adicionalmente, formamida pode ser usada para aumentar a severidade. Condições altamente rigorosas, portanto, também incluem 5X SSC, 50% de formamida e 42°C. Detecção de moléculas de polinucleotídeos via hibridização é bem-conhecida por aqueles de habilidade na técnica, e os ensinamentos das patentes U.S. nos. 4.965.188 e 5.176.995 são exemplares dos métodos de análises de hibridização.

[0044] A frase "isolada" significa ter sido removida a partir do material natural, independentemente de sua disposição final. Por exemplo, uma sequência de ácidos nucleicos "isolada" de arroz, tal como por clonagem de uma célula de arroz, permanece "isolada" quando ela é inserida para dentro do genoma de uma célula de milho.

[0045] A frase "operavelmente ligada" refere-se à disposição espacial de duas ou mais regiões de ácido nucleico ou sequências de ácidos nucleicos de modo que elas exercem seus efeitos apropriados com relação entre si. Por exemplo, uma região de promotor pode ser posicionada em relação a uma sequência de ácidos nucleicos de modo que a transcrição da sequência de ácido nucleico seja dirigida pela região de promotor. A região de promotor e a sequência de ácidos nucleicos são "operavelmente ligadas".

[0046] O termo "transferase de fosfopanteteínica ou PPT" refere-se a uma enzima que catalisa a ativação pós-traducional de proteínas carreadoras, por exemplo, um polipeptídeo de uma sintase de policetídeo, pela ligação covalente da porção de 4'-fosfopanteteína de coenzima A a um resíduo de serina conservado.

[0047] O termo "sintase de policetídeo" refere-se a um complexo de enzima constituído de polipeptídeos multifuncionais que catalisam a síntese de moléculas complexas a partir de substratos simples em uma forma iterativa. Em *Moritella marina*, um complexo de PKS sintetiza DHA a partir de malonil-CoA e acetil-CoA). Por exemplo, em *M. marina*, o PKS contém 4 polipeptídeos codificados pelos quadros de leitura aberta Orf5, Orf6, Orf7 e Orf8 (Metz e outros, 2001), que são descritos como Orf6, Orf7, Orf8, e Orf9 na patente U.S. nº 6.140.486, respectivamente. Para ativar esse complexo, uma transferase de fosfopanteteínica é exigida para pantetenizar o polipeptídeo codificado por Orf5. O complexo de PKS de *Shewanella* sp. SCRC2738 sintetiza EPA (Metz e outros, 2001).

[0048] "A montante" e "a jusante" são termos posicionais usados com referência à localização de uma sequência de nucleotídeos e a direção da transcrição ou tradução de sequências de codificação, que normalmente prossegue na direção de 5'a 3'.

[0049] Os termos "promotor" ou "região de promotor" referem-se a uma sequência de ácidos nucleicos, usualmente encontrada a montante (5') em relação a uma sequência de codificação, capaz de dirigir transcrição de uma sequência de ácidos nucleicos em uma molécula de RNA. O promotor ou região de promotor tipicamente provê um sítio de reconhecimento para polimerase de RNA e os outros fatores necessários para a indicação adequada da transcrição. Como contemplado aqui, um promotor ou uma região de promotor inclui variações de promotores derivados por inserção ou deleção de regiões reguladoras, submissão do

promotor a mutagênese de sítio-dirigida ou aleatória, e semelhantes. A atividade ou poder de um promotor pode ser medido em termos das quantidades de RNA que ele produz, ou a quantidade de acúmulo de proteína em uma célula ou tecido, em relação a um promotor secundário que é similarmente medido.

[0050] A frase "sequências de não codificação 3'" refere-se a sequências de nucleotídeos localizadas a jusante de uma sequência de codificação e incluem sequências de reconhecimento de poliadenilação e outras sequências que codificam sinais reguladores capazes de afetar expressão de gene ou processamento de mRNA. Esses são comumente chamados de regiões 3'-não traduzidas ou 3'-UTRs. O sinal de poliadenilação é usualmente caracterizado por afetar a adição de tratos de ácido poliadenílico à extremidade 3' do precursor de mRNA. O uso de diferentes sequências de não codificação 3' é exemplificado por Ingelbrecht e outros (1989).

[0051] "Sequência líder de tradução" ou "região 5'-não traduzida" ou "5'-UTR" a totalidade refere-se a uma sequência de nucleotídeos localizada entre a sequência de promotor de um gene e a sequência de codificação. A 5'-UTR está presente na mRNA totalmente processado a montante da sequência de partida de tradução. A 5'-UTR pode afetar o processamento do transcrito primário para dar mRNA, estabilidade de mRNA ou eficácia de tradução. Exemplos de sequências de líder de tradução foram descritos (Turner and Foster, 1995).

[0052] "Transcrito de RNA" refere-se ao produto resultante de transcrição catalisada por polimerase de RNA de uma sequência de DNA. Quando o transcrito de RNA é uma cópia complementar perfeita da sequência de DNA, é chamado de transcrito primário. Uma sequência de RNA derivada de processamento pós-traducional do transcrito primário é chamado de RNA. "RNA mensageiro" (mRNA) refere-se ao RNA que está sem íntrons e que pode ser traduzido em polipeptídeo pela célula.

[0053] "Construção de DNA" refere-se aos elementos genéticos heterólogos operavelmente ligados entre si formando uma molécula de DNA recombinante e pode compreender elementos que provêm expressão de uma molécula de polinucleotídeo de DNA em uma célula hospedeira que provêm a manutenção da construção. Um pacote de expressão de planta compreende uma ligação operável de elementos genéticos que quando transferidos em uma célula de planta provê expressão de um produto de gene desejável.

[0054] "Vetor recombinante" refere-se a qualquer agente por em que um ácido nucléico de interesse é ampliado, é expresso ou é armazenado, tal como um plasmídeo, cosmídeo, vírus, sequência de replicação autônoma, fago, ou sequência de nucleotídeos de DNA ou de RNA de filamento único linear, de filamento único circular, de filamento duplo linear ou de filamento duplo circular. O vetor recombinante pode ser sintetizado ou derivado de qualquer fonte e é capaz de integração genômica ou replicação autônoma.

[0055] "Sequência reguladora" refere-se a uma sequência de nucleotídeos localizada a montante (5'), dentro, ou a jusante (3') com relação a uma sequência de codificação ou um íntron, cuja presença ou ausência afeta a transcrição e expressão da sequência de codificação.

[0056] "Substancialmente homóloga" refere-se a duas sequências que são pelo menos 90% idêntica na sequência, como medida pelo algoritmo CLUSTAL W em, por exemplo, DNASTar (Madison, WI).

[0057] "Substancialmente purificada" refere-se a uma molécula separada de substancialmente todas as outras moléculas normalmente associadas a ela em seu estado nativo. Mais de preferência, uma molécula substancialmente preferida é a espécie predominante presente em uma preparação. Uma molécula substancialmente purificada pode ser maior do que cerca de 60% livre de preferência cerca 75% livre, mais preferivelmente, cerca de 90% livre, e mais de preferência cerca de 95%

livre das outras moléculas (exclusive de solvente) presentes na mistura natural. Pretende-se que a frase "substancialmente purificada" não inclua moléculas presentes em seu estado nativo. De preferência, as moléculas de ácido nucléico e polipeptídeos dessa invenção são substancialmente purificadas.

[0058] O termo "transformação" refere-se à introdução de ácido nucléico para dentro de um hospedeiro receptor. O termo "hospedeiro" refere-se a células bacterianas, fungos, animais ou células de animais, plantas e sementes, ou quaisquer tecidos ou partes de planta incluindo células de planta, protoplastos, calos, raízes, tubérculos, sementes, troncos, folhas, mudas, embriões e pólen.

[0059] Como usado aqui, uma "planta transgênica" é uma planta tendo estavelmente introduzida para dentro de seu genoma, por exemplo, os genomas nucleares ou de plastídio, um ácido nucléico exógeno.

[0060] O termo "isogênico" como um termo comparativo entre plantas ou linhas de planta tendo ou carecendo de um transgene significa plantas ou linhas tendo as bases genéticas iguais ou similares, com a exceção do transgene em questão. Por exemplo, linhas irmãs assim chamadas que representam seleções fenotipicamente similares ou iguais a partir da mesma população de F2 de origem são consideradas serem "isogênicas". Quando a progênie de uma planta de transformante estável são cruzadas e retro-cruzadas com as plantas da linha de origem não transformadas para 3 a 6 gerações (ou mais) usando-se a origem não transformada como a origem recorrente enquanto selecionando-se para o tipo (genótipo por análise de marcador molecular, fenótipo por observação de campo ou ambos) e para o transgene, a linha transgênica resultante é considerada ser altamente "isogênica" a sua linha de origem não transformada.

[0061] Os termos "sementes", "sementes" ("kernel") e "grão" são entendidos como sendo equivalentes no significado. O termo semente

é frequentemente usado na descrição de uma semente de uma planta de milho ou arroz. Em todas as plantas a semente é o óvulo maduro que consiste em um revestimento de semente, embrião, aleurona e um endosperma.

Ácidos nucleicos que codificam transferase de fosfopanteteínila

[0062] A invenção provê, em uma concretização, novos ácidos nucleicos que codificam transferases de fosfopanteteínila *Moritella marina*. Em certas concretizações, os ácidos nucleicos compreendem SEQ ID NOS: 2, 4, 6 ou 8. A invenção também provê métodos de uso de tais ácidos nucleicos, incluindo SEQ ID NOS: 2, 4, 6 e 8. Em uma concretização, essas moléculas de ácido nucleico são usadas no contexto dessa invenção para alterar a composição oleosa de uma semente de uma planta.

[0063] Tal ácido nucleico pode ser ampliado usando-se cDNA, mRNA ou DNA genômico como um modelo e iniciadores de oligonucleotídeo apropriados de acordo com técnicas de ampliação de PCR® padrão. Alternativamente, eles podem ser sintetizados usando-se técnicas sintéticas padrão, tal como um sintetizador de DNA automatizado. Polinucleotídeos que codificam transferases de fosfopanteteínila desejadas podem ser identificados de uma variedade de modos. Como um exemplo, uma fonte da transferase de fosfopanteteínila, por exemplo, uma biblioteca oriunda de *Moritella*, é triada com sondas enzimaticamente ou quimicamente sintetizadas detectáveis, que podem ser produzidas a partir do DNA, RNA ou nucleotídeos de ocorrência natural, ou suas misturas. Sondas podem ser enzimaticamente sintetizadas a partir de polinucleotídeos de transferases de fosfopanteteínila conhecidas para métodos de hibridização normal ou rigorosamente reduzida. Sondas de oligonucleotídeos também podem ser usados para triar e podem ser baseados em sequências de transferases de fosfopanteteínila conhecidas, incluindo sequências conservadas entre transferases de

fosfopanteteína conhecidas ou nas sequências de peptídeos obtidas a partir da proteína purificada desejada. Sondas de oligonucleotídeos com base em sequências de aminoácidos podem ser degenerados para incluir a degeneração de código genético, ou podem ser desfavoráveis em favor dos códons preferidos do organismo da fonte. Oligonucleotídeos também pode ser usados como iniciadores para PCR[®] a partir de mRNA de transcrito reverso de uma fonte conhecida ou suspeita; o produto de PCR[®] pode ser o cDNA de comprimento total ou pode ser usado para gerar uma sonda para se obter o cDNA de comprimento total desejado. Alternativamente, uma proteína desejada pode ser totalmente sequenciada e síntese total de uma DNA que codifica aquele polipeptídeo realizado.

[0064] Uma vez que cDNA ou genômico desejado foi isolado, ele pode ser sequenciado por métodos conhecidos, é reconhecido na técnica que tais métodos são submetidos a erros, tal que sequenciação múltipla da mesma região é rotineira e é ainda esperado levar a taxas mensuráveis de erros na sequência deduzida resultante, particularmente em regiões tendo domínios repetidos, estrutura secundária extensiva ou composições de base incomum, tais como regiões com alto teor de base de GC. Quando discrepâncias surgem, sequenciação pode ser feita e pode empregar métodos especiais. Métodos especiais podem incluir alteração de condições de sequenciação por uso de: diferentes temperatura; diferentes enzimas; proteínas que alteram a capacidade de oligonucleotídeos de formar estruturas de ordem superiores; nucleotídeos alterados tal como ITP ou dGTP metilado, composições de gel diferentes, por exemplo, adição de formamida; diferentes iniciadores ou iniciadores localizados a diferentes distâncias da região do problema; ou diferentes modelos tais como DNAs de filamento único. Sequenciação de mRNA pode também ser empregada.

[0065] Se desejadas, as sequências de ácidos nucléicos que

codificam transferases de fosfopanteteínica podem ser modificadas sem mudar a sequência de aminoácidos da proteína expressa de modo que as sequências são mais receptivas a expressão em hospedeiros de planta. Uma sequência de codificação pode ser um DNA artificial. Um DNA artificial, como usado aqui significa uma molécula de polinucleotídeo de nda que não é de ocorrência natural. Moléculas de DNA artificiais podem ser projetadas por uma variedade de métodos, tais como, métodos conhecidos na técnica que são à base de substituição do(s) códon(s) de um primeiro polinucleotídeo para criar um equivalente, ou ainda um polinucleotídeo artificial de segunda geração, aperfeiçoado, onde esse novo polinucleotídeo artificial é útil para expressão aumentada nas plantas transgênicas. O aspecto do projeto frequentemente emprega sequências de codificação isoladas de uma planta, tipo de planta, família ou genes. Outros aspectos de projeto incluem redução da ocorrência de sinais de poliadenilação, sítios de união de íntron, ou poderes de GC e AT longos da sequência (patente U.S. nº 5.500.365). Sequências de codificação de comprimento total ou seus fragmentos podem ser produzidos de DNA artificial usando-se métodos conhecidos por aqueles versados na técnica. Modificações das sequências de nucleotídeos ou elementos reguladores descritos aqui que mantêm as funções contempladas aqui estão dentro do escopo dessa invenção. Tais modificações incluem inserções, substituições e deleções, e especificamente substituições que refletem a degeneração do código genético.

[0066] Os inventores têm sequências de DNA isoladas de *Moritella marina* que produzem polipeptídeos com atividade de transferase de fosfopanteteínica. As sequências de codificação da transferases de fosfopanteteínica podem ser expressas em plantas transgênicas, microorganismos ou animais para efetuar ativação de uma sintase de policetídeo. Outros polinucleotídeos que são substancialmente idênticos aos polinucleotídeos de transferase de fosfopanteteínica providos aqui, ou

que codificam polipeptídeos que são substancialmente idênticos aos polipeptídeos de transferase de fosfopanteteínica, também podem ser usados. "Substancialmente idêntica" refere-se a uma sequência de aminoácidos ou sequência de ácidos nucleicos que exibe em ordem de preferência crescente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98 ou 99% identidade com a sequência de polipeptídeos de transferase na SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 ou sequências que codificam esses polipeptídeos. Comparações de polipeptídeo ou polinucleotídeo podem ser realizados usando-se programa de análise de sequência, por exemplo, pacote de programa Sequence Analysis da GCG Wisconsin Package (Accelrys, San Diego, CA) e MEGAlign (DNASStar, Inc., 1228 S. Park St., Madison, Wis. 53715). Tal programa satisfaz sequências similares por apontamento de grau de similaridade ou identidade.

Construções de DNA

[0067] A invenção provê construções de DNA compreendendo um promotor heterólogo operavelmente ligado a um ácido nucleico descrito aqui. A seleção de promotores, por exemplo, promotores que podem ser descritos como fortemente expressos, fracamente expressos, induzivelmente expressos, expresso por tecido aumentado (isto é, especialmente ou de preferência expresso em um tecido), expresso por órgão aumentado (isto é, especialmente ou de preferência expresso em um órgão) e expresso desenvolventemente aumentado (isto é, especificamente ou de preferência expresso durante um estágio(s) particular de desenvolvimento), está dentro da habilidade na técnica. Similarmente, a combinação de uma molécula de ácido nucleico como descrito acima com um promotor está também dentro da habilidade na técnica (ver, por exemplo, Sambrook e outros, 1989).

[0068] Promotores para o uso com a invenção incluem, mas não são limitados a, promotores que funcionam em bactérias, bacteriófagos, fungos ou células de planta. Promotores úteis para expressão

bacteriana são os promotores lacZ, Sp6, T7, T5 ou glgC de *E. coli*. Promotores úteis para fungos incluem *Saccharomyces cerevisiae* Gal1 (West, e outros (1984)), *Saccharomyces pombe* nmt1 (Maundrell, K. (1990)), *Neurospora crassa* ccg-1 (Freitag M and Selker EU (2005)) e *Pichia methanolica* AUG1 (Invitrogen). Promotores úteis para células de planta incluem o promotor de Z27 de gama zeína (vide, por exemplo, Lopes e outros (1995), promotor de oleosina de L3 (a patente U.S. nº 6.433.252), promotor de PER1 de cevada (Stacey e outros, 1996), promotor de 35S de CaMV (Odell e outros 1985), o CaMV 19S (Lawton e outros, 1987), nos (Ebert e outros, 1987), Adh (Walker e outros, 1987), sintase de sacarose (Yang e outros, 1990), actina (Wang e outros, 1992), cab (Sullivan e outros, 1989), promotor de PEPCase (Hudspeth e outros, 1989), ou aqueles associados ao complexo de gene R (Chandler e outros, 1989). O promotor de vírus de mosaíco Figwort (FMV) (Richins e outros, 1987), promotores de arcelina, E8 de tomate, patatina, ubiquitina, sintase de manopina (mas) e tubulina são outros exemplos de promotores úteis.

[0069] Há uma ampla variedade de sequências de promotor de planta que podem ser usados para dirigir expressão específica de tecido de polinucleotídeos que codificam transferases de fosfopanteteínica em plantas transgênicas. Exemplos de tais promotores incluem as regiões reguladoras 5' de tais genes de napin (Kridl e outros, 1991), faseolin (Bustos, e outros, 1989), inibidor de tripsina de soja (Riggs, e outros, 1989), ACP (Baerson e outros, 1993), stearyl-ACP desaturase (Slocombe e outros, 1994), subunidade α' de soja de β -conglícinina (P-Gm7S α' , vide, por exemplo, Chen e outros, 1986), Vicia faba USP (P-Vf.Usp, vide, por exemplo, SEQ ID NO: 1, 2, e 3, Pedido de Patente U.S. 10/429,516), the promotor de globulina (vide, por exemplo, Belanger and Kriz, (1991), subunidade α de soja de β -conglícinina (7S α) (Pedido de Patente U.S. 10/235.618, incorporado por referência) e

promotor de *Zea mays* L3 oleosina (P-Zm.L3, vide por exemplo, Hong e outros, 1997).

[0070] Promotores expressos em milho incluem promotores de genes que codificam zeínas, que são um grupo de proteínas de armazenagem em endoesperma de milho. Clones genômicos para genes de zeína foram isolados (Pedersen e outros, 1982; Russell e outros, 1997) e os promotores oriundos desses clones, incluindo os genes de kD, 16 kD, 19 kD, 22 kD e 27 kD, podem ser usados. Outros promotores de expressão de semente aumentado conhecidos como funcionando no milho e em outras plantas incluem os promotores para os seguintes genes: Waxy (sintase de amido ligado a grânulo), Brittle and Shrunken 2 (pirogosforilase de glicose de ADP), Shrunken 1 (sintase de sacarose), enzimas I e II de ramificação, sintase de amido, enzimas de desramificação, oleosinas, glutelinas, e Bet11 (camada de transferência de endoesperma basal). Outros promotores úteis na prática da invenção que são conhecidos por aquele de habilidade na técnica são também contemplados pela invenção.

[0071] Além do mais, duplicações e aumentadores de transcrição de aumentados podem ser usados para aumentar a expressão de um promotor particular. Exemplos de tais aumentadores incluem, mas não são limitados ao íntron 1 de Adh, mas não são limitados ao íntron 1 de Adh (Callis e outros, 1987), um íntron de actina de arroz (McElroy e outros, 1991; U.S. Patent No. 5,641,876), sucrose synthase intron (Vasil e outros, 1989), um íntron de HSP70 de milho (também chamado de Zm.DnaK) (a patente U.S. nº 5.424.412, Brown e outros) um elemento TMV omega (Gallie e outros, 1999), o aumentado de 35S de CaMV 35S (as patentes U.S. nos 5.359.142 & 5.196.525, McPherson e outros) ou um aumentador de sintase de octopina (a patente U.S. nº 5.290.924, Last e outros). Uma vez que a sequência de DNA entre sítio de iniciação de transcrição e o início da sequência de codificação, isto

é, a sequência líder não traduzida, pode influenciar expressão de gene, pode-se também desejar empregar uma sequência líder particular. Qualquer sequência líder disponível por aquele de habilidade na técnica pode ser empregada. Sequências líder preferidas dirigem ótimos níveis de expressão do gene ligado, por exemplo, por aumento ou manutenção de estabilidade de mRNA e/ou por prevenção de iniciação inadequada de tradução (Joshi, 1987). A escolha de tais sequências está na descrição por aqueles de habilidade na técnica.

[0072] Contrutos de DNA da invenção podem incluir uma sequência próxima a extremidade 3' do pacote que age como um sinal para terminar transcrição a partir de um ácido nucléico heterólogo e que dirige poliadenilação do mRNA resultante. Esses são comumente chamados de regiões não traduzidas 3' ou 3'UTRs. Alguns elementos 3' que pode agir como sinais de terminação de transcrição incluem aqueles a partir do gene de sintase de nopalina (nos) de *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan e outros, 1983), uma região não traduzida 3' de napina (Kridl e outros, 1991), uma região não traduzida 3' de globulina (Belanger and Kriz, 1991), região não traduzida 3' do gene de Adr12 de soja (auxin regulado para baixo) (Wang e outros, Publicação de PCT WO 200250295) ou um de gene de zeína, tal como Z27 (Lopes e outros, 1995). Outros elementos reguladores 3' conhecidos na técnica também podem ser usados nos vetores da invenção.

[0073] A molécula de ácido nucléico como descrito aqui pode ser clonado em qualquer vetor adequado e pode ser usada para transformar ou transfectar qualquer hospedeiro adequado. A seleção de vetores e métodos para construí-los são comumente conhecidos pela técnica e são descritos em referências técnicas gerais (vide, em geral "Recombinant DNA Part D" (1987). O vetor de preferência compreenderá sequências reguladoras, tais como transcrição e iniciação de tradução e códons de terminação, que são específicos para o tipo de hospedeiro (por

exemplo, bactéria, fungo ou planta) em que o vetor deve ser introduzido, quando apropriado e levar em conta a consideração se o vetor é DNA ou RNA.

[0074] Vetores que são circulares ou lineares podem ser preparados para conter uma sequência de ácido nucléico inteira como descrita acima ou uma sua porção ligada a um sistema de replicação funcional em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica. Sistemas de replicação podem ser derivados de ColE1, 2 μ de plasmídio, λ fago, fago de filamento f1, espécie de *Agrobacterium* (por exemplo, *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*), e semelhantes.

[0075] Além do sistema de replicação e a sequência de ácidos nucléicos inserida, o vetor pode incluir um ou mais genes marcadores que permitem a seleção de hospedeiros transformados ou transfectados. Genes marcadores incluem resistência a biocida, tais como resistência a antibióticos, metais pesados, herbicidas, etc., complementação em um hospedeiro auxotrófico para prover prototrofia e semelhantes.

[0076] A invenção provê células hospedeiras compreendendo uma molécula de ácido nucléico descrita aqui, opcionalmente na forma de um vetor. Hospedeiros adequados incluem células fúngicas, bacterianas, e de planta, incluindo *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Neurospora crassa*. Hospedeiros de *E. coli* incluem TB-1, TG-2, DH5 α , XL-Blue MRF' (Stratagene, Austin, TX), SA2821, Y1090 e TG02. Células de planta incluem, mas não são limitadas a, soja, *Brassica campestris*, canola, colza de semente olheosa, crumbe, mostarda, semente de rícino, amendoim, gergelim, rama de algodão, linhaça, alçafrão, óleo de palma, linho, girassol, alfalfa, milho, trigo, cevada, aveia, centeio, milho miúdo, sorgo e arroz.

[0077] Expressão em uma célula hospedeira pode ser realizada em uma forma transitória ou estável. Expressão transitória pode ocorrer de

construções introduzidas que contêm sinais de expressão funcionais na célula hospedeira, mas que tais construções não replicam e raramente se integram na célula hospedeira, ou em que a célula hospedeira não está se proliferando. Expressão transitória também pode ser realizada por indução da atividade de promotor regulável operavelmente ligado ao gene de interesse, embora tais sistemas induzíveis frequentemente exibam um baixo nível basal de expressão. Expressão adequada pode ser alcançada por introdução de uma construção que pode integrar no genoma hospedeiro ou que autonomamente se replica na célula hospedeira. Tal expressão do gene de interesse pode ser selecionado para através do uso de um marcador selecionável localizado na ou transfectado com a construção de expressão, seguido para células que expressam o marcador. Quando expressão estável resulta da integração, integração de construções pode ocorrer aleatoriamente dentro do genoma hospedeiro ou pode ser direcionada através do uso de regiões contendo construções de homologia com o genoma hospedeiro suficiente para direcionar recombinação com o local de hospedeiro. Onde construções são direcionados para um local endógeno, todas ou algumas das regiões reguladoras traducionais e transcritivas podem ser providas pelo local endógeno.

[0078] Expressão em uma célula hospedeira pode envolver técnicas de fermentação conhecidas por aquele versado na técnica. A célula hospedeira fermentada pode ser uma procariote, *Escherichia coli*, ou uma eucariote, tal como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, ou *Neurospora crassa*, um fungo filamentoso. Exemplos de produção de PUFA por fermentação incluem (a patente U.S. 6.319.698) e *Thraustochytriales* (a patente U.S. 6.451.567).

[0079] É contemplado que mais do que um gene pode ser introduzido e propagado em uma célula hospedeira através do uso de vetores de expressão integrados ou episomais. Onde dois ou mais genes são

expressos a partir de vetores de replicação separados, se é desejável que cada vetor tenha um meio diferente de replicação. Cada construção introduzida, se integrado ou não, teria um modo diferente de seleção e careceria de homologia para as outras construções para manter expressão estável e prevenir reagrupamento de elementos entre constructos. Escolhas judiciosas de regiões reguladoras, meio de seleção e método de propagação do constructo introduzido podem ser experimentalmente determinadas de modo que todos os polinucleotídeos introduzidos são expressos no níveis necessários para prover a síntese dos produtos desejados.

Polipectídeos

[0080] A invenção provê transferases de fosfopanteteínica codificadas por moléculas de ácido nucléico descritas aqui. Sintase de plicetídeo são complexos de enzimas constituídas de polipeptídeos multifuncionais que catalisam a síntese de moléculas complexas a partir de substratos simples em uma forma iterativa. Em *Moritella marina*, um complexo de PKS sintetiza DHA a partir de malonil-CoA e acetil-CoA. Para ativar esse complexo, uma transferase de fosfopanteteínica é necessária. O polipeptídeo de preferência compreende uma extremidade de amino e uma extremidade de carboxila. O polipeptídeo pode compreender D-aminoácido, L-aminoácidos ou uma mistura de D- e L-aminoácidos.

[0081] Alterações da sequência de aminoácidos nativa para produzir polipeptídeos variantes podem ser preparadas por uma variedade de meios conhecidos por aqueles normalmente versados na técnica. Por exemplo, substituições de aminoácidos podem ser convenientemente introduzidas para dentro dos polipeptídeos por mudança da sequência da molécula de ácido nucléico na hora da síntese. Mutações específicas de sítio podem também ser introduzidas por ligação em um vetor de expressão de um oligonucleotídeo sintetizado compreendendo a

sequência modificada. Alternativamente, procedimentos de mutagenese específicos de sítio, dirigidos por oligonucleotídeo podem ser usados, tais como descritos em in Walder e outros (1986); Bauer e outros (1985); e as patentes U.S. nos. 4.518.584 e 4.737.462.

[0082] Está dentro da habilidade do técnico comum selecionar aminoácidos de ocorrência natural e sintéticos que efetuam substituições conservadoras e neutras para quaisquer aminoácidos de ocorrência natural. O técnico normalmente versado desejavelmente considerará o contexto em que qualquer substituição de aminoácido é feita, além da consideração da hidrofobicidade ou polaridade da cadeia lateral, o tamanho geral da cadeia lateral e o valor de pK de cadeias laterais com caráter ácido ou básico sob condições fisiológicas. Por exemplo, lisina, arginina, e histidina são frequentemente adequadas entre si, e mais frequentemente arginina e histidina. Como é também conhecido na técnica, isso é porque todos os três aminoácidos têm cadeias laterais básicas, enquanto que o valor de pK para as cadeias laterais de lisina e arginina são muito mais próximas entre si (cerca de 10 e 12) do que histidina (cerca de 6). Similarmente, glicina, alanina, valina, leucina, ácido isoleucina são frequentemente adequadamente substituídos entre si, com a condição de que a glicina não seja usada frequentemente como substituta dos outros membros do grupo. Isso é, porque cada um desses aminoácidos é relativamente hidrofóbico quando incorporado em um polipeptídeo, mas glicinas carecem de um alfa-carbono que permite os ângulos phi e psi de rotação (em volta do alfa-carbono) tanto liberada conformacional que resíduos de glicinila podem disparar mudanças em conformação ou em estrutura secundárias que não frequentemente ocorrem quando os outros aminoácido são substituídos entre si. Outros grupos de aminoácidos frequentemente adequadamente são usados como substitutos entre si incluem, mas não são limitados ao grupo que consiste em ácidos glutâmico ou aspártico; o

grupo que consiste em fenilalanina, tirosina e triptofano; e o grupo que consiste em serina, treonina e, opcionalmente, tirosina. Adicionalmente, o técnico normalmente versado pode prontamente agrupar aminoácidos sintéticos com aminoácidos de ocorrência natural.

[0083] Se desejado, os polipeptídeos podem ser modificados, por exemplo, por glicosilação, amidação, carboxilação ou fosforilação ou pela criação de um sal de adição de ácido, amidas, ésteres, em particular ésteres C-terminais, e derivados de N-acila dos polipeptídeos da invenção. Os polipeptídeos podem também ser modificados para criar derivados de proteína por formação de complexos covalentes ou não covalentes com outras porções de acordo com os métodos conhecidos na técnica. Complexos covalentemente ligados podem ser preparados por ligação das porções químicas a grupos funcionais nas cadeias laterais de aminoácidos compreendendo os polipeptídeos, ou no terminal-C ou -N. Desejavelmente, tais modificações e conjugações não adversamente afetam a atividade dos polipeptídeos (e suas variantes). Enquanto tais modificações e conjugações podem ter maior ou menor atividade, a atividade desejavelmente não é negada e é característica do polipeptídeo inalterado.

[0084] Os polipeptídeos (e fragmentos, variantes e proteínas de fusão) podem ser preparados por qualquer uma de numerosas técnicas. O polipeptídeo pode ser isolado ou substancialmente purificado de uma fonte de ocorrência natural ou de uma fonte recombinante. Por exemplo, no caso de proteínas recombinantes, um fragmento de DNA que codifica uma proteína desejada pode ser subclonado em um vetor apropriado usando-se técnicas genéticas moleculares bem-conhecidas (vide, por exemplo, Maniatis e outros, 1989) e outras referências citadas aqui sob "EXEMPLOS"). O fragmento pode ser transcrito e a proteína subsequentemente traduzida in vitro. Kits comercialmente disponíveis também podem ser empregados (por exemplo, tais como fabricados por

Clontech, Mountain View, CA; Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, IL; Invitrogen, Carlsbad, CA e semelhantes). A reação de cadeia de polimerase opcionalmente pode ser empregada na manipulação de ácidos nucleicos.

[0085] Polipeptídeos podem ser sintetizados usando-se sintetizador de peptídeo automatizado de acordo com os métodos conhecidos na técnica. Alternativamente, o polipeptídeo (e fragmentos, variantes e proteínas de fusão) pode ser sintetizado usando-se técnicas de síntese de peptídeo padrão bem-conhecidas por aqueles de habilidade normal na técnica (vide, por exemplo, Merrifield, 1963; Barany e outros, 1987; e a patente U.S. 5.424.398). Se desejado, isso pode ser feito usando-se um sintetizador de peptídeo automatizado. Remoção do grupo de bloqueamento de aminoácido de t-butiloxicarbonila (t-BOC) ou 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc) e separação da proteína da resina pode ser realizada por, por exemplo, tratamento com ácido a temperatura reduzida. A mistura contendo polipeptídeo então pode ser extraída, por exemplo, com éter de dietila, para remover compostos orgânicos de não peptídicos, e a proteína sintetizada pode ser extraída a partir do pó de resina (por exemplo, com cerca de 25% p/v de ácido acético). Após a síntese do polipeptídeo, outra purificação (por exemplo, usando-se HPLC) opcionalmente pode ser feita a fim de eliminar quaisquer proteínas, polipeptídeos, peptídeos ou aminoácidos livres incompletos. Análise de aminoácido e/ou de HPLC podem ser realizadas no polipeptídeo sintetizado para validar sua identidade. Para outras aplicações de acordo com a invenção, pode ser de preferência para produzir o polipeptídeo como parte de uma proteína de fusão maior, ou por conjugação química, ou através de meio genético conhecido na técnica. A esse respeito, essa invenção também provê uma proteína de fusão compreendendo o polipeptídeo (ou seu fragmento) ou sua variante e um ou mais outros polipeptídeos/proteína(s) tendo quaisquer propriedades ou

funções efetoras desejadas.

[0086] Ensaios para a produção e identificação de proteínas específicas são com base nas variações de propriedades físico-químicas, estruturais, funcionais ou outras propriedades das proteínas. Propriedades unicamente físico-químicas ou estruturais permite que as proteínas sejam separadas e identificadas por procedimentos eletroforéticos, tal como focalização isoeletrica ou eletroforese de gel de densaturação ou nativa, ou por técnicas cromatográficas tal como cromatografia de troca de íons ou de exclusão por gel. As únicas estruturas de proteínas individuais oferecem oportunidades para o uso de anticorpos específicos para detectar sua presença em formatos tal como um ensaio de ELISA. Combinações de abordagens podem ser usadas para alcançar especificidade ainda maior tal como western blotting em que anticorpos são usados para localizar produtos de gene individuais que foram separados pelas técnicas de eletroforese. Técnicas adicionais podem também ser usadas para confirmar absolutamente a identidade do produto de interesse tal como avaliação por sequenciação de aminoácido após purificação. Embora esses estão entre os mais comuns, outros procedimentos podem também ser usados.

[0087] Procedimentos de ensaio podem identificar a expressão de proteínas por sua funcionalidade, particularmente onde a proteína expressa em uma enzima capaz de catalisar reações químicas que envolvem produtos e substratos específicos. Por exemplo, em extratos de planta essas reações podem ser medidas por provisão e quantificação da perda de substratos ou a geração de produtos das reações por procedimentos físicos e/ou químicos.

[0088] Em muitos casos, a expressão de um produto de gene é determinada por avaliação dos resultados fenotípicos de sua expressão. Tais avaliações podem ser simples como observações visuais, ou podem envolver ensaios. Tais ensaios podem tomar muitas formas, tais

como análise de mudanças na composição química, morfologia, ou propriedades fisiológicas da planta. Propriedades de composição química, morfológicas ou fisiológicas da planta. Composição química pode ser alterada por expressão de genes que codificam enzimas ou proteínas de armazenagem que mudam composição de aminoácido e essas mudanças podem ser detectadas por análise de aminoácido, ou por enzimas que mudam quantidade de amido, que pode ser analisada por espectrometria de refletância de infravermelho ou por enzimas que mudam composição oleosa, que pode ser detectada por cromatografia gasosa. Mudanças morfológicas podem incluir estatura maior ou talos mais grossos.

[0089] As moléculas de ácido nucléico, constructos de DNA e polipeptídeos dessa invenção podem ser usados em métodos agrícolas e várias ensaios de triagem. Por exemplo, uma molécula de ácido nucléico pode ser usada para expressar transferase de fosfopanteteínila via um vetor em uma célula hospedeira, para detectar transcritos de mRNA que codifica transferase de fosfopanteteínila em uma amostra biológica, para detectar uma alteração genética em um gene que codifica transferase de fosfopanteteínila via Southern blot, para suprimir transferase de fosfopanteteínilam ou regular para cima transferase de fosfopanteteínila. Os polipeptídeos podem ser usados para compensar deficiências em transferase de fosfopanteteínila ou para a presença de um transferase de fosfopanteteínila mutada tendo atividade reduzida ou nenhuma atividade em uma planta, ou para tratar níveis excessivos de substratos, se diretos ou indiretos, para transferase de fosfopanteteínila em uma planta. Alternativamente, os polipeptídeos podem ser usados para triar agentes quanto a capacidade de modular sua atividade. Os anticorpos podem ser usados para detectar e isolar os polipeptídeos respectivos bem como diminuir a disponibilidade de tais polipeptídeos in vivo.

Transformação de Planta

[0090] Em uma concretização preferida da invenção, uma planta transgência que expressa a proteína ou proteínas desejadas é produzida. Vários métodos para a introdução de uma sequência de polinucleotídeos desejado que codifica a proteína desejada em células de planta são conhecidos na técnica, incluindo: (1) métodos físicos tais como microinjeção, eletroporação e fornecimento mediado por micropartículas (tecnologia de pistola de gene ou biolística); (2) fornecimento mediado por vírus; e (3) transformação mediada por *Agrobacterium*.

[0091] Os métodos mais comumente usados para a transformação de células de planta são processo de transferência de DNA mediado por *Agrobacterium* e o processo mediado por bombardeamento de partículas ou biolística. Tipicamente, transformação nuclear é desejado mas one é desejável especificamente transformar plastídios, tais como cloroplastos ou amiloplastos, plastídios de planta podem ser transformadas utilizando-se um fornecimento mediado por micropartículas dos polinucleotídeos desejados.

[0092] Transformação mediada por *Agrobacterium* é alcançada através do uso de uma bactéria de solo geneticamente modificado que pertence ao gênero *Agrobacterium*. Numerosas cepas de tipo selvagem e deseparalhadas de *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes* que abrigam plasmídios de Ti ou de Ri podem ser usadas para a transferência de gene em plantas. Transferência de gene é feita via a transferência de um DNA específico conhecido como "T-DNA" que pode ser em geral engenheirado para portar qualquer pedaço desejado de DNA em muitas espécies de planta, como anteriormente elaborado, por exemplo, na patente U.S. 6.265.638 por Bidney e outros, cuja revelação é aqui incorporada aqui por referência.

[0093] Transformação genética mediada por *Agrobacterium* de plantas envolve várias etapas. A primeira etapa, em que as células de

planta e *Agrobacterium virulenta* são primeiramente colocadas em contato entre si, é em geral chamada "inoculação". Inoculação é de preferência realizada por algum método de lesão para alguma das células de planta, que libera constituintes celulares de planta, tais como álcool coumarílico, sinapinato (que é reduzida a acetossirigona), álcool sinapílico, e álcool coniferílico, que ativam fatores de virulência na *Agrobacterium*. Após a inoculação células/tecidos de planta e *Agrobacterium* são permitidos que se desenvolvam juntos por um período de várias horas até vários dias ou mais sob condições adequadas para o crescimento de transferência de T-DNA. Essa etapa é chamada "co-cultura". Após a co-cultura e fornecimento de T-DNA as células de planta são tratadas com agentes bacteriocidas ou bacterioestáticos para matar a *Agrobacterium* que resta em contato com o explante e/ou no recipiente contendo o explante. Se isso é feito na ausência de quaisquer agentes seletivos para promover crescimento preferencial de células de planta transgênicas versus não transgênicas, então isso é tipicamente chamado da etapa de "atraso". Se feito na presença de uma pressão seletiva que favorece células de planta transgênicas, então é chamado de uma etapa de "seleção". Quando um "atraso" é usado, ele é tipicamente seguido por uma ou mais séries de "seleção".

[0094] Com relação a bombardeamento de micropartículas (a patente U.S. 5.550.318 (Adams e outros); a patente U.S. 5.538.880 (Lundquist e outros), a patente U.S. 5.610.042 (Chang e outros); e PCT WO 95/06128 (Adams e outros); cada um das quais é especificamente incorporada aqui por referência em sua totalidade), partículas microscópicas são revestidas com ácidos nucleicos e são fornecidas em células por uma força de impulsionamento. Partículas exemplares incluem aquelas constituídas de tungstênio, platina e de preferência ouro.

[0095] Uma concretização ilustrativa de um método para o fornecimento de DNA em células planta pela aceleração é o sistema de

fornecimento de partículas biolísticas (BioRad, Hercules, CA), que pode ser usado para impulsionar partículas revestidas com DNA ou células através de uma peneira, tal como aço inoxidável ou peneira Nytex, sobre uma superfície de filtragem recoberta com células de planta monocot cultivadas em suspensão.

[0096] Técnicas de bombardeamento de partículas são amplamente aplicáveis, e podem ser usadas para transformar virtualmente quaisquer espécies de planta. Exemplos de espécies de planta que foram transformados pelo bombardeamento de micropartículas incluem espécie monocotais como milho (Publicação Internacional nº WO 95/06128 (Adams e outros)), cevada, trigo (a patente U.S. 5.563.055 (Townsend e outros) incorporadas aqui por referência em sua totalidade), arroz, aveia, centeio, cana-de-açúcar, e sorgo; bem como numerosas dicots incluindo tabaco, soja (a patente U.S. 5.322.783 (Tomes e outros), incorporada aqui por referência em sua totalidade), girassol, amendoim, algodão, tomate e legume em geral (a patente U.S. 5.563.055 (Townsend e outros) incorporada aqui por referência em sua totalidade).

[0097] Para selecionar ou classificar quanto a células de planta transformadas apesar de metodologia de transformação, o DNA introduzido para dentro da célula contém um gene que funciona em um tecido de planta regenerável para produzir um composto que confere no tecido de planta resistência a um composto de outra maneira tóxico. Genes de interesse para o uso como marcador selecionável, triável, ou classificável incluiria mas são limitantes a β -glucuronidase (GUS), proteína fluorescente verde (GFP), luciferase (LUX), genes de tolerância a antibiótico ou herbicida. Exemplos de genes de resistência a antibiótico incluem as penicilinas, canamicina (e neomicina, G418, bleomicina); metotrexato (e trimetoprim); cloranfenicol; canamicina e tetraciclina. Moléculas de polinucleotídeo que codificam proteínas envolvidas em tolerância a herbicida são conhecidas na técnica, e incluem, mas não são

limitadas a uma molécula de polinucleotídeo que codifica sintase de 5-enolpiruvilshicimato-3-fosfato (EPSPS) descrito na patente U.S. 5.627.061 (Barry, e outros), na patente U.S. 5.633.435 (Barry, e outros), e na patente U.S. 6.040.497 (Spencer, e outros) e aroA descrito na patente U.S. 5.094.945 (Comai) para a tolerância a glifosato; uma molécula de polinucleotídeo que codifica bromoxinil nitrilase (Bxn) descrito na patente U.S. 4.810.648 (Duerrschnabel, e outros) para a tolerância a Bromoxinila; uma molécula de polinucleotídeo que codifica fitoeno desaturase (Ccr1) descrito em Misawa e outros, (1993); Misawa e outros, (1994) para a tolerância a norflurazon; uma molécula de polinucleotídeo que codifica de sintase de ácido acetoidróxi (AHAS, aka ALS) descrito in Sathasiivan e outros (1990) para tolerância a herbicidas de sulfoniluréia; tanto o gene de pat descrito em Wohlleben, e outros, (1988) quanto gene de bar descrito em DeBlock, e outros (1987), cada um dos quais provê tolerância a glifosinato e bialafos.

[0098] A regeneração, desenvolvimento de cultivo de plantas a partir de vários explantes transformados são bem documentados na técnica. Essa regeneração e processo de crescimento tipicamente incluem as etapas de seleção de células transformadas e cultivo daquelas células individualizadas através dos estágios usuais de desenvolvimento embrionário através do estágio de plântula enraizada. Sementes e embriões transgênicos são similarmente regenerados. Os brotos enraizados transgênicos resultantes são aqui em seguida plantados em um meio de crescimento de planta apropriado tal como solo. Células que sobrevivem a exposição ao agente seletivo, ou células que foram classificadas positivas em um ensaio de triagem, podem ser cultivadas em meio que suporta regeneração de plantas. Plântulas em desenvolvimento são transferidas para mistura de crescimento de planta menos solo, e são endurecidas, antes da transferência para uma estufa ou câmara de crescimento para a maturação.

[0099] Essa invenção pode ser usada com qualquer tecido ou célula transformável. Por transformável como usado aqui quer se dizer uma célula ou um tecido que é capaz de outra propagação para dar origem a uma planta. Aqueles de habilidade na técnica reconhecem que numerosas células ou tecidos de planta sejam transformáveis em que depois da inserção de DNA exógeno e condições de cultura apropriadas, os tecidos ou células de planta podem transformar em uma planta diferenciada. Tecido adequado para essas finalidades pode incluir mas não é limitado a embriões imaturos, tecido scutellar, culturas de célula de suspensão, inflorescência imatura, meristema de broto, explantes nodais, tecido de calo, tecido hipocotila, cotiledons, raízes e folhas. Os Tomes e outros patente '783, citada acima, descreve um método de tratamento com uma citocinina seguido por incubação por um período suficiente para permitir células indiferenciadas em tecido de nó de cotiledonário para diferenciar em células meristemáticas e para permitir que as células entrem nas fases entre G1 e as fases de divisão de desenvolvimento, que é afirmado para aperfeiçoar suscetibilidade para a transformação.

[00100] Qualquer meio de cultura de planta adequado pode ser usado. Meios adequados incluem mas não são limitados a meio à base de MS (Murashige and Skoog, 1962) ou meio à base de N6 (Chu e outros, 1975) suplementado com reguladores de crescimento de planta adicionais incluindo mas não limitado a auxinas, citocininas, ABA, e giberelinas. Aqueles de habilidade na técnica são familiares com uma variedade de meio de cultura de tecido, que quando suplementado apropriadamente, suportam desenvolvimento e crescimento de planta e são adequados para a transformação e a regeneração de planta. Esses meios de cultura de tecido podem ou ser adquiridos como uma preparação comercial ou preparados ou modificados habituais. Aqueles de habilidade na técnica estão cientes que meios e suplementos de meio

tais como nutrientes ou reguladores de crescimento para o uso na transformação e regeneração e outras condições de cultura tais como intensidade de luz durante a incubação, pH, e temperaturas de incubação que podem ser otimizadas para a variedade particular de interesse.

[00101] Depois que uma construção de DNA é estavelmente incorporada em plantas transgênicas e é confirmado ser operável, ele pode ser introduzido em outras plantas da mesma ou de uma outra espécie sexualmente compatível por cruzamento sexual. Qualquer numerosas técnicas de reprodução padrão podem ser usadas, dependendo da espécie a ser cruzada. Portanto, a invenção atual não apenas inclui uma planta diretamente transformada ou regenerada a partir de células que foram transformadas de acordo com a invenção atual, mas também a progênie de tais plantas. Como usado aqui o termo "progênie" significa a prole de qualquer geração de uma planta de origem preparada de acordo com a presente invenção, em que a progênie compreende uma construção de DNA selecionada e preparada de acordo com a invenção. "Cruzamento" de uma planta para prover uma linha de planta tendo um ou mais transgenes ou alelos adicionados em relação a uma linha de planta de partida, como descrito aqui, é definido como as técnicas que resultam em uma sequência particular sendo introduzida para dentro de uma linha de planta por cruzamento de uma linha de partida com linha de planta doadora que compreende um transgene ou um alelo da invenção. Para alcançar isso poderia, por exemplo, realizar as seguintes etapas: (a) sementes de planta da primeira (linha de partida) e da segunda (linha de planta de doador que compreende um alelo ou transgene desejado) plantas de origem; (b) desenvolver as sementes da primeira e segunda plantas de origem em plantas que portam flores; (c) polinizar uma forma a partir da primeira planta de origem com pólen oriundo da segunda planta de origem; e (d) semente coletadas produzidas na planta de origem que portam as flores fertilizadas.

[00102] Retro-cruzamento é aqui definido como o processo incluindo as etapas de: (a) cruzamento de uma planta em um primeiro genótipo contendo um gene desejado, elemento ou sequência de DNA para dar uma planta de um segundo genótipo que carece do dito gene desejado, sequência ou elemento DNA; (b) seleção de uma ou mais planta de progênie contendo o gene desejado; sequência o elemento de DNA; (c) cruzamento da planta de progênie para dar o segundo genótipo; e (d) etapas de repetição (b) e (c) para a finalidade de transferência de uma sequência de DNA desejada de uma planta de um primeiro genótipo para uma planta de segundo genótipo.

[00103] Introgessão de um elemento de DNA para dentro de um genótipo de planta é definida como o resultado do processo de conversão por retro-cruzamento. Um genótipo de planta em que uma sequência de DNA foi introgressada pode ser chamada de um genótipo convertido por retro-cruzamento, linhagem, congênto ou híbrido. Similarmente um genótipo de planta que carece da sequência de DNA desejada pode ser chamado de um genótipo não convertido, linhagem, congênito ou híbrido.

Sementes, farelo, óleo e produtos compreendendo sementes, farelo e óleo

[00104] Essa invenção também provê um recipiente de acima de cerca de 1000, mais de preferência cerca de 20.000, e ainda mais de preferência cerca de 40.000 de sementes onde acima de cerca de 10%, mais de preferência cerca de 25%, mais de preferência cerca de 50%, e ainda mais de preferência cerca de 75% ou mais de preferência cerca de 90% das sementes são sementes derivados de uma planta dessa invenção.

[00105] Essa invenção também provê um recipiente de acima de cerca de 10 kg, mais de preferência cerca de 25 kg, e ainda mais de preferência cerca de 50 kg de sementes onde acima de cerca de 10%,

mais de preferência cerca de 25%, com mais preferência cerca de 50%, e ainda mais de preferência cerca de 75% ou mais de preferência cerca de 90% das sementes são sementes derivadas de uma planta dessa invenção.

[00106] Qualquer uma das plantas ou suas partes dessa invenção pode ser coletadas e, opcionalmente processadas para produzir uma preparação oleosa, farelo ou alimentícia. Uma parte de planta particularmente preferida para essa finalidade é grão colhido, mas outras partes de planta podem ser colhidas e são usadas para forragem ou silagem. Métodos para produzir preparações alimentícias, farelo e oleosas são conhecidas na técnica. Vide, por exemplo, as patentes U.S. 4.957.748; 5.100.679; 5.219.596; 5.936.069; 6.005.076; 6.146.669; e 6.156.227. O grão ou farelo dessa invenção podem ser combinados com outros grãos ou farinhas grossas.

Métodos

[00107] A presente invenção provê um método para a provisão de plantas transgênicas com um teor aumentado de DHA ou EPA. Esse método inclui, por exemplo, introdução do DNA que codifica transferase de fosfopanteteínica bem como um complexo de PKS para dentro das células de planta e plantas de regeneração com teor de DHA ou de EPA aumentado a partir das células transgênicas.

[00108] Mais especificamente, a invenção provê um método de produção de um óleo de planta contendo DHA ou EPA compreendendo as etapas de (a) desenvolvimento de uma planta compreendendo a célula hospedeira transformada com uma construção de DNA compreendendo um promotor heterólogo operavelmente ligado a uma molécula de DNA que codifica um polipeptídeo tendo atividade de transferase de fosfopanteteínica, em que a molécula de DNA é selecionada do grupo que consiste em: um polinucleotídeo que hibridiza para dar SEQ. ID NO: 6 ou SEQ. ID NO: 8, ou um seu complemento, sob condições

de 5X SSC, 50% de formamida e 42°C; um polinucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeos de SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 7; um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo com pelo menos 75% de identidade de sequência com uma sequência de polipeptídeos de SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 7; um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de SEQ ID NO: 1; e um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO: 3 em que a célula hospedeira ulteriormente compreende sintase de policetídeo; (b) produção de semente; e (c) processamento da semente para se obter um óleo.

[00109] A presente invenção ulteriormente provê um método de provisão de plantas transgênicas que podem conter níveis elevados de DHA ou de EPA, em que os ditos elevados são maiores do que os níveis encontrados em plantas não transformadas.

[00110] Para a suplementação de dieta, os PUFAs purificados, plantas ou partes de planta transformadas, ou seus derivados, podem ser incorporados em óleos, gorduras ou margarinas de cozinhar formulados de modo que no uso normal o receptor recebesse a quantidade desejada. Os PUFAs podem também ser incorporados em suplementos nutricionais, outros produtos alimentícios ou fórmulas infantis, e podem encontrar uso como agentes antiinflamatórios ou de diminuição de colesterol.

[00111] Como usado aqui, "composição comestível" é definida como composições que podem ser ingeridas por um mamífero tais como gêneros alimentícios, substâncias nutricionais e composições farmacêuticas. Como usado aqui "gêneros alimentícios" referem-se a substâncias que podem ser usadas ou preparadas para o uso como alimento para um mamífero e incluem substâncias que podem ser usadas na preparação de alimento (tais como óleos de fritura) ou aditivos alimentícios. Por exemplo, gêneros alimentícios incluem animais usados para o consumo humano ou qualquer produto a partir do mesmo,

tais como, por exemplo, ovos. Gêneros alimentícios incluem mas não são limitados a bebidas (por exemplo, refrigerantes, bebidas carbonatadas, bebidas prontas para misturar), alimentos introduzidos (por exemplo, frutas e vegetais), molho, condimentos, molhos de salada, sucos de fruta, xaropes, sobremesas (por exemplo, pudim, gelatina, glaces, e recheios, produtos de padaria, sobremesas congeladas, tais como sorvetes e sorvetes cuja base é água), produtos congelados moles (por exemplo, cremes congelados moles, sorvetes congelados moles e iogurtes, coberturas congeladas moles tais como coberturas batidas de laticínios ou de não laticínios), óleos e produtos emulsificados (por exemplo, gordura, margarina, maionese, manteiga, óleo de cozinhar, e molhos de salada) e alimentos de umidade intermediária (por exemplo, arroz e ração de cachorro).

[00112] Além do mais, composições comestíveis descritas aqui podem também ser ingeridas como um aditivo ou suplemento contido em alimentos e bebidas. Essas formulações juntamente com uma substância nutricional tais como várias vitaminas e minerais e incorporadas em composições substancialmente líquidas tais como bebidas de nutriente, leites de soja e sopas; composições substancialmente sólidas; e gelatinas ou usadas na forma de um pó para ser incorporado em vários alimentos. O teor do ingrediente em tal alimento funcional ou saudável pode ser similar à dose contida em um agente farmacêutico típico.

[00113] Os PUFA's purificados, plantas ou partes de planta transformadas podem também ser incorporados em ração animal, particularmente animais de criação. Desse modo, os próprios animais podem se beneficiar de uma dieta rica em PUFA, enquanto consumidores humanos de produtos alimentícios produzidos a partir de tais animais de criação podem também se beneficiar.

[00114] Para o uso farmacêutico (humano ou veterinário), as

composições podem em geral ser administradas por qualquer rota pela qual elas podem ser absorvidas com sucesso, por exemplo, parenteral (isto é, subcutaneamente, intramuscularmente ou intravenosamente), retalmente, vaginalmente, topicamente, por exemplo, como loção ou pomada de pele. Os PUFAs, partes de planta ou plantas transformadas da presente invenção podem ser administrados sozinhos ou em combinação com um excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável. Onde disponível, cápsulas de gelatina são a forma preferida da administração oral. Suplementação de dieta como indicada acima pode também prover uma rota de administração oral. Os ácidos insaturados da presente invenção podem ser administrados em formas conjugadas, ou como sais, ésteres, amidas ou pró-fármacos dos ácidos graxos. Qualquer sal farmaceuticamente aceitável está incluído pela presente invenção; especialmente preferido são sais de sódio, de potássio ou de lítio. Também incluídos são os sais de N-alkilpoliidroxamina, tal como N-metil glucamina, encontrados na publicação de PCT WO 96/33155. Os ésteres preferidos são os ésteres de etila. Como sais de sólido, os PUFAs também podem ser administrados em forma de comprimido. Para a administração intravenosa, os PUFAs ou seus derivados podem ser incorporados em formulações comerciais tais como intralipídios.

Exemplos

[00115] Os seguintes exemplos estão incluídos para ilustrar as concretizações da invenção. Seria apreciado por aqueles de habilidade na técnica que as técnicas reveladas nos exemplos que se seguem representam técnicas reveladas pelo inventor para funcionar bem na prática da invenção. No entanto, aqueles de habilidade na técnica, à luz da presente revelação, apreciariam que muitas mudanças podem ser feitas nas concretizações específicas que são reveladas e ainda obtêm um resultado semelhante ou similar sem se afastar do conceito,

espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, estará evidente que certos agentes que são tanto quimicamente quanto fisiologicamente relacionados podem ser usados como substitutos dos agentes descritos aqui embora os mesmos resultados ou resultados similares não fossem alcançados. Todos os tais substituintes e modificações aparentes por aqueles versados na técnica são julgados estarem dentro do espírito, escopo e conceito da invenção como definidos pelas reivindicações anexos.

Exemplo 1

Clonagem de Sequências de transferase de fosfopanteteínila

[00116] Três transferases de fosfopanteteínila bacterianas foram clonadas. A sequência de aminoácidos da transferase de fosfopanteteínila (Ppt) oriunda de *Shewanella* SCRC-2738 (SEQ ID NO: 17) foi usada para busca de base de dados públicos para novos ppts que funcionam na biossíntese de EPA ou de DHA. Essa busca forneceu ppts putativos da *Shewanella* oneidensis MR-1 (SEQ ID NO: 1) (So-ppt) e *Colwellia psychrerythraea* (SEQ ID NO: 3) (Cp-ppt). As sequências de ácidos nucleicos de ppts oriundas de *Shewanella* oneidensis MR-1 (SEQ ID NO: 2) e *Colwellia psychrerythraea* (SEQ ID NO: 4) foram clonadas usando-se o sistema Expand High Fidelity PCR (Roche, Applied Science, Indianapolis, IN) com os seguintes pares iniciadores:

Shew new 5': tcgagctcgcatatgaagattgagcttttttataacc (SEQ ID NO: 9)

Shew 3': tcttaattaattagtcagccaaactagccgc (SEQ ID NO: 10)

Colwe new 5': tcgagctcgcatatgacttcttttctcaatctg (SEQ ID NO: 11)

Colwe 3': tcttaattaattagatttctgataaccaagtag (SEQ ID NO: 12).

[00117] Os genes foram ampliados para 25 ciclos com a temperatura de fusão ajustada a 55°C e 52°C para os ppts de *Shewanella* e

Colwellia, respectivamente. Os produtos de PCR foram digeridos com NdeI e PaeI e foram ligados em Novagen pACYC-Duet-1 digeridos por NdeI e PaeI (EMD Biosciences, Darmstadt, Alemanha) resultando na formação de pMON68081 (figura. 1) e pMON68080 (figura. 2) respectivamente.

[00118] Para clonar a transferase de fosfopanteteínica de *Moritella marina* (Mm-ppt), as sequências de nucleotídeos do ppt de *Shewanella* SCRC-2738 (SEQ ID NO:18), o ppt de *C. psychrerythraea*, e o ppt de *S. oneidensis* MR-1 foram alinhados para identificar a região mais conservada dessas sequências. Uma região de sequência de nucleotídeos conservada no So-ppt (bps 425 –635 de SEQ ID NO: 2) e Cp-ppt (bps 389 – 596 de SEQ ID NO: 4) foi identificada por esse alinhamento e sequência nessa região foi escolhida para gerar sondas usando-se DNA genômico de *C. psychrerythraea* e *S. oneidensis* MR-1 como DNAs de modelo e os iniciadores abaixo:

Shewanella F1 taggtgtcgatattgagcggg (SEQ ID NO: 13)

Shewanella R1 tcaaaggcaaaggatttaac (SEQ ID NO: 14)

Colwellia F1 tcggttgtgatgttgaaaatac (SEQ ID NO: 15)

Colwellia R1 ttaaaactaaaatcagcgagt (SEQ ID NO: 16).

[00119] Sondas marcadas com digoxigenina foram geradas usando-se o kit de PCR DIG Probe Synthesis (Roche) de acordo com o protocolo dos fabricantes para 30 ciclos de 30 s cada a 94°C, 55 °C, e 65°C seguido por uma incubação de 7 min a 65°C e incubação subsequente a 4°C. As sondas marcadas com digoxigenina foram usadas em uma hibridização de Southern para sondar sequências homólogas em DNA genômico total de *M. marina* com *S. oneidensis* MR-1 e *C. psychrerythraea* como controles positivos. A hibridização foi realizada a 30°C usando-se DIG Easy Hyb (Roche) de acordo com o protocolo do fabricante. O filtro foi lavado duas vezes usando-se 0,5 x SSC, 0,1% de SDS a temperatura ambiente. Sondas marcadas com Dig foram

visualizadas usando-se a Anti-Digoxigenin-AP, fragmentos de Fab e lavagem Dig e conjunto de tampão de bloqueamento (Roche) de acordo com o protocolo dos fabricantes.

[00120] Os sinais mais fortes oriundos do DNA de *M. marina* DNA foram obtidos usando-se a sonda de *Colwellia*. Em alguns casos esses sinais coincidiam com sinais fracos obtidos a partir de DNA de *M. marina* usando-se a sonda de *Shewanella*.

[00121] Com base na experiência de hibridização Southern, digestos de BglII e PstI de DNA de *M. marina* foram escolhidos para clonar os fragmentos de hibridização. DNA genômico total foi digerido com BglII ou PstI, foi fracionado pelo tamanho em um gel de agarose e o fragmento de tamanho apropriado foi extirpado. Os fragmentos de DNA foram purificados usando-se o kit Qiagen Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA). Alíquotas de DNA fracionado foram realizadas em um gel de agarose e foram manchadas sobre uma membrana de náilon (Roche, Mannheim, Alemanha) usando-se um Turboblotter (Schleicher & Schuell, Keene, NH), de acordo com o protocolo dos fabricantes. O fragmento alvo foi identificado por uma hibridização Southern usando-se a sonda de *Colwellia*.

[00122] A fração 5 de BglII e a fração 4 de PstI foram escolhidas para gerar um biblioteca parcial em pSP72 (Promega, Madison, WI). Essas bibliotecas foram transformadas em DH5α de *Escherichia coli* e combinações de clones foram divididos em alíquotas nas cavidades de uma placa de 96 cavidades para o crescimento no período da noite. Alíquotas de cultura foram giradas por rotação, o sobrenadante foi descartado, e os péletes de célula foram ressuspensas em 10 µl de solução de SDS a 10%. Os péletes de célula foram aquecidos por 1 min a 100°C e foram manchadas sobre membranas de náilon (Roche). DNA foi desnaturado por incubação de 5 min em NaOH a 0,5 M, contendo NaCl a 1,5 M, foi neutralizado por incubação de 5 min em Tris/HCl a

0,5 M, pH 7,6 contendo NaCl a 1,5 M, foi lavado por 5 min em 2 x SSC, e foi fixado por incubação com UV por 1 min em um Stratagene UV-Stratalinker 2400 (Stratagene, La Jolla, CA) de acordo com o protocolo dos fabricantes. O blot foi sondado com a sonda de ppt de *Colwellia*. Sinais positivos foram rastreados para a cavidade de origem e uma alíquota oriunda daquelas cavidades foi laminada a fim de se obter colônias simples. Aquelas colônias simples foram inoculadas em 250 µl de LB contendo 100 mg/l de carbampicilina. Células foram desenvolvidas e o procedimento de hibridização descrito acima foi repetido para identificar cavidades contendo clones positivos simples. Clones positivos foram desenvolvidas e DNA de plasmídio foi isolado e foi digerido com BglII, PvuII, PstI, ou Sall. Esses digestos foram usados em uma hibridização Southern para confirmar clones positivos. Nesse ponto todos os clones restantes demonstraram ser positivos.

[00123] Três dos clones finais (dois clones de BglII e um clone de PstI) foram escolhidos para análise de sequência de DNA. Análise de bioinformática da sequência completa revelou que o clone de PstI continha apenas um Mm-ppt parcial, enquanto os clones de BglII continham um quadro de leitura aberto completo. A sequência de DNA completa de todos os três clones foram montados em um contig. Um clone de BglII foi escolhido para outras experiências de clonagem (pMON96400). A sequência de aminoácidos putativa do Mm-ppt é mostrada na SEQ ID NO: 5 se o códon de partida é TTG (chamado de Mm-ppt longo). Um códon de partida alternativo usando-se Met é encontrado em aminoácido 43 de SEQ ID NO: 5 (fornecendo um polipeptídeo chamado de Mm-ppt curto SEQ ID NO: 7). A sequência de ácidos nucleicos de Mm-ppt longa é SEQ ID NO: 6. A sequência de ácidos nucleicos de Mm-ppt curta é mostrada na SEQ ID NO: 8. Uma comparação do relacionamento de aminoácido das Ppts da invenção é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência de aminoácidos identidade de transferases de fosfopanteteínica

	<i>Colwellia psychrerythraea</i>	<i>Shewanella</i> SCRC 2738	<i>Schewanella oneidensis</i> MRI
<i>Moritella marina</i> (long)	60,9%	31,5%	30,0%
<i>Colwellia psychrerythraea</i>		32,4%	33,5%
<i>Shewanella</i> SCRC 2738			46,6%

Exemplo 2

Expressão de Sequências de transferase de fosfopanteteínica em *Escherichia coli*

[00124] Para demonstrar funcionalidade das ppts descrita no Exemplo 1, os genes de sintase de policetídeo de *Moritella marina* (PKS) foram clonados nos vetores de Novagen pDUET (EMD, Biosciences, Darmstadt, Alemanha), um conjunto de 4 vetores de expressão de *E. coli* compatíveis. Esse PKS consiste em 4 polipeptídeos codificados pelos ácidos nucleicos orf5 (SEQ ID NO: 20), orf6 (SEQ ID NO: 22), orf7 (SEQ ID NO: 24) e orf8 (SEQ ID NO: 26), que são descritos como orf6, orf7, orf8, e orf9 na patente U.S. nº 6.140.486, respectivamente. Os vetores de expressão pMON94547 (Orf5 e Orf6) (figura 3), pMON94544 (Orf7) (figura 4) e pMON94534 (Orf8) (figura 5) foram construídos usando-se 3 dos vetores de pDUET. O quarto vetor de pDUET foi usado para a expressão de ppt.

[00125] Para se obter um PKS enzimaticamente ativo, o produto de expressão de Orf5 exige pantetenilação, que é catalisado pela Ppt. Cada uma das ppts bacterianas foi clonada em pACYC-DUET-1. A construção de pMON68081 e pMON68080 é descrita no Exemplo 1. Similarmente as duas diferentes ppts de *M. marina* putativas, Mm-ppt curta ou Mm-ppt longa, foram clonadas na mesma base de vetor como a *Colwellia* e as ppts de *Shewanella* ppts para fornecer pMON68084

(figura 6) e pMON68085 (figura 7), respectivamente. O iniciador de Mm-ppt longo PCR® (SEQ ID NO: 27) mudou a partida de TTG putativa em um ATG. Cada ppt é então expressa juntamente com genes de PKS de *M. marina* em *E. coli*, é incubada por 24 h, e as células de *E. coli* liofilizadas são metiladas diretamente com ácido sulfúrico/metanol, e os ésteres de metila de ácido gaxo são analisados quanto ao teor de EPA e DHA por cromatografia gasosa. Os resultados são mostrados abaixo na Tabela 2.

Tabela 2

Combinação de gene	DHA produzido
PKS apenas	Não
PKS + Mm-ppt longa	Sim
PKS + Mm-ppt curta	Sim
PKS + So-ppt	Sim
PKS + Cp-ppt	Sim
PKS - Orf8 + Cp-ppt	Não

[00126] Co-expressão do PKS de *Moritella marina* completa com qualquer uma das transferases de fosfopanteteínica testadas em *E. coli* resultou no acúmulo de DHA, enquanto expressão do PKS de *M. marina* sem co-expressão de uma Ppt não resultou em acúmulo de DHA. Co-expressão da Cp-ppt com um PKS incompleto (perdendo Orf8) também não resultou em acúmulo de DHA. Esses resultados demonstram que todas as PPTs testadas pantotenilavam o PKS de *M. marina* resultando na formação de um complexo de múltiplas enzimas ativas.

[00127] Foi demonstrado que Orf7 (Orf8 na patente U.S. 6.140.486) controla o comprimento de cadeia no produto final de PKSs de produção de PUFA. O PKS de *Shewanella putrefaciens* produz EPA. Nas experiências em *E. coli* contendo o grupo de PKS de *S. putrefaciens*, um mutante de deleção de orf7 produziu DHA quando complementado com orf7 de *Moritella marina*. A Ppt usada para ativar o PKS não muda o

produto, portanto, as Ppts dessa invenção são usadas para produzir EPA quando combinadas com um PKS produtor de EPA e DHA quando combinado com um PKS produtor de DHA.

Exemplo 3

Expressão de Sequências de transferase de fosfopanteteínica em Plantas

[00128] Para demonstrar a capacidade do PKS de *M. marina*, incluindo a ppt de *M. marina*, para sintetizar DHA em plantas, vários pacotes de expressão de planta foram gerados. Os genes para orf5-8 foram modificados para a expressão em plantas dicotiledôneas. É conhecido que sequências de codificação de proteína endógena não podem expressar bem em plantas (a patente U.S. 5.880.275, aqui incorporada por referência). Portanto, usando-se as sequências de polipeptídeos de PKS nativas para Orfs5-8 (SEQ ID NOS: 19, 21, 23, e 25), sequências de polinucleotídeos de codificação de proteína artificial foram projetadas e foram construídas por 1) uso de uma "codon usage bias" similar àquele de proteínas de soja altamente expressas, e por 2) remoção de elementos de desestabilização de RNA anteriormente caracterizados e conhecidos como afetando estabilidade de mRNA na planta (a patente U.S. 5.880.275) e por introdução de uma sequência de Kozak antes do códon de partida de ATG (Joshi e outros, 1997). As sequências de polinucleotídeos modificadas resultantes codificam polipeptídeos idênticos na sequência para dar os polipeptídeos nativos.

[00129] O vetor binário pMON97063 (figura 8) contém os pacotes de expressão para orf5 (modificado por códon, SEQ ID NO: 28) (sob o controle do promotor de FMV.35S-enh com o líder de L-Ph.DnaK) e Mm-ppt curta (SEQ ID NO: 8) (sob o controle do promotor de CaMV35S-enh e o líder de L-CaMV35S). Esse vetor porta o gene de Bar como marcador selecionável. O vetor binário pMON94563 (figura 9) foi gerado por clonagem dos pacotes de expressão para orf6 (modificado por códon, SEQ ID NO: 29) (sob o controle do promotor de CaMV35S-enh com o líder

de L-CaMV35S) orf7 (modificado por códon, SEQ ID NO: 30) (sob o controle do promotor de FMV35S-enh com o líder de L-Ph.DnaK), e orf8 (modificado por códon, SEQ ID NO: 31) (sob o controle do promotor CaMV35S-enh com o líder de L-CaMV35S). pMON94563 porta o marcador de CP4 que provê resistência a glifosato. O vetor binário pMON97066 (figura 10) contém o mesmo pacote de expressão que pMON94563, mas com o pacote de orf7 precedente do pacote de orf6 ao invés do seguinte dele. Todos os constructos eram sequência verificada por sequenciação de DNA.

[00130] Os pares de vetor binário pMON97063 e pMON94563 ou pMON97063 e pMON97066 são contranformados em *Arabidopsis thaliana* usando-se transformação mediada por *Agrobacterium*. Plantas são regeneradas e material de folha das plantas de R1 *Arabidopsis* e semente de R2 dessas plantas é analisada quanto à composição e teor de ácido graxo.

[00131] Para gerar um vetor binário de múltiplos genes simples que colheita todos os 4 genes de PKS e a ppt o vetor binário de baixo número de cópias pMON83934 foi digerido com HindIII e NotI e foi ligado com um poliligador que consiste em oligômeros MCS-3 (SEQ ID NO: 32) e MCS-4 de DNA (SEQ ID NO: 33). O vetor resultante foi designado pMON68091. Os pacotes de expressão para orf6, orf7, orf8 e o marcador selecionável de CP4 foram extirpados por digesto de HindIII/BsiWI de pMON94563 e ligado no pMON68091 digerido por HindIII/BsiWI. O vetor binário resultante é digerido com AscI e BsiWI e é ligado com pacotes de expressão contendo orf5 e Mm-ppt de pMON97063 extirpado por digesto de BsiWI/AscI. O vetor binário resultante, pMON96401 (figura 11), é transformado por meio de transformação mediada por *Agrobacterium* em *Arabidopsis thaliana* e soja. Plantas são regeneradas e material de semente e folha oriundos dessas plantas são analisados quanto à composição e teor de ácido graxo.

[00132] Eventos 48 R1 contendo pMON96401 foram gerados em Arabidopsis. Semente R2 maduro oriundo desse estudo foi analisado por cromatografia gasosa. 9 dos 48 eventos analisados produziram DHA (Tabela 3).

Tabela 3: DHA content of pMON96401-contendo seed

Evento	Construção	Geração	DHA
AT_G3764	pMON96401	R2	0,07
AT_G3756	pMON96401	R2	0,05
AT_G3732	pMON96401	R2	0,04
AT_G3737	pMON96401	R2	0,03
AT_G3730	pMON96401	R2	0,03
AT_G3740	pMON96401	R2	0,03
AT_G3728	pMON96401	R2	0,02
AT_G3750	pMON96401	R2	0,02
AT_G3748	pMON96401	R2	0,02
Controle		variedade	0

[00133] Caracterização molecular de 4 eventos contendo DHA de R2 Arabidopsis transformado com semente de pMON96401 são representados na Tabela 4. Os dados demonstram que eventos que produziam DHA eram positivos para a presença dos 5 transgenes como determinado por ensaio de ponto final TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA)

Tabela 4: Presença de gene de pMON96401 de Arabidopsis

Amostra	DHA	PKS5	PKS-Ppt	PKS6	PKS7	PKS8
Controle	0	neg	neg	neg	neg	neg
At_G3748	0,02	POS	POS	POS	POS	POS
At_G3756	0,04	POS	POS	POS	POS	POS
At_G3764	0,04	POS	POS	POS	POS	POS
At_G3764	0,07	POS	POS	POS	POS	POS

[00134] Na geração R3 de semente de *Arabidopsis* pMON96401, o fenótipo persistia com uma faixa de 0,025-0,1% de DHA por cromatografia gasosa. O pico de cromatografia gasosa foi confirmado como DHA por cromatografia gasosa/tempo de espectrometria de massa de vôle com óleo de peixe como um padrão.

[00135] Para a expressão específica de semente do PKS de *Moritella marina*, os genes modificados por códon ou nativos são clonados como pacotes de expressão de gene simples usando-se promotores específicos de semente tais como p7Sa, p7Sa', Arcelin-5, USP88, pNapin, pFAE ou pOleosin. Subsequente esses pacotes de expressão são montados para combinar todos os cinco genes em um vetor binário simples usando-se um vetor binário de baixo número de cópias tal como pMON83934 como vetor de base. Os vetores de cinco genes resultantes (cada um deles colhendo todos os quatro genes de PKS mais o pacote de expressão de ppt) podem conter os pacotes de expressão em ordem ou orientação variável em relação entre si. Esses vetores são transformados em soja e a semente de soja resultante são analisadas quanto à composição e teor de ácido graxo.

[00136] Um exemplo de um vetor de múltiplos gene para a expressão específica de semente do PKS de *M. marina* e ppt de *M. marina* segue. Pacotes de expressão para a expressão específica de semente do PKS aumentado por códon de dicot e genes de ppt são montados como descritos na Tabela 5. Os pacotes de expressão são montados na orientação de cabeça para o cauda resultando na formação de pMON78528 (figura 12). Esse vetor binário é transformado em soja e *Arabidopsis* usando-se transformação mediada por *Agrobacterium* e a semente resultante são analisadas quanto à composição e teor de ácido graxo.

Tabela 5: Pacotes de expressão específicos de semente para PKS de

M. marina.

Promotor	GOI	3'UTR
napin (SEQ ID NO: 35)	<i>Mm-ppt short</i> (SEQ ID NO:34)	napin 3' (SEQ ID NO:36)
Arcelin 5	Orf1 (SEQ ID NO:30)	Arcelin 5 3'
7Sa'	Orf6 (SEQ ID NO:29)	7Sa' 3'
7Sa	Orf8 (SEQ ID NO:31)	nos 3'
USP88	Orf5 (SEQ ID NO:28)	Adr12

[00137] Para demonstrar a capacidade do PKS de *M. marina*, juntamente com a ppt de *M. marina*, para sintetizar DHA em milho, vários pacotes de expressão de planta são gerados. Os genes para orfs 5-8 e uma ppt são modificados para a expressão em planta monocotiledônea. É conhecido que sequências de codificação de proteína não endógenas não podem expressar bem em plantas (a patente U.S. 5.880.275, aqui incorporada por referência). Portanto, usando-se as sequências de polipeptídeos de Ppt e de Orf nativas anteriormente descritas, sequências de polinucleotídeos de codificação de proteína artificial são projetadas e são construídas por 1) uso de uma "codon usage bias" similar àquele de proteínas de milho altamente expressas, e por 2) remoção de elementos de desestabilização de RNA anteriormente caracterizados e conhecidos por afetar a estabilidade de mRNA em planta (a patente U.S. 5.880.275). As sequências de polinucleotídeos modificadas resultantes codificam polipeptídeos idênticos na sequência aos polipeptídeos nativos. Explantes transformados são obtidos através de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para vetores contendo as sequências de polinucleotídeos modificadas. Plantas são regeneradas a partir de tecido transformado. As plantas desenvolvidas em estufa são então analisadas quanto a gene de níveis de expressão de interesse bem como composição oleosa, incluindo DHA ou EPA.

Exemplo 4

Clonagem de sequências de sintase de policetídeo

[00138] Oito genes de sintase de policetídeo candidatos foram clonadas oriundos de 2 espécies. As sequências de aminoácidos deduzidas de genes de PKS de *M. marina* (SEQ ID NOS: 19, 21, 23 e 25) foram usados para buscar base de dados disponíveis para novos genes de sintase de policetídeo in *Shewanella oneidensis* (ATCC # 700550) e *Colwellia psychrerythrae* (ATCC # BAA-681). *S. oneidensis* acumula EPA enquanto *C. psychrerythrae* acumula DHA. Com base nisso, acreditava-se que a produção de PUFA production nessas bactérias resultassem de um mecanismo de PKS. A busca forneceu um conjunto de 4 genes de PKS candidatos a partir de cada bactéria. Usando-se técnicas de clonagem por PCR, esses genes foram clonadas em TOPO vetores de clonagem, a sequência verificada e subclonada em vetores de expressão de Duet (vide Tabela 6). Expressão do orf5 de *S. oneidensis* juntamente com os orf6, orf7, orf8, e ppt de *M. marina* em *E. coli* demonstrou resultar na formação de até 0.2% de DHA como determinado por cromatografia gasosa, confirmando a função prevista do orf5 de *S. oneidensis*. Similarmente, a função de cada gene listado na Tabela 6 é confirmada por expressão com os genes de PKS de *M. marina* em *E. coli* ou por expressão do gene de PKS completo oriundo de *Shewanella* ou *Colwellia* ou uma combinação das duas espécies em *E. coli*. Alternativamente a função é demonstrada em plantas.

Tabela 6: Vetores de expressão de *E. coli* para genes de PKS de *Shewanella* e de *Colwellia*.

Organismo fonte	Designação de gene	Vetor de expressão de <i>E. coli</i>
<i>Shewanella oneidensis</i>	orf5 SEQ ID NO: 37	pMON108255
<i>Shewanella oneidensis</i>	orf6 SEQ ID NO: 38	pMON108256
<i>Shewanella oneidensis</i>	orf7 SEQ ID NO: 39	pMON108258

Organismo fonte	Designação de gene	Vetor de expressão de E. coli
<i>Shewanella oneidensis</i>	orf 8 SEQ ID NO: 40	pMON108259
<i>Moritella marina</i>	orf6 SEQ ID NO: 22	pMON108252
<i>Shewanella oneidensis</i>	orf5 SEQ ID NO: 37	
<i>Colwellia psychrerythrae</i>	orf5 SEQ ID NO: 41	pMON108267
<i>Colwellia psychrerythrae</i>	orf7 SEQ ID NO: 43	pMON108269
<i>Colwellia psychrerythrae</i>	orf8 SEQ ID NO: 44	pMON108270
<i>Colwellia psychrerythrae</i>	orf5 SEQ ID NO: 41 orf6 SEQ ID NO: 42	pMON108268

Referências

[00150] As referências listadas abaixo são incorporadas aqui por referência na medida que elas suplementam, explicam, provêm uma base para, ou ensinam metodologia, técnicas e/ou composições empregadas aqui.

a patente U.S. 4.518.584, a patente U.S. 4.737.462, a patente U.S. 4.810.648, a patente U.S. 4.957.748, a patente U.S. 4.965.188, a patente U.S. 5.094.945, a patente U.S. 5.100.679, a patente U.S. 5.176.995, a patente U.S. 5.196.525, a patente U.S. 5.219.596, a patente U.S. 5.290.924, a patente U.S. 5.322.783, a patente U.S. 5.359.142, a patente U.S. 5.424.398, a patente U.S. 5.424.412, a patente U.S. 5.500.365, a patente U.S. 5.538.880, a patente U.S. 5.550.318, a patente U.S. 5.563.055, a patente U.S. 5.610.042, a patente U.S. 5.627.061, a patente U.S. 5.633.435, a patente U.S. 5.641.876, a patente U.S. 5.880.275, a patente U.S. 5.936.069, a patente U.S. 6.005.076, a patente U.S. 6.040.497, a patente U.S. 6.140.486, a patente U.S. 6.140.486, a patente U.S. 6.140.486, a patente U.S. 6.140.486, a patente U.S. 6.146.669, a patente U.S. 6.156.227, a patente U.S. 6.265.638, a patente U.S. 6.319.698, a patente U.S. 6.433.252, a patente U.S. 6.451.567. o Pedido

U.S. 10/235.618. o Pedido U.S. 10/429.516, a Publicação U.S.. 2004 0039058, a Publicação U.S.. 2004 0235127

Allen and Bartlett, Microbiology, 148(Pt 6):1903-1913 , 2002.

Baerson e outros, Plant Mol. Biol., 22(2):255-267, 1993.

Barany e outros, Int. J. Peptide Protein Res., 30:705-739, 1987.

Bauer e outros, Gene, 37:73, 1985.

Belanger and Kriz, Genet., 129:863-872, 1991.

Bevan e outros, Nucleic Acids Res., 11(2):369-385, 1983.

Bodanszky, In: Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg, 1984.

Bustos, e outros, Plant Cell, 1(9):839-853, 1989.

Callis e outros, Genes Dev., 1:1183-1200, 1987.

Chandler e outros, Plant Cell, 1:1175-1183, 1989.

Chen e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:8560-8564, 1986.

Chu e outros, Scientia Sinica, 18:659-668, 1975.

De Deckerer, Eur. J. Clin. Nutr., 52:749, 1998.

DeBlock e outros, EMBO J., 6:2513-2519, 1987.

Ebert e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:5745-5749, 1987.

Freitag and Selker, Curr. Opin. Genet. Dev., 15(2):191-199, 2005.

Gallie e outros, The Plant Cell, 1:301, 1999.

Hong e outros, Plant Mol. Biol., 34(3):549-555, 1997.

Hudspeth and Grula, Plant Mol. Biol., 12:579-589, 1989.

Ingelbrecht e outros, Plant Cell, 1:671-680, 1989.

James e outros, Semin. Arthritis Rheum., 28:85, 2000.

Joshi e outros, Plant Mol. Biol., 35(6):993-1001 1997.

Joshi, Nucleic Acids Res., 15:6643-6653, 1987.

Kridl e outros, Seed Sci. Res., 1:209-219, 1991.

Kridl e outros, Seed Sci. Res., 1:209-219, 1991.

Lawton e outros, Plant Mol. Biol. 9:315-324, 1987.

- Lopes e outros, *Mol. Gen. Genet.*, 247:603-613, 1995.
- Maniatis, e outros, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- Manzioris e outros, *Am. J. Clin. Nutr.*, 59:1304, 1994.
- Maundrell, J. *Biol. Chem.*, 265(19):10857-10864, 1990.
- McElroy e outros, *Mol. Gen. Genet.*, 231(1):150-160, 1991.
- Merrifield, J. *Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963.
- Metz e outros, *Science*, 293(5528):290-293, 2001.
- Misawa e outros, *Plant J.*, 4:833-840, 1993.
- Misawa e outros, *Plant J.*, 6:481-489, 1994.
- Murashige and Skoog, *Physiol. Plant*, 15:473-497, 1962.
- Naylor e outros, *Nature*, 405:1017, 2000.
- Pedido PCT WO 04071467A2
- Pedido PCT WO 05103253A1
- Pedido PCT WO 2002/50295
- Pedido PCT WO 95/06128
- Pedido PCT WO 96/33155
- Pedersen e outros, *Cell*, 29:1015-1026, 1982.
- Recombinant DNA Part D, *Methods in Enzymology*, Vol. 153, Wu and Grossman, eds., Academic Press, 1987.
- Richins e outros, *Nucleic Acids Res.*, 20:8451, 1987.
- Riggs, e outros, *Plant Cell*, 1(6):609-621, 1989.
- Russell e outros, *Transgenic Res.*, 6(2):157-168, 1997.
- Sambrook e outros, In: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sathasiivan e outros, *Nucl. Acids Res.*, 18:2188-2193, 1990.
- Simopoulos e outros, *Am. Coll. Nutr.*, 18:487, 1999.
- Simopoulos, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75:234-239, 1997
- Slocombe e outros, *Plant Physiol.*, 104(4):167-176, 1994.

- Stacey e outros, *Plant Mol. Biol.*, 31:1205-1216, 1996.
- Sullivan e outros, *Mol. Gen. Genet.*, 215(3):431-440, 1989.
- Turner and Foster, *Molecular Biotech.*, 3:225, 1995.
- Vasil e outros, *Plant Physiol.*, 91:1575-1579, 1989.
- Walder e outros, *Gene*, 42:133, 1986.
- Walker e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6624, 1987.
- Wang e outros, *Molec. Cell. Biol.*, 12(8):3399-3406, 1992.
- Wohlleben e outros, *Gene*, 70:25-37, 1988.
- Yang e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:9568-9572, 1990.

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que consiste em uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 6 ou 8, sendo que a referida sequência de nucleotídeos é operacionalmente ligada a um promotor heterólogo.

2. Construção de DNA, caracterizada pelo fato de que compreende um polinucleotídeo, como definido na reivindicação 1.

3. Construção de DNA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o promotor é funcional em uma célula procariótica.

4. Construção de DNA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o promotor é funcional em uma célula eucariótica.

5. Construção de DNA, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o promotor é funcional em uma célula de planta.

6. Construção de DNA, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o promotor é um promotor melhorado para semente.

7. Micro-organismo transgênico, caracterizado pelo fato de que é transformado com uma construção de DNA, como definida na reivindicação 2.

8. Micro-organismo transgênico de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma molécula de DNA de SEQ ID NO: 20.

9. Micro-organismo transgênico, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que é uma célula fúngica ou bacteriana.

10. Método de produção de comida ou alimento, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) obtenção da planta transgênica compreendendo um polinucleotídeo como definido na reivindicação 1 ou uma parte da mesma; e

(b) produção da dita comida ou alimento a partir da mesma.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a comida ou alimento é óleo, silagem, farelo, grão, amido, farinha ou proteína.

12. Método de produção de ácido docosaexaenóico ou ácido eicosapentaenóico, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) expressão nas sementes de uma planta que compreende uma molécula de DNA que codifica sintase de policetídeo um polinucleotídeo selecionado do grupo que consiste em: (i) uma sequência de polinucleotídeos como definida na reivindicação 1, (ii) um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 2, e (iii) um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 4, para produzir ácido docosaexaenoico ou ácido eicosapentaenoico e; e

(b) obtenção do ácido docosaexaenoico ou ácido eicosapentaenoico a partir da dita semente.

FIG. 1.

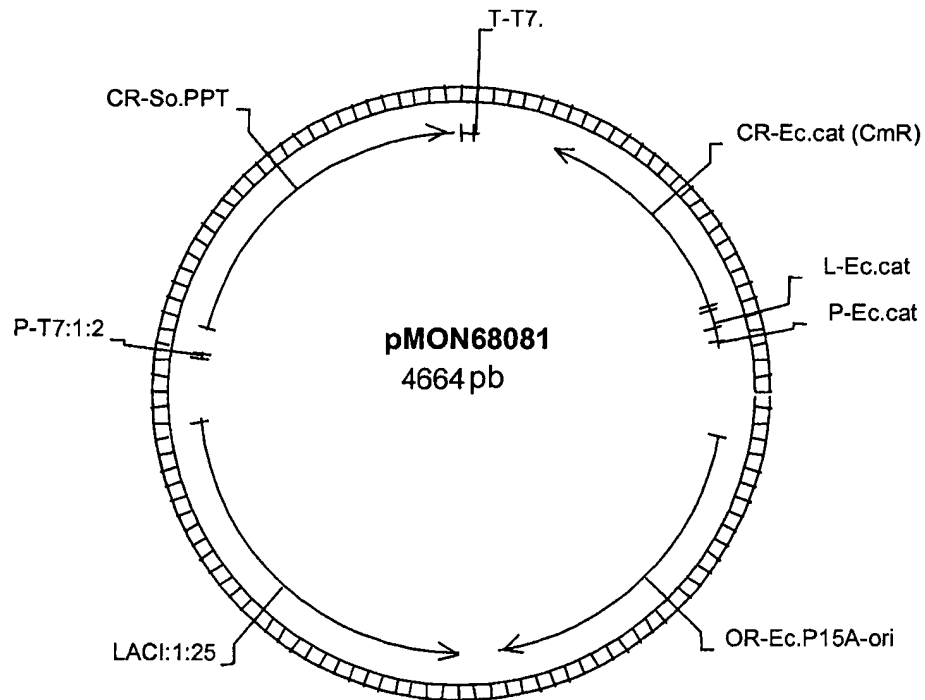


FIG. 2

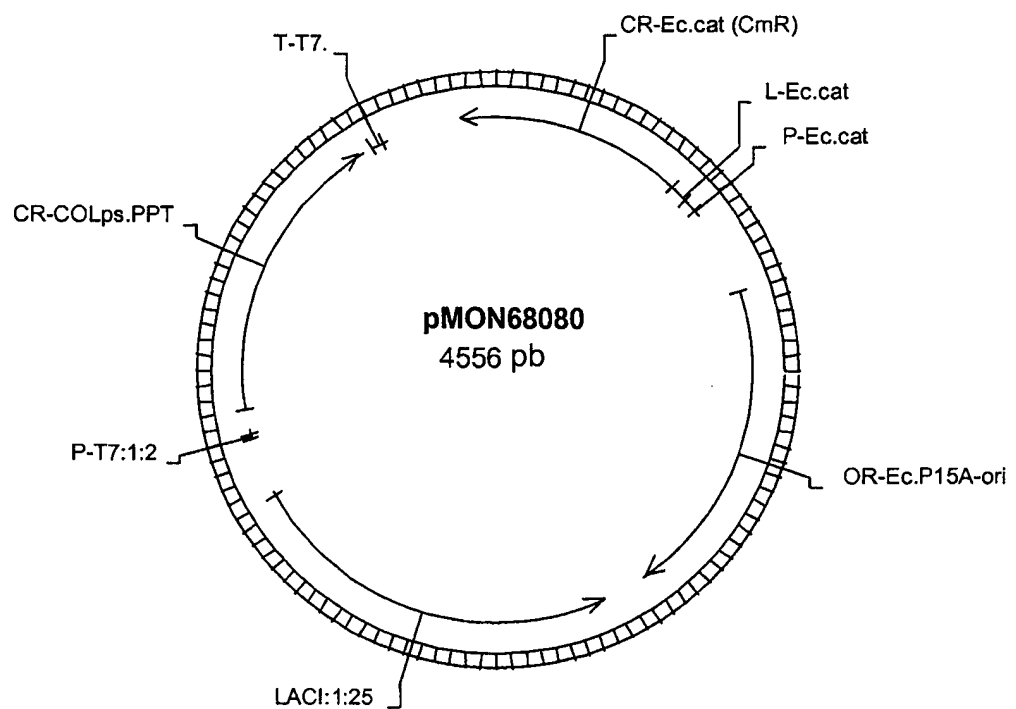


FIG. 3

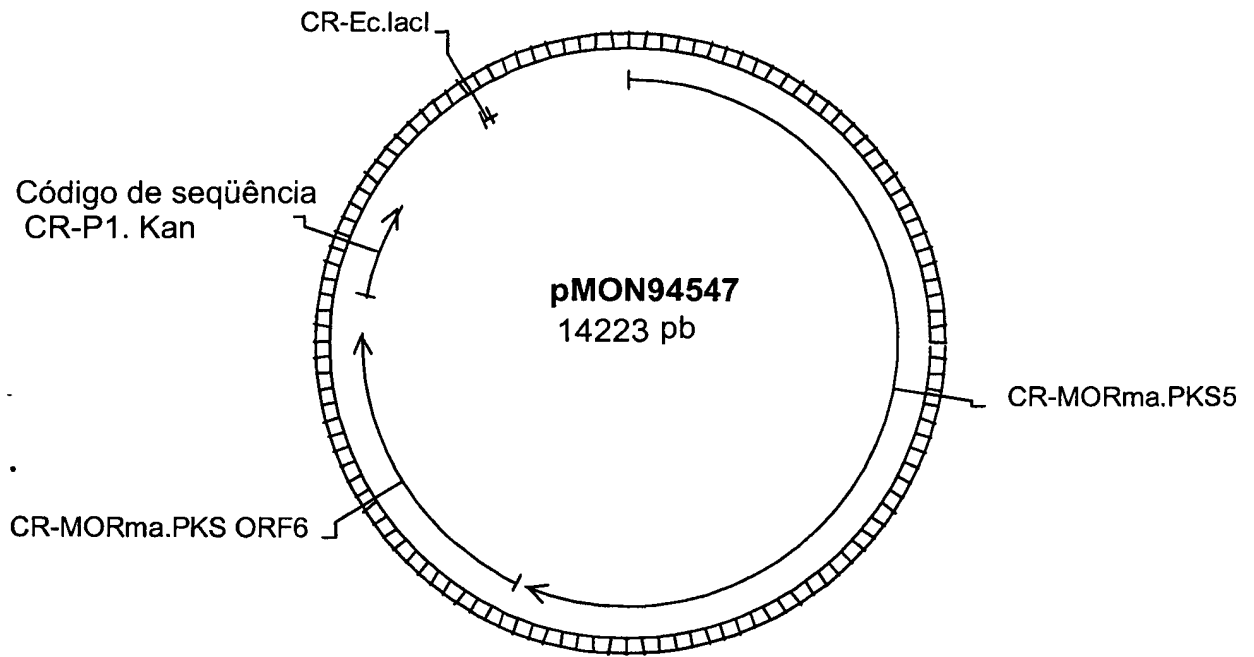


FIG. 4

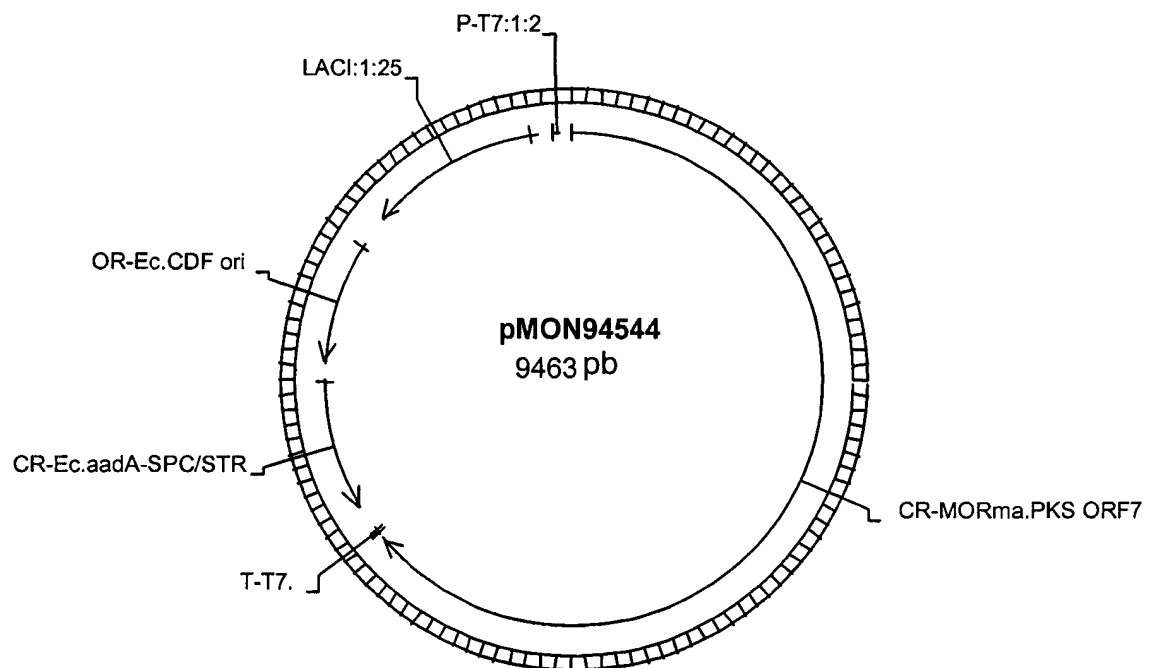


FIG. 5

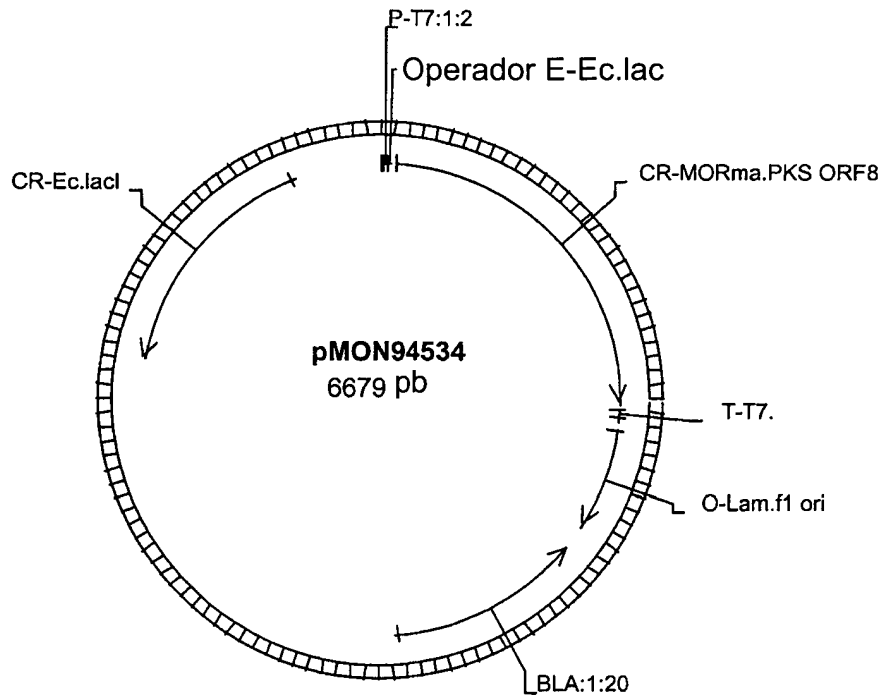


FIG. 6

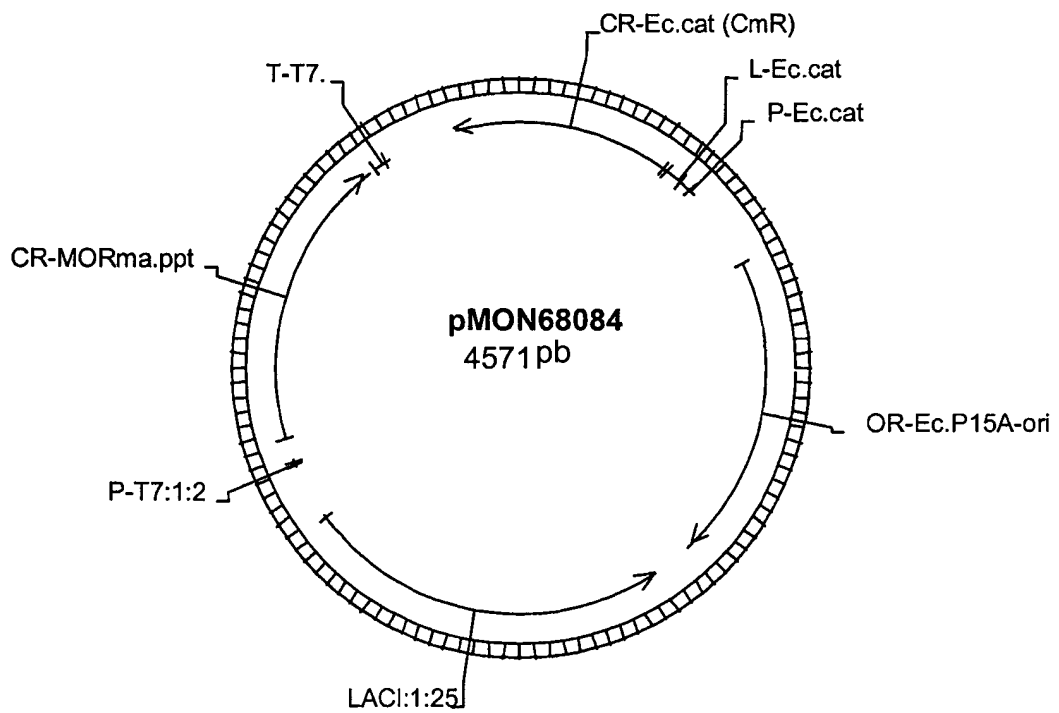


FIG. 7

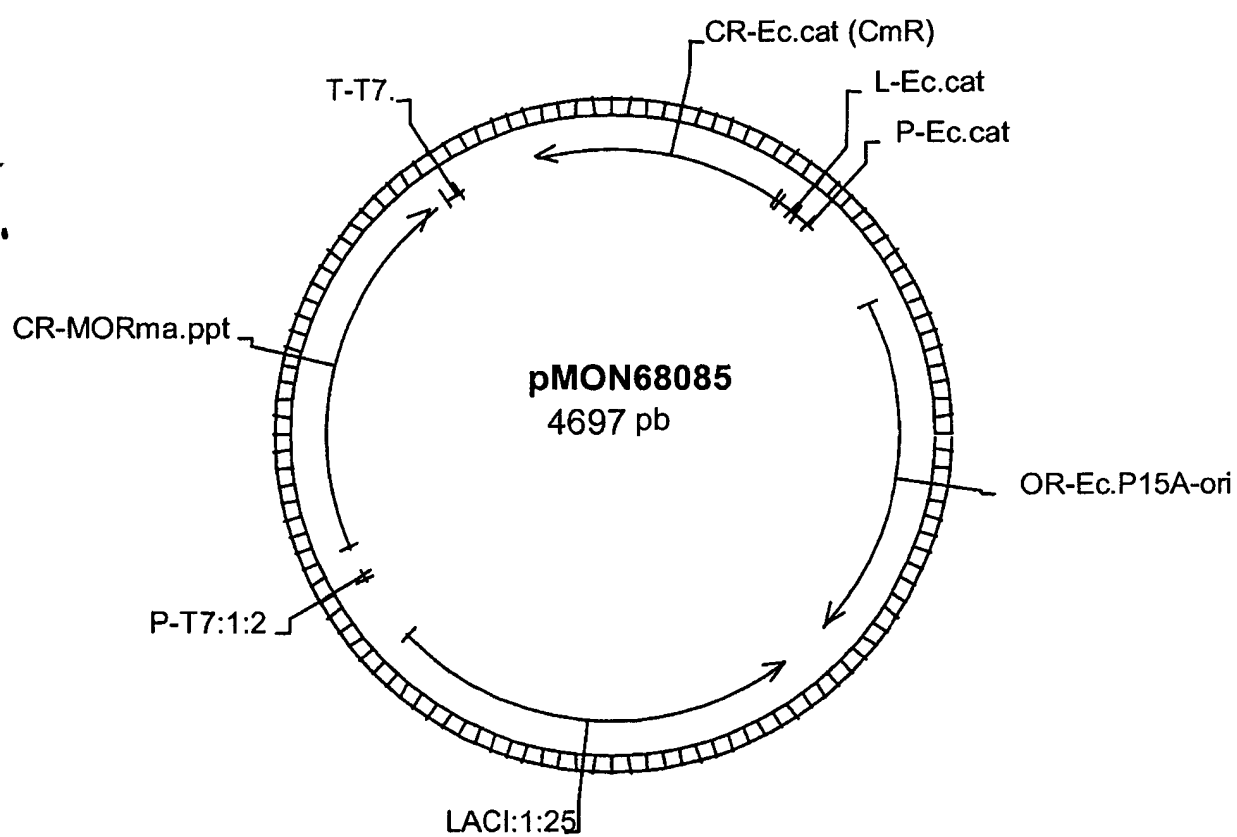


FIG. 8

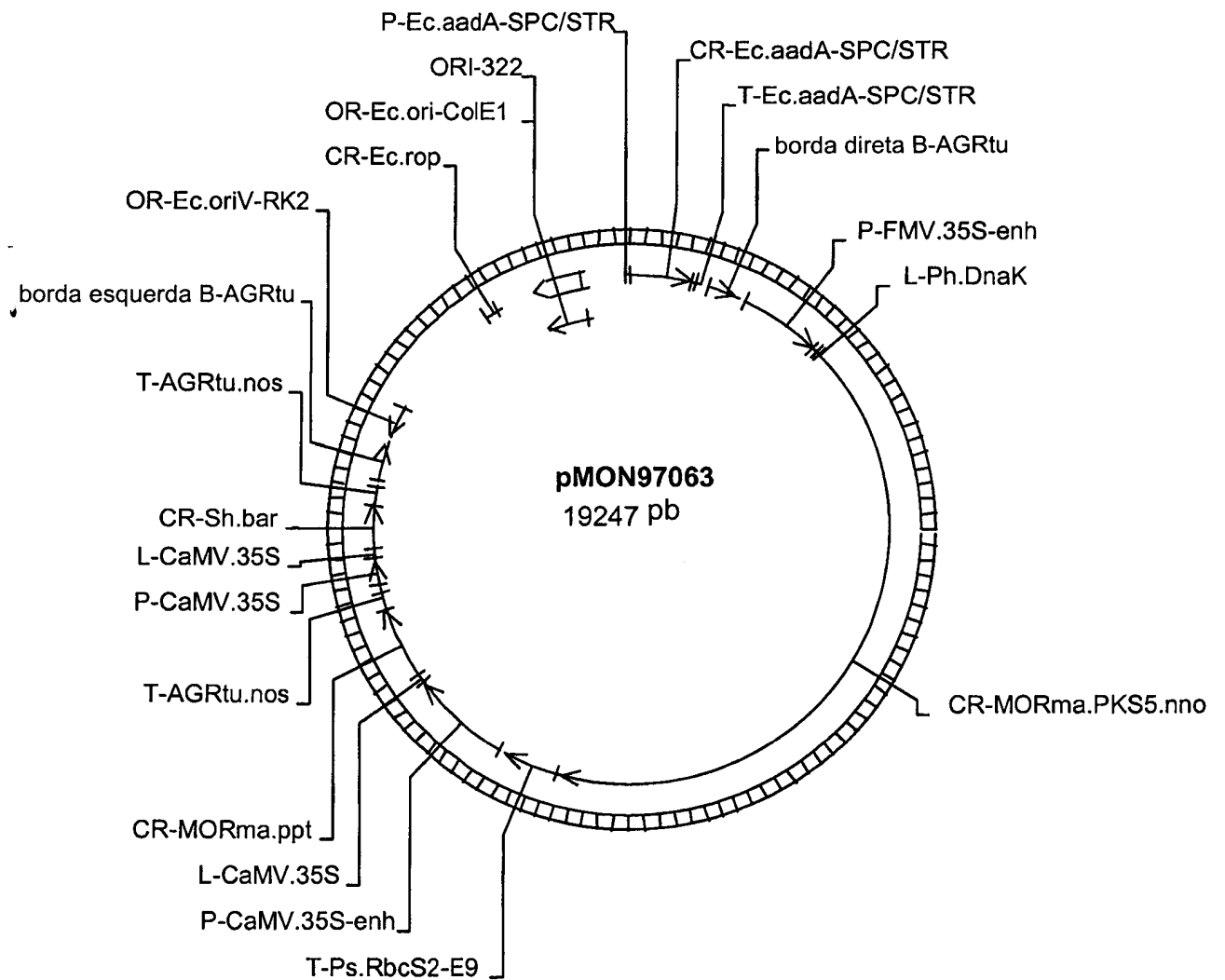


FIG. 9

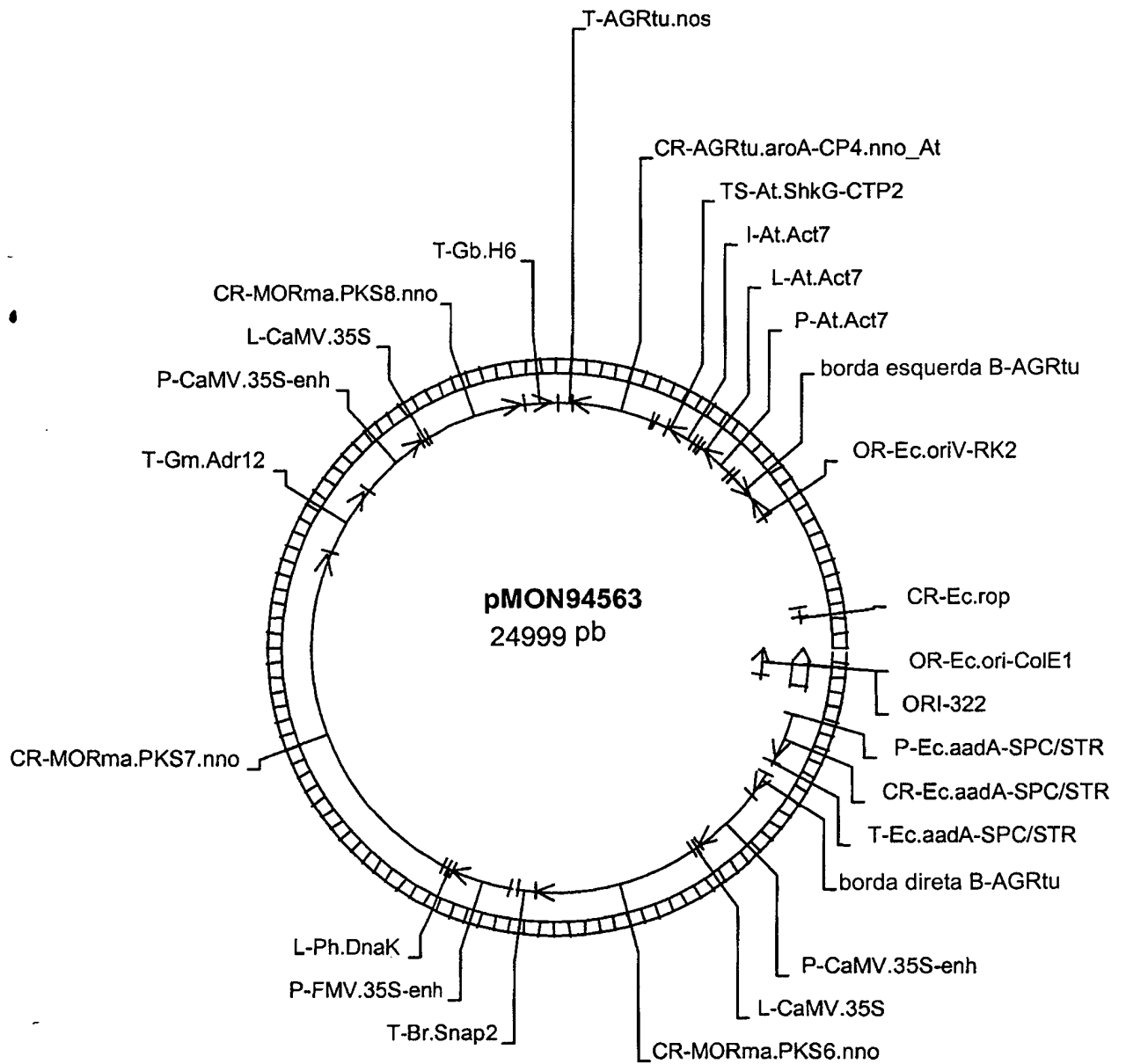


FIG. 10

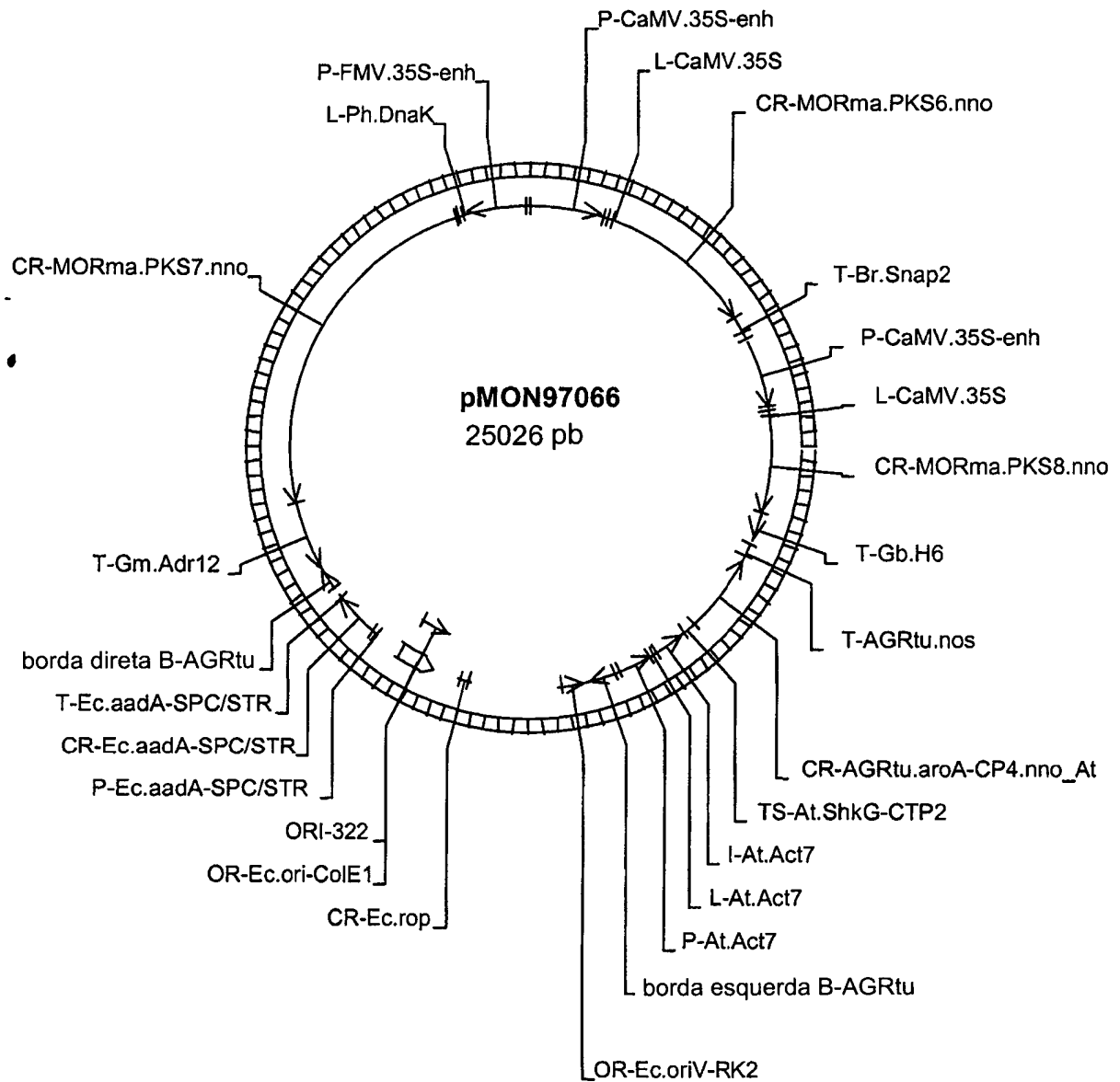


FIG. 11

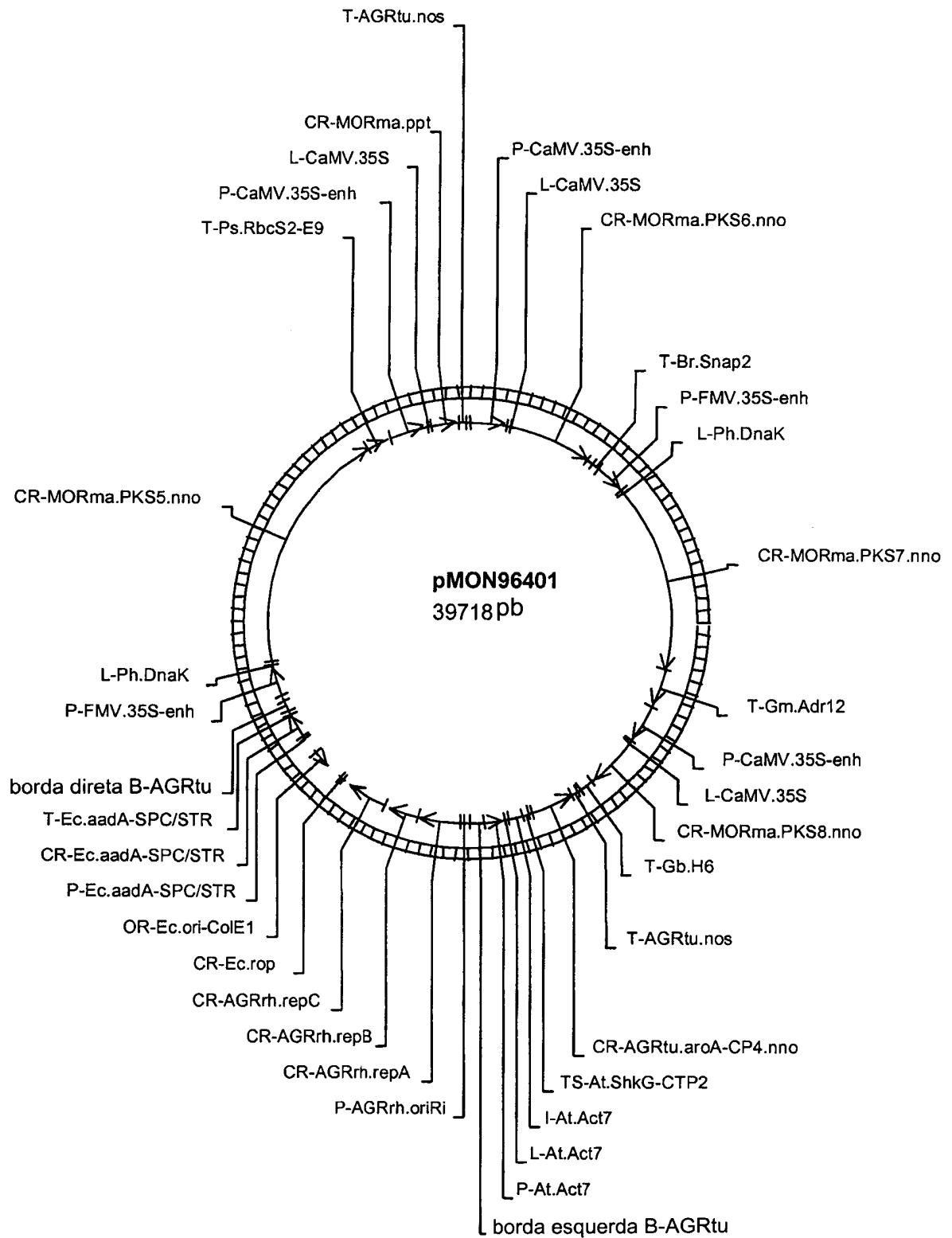


FIG. 12

