



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 122021003836-8 B1



(22) Data do Depósito: 17/11/2009

(45) Data de Concessão: 01/02/2022

(54) Título: POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO E/OU EXÓGENO QUE NÃO OCORRE DE FORMA NATURAL, VETOR E MÉTODO PARA PRODUIR ÓLEO CONTENDO ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS

(51) Int.Cl.: C12N 15/82; A01H 5/10; C12N 15/87; A01H 5/00; C12N 15/84.

(30) Prioridade Unionista: 09/07/2009 US 61/270,710; 18/11/2008 US 61/199,669.

(73) Titular(es): COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION; GRAINS RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION.

(72) Inventor(es): JAMES ROBERTSON PETRIE; ANNE MAREE MACKENZIE; QING LIU; PUSHKAR SHRESTHA; PETER DAVID NICHOLS; SUSAN IRENE ELLIS BLACKBURN; MAGED PETER MANSOUR; STANLEY SURESH ROBERT; DION MATTHEW FREDERICK FRAMPTON; XUE-RONG ZHOU; SURINDER PAL SINGH; CRAIG CHRISTOPHER WOOD.

(86) Pedido PCT: PCT AU2009001488 de 17/11/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/057246 de 27/05/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/02/2021

(62) Pedido Original do Dividido: PI0921467-4 - 17/11/2009

(57) Resumo: A presente invenção se relaciona, em geral, ao campo da síntese de ácidos graxos recombinantes, particularmente em plantas transgênicas. A aplicação descreve genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e fornece métodos e vetores para a manipulação da composição de ácidos graxos de óleos de plantas. Em particular, a invenção fornece construções para alcançar a integração de genes heterólogos múltiplos envolvidos na síntese de ácidos graxos para dentro do genoma da planta, tal que as plantas resultantes produzam níveis alterados de ácidos graxos poli não-saturados. Também são descritos métodos para melhorar a expressão de enzimas de biossíntese de ácidos graxos ao co-expressar um supressor de silenciamento dentro do órgão de estocagem da planta.

**POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO E/OU EXÓGENO QUE NÃO OCORRE DE
FORMA NATURAL, VETOR E MÉTODO PARA PRODUZIR ÓLEO CONTENDO
ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS**

(Pedido dividido do PI 0921467-4 de 17/11/2009)

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a métodos de sintetização de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, especialmente, ácido eicosapentaenóico, ácido docosapentaenoico e ácido docosahexaenoico, em células recombinantes como as células de levedura ou planta. Apresentam a se, ainda, células recombinantes ou de plantas que produzem ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa. Adicionalmente, a presente invenção se refere a um grupo de novas enzimas que possuem atividade desaturase ou elongase que podem ser usadas em métodos de sintetização de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa. Em particular, a presente invenção confere novas atividades às destaurases ω 3, elongases Δ 5 e desaturases Δ 6. Apresentam a se, ainda, métodos e construções de DNA para transformar células, transiente e/ou estavelmente, em particular células de plantas com múltiplos genes.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Os ácidos graxos Ômega-3 poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA e VLC-PUFA) são amplamente reconhecidos como compostos importantes para a saúde de seres humanos e animais. Esses ácidos graxos podem ser obtidos de fontes nutricionais ou pela conversão de ácidos graxos linoléicos (LA, 18:2 ω 6) ou α -linolênicos (ALA, 18:3 ω 3), sendo ambos considerados ácidos graxos essenciais à dieta do ser humano. Ao mesmo tempo em que seres humanos

e muitos outros animais vertebrados conseguem converter LA ou ALA, obtido de fontes de planta sources, em VLC-PUFA, eles realizam esta conversão a uma taxa muito baixa. Ademais, a maioria das sociedades modernas apresenta dietas desequilibradas, nas quais pelo menos 90% dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) são os ácidos graxos $\omega 6$, ao invés de os serem na razão de 4:1 ou menos de ácidos graxos $\omega 6$: $\omega 3$ que é considerada ideal (Trautwein, 2001). A fonte alimentícia imediata de VLC-PUFAs, como o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 $\omega 3$) e ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 $\omega 3$) para seres humanos vem grande parte de peixes ou óleo de peixe. Os profissionais de saúde, portanto, recomendaram a inclusão regular de peixes contendo níveis significativos de VLC-PUFA na dieta de ser humano. Cada vez mais os óleos VLC-PUFA derivados de peixe vêm sendo incorporados em produtos alimentícios e nas fórmulas para bebês, por exemplo. Contudo, devido ao declínio nacional e mundial de áreas de pesca, são necessárias fontes alternativas para a obtenção desses óleos que intensificam os benefícios à saúde.

[003] Ao contrário dos animais, plantas mais altas carecem da capacidade de sintetizar ácidos graxos poliinsaturados com cadeias de comprimento mais longo do que 18 carbonos. Em particular, plantas agrícolas e de horticultura juntamente com outros angiospermas não têm as enzimas necessárias para sintetizar ácidos graxos $\omega 3$ de cadeia mais longa como o EPA, ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5 $\omega 3$) e DHA que são derivados do ALA. Uma meta importante na biotecnologia vegetal, portanto, é a engenharia de plantas cultivadas que produzem quantidades

substanciais de VLC-PUFA, conferindo, assim, uma fonte alternativa destes compostos.

Trajetórias de Biossíntese de VLC-PUFA

[004] A biossíntese de VLC-PUFAs em organismo como microalgas, musgos e fungos ocorre normalmente como uma série de reações de dessaturação e alongamento dependentes de oxigênio (Figura 1). A trajetória mais comum que produz EPA nestes organismos inclui $\Delta 6$ -dessaturação, $\Delta 6$ - elongase e $\Delta 5$ -dessaturação (chamada de trajetória $\Delta 6$ -dessaturação), enquanto uma trajetória não tão comum utiliza $\Delta 9$ - elongase, $\Delta 8$ -dessaturação e $\Delta 5$ -dessaturação (chamada de trajetória de $\Delta 9$ -dessaturação). Essas reações consecutivas de dessaturação e elongase podem começar tanto com o substrato de ácido graxo $\omega 6$ LA, mostrado esquematicamente na parte superior esquerda da Figura 1 substrato ALA ($\omega 6$) ou $\omega 3$, mostrado na parte inferior direita da 1 ($\omega 3$). Sendo desempenhada a $\Delta 6$ -dessaturação inicial no substrato LA $\omega 6$, o produto de VLC-PUFA da série de três enzimas será o ácido graxo $\omega 6$ ARA. Os organismos de sintetização VLC-PUFA podem converter os ácidos graxos $\omega 6$ em ácidos graxos $\omega 3$ com o uso de um $\omega 3$ desaturase, mostrado como etapa $\Delta 17$ desaturase na Figura 1 para converter ácido araquidônico (ARA, 20:4 $\omega 6$) em EPA. Alguns membros da família $\omega 3$ desaturase podem agir sobre uma variedade de substratos que variam do LA ao ARA. As plantas $\omega 3$ desaturases muitas vezes catalisam especificamente a $\Delta 15$ desaturase de LA a ALA, enquanto as $\omega 3$ desaturases de fungo e levedura podem ser específicas para a $\omega 17$ desaturase de ARA a EPA (Pereira et al., 2004a; Zank et al., 2005). Alguns relatórios sugerem que podem existir as $\omega 3$ desaturases, as quais podem converter uma

vasta gama de substratos $\omega 6$ em seus produtos $\omega 3$ correspondentes (Zhang et al., 2007). Outros $\omega 3$ desaturases podem ser preferenciais em relação aos substratos $\omega 3$ (Sayanova et al., 2003).

[005] A conversão de EPA em DHA nesses organismos é relativamente simples e consiste em um $\Delta 5$ - elongase de EPA para produzir DPA, seguido de um $\Delta 4$ -dessaturação para produzir DHA (Figura 1). Em contrapartida, os mamíferos utilizam a autodenominada trajetória "Sprecher", que converte DPA em DHA por meio de três reações separadas que são independentes de um $\Delta 4$ desaturase (Sprecher et al., 1995).

[006] As desaturases front-end em geral encontradas em plantas, musgos, microalgas e animais menores como o *Caenorhabditis elegans* aceitam predominantemente o substrato de ácido graxos esterificados para a posição *sn*-2 de um de fosfatidilcolina (PC). Estas desaturases são, portanto, conhecidas como desaturases front-end acil-PC, ligadas por lipídeo (Domergue et al., 2003). Em contrapartida, desaturases front-end em animais maiores em geral aceitam substratos acil-CoA quando o substrato de ácido graxo está ligado em CoA ao invés de PC (Domergue et al., 2005).

[007] Cada reação de elongase PUFA e VLC-PUFA consiste em quatro etapas catalisadas por um complexo protéico de múltiplos componentes: primeiro, uma reação de condensação resulta na adição de uma unidade 2C de malonil-CoA no ácido graxo, resultando na formação de um intermediário β a cetoacila. Portanto, ele é reduzido por NADPH, após desidratação para o rendimento de um

intermediário enoíla. Este intermediário é finalmente reduzido pela segunda vez para produzir o ácido graxo alongado. Em geral, imagina-se que a etapa de condensação dessas quatro reações é específica do substrato, enquanto as outras etapas não o são. Na prática, isso significa que o maquinário para alongase de planta nativa consegue alongar VLC-PUFA, desde que a enzima de condensação (chamada tipicamente de uma 'elongase') específica para VLC-PUFA seja introduzida, embora seja baixa a eficiência do maquinário para alongase de planta nativa para alongar os substratos VLC-PUFAe. Em 2007 a identificação e a caracterização da desidratase em ciclo de alongase da levedura elongase foram publicados (Denic e Weissman, 2007).

[008] Dessaturação VLC-PUFA em plantas, musgos e microalgas ocorre naturalmente ao substrato de ácidos graxos predominantemente na poça de acil-PC, enquanto que o corre o alongase em substratos na poça acil-CoA. A transferência de ácidos de molécula de acil-PC para um carreador de CoA se dá por meio das fosfolipases (PLAs), enquanto que a transferência de ácidos graxos acil-CoA para um carreador PC se dá por meio de lisofosfatidil-colina aciltransferases (LPCATs) (Figura 2) (Singh et al., 2005). A redução no fluxo devido à troca acil ter ocorrido antes da dessaturação pode seguir a se ao alongase, ou vice a versa, pode ser superada pelo uso de uma desaturase que tenha especificidade para substratos acil-CoA (Hoffmann et al., 2008).

Produção de VLC-PUFA por engenharia

[009] A maior parte da engenharia metabólica de

VLC-PUFA vem sendo executada com o uso de uma trajetória aeróbica $\Delta 6$ -dessaturação/ elongase. A biossíntese de γ ácido linolênico (GLA, 18:3 ω 6) em tabaco foi relatada pela primeira vez em 1996 com o uso de um $\Delta 6$ desaturase a partir da cianobactéria *Synechocystis* (Reddy e Thomas, 1996). Mais recentemente foi produzido GLA em plantas cultivadas como açafrão (73% GLA; Knauf et al., 2006) e semente de soja (28% GLA; Sato et al., 2004). A de VLC-PUFA como EPA e DHA envolve uma engenharia mais complicada devido ao número aumentado das etapas de dessaturação e elongase envolvidas. A produção de EPA em uma planta de terra foi relatada primeiramente por Qi et al. (2004) que apresentou os genes que encodificam um $\Delta 9$ a elongase a partir de *Isochrysis galbana*, um $\Delta 8$ desaturase de *Euglena gracilis* e um $\Delta 5$ desaturase de *Mortierella alpina* no rendimento de *Arabidopsis* até 3% em EPA. A este trabalho seguiu a se o de Abbadi et al. (2004) que relatou a produção de até 0,8% de EPA na semente de semente de linhaça com o uso de genes encodificando um $\Delta 6$ desaturase e $\Delta 6$ elongase a partir de *Physcomitrella patens* e um $\Delta 5$ desaturase de *Phaeodactylum tricornutum*.

[0010] O primeiro relato sobre a produção de DHA e até então os mais elevados níveis de produção de VLC-PUFA relatados foram no documento WO 04/017467, no qual a produção de 3% DHA em embriões de semente de soja é descrita, mas não a semente pela introdução de genes encodificando o *Saprolegnia diclina* $\Delta 6$ desaturase, *Mortierella alpina* $\Delta 6$ desaturase, *Mortierella alpina* $\Delta 5$ desaturase, *Saprolegnia diclina* $\Delta 4$ desaturase, *Saprolegnia diclina* $\Delta 17$ desaturase, *Mortierella alpina* $\Delta 6$ elongase e

Pavlova lutheri $\Delta 5$ elongase. O nível máximo de EPA nos embriões que também produziam DHA era de 19,6%, indicando que a eficiência de conversão de EPA a DHA era insuficiente (WO 2004/071467). Esta conclusão foi similar àquela publicada por Robert et al. (2005), em que o fluxo de EPA a DHA era baixo com a produção de 3% EPA e 0,5% DHA em *Arabidopsis* com o uso de *Danio rerio* $\Delta 5/6$ desaturase, *Caenorhabditis elegans* $\Delta 6$ elongase, e *Pavlova salina* $\Delta 5$ elongase e $\Delta 4$ desaturase. Além disso, em 2005, Wu et al., publicaram a produção de 25% de ARA, 15% de EPA, e 1,5% de DHA em *Brassica juncea* com o uso de *Pythium irregulare* $\Delta 6$ desaturase, um *Thraustochytrid* $\Delta 5$ desaturase, a *Physcomitrella patens* $\Delta 6$ a elongase, a *Calendula officianalis* $\Delta 12$ desaturase, um *Thraustochytrid* $\Delta 5$ a elongase, o *Phytophthora infestans* $\Delta 17$ desaturase, o *Oncorhynchus mykiss* VLC-PUFA elongase, um *Thraustochytrid* $\Delta 4$ desaturase e um *Thraustochytrid* LPCAT (Wu et al., 2005).

[0011] Portanto, prevalece a necessidade pela produção mais eficaz de LC-PUFA em células recombinantes, em particular nas sementes de plantas com sementes oleosas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0012] Os presentes inventores identificaram pela primeira vez uma $\Delta 5$ elongase que converte de forma EPA em DPA em uma célula recombinante.

[0013] Portanto, a presente invenção apresenta adicionalmente uma célula recombinante, preferencialmente uma célula vegetal e com mais preferência uma célula da semente vegetal, que compreende um polinucleotídeo exógeno que codifica um ácido graxo elongase com atividade $\Delta 5$ elongase, em que a elongase tem atividade em EPA para

produzir DPA com eficiência de pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70% ou pelo menos 75% quando a elongase é expressa a partir do polinucleotídeo exógeno na célula, com preferência em uma célula de planta.

[0014] Em uma modalidade, a elongase compreende aminoácidos tendo uma sequência conforme SEQ ID NO:6, um fragmento biologicamente ativo do mesmo ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 47% idêntica a SEQ ID NO:6.

[0015] Em outra modalidade, a célula compreende adicionalmente em codificação de polinucleotídeos exógenos que codificam:

- i) um $\Delta 8$ desaturase e/ou um $\Delta 6$ desaturase,
- ii) uma $\Delta 9$ elongase e/ou um $\Delta 6$ elongase,
- iii) um $\Delta 5$ desaturase, e
- iv) opcionalmente um $\Delta 4$ desaturase e/ou um $\omega 3$ desaturase, em que cada polinucleotídeo é ligado operavelmente a um ou mais promotores que conseguem direcionar a expressão dos ditos polinucleotídeos na célula.

[0016] Os presentes inventores também identificaram um $\omega 3$ desaturase com propriedades novas. O $\omega 3$ desaturase é útil nas trajetórias recombinantes designadas para produzirem EPA, os ácidos graxos a jusante DPA e DHA, e outro $\omega 3$ VLC-PUFA.

[0017] Portanto, a presente invenção apresenta uma célula recombinante, com preferência uma célula de semente vegetal, que compreende um polinucleotídeo exógeno encodificando um ácido graxo desaturase com atividade de $\omega 3$ desaturase em que desaturase tem capacidade de dessaturação de pelo menos um entre ARA a EPA, DGLA a ETA,

GLA a SDA, tanto ARA quanto em EPA e DGLA a ETA, tanto ARA quanto em EPA e GLA a SDA, ou todos os três quando desaturase é expressa a partir do polinucleotídeo exógeno na célula.

[0018] A desaturase é, com preferência, uma desaturase front-end.

[0019] Em outra modalidade, a desaturase tem atividade de $\Delta 17$ desaturase em um ácido graxo C20 que tem ao menos três ligações duplas carbono a carbono em sua cadeia acila, com preferência ARA.

[0020] Em outra modalidade, a desaturase tem atividade $\Delta 15$ desaturase em um ácido graxo C18 que tem três ligações duplas de carbono a carbono em sua cadeia acila, com preferência GLA.

[0021] A desaturase tem, com preferência, atividade maior sob um substrato acil-CoA maior do que o substrato acil-PC correspondente.

[0022] Em uma modalidade, o substrato acila a CoA é ARA a CoA e o substrato acila-PC compreende ARA na posição sn-2 de PC.

[0023] Em outra modalidade, a célula é uma célula vegetal e desaturase tem atividade em ARA para produzir EPA com uma eficiência de pelo menos 40% quando expressa a partir do polinucleotídeo exógeno na célula.

[0024] Em uma modalidade particular, a desaturase compreende aminoácidos tendo uma sequência conforme mostra SEQ ID NO: 15, 17 ou 20, um fragmento biologicamente ativo ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 30% idêntica à SEQ ID NO:15, pelo menos, 60% idêntica à SEQ ID NO: 17 e/ou ao menos 60% idêntica à SEQ ID NO:20.

[0025] Adicionalmente, os presentes inventores identificaram um gene encodificando um $\Delta 6$ desaturase que tem uma eficiência de conversão maior para os substratos de ácido graxo $\omega 3$ maiores do que o substrato de ácido graxo $\omega 6$ em plantas e/ou em levedura. Esta desaturase $\Delta 6$ também exibe atividade desaturase $\Delta 8$. O uso desta desaturase $\Delta 6$ e outras desaturasas com especificidade elevada para os substratos de ácido graxo $\omega 3$ dessaturados em trajetórias recombinantes LC-PUFA em plantas aumenta os níveis de EPA, DPA e DHA em relação ao uso de desaturasas sem preferência pelos substratos de ácido graxo dessaturados $\omega 3$.

[0026] Portanto, a presente invenção apresenta adicionalmente uma célula recombinante, com preferência uma célula de planta e com mais preferência uma célula de semente de planta, que compreende um polinucleotídeo exógeno encodificando um ácido graxo desaturase com atividade $\Delta 6$ desaturase, em que desaturase é caracterizada adicionalmente por ter pelo menos dois, com preferência todos os três, entre os seguintes:

i) atividade $\Delta 6$ desaturase maior em ALA do que LA como no substrato de ácido graxo, com preferência em uma célula de planta,

ii) atividade $\Delta 6$ desaturase maior em ALA a CoA como no substrato de ácido graxo do que em ALA unida à posição sn-2 de PC como substrato de ácido graxo, com preferência em uma célula de planta, e

iii) atividade $\Delta 8$ desaturase em ETrA, com preferência em uma célula de planta.

[0027] A presente invenção apresenta adicionalmente uma célula recombinante, com preferência uma célula de

planta e com mais preferência uma célula de semente de planta, que compreende um polinucleotídeo exógeno encodificando um ácido graxo desaturase com atividade $\Delta 6$ desaturase, em que desaturase tem atividade em um substrato $\omega 3$ maior do que o substrato $\omega 6$ correspondente, em que desaturase tem atividade em ALA para produzir SDA com uma eficiência de pelo menos 5%, pelo menos 7,5%, ou pelo menos 10% quando desaturase é expressa a partir do polinucleotídeo exógeno na célula, ou pelo menos 35% quando expresso em uma célula de levedura.

[0028] Em uma modalidade, desaturase tem atividade $\Delta 6$ desaturase maior em ALA do que LA como substrato de ácido graxo, com preferência em uma célula de planta.

[0029] A $\Delta 6$ desaturase tem com preferência pelo menos cerca de uma atividade $\Delta 6$ desaturase 2 vezes maior, atividade 3 vezes maior, pelo menos atividade 4 vezes maior, ou pelo menos atividade 5 vezes maior em ALA como um substrato comparado a LA, com preferência em uma célula vegetal.

[0030] Em outra modalidade, a $\Delta 6$ desaturase tem atividade maior em ALA a CoA como substrato de ácido graxo do que em ALA unida na posição sn-2 de PC como substrato de ácido graxo, com preferência em uma célula vegetal.

[0031] A $\Delta 6$ desaturase tem com preferência pelo menos cerca de uma atividade $\Delta 6$ desaturase 5 vezes maior ou atividade pelo menos 10 vezes maior em ALA a CoA como substrato de ácido graxo maior do que em ALA unida na posição Sn-2 de PC como substrato de ácido graxo, com preferência em uma célula vegetal.

[0032] A $\Delta 6$ desaturase é, com preferência, uma

desaturase front-end.

[0033] Em ainda outra modalidade, a célula de acordo com a invenção compreende adicionalmente polinucleotídeos exógenos encodificando:

- i) um $\Delta 6$ elongase,
- ii) um $\Delta 5$ desaturase,
- iii) um $\Delta 5$ elongase, e
- iv) opcionalmente, um $\Delta 4$ desaturase e/ou um $\omega 3$ desaturase,

em que cada polinucleotídeo é ligado operavelmente a um ou mais promotores que conseguem direcionar a expressão dos ditos polinucleotídeos na célula.

[0034] A $\Delta 6$ desaturase na célula conforme a invenção, não tem com preferência atividade $\Delta 5$ desaturase detectável alguma sobre ETA.

[0035] A $\Delta 6$ desaturase compreende com preferência aminoácidos tendo uma sequência como mostra a SEQ ID NO: 10, um fragmento biologicamente ativo do mesmo ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 77% idêntica à SEQ ID NO: 10.

[0036] Em outra modalidade, a $\Delta 6$ desaturase compreende aminoácidos tendo uma sequência como mostra a SEQ ID NO: 8, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 67% idêntica à SEQ ID NO: 8 e tem atividade $\Delta 8$ desaturase.

[0037] Os presentes inventores concluíram também que células recombinantes $\Delta 9$ elongase, $\Delta 8$ desaturase e $\Delta 5$ desaturase conseguem converter de forma mais eficaz o substrato de ácido graxos em EPA, DPA e DHA.

[0038] Portanto, a presente invenção apresenta,

adicionalmente, uma célula recombinante, com preferência uma célula vegetal e com mais preferência uma célula de semente de planta, compreendendo polinucleotídeos exógenos encodificando:

- i) um $\Delta 9$ elongase,
- ii) um $\Delta 8$ desaturase,
- iii) um $\Delta 5$ desaturase,
- iv) opcionalmente, a elongase um Δ elongase, e
- v) se a $\Delta 5$ elongase estiver presente, opcionalmente, um $\Delta 4$ desaturase,

em que cada polinucleotídeo é ligado operavelmente a um ou mais promotores que conseguem direcionar a expressão dos ditos polinucleotídeos na célula, e em que pelo menos 15%, pelo menos 20%, ou pelo menos 25%, do total de ácidos graxos na célula compreende pelo menos 20 carbonos e pelo menos 3 duplas ligações carbono a carbono em suas cadeias de acila.

[0039] Em uma modalidade, a soma total de ARA, EPA, DPA e DHA nos ácidos graxos na célula da invenção compreende pelo menos 15%, pelo menos 20%, ou pelo menos 25% do total de ácidos graxos na célula.

[0040] Em uma modalidade adicional, a célula de acordo com a invenção tem capacidade reduzida para converter ácido oléico em ácido ecosênico (C20:1) quando comparado à planta do tipo selvagem e/ou menos do que 5% do ácido oléico é convertido em ácido eicosênico na célula.

[0041] Em uma modalidade particular, o ácido graxo total na célula tem menos do que 1% de C20:1.

[0042] Em uma modalidade adicional, a célula de acordo com a invenção tem atividade reduzida de $\Delta 15$

desaturase endógena quando comparada com uma célula do tipo selvagem, e/ou menos do que 10% do LA é convertido para ALA na célula.

[0043] Em uma modalidade particular Em uma modalidade particular, o $\Delta 15$ desaturase endógena tem maior atividade em um substrato acila-PC do que no substrato acila a CoA correspondente, com preferência se o grupo acila for LA.

[0044] Em uma modalidade adicional, a célula da invenção compreende adicionalmente uma conversão aumentada de GLA para SDA e/ou ARA em EPA relação à célula correspondente que carece de polinucleotídeos exógenos.

[0045] Em uma modalidade, quantidade de DHA nos ácidos graxos na célula da invenção é de menos 3%, pelo menos, 5% ou, pelo menos, 10%, do total de ácidos graxos na célula.

[0046] Em outra modalidade, a eficiência de conversão de LA a ARA e/ou ALA em EPA na célula da invenção é de pelo menos 80% ou pelo menos 90%.

[0047] Em uma modalidade, a $\Delta 9$ elongase compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostrada na SEQ ID NO:22, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% idêntica à SEQ ID NO:22.

[0048] Em outra modalidade, o $\Delta 8$ desaturase compreende aminoácidos que têm uma sequência como mostra a SEQ ID NO:24, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% idêntica à SEQ ID NO:24.

[0049] Em ainda outra modalidade, o $\Delta 5$ desaturase

compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra a SEQ ID NO:26 ou SEQ ID NO: 13, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% idêntica à SEQ ID NO:26 e/ou SEQ ID NO: 13.

[0050] Os presentes inventores obtiveram resultados que indicam que um conjunto de genes expressando a $\Delta 6$ desaturase, $\Delta 6$ elongase, $\Delta 5$ desaturase, $\Delta 5$ elongase, e $\Delta 4$ desaturase, ou a um conjunto de genes similar, em particular, se os desaturases estiverem ativos nos substratos acila a CoAs, podem ser usados para sintetizar níveis substanciais de, DPA e DHA.

[0051] Portanto, a presente invenção apresenta, adicionalmente, a célula recombinante, com preferência a célula vegetal e com mais preferência uma célula de semente de planta, compreendendo polinucleotídeos exógenos encodificando:

- i) um $\Delta 6$ elongase e/ou um $\Delta 9$ elongase,
- ii) um $\Delta 6$ desaturase e/ou um $\Delta 8$ desaturase,
- iii) um $\Delta 5$ desaturase,
- iv) um $\Delta 5$ elongase,
- v) um $\Delta 4$ desaturase, e
- vi) opcionalmente um diacilglicerol-aciltransferase,

em que cada polinucleotídeo é ligado operavelmente a um ou mais promotores que conseguem direcionar a expressão dos ditos polinucleotídeos na célula, caracterizados por um ou mais de todas as propriedades a seguir

a) a eficiência da conversão de ALA em EPA, DPA ou DHA é de pelo menos 17,3%, ou pelo menos 23%,

b) a eficiência de conversão de ALA a DPA ou DHA é

pelo menos 15,4%, ou pelo menos 21%,

c) a eficiência de conversão de ALA a DHA é de pelo menos 9,5%, ou pelo menos 10,8%, e

d) a eficiência de conversão de EPA a DHA é pelo menos 45%, ou pelo menos 50%, e com preferência caracterizado, adicionalmente, pelo fato de que pelo menos 4% do total de ácido graxo na célula é DHA.

[0052] Com preferência, pelo menos 6%, pelo menos 11% ou pelo menos 15% do total de ácido graxo incorporado no triacilglicerol na célula é DHA.

[0053] Em uma modalidade, o DHA constitui de 20% a 65%, com preferência, de 40% a 65%, do total de SDA, ETA, EPA, DPA e DHA na célula.

[0054] Com preferência, dos ω 3 ácidos graxos na célula 0,1% a 25% é SDA, 0,1% a 10% é ETA, 0,1% a 60% é EPA, 0,1% a 50% é DPA e 30% a 95% é DHA, com mais preferência do ω 3 ácidos graxos na célula 0,1 a 25% é SDA, 0,1 a 10% é ETA, 0,1 a 50% é EPA, 0,1 a 50% é DPA e 40 a 95% é DHA.

[0055] A Δ 4desaturase com preferência compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra a SEQ ID NO: 73, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% idêntica à SEQ ID NO:73.

[0056] Em outro aspecto, a presente invenção apresenta uma célula recombinante, com preferência uma célula vegetal e com mais preferência uma célula de semente de planta, compreendendo polinucleotídeos exógenos encodificando;

i) um Δ 6 elongase e/ou um Δ 9 elongase,

- ii) um $\Delta 6$ desaturase e/ou $\Delta 8$ desaturase,
- iii) um $\Delta 5$ desaturase,
- iv) um $\Delta 5$ elongase, e
- v) opcionalmente um diacilglicerol-aciltransferase,

em que cada polinucleotídeo é ligado operavelmente a um ou mais promotores que conseguem direcionar a expressão dos ditos polinucleotídeos na célula, caracterizado pelo fato de que uma ou mais ou todas as propriedades a seguir:

a) a eficiência de conversão de ALA em EPA ou DPA é pelo menos 17,3%, ou pelo menos 23%, e

b) a eficiência de conversão de ALA a DPA é pelo menos 15,4%, ou pelo menos 21%, e com preferência, caracterizado, adicionalmente, pelo fato de que pelo menos 4% do total de ácido graxo na célula é DPA.

[0057] Com preferência, pelo menos 6%, pelo menos 11% ou pelo menos 15% do total de ácidos graxos incorporado em triacilglicerol na célula é DPA.

[0058] O DPA com preferência constitui 20% a 65%, com mais preferência de 40% a 65%, do total de SDA, ETA, EPA e DPA na célula.

[0059] Com preferência, dos $\omega 3$ ácidos graxos na célula 0,1 a 35% é SDA, 0,1 a 15% é ETA, 0,1 a 60% é EPA e 30 a 75% é DPA, com mais preferência dos $\omega 3$ ácidos graxos na célula 0,1 a 35% é SDA, 0,1 a 15% é ETA, 0,1 a 50% é EPA e 40 a 75% é DPA.

[0060] Em uma modalidade, o $\Delta 6$ elongase compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra a SEQ ID NO:4, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 55% idêntica à SEQ ID NO:4.

[0061] Em outra modalidade, a $\Delta 6$ desaturase compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra a SEQ ID NO: 8, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 67% idêntica à SEQ ID NO: 8.

[0062] Em uma modalidade, a $\Delta 5$ desaturase compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra a SEQ ID NO:26, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% idêntica à SEQ ID NO:26. Em ainda outra modalidade, a $\Delta 5$ elongase compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra a SEQ ID NO:6, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 47% idêntica à SEQ ID NO: 6.

[0063] Em uma modalidade, o diacilglicerol-aciltransferase compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra a SEQ ID NO:75 ou SEQ ID NO: 108, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% idêntica à SEQ ID NO:75 e/ou SEQ ID NO: 108.

[0064] Combinações de quaisquer entre dois, três, quatro ou todas as enzimas acima são abrangidas claramente pela invenção.

[0065] Em ainda outra modalidade, a célula, com preferência a célula vegetal e com mais preferência uma célula de semente de planta, da invenção compreende adicionalmente polinucleotídeos exógenos encodificando:

- i) um $\Delta 17$ desaturase,
- ii) um $\Delta 15$ desaturase, e/ou
- iii) um $\Delta 12$ desaturase

em que cada polinucleotídeo é ligado operavelmente a um ou mais promotores que conseguem direcionar a expressão dos ditos polinucleotídeos na célula.

[0066] Em outra modalidade, um ou mais de todas as desaturasas expressas dos polinucleotídeos exógenos na célula da invenção tem atividade em substrato acila-CoA maior do que no substrato correspondente acila-PC. Em uma modalidade particular, o $\Delta 6$ desaturase e o $\Delta 5$ desaturase, o $\Delta 5$ desaturase e o $\Delta 4$ desaturase, $\Delta 6$ desaturase e o $\Delta 4$ desaturase, ou todos os três $\Delta 6$ desaturase, $\Delta 5$ desaturase e $\Delta 4$ desaturasas, ou adicionalmente a cada uma dessas combinações qualquer entre $\Delta 17$ desaturase, $\Delta 15$ desaturase e/ou $\Delta 12$ desaturasas tem atividade em seus substratos acila-CoA maior do que os substratos correspondentes acila-PCs. Nesta modalidade, as outras desaturasas expressas a partir dos polinucleotídeos exógenos na célula podem ou não ter atividade em um substrato acila CoA maior do que o substrato correspondente acila-PC. Conforme se pode verificar, o substrato acila-CoA preferencial para cada enzima é diferente.

[0067] A presente invenção apresenta, adicionalmente, uma célula recombinante, com preferência uma célula vegetal e com mais preferência uma célula de semente de planta, compreendendo um polinucleotídeo exógeno encodificando um ácido graxo elongase com atividade $\Delta 6$ elongase e $\Delta 9$ elongase, em que a elongase tem atividade $\Delta 6$ elongase maior do que atividade $\Delta 9$ elongase.

[0068] Em uma modalidade, a elongase tem uma eficiência de conversão em SDA para produzir ETA que é pelo menos 50% ou pelo menos 60%, e/ou uma eficiência de

conversão em ALA para produzir ETrA que é pelo menos 6% ou pelo menos 9%. Com preferência, a elongase tem pelo menos cerca de 6,5 vezes mais de atividade $\Delta 6$ elongase do que a atividade $\Delta 9$ elongase.

[0069] Em ainda outra modalidade, a elongase não tem uma atividade $\Delta 5$ elongase detectável alguma.

[0070] A elongase com preferência compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra a SEQ ID NO:4, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 55% idêntica à SEQ ID NO:4.

[0071] Em ainda outra modalidade, a célula compreende adicionalmente polinucleotídeos exógenos encodificando:

- i) um $\Delta 8$ desaturase e/ou desaturase,
- ii) um $\Delta 5$ desaturase,
- iii) um $\Delta 5$ elongase, e
- iv) opcionalmente um $\Delta 4$ desaturase e/ou um $\omega 3$ desaturase, em que cada polinucleotídeo é ligado operavelmente a um ou mais promotores que conseguem direcionar a expressão dos ditos polinucleotídeos na célula.

[0072] A presente invenção apresenta, adicionalmente, a célula recombinante, com preferência a célula vegetal e com mais preferência uma célula de semente de planta, compreendendo um polinucleotídeo exógeno encodificando um ácido graxo desaturase com atividade de $\Delta 5$ desaturase, em que a desaturase compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra a SEQ ID NO: 13, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência

de aminoácido que é pelo menos 53% idêntica à SEQ ID NO: 13.

[0073] A presente invenção apresenta, adicionalmente, uma célula recombinante, com preferência uma célula vegetal e com mais preferência uma célula de semente de planta, compreendendo um polinucleotídeo exógeno encodificando um ácido graxo elongase com atividade de $\Delta 9$ elongase, em que a elongase compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra qualquer um da SEQ ID NOs: 28, 94 e 96, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, uma sequência de aminoácido que é pelo menos 81% idêntica à SEQ ID NO: 28, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 50% idêntica à SEQ ID NO: 94 e/ou SEQ ID NO: 96.

[0074] Em uma modalidade, a $\Delta 9$ elongase compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra a SEQ ID NO: 94 ou SEQ ID NO: 96, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 50% idêntica à SEQ ID NO: 94 e/ou SEQ ID NO: 96, e em que a elongase tem maior atividade em um substrato $\omega 6$ do que no substrato $\omega 3$. Com mais preferência, a $\Delta 9$ elongase tem pelo 2 vezes mais, com mais preferência pelo menos uma atividade 4 vezes mais em um $\omega 6$ substrato (por exemplo LA) do que o substrato correspondente $\omega 3$ (por exemplo ALA).

[0075] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma célula recombinante compreendendo um polinucleotídeo exógeno encodificando um diacilglicerol-aciltransferase, em que o diacilglicerol-aciltransferase compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra a SEQ ID NO: 108, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos

54% idêntica à SEQ ID NO: 108.

[0076] Em uma modalidade da célula de acordo com a invenção, desaturase e/ou elongase, ou desaturases múltiplas e/ou elongases, pode ser purificada a partir da microalga. As microalgas preferenciais são *Pavlova spp*, *Pyramimonas spp* e *Micromonas spp*.

[0077] Em uma modalidade preferencial, a célula de acordo com a invenção é uma célula eucariótica. Por exemplo, a célula pode ser uma célula vegetal, uma célula de mamíferos, uma célula de inseto, uma célula de fungos ou uma célula de levedura. A célula pode estar uma célula em cultura de tecido, *in vitro* e/ou isolada.

[0078] Em uma modalidade, a célula está em uma planta e/ou é uma célula de semente de planta madura. A planta pode estar no campo ou colhida como uma parte de uma planta, ou uma semente pode ser uma semente colhida.

[0079] Em uma modalidade particular, a planta ou a semente da planta é uma planta de óleo de semente ou uma semente oleosa respectivamente.

[0080] Conforme verificarão os versados na técnica, um dentre um ou mais das elongases definidas e/ou desaturases pode ser coexpressada na mesma célula.

[0081] Em uma outra modalidade, a célula da invenção é capaz de sintetizar uma longa cadeia de ácidos graxos poliinsaturados (LC-PUFA), em que uma célula é derivada de uma célula que não é capaz de sintetizar os ditos LC-PUFA.

[0082] Os presentes inventores concluíram também que a coexpressão de um supressor silenciador pode intensificar os níveis de biossíntese de enzimas em ácido

graxo nas células de plantas, particularmente sobre gerações repetidas da planta inicialmente transformadas. Portanto, em uma modalidade preferencial, uma célula da invenção, com preferência a célula vegetal e com mais preferência uma célula de órgão de armazenagem de planta ou célula de semente, compreende um exógeno polinucleotídeo encodificando um supressor silenciador.

[0083] Com preferência, o exógeno polinucleotídeo encodificando o supressor silenciador é ligado operavelmente a um promotor específico de órgão de armazenagem de planta. Em uma modalidade, o promotor específico de órgão de armazenagem de planta é um promotor de semente específico, um promotor específico de cotiledon ou um promotor específico de endosperma que é preferencialmente expresso na semente em desenvolvimento.

[0084] A presente invenção apresenta, adicionalmente, um método de obtenção de uma célula, com preferência uma célula vegetal e com mais preferência uma célula de semente de planta, capaz de sintetizar uma ou mais cadeias de ácidos graxos poliinsaturados (LC-PUFAs), o método compreendendo:

a) a introdução da célula, com preferência uma célula que não é capaz de sintetizar ditos LC-PUFA, um polinucleotídeo exógeno encodificando uma atividade de desaturase de ácido graxo ω 3, em que o polinucleotídeo é ligado operavelmente a um promotor que é capaz de direcionar a expressão dos ditos polinucleotídeo na célula,

b) a expressão dos polinucleotídeos exógenos na célula,

c) a análise da composição de ácido graxo de uma

célula, e d) a seleção de uma célula capaz de dessaturar menos uma de ARA em EPA, DGLA a ETA, GLA a SDA, tanto ARA quanto EPA e DGLA a ETA, tanto ARA quanto em EPA e GLA a SDA, ou todos os três destas.

[0085] Em uma modalidade, a célula selecionada é uma célula de acordo com a invenção. Em particular, a célula pode compreender adicionalmente uma combinação de desaturases e elongases conforme descrito na presente invenção.

[0086] A presente invenção apresenta, adicionalmente, um método de obtenção de uma célula, com preferência uma célula vegetal e com mais preferência uma célula de semente de planta, capaz de sintetizar uma ou mais cadeias longas em ácidos graxos poliinsaturados (LC-PUFAs), o método compreendendo:

a) a introdução em uma célula, com preferência a célula que é não é capaz de sintetizar os ditos LC-PUFA, um polinucleotídeo exógeno encodificando um ácido graxo elongase em que o polinucleotídeo é ligado operavelmente a um promotor que é capaz de direcionar a expressão dos ditos polinucleotídeo na célula,

b) a expressão do polinucleotídeo exógeno na célula,

c) a análise da composição de ácido graxo de uma célula, e

d) a seleção de uma célula em que a elongase tem uma atividade em EPA para produzir DPA com uma eficiência de pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70% ou pelo menos 75%.

[0087] Em uma modalidade do método da invenção, a célula selecionada é uma célula de acordo com a invenção.

Em particular, a célula pode compreender uma combinação de desaturases e elongases conforme descritos na presente invenção.

[0088] A presente invenção apresenta, adicionalmente, um método de obtenção de uma célula, com preferência a célula vegetal e com mais preferência uma célula de semente de planta, capaz de sintetizar uma ou mais cadeias longas de ácidos graxos poliinsaturados (LC-PUFAs), o método compreendendo:

a) introdução em uma célula, com preferência a célula que não é capaz de sintetizar os ditos LC-PUFA, um polinucleotídeo exógeno encodificando um ácido graxo desaturase, em que o polinucleotídeo é ligado operavelmente a um promotor que é capaz de direcionar uma expressão dos ditos polinucleotídeos na célula,

b) expressão do polinucleotídeo exógeno na célula,

c) análise da composição do ácido graxo de uma célula,
e

d) seleção de uma célula que tem pelo menos duas, com preferência todas as três, das seguintes:

i) maior atividade de desaturase em ALA do que em LA como substrato de ácido graxo, com preferência em uma célula vegetal,

ii) maior atividade de desaturase em ALA-CoA como substrato de ácido graxo do que em ALA é unida a uma posição Sn-2 de PC como substrato de ácido graxo, com preferência em uma célula vegetal, e

iii) atividade de desaturase em ALA e $\Delta 8$ desaturase em ETrA, com preferência em uma célula vegetal.

[0089] A presente invenção apresenta,

adicionalmente, um método de obtenção de uma célula, com preferência a célula vegetal e com mais preferência uma célula de semente de planta, capaz de sintetizar um ou mais cadeias de ácidos graxos poliinsaturados (LC-PUFAs), em que o método compreende:

a) a introdução em uma célula, com preferência a célula que não é capaz de sintetizar os ditos LC-PUFA, um polinucleotídeo exógeno encodificando um ácido graxo desaturase, em que o polinucleotídeo é ligado operavelmente a um promotor que é capaz de direcionar a expressão dos ditos polinucleotídeo na célula,

b) a expressão do polinucleotídeo exógeno na célula,

c) a análise da composição de ácido graxo de uma célula, e

d) a seleção de uma célula com atividade de desaturase que tem maior atividade em um substrato ω 3 do que o substrato ω 6 correspondente, e com atividade em ALA para produzir SDA com uma eficiência de pelo menos 5%, pelo menos 7,5%, ou pelo menos 10%, ou pelo menos 35% quando expressa em uma célula de levedura.

[0090] Em uma modalidade, a célula selecionada é a célula de acordo com a invenção. Em particular, a célula pode compreender adicionalmente uma combinação de desaturases e elongases conforme descritas na presente invenção.

[0091] A presente invenção apresenta, adicionalmente, um método de obtenção de uma célula, com preferência a célula vegetal e com mais preferência uma célula de semente de planta, capaz de sintetizar uma ou mais cadeias longas de ácidos graxos poliinsaturados (LC-

PUFAs), em que o método compreende:

a) a introdução em uma célula, com preferência uma célula que não é capaz de sintetizar os ditos LC-PUFA, polinucleotídeos exógenos encodificando;

i) um $\Delta 9$ elongase,

ii) um $\Delta 8$ desaturase,

iii) um $\Delta 5$ desaturase,

iv) opcionalmente um elongase, e

v) se o elongase estiver presente, opcionalmente um $\Delta 4$ desaturase, em que cada polinucleotídeo é ligado operavelmente a um ou mais promotores que conseguem direcionar a expressão dos ditos polinucleotídeos na célula,

b) a expressão de polinucleotídeos exógenos na célula;

c) a análise de composição de ácido graxo de uma célula, e

d) a seleção de uma célula em que pelo menos 15%, pelo menos 20% ou pelo menos 25% do total de ácidos graxos compreende pelo menos 20 carbonos e pelo menos 3 ligações duplas carbono-carbono em suas cadeias.

[0092] Em uma modalidade, a célula selecionada é a célula de acordo com a invenção.

[0093] A presente invenção apresenta, adicionalmente, a método de obtenção de uma célula, com preferência a célula vegetal e com mais preferência uma célula de semente de planta, capaz de sintetizar uma ou mais cadeias longas de ácidos graxos poliinsaturados (LC-PUFAs), em que o método compreende:

a) a introdução em uma célula, com preferência a célula que não é capaz de sintetizar os ditos LC-PUFA,

polinucleotídeos exógenos encodificando;

i) um $\Delta 6$ elongase e/ou um $\Delta 9$ elongase,

ii) uma desaturase e/ou um $\Delta 8$ desaturase,

iii) um $\Delta 5$ desaturase,

iv) um $\Delta 5$ elongase,

v) um $\Delta 4$ desaturase, e

vi) opcionalmente um diacilglicerol-aciltransferase,

em que cada polinucleotídeo é ligado operavelmente a um ou mais promotores que conseguem direcionar a expressão dos ditos polinucleotídeos na célula,

b) expressando os polinucleotídeos exógenos na célula;

c) analisando a composição de ácido graxo de uma célula, e d) selecionando uma célula caracterizada por um ou mais de todas as propriedades a seguir:

1) a eficiência de conversão de ALA em EPA, DPA ou DHA é pelo menos 17,3%, ou pelo menos 23%;

2) a eficiência de conversão de ALA a DPA ou DHA é pelo menos 15,4%, ou pelo menos 21%;

3) a eficiência de conversão de ALA a DHA é pelo menos 9,5%, ou pelo menos 10,8%; e

4) a eficiência de conversão de EPA a DHA é pelo menos 45%, ou pelo menos 50%; e com preferência caracterizado, adicionalmente, pelo fato de que pelo menos 4% do total de ácido graxo na célula é DHA.

[0094] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece um método de obtenção de uma célula, com preferência a célula vegetal e com mais preferência uma célula de semente de planta, capaz de sintetizar uma ou mais cadeias longas de ácidos graxos poliinsaturados (LC-PUFAs), o método compreendendo:

a) a introdução em uma célula, com preferência a célula que é não é capaz de sintetizar os ditos LC-PUFA, polinucleotídeos exógenos encodificando;

i) um $\Delta 6$ elongase e/ou um $\Delta 9$ elongase,

ii) um desaturase e/ou um $\Delta 8$ desaturase,

iii) um $\Delta 5$ desaturase,

iv) uma $\Delta 6$ elongase, e

v) opcionalmente um diacilglicerol-aciltransferase em que cada polinucleotídeo é ligado operavelmente a um ou mais promotores que conseguem direcionar a expressão dos ditos polinucleotídeos na célula,

b) expressando os polinucleotídeos exógenos na célula;

c) analisando a composição do ácido graxo de uma célula, e

d) selecionando uma célula caracterizada por uma ou mais de todas as propriedades seguintes

a) a eficiência de conversão de ALA em EPA ou DPA é pelo menos 17,3%, ou pelo menos 23%, e

b) a eficiência de conversão de ALA a DPA é pelo menos 15,4%, ou pelo menos 21%, e com preferência caracterizado, adicionalmente, pelo fato de que pelo menos 4% do total de ácido graxo na célula é DPA.

[0095] Em uma modalidade do método de acordo com a invenção, os polinucleotídeos exógenos tornam-se estavelmente integrados em um genoma de uma célula.

[0096] Em outra modalidade, o método adicionalmente compreende a etapa de regeneração de uma planta transformada a partir de uma célula da etapa a).

[0097] Em uma outra modalidade, o(s) polinucleotídeo exógeno(s) são expressos brevemente na

célula.

[0098] Em uma modalidade, a célula é uma célula folha em uma planta.

[0099] A presente invenção apresenta, adicionalmente, um processo para seleção de uma molécula de ácido nucléico envolvida na dessaturação do ácido graxo compreendendo:

i) a obtenção de uma molécula de ácido nucléico ligada operavelmente a um promotor, a molécula de ácido nucléico encodificando um polipeptídeo que pode ser um ácido graxo desaturase;

ii) introdução da molécula de ácido nucléico em uma célula em que o promotor é ativo;

iii) expressar a molécula de ácido nucléico na célula;

iv) analisar a composição de ácido graxo de uma célula; e

v) selecionar a molécula de ácido nucléico envolvida na dessaturação do ácido graxo com base em que o polipeptídeo tem atividade de ω 3 desaturase é capaz de dessaturar pelo menos uma de ARA em EPA, DGLA a ETA, GLA a SDA, tanto ARA quanto EPA e DGLA a ETA, tanto ARA quanto EPA e GLA a SDA, ou todas as três destas.

[00100] Em uma modalidade do processo, a sequência de aminoácidos do polipeptídeo é pelo menos 35% idêntica à SEQ ID NO: 15, pelo menos 60% idêntica à SEQ ID NO: 17 e/ou pelo menos 60% idêntica à SEQ ID NO:20.

[00101] A presente invenção apresenta, adicionalmente, um processo para selecionar uma molécula de ácido nucléico envolvida no elongase de ácido graxo compreendendo:

i) obtenção de uma molécula de ácido nucléico ligado operavelmente a um promotor, a molécula de ácido nucléico encodificando um polipeptídeo que pode ser um ácido graxo alongase,

ii) introdução da molécula de ácido nucléico em uma célula em que o promotor é ativo,

iii) expressão da molécula de ácido nucléico na célula;

iv) análise da composição de ácido graxo de uma célula; e

v) seleção da molécula de ácido nucléico envolvida no alongase de ácido graxo com base em que o polipeptídeo tem atividade de alongase e uma eficiência de conversão em EPA para produzir DPA que é pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70% ou pelo menos 75%.

[00102] Em uma modalidade, a sequência de aminoácido do polipeptídeo é pelo menos 47% idêntica à SEQ ID NO:6.

[00103] A presente invenção apresenta, adicionalmente, um processo para selecionar uma molécula de ácido nucléico envolvida em dessaturação de ácido graxo compreendendo:

i) obtenção de uma molécula de ácido nucléico ligado operavelmente a um promotor, a molécula de ácido nucléico encodificando um polipeptídeo que pode ser um ácido graxo desaturase,

ii) introdução da molécula de ácido nucléico em uma célula na qual o promotor é ativo,

iii) expressão da molécula de ácido nucléico na célula;

iv) análise da composição de ácido graxo de uma

célula; e

v) seleção de uma molécula de ácido nucléico envolvida na dessaturação de ácido graxo na com base em que o polipeptídeo uma atividade desaturase e pelo menos duas, com preferência todas as três, das seguintes:

a) maior atividade de desaturase em ALA do que LA como substrato de ácido graxo, com preferência in a célula vegetal,

b) maior atividade de desaturase em ALA-CoA como substrato de ácido graxo do que em ALA unidos à posição Sn-2 de PC como substrato de ácido graxo, com preferência em uma célula vegetal, e

c) $\Delta 8$ atividade de desaturase em ALA, com preferência em uma célula vegetal. Em uma modalidade do processo, a sequência de aminoácidos de polipeptídeo é pelo menos 77% idêntica à SEQ ID NO: 10 e/ou é pelo menos 67% idêntica à SEQ ID NO:8.

[00104] A presente invenção apresenta, adicionalmente, um processo para seleção de uma molécula de ácido nucléico envolvida em dessaturação de ácido graxo, compreendendo:

i) obtenção de uma molécula de ácido nucléico ligado operavelmente a um promotor, a molécula de ácido nucléico encodificando um polipeptídeo que pode ser um ácido graxo de desaturase,

ii) introdução da molécula de ácido nucléico em uma célula na qual o promotor é ativo,

iii) expressão da molécula de ácido nucléico na célula;

iv) análise da composição de ácido graxo de uma

célula; e

v) seleção de uma molécula de ácido nucléico envolvida na dessaturação de ácido graxo com base em que o polipeptídeo tem ambas desaturase e atividades de $\Delta 8$ desaturase.

[00105] Em uma modalidade, a sequência de aminoácido do polipeptídeo é pelo menos 67% idêntica à SEQ ID NO:8.

[00106] Em uma outra modalidade, etapa (v) do processo da invenção compreende selecionar a molécula de ácido nucléico encodificando desaturase ativa no substrato de acila-CoAs ou uma desaturase front-end.

[00107] A presente invenção apresenta, adicionalmente, uma combinação de polinucleotídeos exógenos conforme definido na presente invenção quando usado para produzir uma célula recombinante, expressar uma combinação de pelo menos dois ácidos graxos desaturases e dois ácidos graxos elongases em uma célula recombinante, e/ou para produzir LC-PUFA em uma célula recombinante.

[00108] A presente invenção apresenta, adicionalmente, um ácido graxo elongase substancialmente purificado e/ou recombinante, em que o elongase tem atividade em EPA para produzir DPA com uma eficiência de pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70% ou pelo menos 75% quando expressa a partir de um polinucleotídeo exógeno em uma célula.

[00109] Em uma modalidade, um elongase é caracterizado por uma qualquer uma ou mais das propriedades conforme definidas na presente invenção.

[00110] A presente invenção apresenta, adicionalmente, um ácido graxo $\omega 3$ desaturase a

substancialmente purificado e/ou recombinante que é capaz de dessaturar pelo menos um de ARA em EPA, DGLA a ETA, GLA a SDA, tanto ARA como EPA e DGLA a ETA, tanto ARA quanto EPA e GLA a SDA, ou todos os três destes quando expressos a partir de um polinucleotídeo exógeno em uma célula.

[00111] Em uma modalidade, a ω 3 desaturase da invenção é caracterizada por qualquer uma ou mais das propriedades conforme definidas na presente invenção. A presente invenção apresenta, adicionalmente, um ácido graxo ω 3 desaturase a substancialmente purificado e/ou recombinante, em que desaturase é caracterizada adicionalmente por ter pelo menos duas, com preferência todas as três, das seguintes;

i) em ALA do que substrato de ácido graxo, com preferência em uma célula vegetal,

ii) maior atividade de desaturase em ALA-CoA como substrato de ácido graxo do que em ALA unido à posição Sn-2 de PC como substrato de ácido graxo, com preferência em uma célula vegetal, e

iii) Δ 8 atividade de desaturase em ETrA, com preferência em uma célula vegetal.

[00112] A presente invenção apresenta, adicionalmente, uma desaturase de ácido graxo substancialmente purificada e/ou recombinante, em que desaturase tem maior atividade em um ω 3 substrato do que o substrato ω 6, e em que desaturase tem atividade em ALA para produzir SDA com uma eficiência de pelo menos 5%, pelo menos 7,5%, ou pelo menos 10% quando o desaturase é expresso a partir de um polinucleotídeo exógeno em uma célula, ou pelo menos 35% quando expresso em uma célula de

levedura.

[00113] Em uma modalidade, a desaturase $\Delta 6$ da invenção é caracterizada por uma ou mais das propriedades conforme ora definidas.

[00114] A presente invenção apresenta, adicionalmente, um ácido graxo e/ou recombinante substancialmente purificado $\Delta 6$ elongase e $\Delta 9$ elongase, em que o elongase tem atividade $\Delta 6$ elongase maior do que a atividade $\Delta 9$ elongase.

[00115] Em uma modalidade, a $\Delta 6$ elongase e $\Delta 9$ elongase da invenção caracterizam-se por qualquer uma ou mais das propriedades como ora definidas.

[00116] A presente invenção apresenta, adicionalmente, a ácido graxo recombinante e/ou substancialmente purificado $\Delta 5$ desaturase, que compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra a SEQ ID NO: 13, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 53% idêntica à SEQ ID NO: 13.

[00117] A presente invenção apresenta, adicionalmente, a ácido graxo recombinante e/ou substancialmente purificado $\Delta 9$ elongase que compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra qualquer uma entre as SEQ ID NOs: 28, 94 e 96, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, uma sequência de aminoácido que é pelo menos 81% idêntica à SEQ ID NO:28, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 50% idêntica à SEQ ID NO: 94 e/ou SEQ ID NO:96.

[00118] Em uma modalidade, o $\Delta 9$ elongase compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra a SEQ ID

NO:94 ou SEQ ID NO:96, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 50% idêntica à SEQ ID NO: 94 e/ou SEQ ID NO:96, e em que o elongase tem atividade maior sobre um substrato ω 6 do que o substrato ω 3 correspondente.

[00119] Em outro aspecto, a presente invenção apresenta um diacilglicerol-aciltransferase recombinante e/ou substancialmente purificado que compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme mostra a SEQ ID NO: 108, um fragmento biologicamente ativo do mesmo, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 54% idêntica à SEQ ID NO: 108.

[00120] Em uma modalidade, uma desaturase ou elongase, de acordo com a invenção, pode ser purificado a partir de microalga. As microalgas preferenciais são *Pavlova* spp, *Pyramimonas* spp e *Micromonas* spp.

[00121] A presente invenção apresenta, adicionalmente, um polinucleotídeo exógeno e/ou isolado compreendendo:

i) uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir de qualquer um da SEQ ID NOs:3, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 27, 29, 93, 95, 107 ou 125 em 129,

ii) uma sequência de nucleotídeos encodificando um desaturase ou um elongase de acordo com a invenção,

iii) a sequência de nucleotídeos que são pelo menos 50% idênticos a um ou mais das sequências fixadas nas SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 27, 29, 93, 95, 107 ou 125 a 129, e/ou

iv) uma sequência que se hibridiza a qualquer uma dentre as etapas i) até iii) sob condições rigorosas.

[00122] Em uma modalidade, o polinucleotídeo exógeno e/ou isolado compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 57% idêntica à SEQ ID NO: 3 e/ou SEQ ID NO: 126, e encodifica um $\Delta 6$ elongase.

[00123] Em outra modalidade, o polinucleotídeo exógeno e/ou isolado compreende a sequência de nucleotídeos que é pelo menos 50% idêntica à SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 e/ou SEQ ID NO: 19, e encodifica um $\omega 3$ desaturase.

[00124] Em outra modalidade, o polinucleotídeo exógeno e/ou isolado compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 50% idêntica à SEQ ID NO: 5 e/ou SEQ ID NO: 128 e encodifica um elongase $\Delta 5$.

[00125] Em uma modalidade, o polinucleotídeo exógeno e/ou isolado compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 75% idêntica à SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 e/ou SEQ ID NO: 125, e encodifica um desaturase $\Delta 6$.

[00126] Em ainda outra modalidade, o polinucleotídeo exógeno e/ou isolado compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 60% idêntica à SEQ ID NO: 12, e encodifica um $\Delta 5$ desaturase. Em outra modalidade, o polinucleotídeo exógeno e/ou isolado compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 50% idêntica à SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 93 e/ou SEQ ID NO: 96, e encodifica um $\Delta 9$ elongase.

[00127] Em ainda outra modalidade, o polinucleotídeo exógeno e/ou isolado compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 60% idêntica à SEQ ID NO: 107, e encodifica um diacilglicerol-aciltransferase.

[00128] Em uma modalidade particular, o

polinucleotídeo exógeno e/ou isolado é pelo menos 80%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos 95%, ou pelo menos 99% idêntica a uma das sequências apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 27, 29, 93, 95, 107 ou 125 a 129.

[00129] A presente invenção apresenta, adicionalmente, a construção de DNA para integração e/ou integrado no genoma de uma célula vegetal, em que a construção compreende um agrupamento de pelo menos três quadros de leitura abertos encodificando proteínas que modulam a síntese de ácido graxo na célula vegetal em que, com preferência, cada proteína é um ácido graxo desaturase ou um ácido graxo elongase, em que cada frase aberta de leitura que tem a mesma orientação de transcrição é separado por pelo menos 750bp, pelo menos 1.000bp ou pelo menos 1.250bp, e pelo menos dois dos quadros abertos de leitura têm orientações de transcrição diferentes, em que cada frase aberta de leitura é ligado operavelmente a um promotor que é ativo na célula vegetal e cada promotor pode ser, independentemente, iguais ou diferentes.

[00130] Com preferência, pelo menos dois dos promotores que estão na construção de DNA são diferentes.

[00131] Um ou mais, ou cada frase aberta de leitura é com preferência ligado operavelmente a uma sequência líder heteróloga 5', em que cada uma pode ser, independentemente, igual ou diferente, em que cada sequência líder heteróloga 5' intensifica a tradução eficaz relacionada com a sequência líder 5' que ocorre naturalmente para a frase aberta de leitura particular.

[00132] Na construção de DNA da invenção, a

sequência líder 5' é, com preferência, um vírus em mosaico do tabaco (TMV).

[00133] Na construção de DNA, de acordo com a invenção, as proteínas, com preferência, são elongases e/ou desaturase, com mais preferência uma combinação conforme ora descrita.

[00134] Em ainda outra modalidade, a construção de DNA de acordo com a invenção tem somente três ou quatro quadros abertos de leitura que são traduzidos em proteínas.

[00135] A presente invenção apresenta, adicionalmente, um vetor compreendendo o polinucleotídeo de acordo com a invenção e/ou construção de DNA, de acordo com a invenção.

[00136] Com preferência, o polinucleotídeo é ligado operavelmente a um promotor.

[00137] A presente invenção fornece ainda um método para produzir a dessaturase ou elongase de acordo com a invenção, o método que compreende expressar em uma célula ou sistema de expressão sem célula do polinucleotídeo da invenção, a construção de DNA da invenção e/ou o vetor da invenção.

[00138] Os presentes inventores também surpreendentemente descobriram que pelo menos três ácidos nucléicos de transferência extracromossomal independente que compreende diferentes polinucleotídeos exógenos podem ser provisoriamente transfectados em uma célula eucariótica e a atividade de cada polinucleotídeo exógeno na célula, em combinação. Logo, em outro aspecto a presente invenção fornece ainda um método de transfectar provisoriamente uma célula eucariótica com pelo menos três diferentes

polinucleotídeos exógenos, o método compreendendo:

i) obter pelo menos

a) uma primeira bactéria que compreende um ácido de transferência extracromossomal que compreende um primeiro polinucleotídeo exógeno,

b) uma segunda bactéria que compreende um ácido de transferência extracromossomal que compreende um segundo polinucleotídeo exógeno, e

c) uma terceira bactéria que compreende um ácido de transferência extracromossomal que compreende um terceiro polinucleotídeo exógeno, e

ii) colocar em contato uma célula com a bactéria da etapa i), em que cada dos ácidos de transferência extracromossomal são transferidos da bactéria para uma célula para produzir uma célula provisoriamente transfectada, em que cada um dos polinucleotídeos exógenos compreende um promotor que é ativo na célula, em que cada promotor pode independentemente ser o mesmo ou diferente, e em que pelo menos um dos polinucleotídeos exógenos codifica um supressor de silenciamento.

[00139] Etapa ii) pode ser conduzida sequencialmente ou simultaneamente com uma ou mais das bactérias. Por exemplo, uma célula pode ser colocada em contato com a primeira bactéria, então a segunda bactéria e assim por diante. Em outro exemplo, uma célula é colocada em contato com cada bactéria ao mesmo tempo, preferivelmente como uma mistura das bactérias. As concentrações das diferentes bactérias podem ser variadas uma em relação à outra ou pode ser a mesma ou similar. As bactérias podem ser reunidas em isolados, por exemplo, compreendendo vários isolados de uma

coleção de cepas.

[00140] Em uma modalidade, o método compreende ainda obter, e então colocar em contato uma célula com, uma ou mais bactérias adicionais cada uma que compreende um ácido de transferência extracromossomal que compreende diferentes polinucleotídeos exógenos. Por exemplo, em uma modalidade, o método compreende obter, e então colocar em contato uma célula com, uma quarta bactéria que compreende um ácido de transferência extracromossomal que compreende um quarto polinucleotídeo exógeno. Em uma modalidade adicional, o método compreende obter, e então colocar em contato uma célula com, uma quinta bactéria que compreende um ácido de transferência extracromossomal que compreende o quinto polinucleotídeo exógeno. Em uma modalidade adicional, o método compreende obter, e então colocar em contato uma célula com, uma sexta bactéria que compreende um ácido de transferência extracromossomal que compreende um sexto polinucleotídeo exógeno. Em uma modalidade adicional, o método compreende obter, e então colocar em contato uma célula com, uma sétima bactéria que compreende um ácido de transferência extracromossomal que compreende um sétimo polinucleotídeo exógeno. Ainda em outra modalidade adicional, o método compreende obter, e então colocar em contato uma célula com, uma oitava bactéria que compreende um ácido de transferência extracromossomal que compreende um oitavo polinucleotídeo exógeno.

[00141] De preferência, os diferentes polinucleotídeos exógenos codificam diferentes moléculas de RNA e/ou polipeptídeos.

[00142] Em uma modalidade, cada polinucleotídeo

exógeno codifica uma enzima que forma parte de uma via enzimática ou é um candidato para tal enzima.

[00143] O aspecto acima é particularmente útil para estudar polinucleotídeos e/ou polipeptídeos que formam vias biológicas grandes e/ou complexas. Por conseguinte, em uma modalidade preferida, cada polinucleotídeo exógeno codifica uma enzima, ou é um candidato para tal enzima, envolvida em síntese de ácido graxo, modificação de ácido graxo, formação de diacilglicerol, formação de triacilglicerol, ou uma combinação de dois ou mais destes.

[00144] Em uma modalidade, um ou mais da bactéria está na forma de uma protoplasta. Exemplos de bactéria útil para a invenção incluem, mas não estão limitados a, *Agrobacterium sp.*, *Rhizobium sp.*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mezorhizobium loti*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia enterocolitica*.

[00145] Exemplos de ácidos de transferência extracromossomal útil para a invenção incluem, mas não estão limitados a, são P-DNA, *Agrobacterium sp.* T-DNA, ou uma combinação destes.

[00146] De preferência, uma célula do aspecto acima é uma célula vegetal ou uma célula de mamífero. Em uma modalidade, a célula é parte de um tecido ou órgão. Em outra modalidade, a célula é uma célula vegetal, e o tecido ou órgão é uma folha, caule, raiz, meristema, calo ou óvulo.

[00147] Os presentes inventores também determinaram que quando os promotores são promotores específicos de

semente, a expressão dos polinucleotídeos exógenos em células de folha pode ser intensificada por co-expressão de um fator de transcrição específico de semente como cotilédone folhoso 2, fusca3 ou sensível um ácido abscísico3. Exemplos de proteínas de cotilédone folhoso 2 incluem, mas não estão limitados àquelas descritas em WO 01/70777. Logo, em uma modalidade preferida, a célula vegetal é uma célula de folha de planta, pelo menos um dos promotores é um promotor específico de semente e pelo menos um dos polinucleotídeos exógenos codifica uma transcrição específica de semente como cotilédone folhoso 2.

[00148] Em uma modalidade, nenhum dos polinucleotídeos exógenos é um gene viral. Em uma modalidade, um ou mais dos polinucleotídeos exógenos estão apenas presentes no ácido de transferência extracromossomal como uma cópia simples, não como um multímero ou multímero parcial de uma sequência de ácido nucléico definida. Em uma modalidade adicional, pelo menos um dos ácidos de transferência extracromossomal não compreende uma origem de replicação que é funcional na célula, preferivelmente não uma origem de replicação viral e mais preferivelmente não uma origem de replicação FBNYV. Em uma modalidade adicional, nenhum dos polinucleotídeos exógenos codifica uma replicase viral ou uma proteína do movimento viral como aquelas descritas em WO 2007/137788 e por Marillonnet et al. (2005).

[00149] Também é fornecido um método de rastreamento uma célula provisoriamente transfectada para a atividade desejada, o método que compreende desempenhar o método de transfectar provisoriamente uma célula eucariótica com pelo

menos três polinucleotídeos exógenos da invenção, e testar a célula para a atividade desejada.

[00150] Os presentes inventores também identificaram que a transformação de células, particularmente células vegetais, com mais do que seis genes diferentes é intensificada ao fornecer os genes através de diferentes ácidos de transferência extracromossomal. Logo, em outro aspecto a presente invenção fornece um método de transformar uma célula eucariótica com pelo menos seis diferentes polinucleotídeos exógenos, o método que compreende

i) obter pelo menos

a) uma primeira bactéria que compreende um primeiro ácido de transferência extracromossomal que compreende três, quatro, cinco ou seis diferentes polinucleotídeos exógenos, e

b) uma segunda bactéria que compreende um segundo ácido de transferência extracromossomal diferente do primeiro que compreende três, quatro, cinco ou seis diferentes polinucleotídeos exógenos,

ii) colocar em contato uma célula com a bactéria da etapa i), e

iii) opcionalmente selecionar uma célula estavelmente transformada com os polinucleotídeos exógenos do primeiro e segundos ácidos de transferência extracromossomal, em que cada um dos polinucleotídeos exógenos do primeiro e segundos ácidos de transferência extracromossomal são transferidos da bactéria para a célula para produzir a célula transformada, em que cada dos polinucleotídeos exógenos compreende um promotor que é ativo na célula ou

uma célula que derivável deste, e em que cada promotor pode independentemente ser o mesmo ou diferente.

[00151] As etapas i)a) e i)b) podem ser conduzidas sequencialmente ou simultaneamente com as duas bactérias. Por exemplo, a célula pode ser colocada em contato com a primeira bactéria e então com a segunda bactéria. A célula colocada em contato com a segunda bactéria pode ser uma célula progenitora ou derivada da célula colocada em contato com a primeira bactéria. Em outro exemplo, a célula é colocada em contato com as ambas as bactérias ao mesmo tempo.

[00152] Em uma modalidade, i) o primeiro ácido de transferência extracromossomal, possui apenas três a seis, apenas três a cinco, apenas três a quatro, apenas quatro a seis, apenas quatro a cinco, ou apenas cinco a seis diferentes polinucleotídeos exógenos, e ii) o segundo ácido de transferência extracromossomal, possui apenas três a seis, apenas três a cinco, apenas três a quatro, apenas quatro a seis, apenas quatro a cinco, ou apenas cinco a seis diferentes polinucleotídeos exógenos.

[00153] De preferência, cada um dos polinucleotídeos exógenos codifica polipeptídeos, e em que cada dos polipeptídeos são diferentes.

[00154] Em uma modalidade adicional,

i) o primeiro ácido de transferência extracromossomal compreende dois polinucleotídeos exógenos independentemente que codificam polipeptídeos selecionado do grupo formado por uma $\Delta 6$ dessaturase, uma $\Delta 12$ dessaturase e uma $\Delta 15$ dessaturase, e

ii) o segundo ácido de transferência extracromossomal

compreende um polinucleotídeo exógeno que codifica um polipeptídeo que é a terceira enzima do grupo.

[00155] De preferência, a célula é uma célula vegetal e o método compreende ainda a etapa de gerar uma planta transformada da célula estavelmente transformada.

[00156] Também é fornecida uma célula produzida pelo método de transfectar provisoriamente uma célula eucariótica com pelo menos três polinucleotídeos exógenos da invenção, ou o método de transformar uma célula eucariótica com pelo menos seis diferentes polinucleotídeos exógenos da invenção.

[00157] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece um método para produzir uma planta estavelmente transformada com pelo menos seis diferentes polinucleotídeos exógenos, o método que compreende

i) obter uma primeira planta estavelmente transformada que compreende uma primeira região genômica exógena que compreende três, quatro, cinco ou seis diferentes polinucleotídeos exógenos,

i) obter uma segunda planta estavelmente transformada de uma espécie sexualmente compatível com a primeira e que compreende uma segunda região genômica exógena diferente da primeira que compreende três, quatro, cinco ou seis diferentes polinucleotídeos exógenos,

iii) cruzar a primeira planta estavelmente transformada com a segunda planta estavelmente transformada, e

iv) selecionar uma planta produzida da etapa iii) ou um produto destas que compreende a primeira e segunda regiões genômicas, com isso produzindo a planta

estavelmente transformada, em que cada um dos polinucleotídeos exógenos compreende um promotor que é ativo na planta, e em que cada promotor pode independentemente ser o mesmo ou diferente.

[00158] Em uma modalidade preferida, os polinucleotídeos exógenos da primeira e/ou segunda regiões genômicas exógenas são orientados e espaçados como descrito acima para a construção de DNA da invenção.

[00159] Qualquer sequência de promotor pode estar presente múltiplas vezes, ou pode ser utilizado apenas uma vez dentro da primeira e segunda regiões genômicas exógenas, ou um ou mais promotores podem ser utilizados múltiplas vezes e um ou mais outros promotores serem utilizados apenas uma vez na primeira e segunda regiões genômicas exógenas. Cada promotor de planta pode ser, independentemente, preferencialmente ativo em um tecido ou órgão da planta, como na folha ou na semente, em relação a outros tecidos ou órgãos. Isto pode permitir expressão simultânea, ou expressão sobreposta, de todas as regiões de codificação de proteína introduzidas, na planta órgão ou tecido. Em uma modalidade alternativa, um ou mais promotores são constitutivamente expressos na planta e um ou mais de outros promotores são preferencialmente expressos no órgão ou tecido da planta.

[00160] Em uma modalidade, a etapa i) compreende produzir a primeira planta estavelmente transformada por

a) colocar em contato uma célula vegetal com uma primeira bactéria que compreende um primeiro ácido de transferência extracromossomal que compreende três, quatro, cinco ou seis diferentes polinucleotídeos exógenos,

b) gerar uma planta estavelmente transformada da célula vegetal da etapa a), e opcionalmente

c) produzir a planta descendente da planta estavelmente transformada da etapa b); e/ou etapa ii) compreende produzir a segunda planta estavelmente transformada por

d) colocar em contato uma célula vegetal com uma segunda bactéria que compreende um segundo ácido de transferência extracromossomal que compreende três, quatro, cinco ou seis diferentes polinucleotídeos exógenos,

e) gerar uma planta estavelmente transformada da célula vegetal da etapa d), e opcionalmente

f) produzir uma planta descendente da planta estavelmente transformada da etapa e).

[00161] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método para produzir uma planta estavelmente transformada com pelo menos seis diferentes polinucleotídeos exógenos, o método que compreende

i) obter uma primeira planta estavelmente transformada ou parte de planta que compreende uma primeira região genômica exógena que compreende três, quatro, cinco ou seis diferentes polinucleotídeos exógenos,

ii) colocar em contato uma célula da primeira planta estavelmente transformada ou parte de planta com uma bactéria que compreende um ácido de transferência extracromossomal que compreende três, quatro, cinco ou seis diferentes polinucleotídeos exógenos,

iii) produzir uma planta da célula, e

iv) de forma opcional, selecionar uma planta produzida da etapa iii) que compreende os pelo menos seis diferentes

polinucleotídeos exógenos.

[00162] Com relação à etapa de "colocar em contato uma célula com a bactéria da etapa i)" os aspectos acima, como o destinatário qualificado estaria ciente que isto é realizado para um tempo adequado e sob condições apropriadas para os ácidos de transferência extracromossomal a serem transferidos da bactéria para a célula.

[00163] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece uma célula eucariótica que compreende pelo menos

a) um primeiro ácido de transferência extracromossomal que compreende um primeiro polinucleotídeo exógeno,

b) um segundo ácido de transferência extracromossomal que compreende um segundo polinucleotídeo exógeno, e

c) um terceiro ácido de transferência extracromossomal que compreende um terceiro polinucleotídeo exógeno.

[00164] Em uma modalidade, a célula promove um ou mais bactéria adicional, cada uma que compreende um ácido de transferência extracromossomal que compreende diferentes polinucleotídeos exógenos.

[00165] Também é fornecida uma planta, ou produto desta, ou semente que compreende uma primeira região genômica exógena que compreende três, quatro, cinco ou seis diferentes polinucleotídeos exógenos, e uma segunda região genômica exógena que compreende três, quatro, cinco ou seis diferentes polinucleotídeos exógenos. Os polinucleotídeos exógenos da(s) região(ões) genômica(s) exógena(s) são preferivelmente orientados e espaçados como descrito acima para a construção de DNA.

[00166] A presente invenção fornece ainda um

organismo não-humano transgênico que compreende uma célula de acordo com a invenção. Em uma modalidade, cada célula do organismo é uma célula de acordo com a invenção.

[00167] De preferência, o organismo não-humano transgênico é uma planta transgênica, mais preferivelmente uma planta oleaginosa transgênica para produzir o óleo como listado abaixo. Em uma modalidade adicional, a planta transgênica compreende pelo menos um polinucleotídeo exógeno adicional que codifica um supressor de silenciamento ligado de maneira operável a um promotor específico de órgão de armazenamento de planta, em que a planta é fenotipicamente normal.

[00168] A presente invenção fornece ainda uma semente que compreende a célula de acordo com a invenção ou obtida da planta transgênica da invenção.

[00169] A presente invenção fornece ainda óleo produzido por, ou obtido de, a célula de acordo com a invenção, o organismo não-humano transgênico da invenção, ou a semente da invenção.

[00170] Em uma modalidade, o óleo é obtido por extração de óleo de uma oleaginosa.

[00171] Em uma modalidade, o óleo é óleo de canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), óleo de mostrada (*Brassica juncea*), outro óleo de Brassica, óleo de girassol (*Helianthus annuus*), óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*), óleo de soja (*Glycine max*), óleo de açafroa (*Carthamus tinctorius*), óleo de milho (*Zea mays*), óleo de tabaco (*Nicotiana tabacum*), óleo de amendoim (*Arachis hypogaea*), óleo de palma, óleo de semente de algodão (*Gossypium hirsutum*), óleo de coco (*Cocos nucifera*), óleo de abacate

(*Persea americana*), azeite de oliva (*Olea europaea*), óleo de caju (*Anacardium occidentale*), óleo de macadâmia (*Macadamia inter grifolia*), óleo de amêndoa (*Prunus amygdalus*) ou óleo de semente de Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*).

[00172] A presente invenção fornece ainda um ácido graxo produzido por, ou obtido de, a célula de acordo com a invenção, o organismo não-humano transgênico da invenção, ou a semente da invenção.

[00173] A presente invenção fornece ainda um método para produzir óleo que contém ácidos graxos insaturados, o método que compreende extrair óleo da célula de acordo com a invenção, do organismo não-humano transgênico da invenção, ou da semente da invenção.

[00174] A presente invenção fornece ainda uma composição que compreende uma célula de acordo com a invenção, a ou elongase de acordo com a invenção, um polinucleotídeo de acordo com a invenção, uma construção de DNA de acordo com a invenção, um vetor da invenção, um óleo de acordo com a invenção ou um ácido graxo da invenção.

[00175] A presente invenção fornece ainda rações animais, cosméticos ou substâncias químicas que compreende a célula de acordo com a invenção, o organismo não-humano transgênico de acordo com a invenção, a semente de acordo com a invenção, o óleo de acordo com a invenção e/ou o ácido graxo da invenção.

[00176] A presente invenção fornece ainda um método de realizar uma reação de dessaturase, o método que compreende colocar em contato um ácido graxo poliinsaturado esterificado em CoA com a dessaturase da invenção. A

presente invenção fornece ainda um anticorpo substancialmente purificado, ou fragmento destes, que liga especificamente uma dessaturase ou elongase da invenção.

[00177] A presente invenção fornece ainda um método de tratar ou prevenir uma condição que se beneficiaria de uma PUFA, o método que compreende administrar a um indivíduo uma célula de acordo com a invenção, a dessaturase ou elongase de acordo com a invenção, um polinucleotídeo de acordo com a invenção, uma construção de DNA de acordo com a invenção, um vetor da invenção, um organismo não-humano transgênico de acordo com a invenção, uma semente de acordo com a invenção, um óleo de acordo com a invenção ou um ácido graxo da invenção e/ou a ração animal da invenção.

[00178] Em uma modalidade, a condição é arritmia cardíaca, angioplastia, inflamação, asma, psoríase, osteoporose, pedras nos rins, AIDS, esclerose múltipla, artrite reumática, doença de Crohn, esquizofrenia, câncer, síndrome do alcoolismo fetal, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, fibrose cística, fenilcetonúria, depressão unipolar, agressividade e hostilidade, adrenoleucodistrofia, doença cardíaca coronariana, hipertensão, diabetes, obesidade, mal de Alzheimer, doença pulmonar obstrutiva crônica, colite ulcerativa, reestenose após angioplastia, eczema, pressão alta, agregação plaquetária, sangramento gastrointestinal, endometriose, tensão pré-menstrual, encefalomielite miálgica, fadiga crônica após infecções virais ou uma doença ocular.

[00179] A presente invenção fornece ainda uso de uma célula de acordo com a invenção, a dessaturase ou elongase

de acordo com a invenção, um polinucleotídeo de acordo com a invenção, uma construção de DNA de acordo com a invenção, um vetor da invenção, um organismo não-humano transgênico de acordo com a invenção, uma semente de acordo com a invenção, um óleo de acordo com a invenção ou um ácido graxo da invenção e/ou uma ração animal da invenção para a fabricação de um medicamento para tratar ou prevenir uma condição que se beneficiaria de uma PUFA.

[00180] Os presentes inventores surpreendentemente descobriram que supressores de silenciamento podem preferencialmente ser expressos em órgãos de armazenamento de planta para intensificar os níveis de expressão de transgene em células vegetais sem afetar significativamente o desenvolvimento da planta.

[00181] Por conseguinte, a presente invenção fornece uma célula vegetal que compreende

i) um primeiro polinucleotídeo exógeno que codifica um supressor de silenciamento, ligado de maneira operável a um promotor específico de órgão de armazenamento de planta, e

ii) um segundo polinucleotídeo exógeno que codifica uma molécula de RNA, ligada de maneira operável a um promotor que direciona transcrição de gene no órgão de armazenamento de planta.

[00182] De preferência, o promotor específico de órgão de armazenamento de planta é ou promotor específico de semente como um promotor específico de cotilédone ou um promotor específico de endosperma. Em uma modalidade, o supressor de silenciamento é uma proteína de supressão viral como, mas não limitada a, P1, P19, V2, P38, P15, Pe-Po e RPV-PO.

[00183] De forma típica, quando a proteína de supressão viral é constitutivamente expressa em uma planta, a planta é fenotipicamente anormal, mas quando o supressor de silenciamento é expresso especificamente no órgão de armazenamento, a planta é fenotipicamente normal. Exemplos de tais proteínas de supressão viral incluem, mas não estão limitados a, P1, P19 e P15.

[00184] Em uma modalidade adicional, a proteína de supressão viral reduz a acumulação de microRNA e/ou clivagem guiada de microRNA.

[00185] A molécula de RNA pode ser funcional por si só como, mas não limitado a, um polinucleotídeo antissentido, polinucleotídeo catalítico, dsRNA e/ou microRNA. De forma alternativa, a molécula de RNA pode codificar um polipeptídeo com uma função desejada como, mas não limitada a, uma enzima envolvida em síntese ou modificação de ácido graxo, uma proteína de armazenamento de semente como, por exemplo, uma glutenina ou gliadina cereal, uma enzima envolvida em síntese ou modificação de carboidrato, metabolismo secundário ou uma farmacêutica. Exemplos de proteínas farmacêuticas incluem, mas não estão limitadas a, anticorpos assim como moléculas relacionadas a anticorpo e fragmentos destas, polipeptídeos antigênicos que podem, por exemplo, fornecer proteção imunológica contra câncer, um agente infeccioso, uma citocina como, por exemplo, fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos, interferon- α , albumina de soro humano, e eritropoietina.

[00186] Em uma modalidade adicional, a célula compreende pelo menos um, pelo menos dois, pelo menos três,

pelo menos quatro ou pelo menos cinco ou mais diferentes polinucleotídeos exógenos adicionais, cada um que codifica uma molécula de RNA e estando ligado de maneira operável a um promotor que direciona transcrição de gene no órgão de armazenamento. Cada polinucleotídeo exógeno pode ser ligado de maneira operável ao mesmo promotor, a promotores diferentes ou uma combinação destes.

[00187] Em uma modalidade, os polinucleotídeos exógenos são DNA.

[00188] Em uma modalidade adicional, a célula está em um órgão de armazenamento de planta como uma semente.

[00189] Em uma modalidade preferida, a molécula de RNA está presente em um nível aumentado em relação a uma célula isogênica carente do primeiro polinucleotídeo exógeno. De preferência, o nível é aumentado em pelo menos 10%, em pelo menos 20%, e mais preferivelmente em pelo menos 30%.

[00190] Em outra modalidade, pelo menos uma molécula de RNA codificada por pelo menos um dos polinucleotídeos exógenos adicionais está presente em um nível aumentado em relação a uma célula isogênica carente do primeiro polinucleotídeo exógeno.

[00191] Também é fornecida uma planta transgênica que compreende uma célula do aspecto acima. Em uma modalidade, cada célula da planta é como definida no aspecto acima. Em uma modalidade particularmente preferida, a planta é fenotipicamente normal quando comparada a uma planta carente da dita célula.

[00192] Ainda em outro aspecto é fornecido um órgão de armazenamento de planta que compreende uma célula do

aspecto acima e/ou obtido da planta transgênica definida acima.

[00193] Em uma modalidade, o órgão de armazenamento de planta é uma semente.

[00194] Em um aspecto adicional, é fornecido um método de obter uma planta fenotipicamente normal que possui níveis aumentados de uma molécula de RNA em seu órgão de armazenamento, que compreende

a) introduzir em uma célula vegetal

i) um primeiro polinucleotídeo exógeno que codifica um supressor de silenciamento ligado de maneira operável a um promotor específico de órgão de armazenamento de planta, e

ii) um segundo polinucleotídeo exógeno que codifica uma molécula de RNA ligada de maneira operável a um promotor que direciona a transcrição de gene no órgão de armazenamento de planta,

b) regenerar uma planta transformada da célula da etapa a), c) cultivar a planta transformada até que esta produza órgãos de armazenamento,

d) determinar o nível da molécula de RNA no órgão de armazenamento, e

e) selecionar uma planta que é fenotipicamente normal, e em que a molécula de RNA está presente em um nível aumentado no órgão de armazenamento em relação a órgão de armazenamento correspondente carente do primeiro polinucleotídeo exógeno.

[00195] Ainda em um aspecto adicional, é fornecido um método de obter uma planta fenotipicamente normal que possui expressão estabilizada de uma molécula de RNA em seu órgão de armazenamento, que compreende

a) introduzir em uma célula vegetal

i) um primeiro polinucleotídeo exógeno que codifica um supressor de silenciamento ligado de maneira operável a um promotor específico de órgão de armazenamento de planta, e

ii) um segundo polinucleotídeo exógeno que codifica uma molécula de RNA ligada de maneira operável a um promotor que direciona transcrição de gene no órgão de armazenamento de planta,

b) regenerar a planta transformada da célula da etapa a),

c) produzir uma planta descendente de terceira geração que compreende o órgão de armazenamento da planta da etapa b), e

d) selecionar uma planta descendente de terceira geração em que a molécula de RNA está presente no órgão de armazenamento em um nível que é pelo menos 90% do nível em um órgão de armazenamento de uma geração anterior da planta.

[00196] De preferência, os polinucleotídeos exógenos dos aspectos acima são estavelmente integrados ao genoma da célula. Ainda em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de estabilizar a expressão de uma molécula de RNA em um órgão de armazenamento da planta transgênica, que compreende

i) expressar um primeiro polinucleotídeo exógeno que codifica um supressor de silenciamento ligado de maneira operável a um promotor específico de órgão de armazenamento de planta, e

ii) expressar um segundo polinucleotídeo exógeno que codifica uma molécula de RNA ligada de maneira operável a

um promotor que direciona transcrição de gene no órgão de armazenamento de planta, em que a planta transgênica é pelo menos uma planta descendente de terceira geração obtida de uma planta parental transformada com os polinucleotídeos exógenos, e em que a molécula de RNA está presente no órgão de armazenamento da planta em um nível que é pelo menos 90% do nível em um órgão de armazenamento de uma geração anterior da planta.

[00197] Em uma modalidade, a planta é cultivada no campo.

[00198] Como ficará aparente, atributos preferidos e características de um aspecto da invenção são aplicáveis a muitos outros aspectos da invenção.

[00199] Ao longo desta especificação, a palavra "compreende", ou variações como "compreendem" ou "que compreende", serão entendidas para indicar a inclusão de um elemento mencionado, número inteiro ou etapa, ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas, mas não a exclusão de qualquer outro elemento, número inteiro ou etapa, ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas.

[00200] A invenção é a seguir descrita por meio dos seguintes Exemplos não limitantes e com referência às figuras anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS ANEXAS

[00201] Figura 1. Rotas de biossíntese de DHA aeróbico.

[00202] Figura 2. As diversas enzimas de comutação acila que transferem ácidos graxos entre pools de PC, CoA e pools de TAG. Adaptado de Singh et al. (2005).

[00203] Figura 3. Alinhamentos múltiplos entre a $\Delta 6$ -

elongase *Micromonas* CS-0170 e genes relacionados. AAV33630, C20- enzima prolongadora de ácido graxo poliinsaturado [Pavlova sp. CCMP459]; AAY15135, elongase 1 [Pavlova salina]; ABR67690, C20 elongase [Pavlova viridis]; AAV67797, elongase 1 de ácido graxo poliinsaturado [*Ostreococcus tauri*]; CAL55414, elongase 2 de ácido graxo poliinsaturado (ISS) [*Ostreococcus tauri*]; XP 001419791, proteína prevista [*Ostreococcus lucimarinus* CCE9901]; MicCS0170-d6E, Δ 6-elongase *Micromonas* CS-0170 (esta patente); AAV67800, elongase 2 de ácido graxo poliinsaturado [*Thalassiosira pseudonana*]; XP_001416454, proteína prevista [*Ostreococcus lucimarinus* CCE9901]; ABC 18313, elongase 1 de ácido graxo poliinsaturado [*Thraustochytrium* sp. FJN-IO]; AAV67799, elongase 1 de ácido graxo poliinsaturado [*Thalassiosira pseudonana*]; AAW70157, delta-6-elongase [*Phaeodactylum tricornutum*]; ABC 18314, elongase 2 de ácido graxo poliinsaturado [*Thraustochytrium* sp. FJN-IO]; CAD58540, produto de proteína anônimo [*Isochrysis galbana*].

[00204] Figura 4. Alinhamento múltiplo entre a Δ 6-elongase *Pyramimonas* CS-0140 e genes relacionados. AAL84174, enzima 1 de alongamento específico de ácido graxo poliinsaturado [*Physcomitrella patens*]; AAT85662, elongase de ácido graxo poliinsaturado [*Marchantia polymorpha*]; AAV67797, elongase 1 de ácido graxo poliinsaturado [*Ostreococcus tauri*]; ABO94747, proteína prevista [*Ostreococcus lucimarinus* CCE9901]; Pyrco-d6E, Δ 6-elongase de *Pyramimonas* CS-0140 (esta patente); ABC 18313, elongase 1 de ácido graxo poliinsaturado [*Thraustochytrium* sp. FJN-IO]; BAF97073, enzima de alongamento de ácido graxo

poliinsaturado [*Mortierella alpina*]; XP 001567488, proteína similar a enzima de alongamento de ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa [*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904]; BAE71129, elongase delta5 [*Marchantia polymorpha*]; XP_001779105; proteína prevista [*Physcomitrella patens*].

[00205] Figura 5. Alinhamento múltiplo entre a $\Delta 5$ -elongase *Pyramimonas* CS-0140 e genes relacionados. AAI52204, proteína Elovl4 [*Danio rerio*]; CAG01780, produto de proteína anônimo [*Tetraodon nigroviridis*]; AAV67800, elongase 2 de ácido graxo poliinsaturado [*Thalassiosira pseudonana*]; AAV33630, enzima C20 prolongadora de ácido graxo poliinsaturado [*Pavlova* sp. CCMP459]; ABR67690, C20 elongase [*Pavlova viridis*]; AAY15135, elongase 1 [*Pavlova salina*]; AAV67798, elongase 2 de ácido graxo poliinsaturado [*Ostreococcus tauri*]; ABO98084, proteína prevista [*Ostreococcus lucimarinus* CCE9901]; Pyrco-d5E, $\Delta 5$ -elongase *Pyramimonas* CS-0140 (esta patente).

[00206] Figura 6. Alinhamento múltiplo entre a $\Delta 6$ -dessaturase *Micromonas* CCMP 1545 e genes relacionados. AAM09687, $\Delta 5$ -dessaturase de ácido graxo [*Thraustochytrium* sp. ATCC21685]; AAV33631, $\Delta 4$ -dessaturase [*Isochrysis galbana*]; AAW70159, $\Delta 6$ -dessaturase [*Ostreococcus tauri*]; ABO99366, proteína prevista [*Ostreococcus lucimarinus* CCE9901]; Mic-d6D, $\Delta 6$ -dessaturase *Micromonas* CCMP 1545 (esta patente); ABF58685, $\Delta 5$ -dessaturase [*Perkinsus marinus*]; ABL96295, $\Delta 5$ -dessaturase [*Pavlova salina*].

[00207] Figura 7. Alinhamento múltiplo entre a $\Delta 6$ -dessaturase *Ostreococcus lucimarinus* e genes relacionados. AAM09687, $\Delta 5$ -dessaturase de ácido graxo [*Thraustochytrium*

sp. ATCC21685]; AAR27297, $\Delta 6$ -dessaturase [*Amylomyces rouxii*]; AAS93682, $\Delta 6$ -dessaturase de ácido graxo [*Rhizopus oryzae*]; AAV33631, $\Delta 4$ -dessaturase [*Isochrysis galbana*]; AAW70159, $\Delta 6$ -dessaturase [*Ostreococcus tauri*]; Ostlu-d6D, $\Delta 6$ -dessaturase *Ostreococcus lucimarinus* (esta patente); ABF58685, $\Delta 5$ -dessaturase [*Perkinsus marinus*]; ABL96295, $\Delta 5$ -dessaturase [*Pavlova salina*]; EDQ92231, proteína prevista [*Monosiga brevicollis* MX1]; CAM41728, dessaturase de ácido graxo, suposta [*Leishmania braziliensis*]; CAM65683, dessaturase de ácido graxo, suposta [*Leishmania infantum*].

[00208] Figura 8 Alinhamento múltiplo entre a $\Delta 5$ -dessaturase *Pyramimonas* CS-0140 e genes relacionados. AAM09687, $\Delta 5$ -dessaturase de ácido graxo [*Thraustochytrium* sp. ATCC21685]; Pyrco-d5D, $\Delta 5$ -dessaturase *Pyramimonas* CS-0140 (esta patente); AAT85661, $\Delta 6$ -dessaturase de ácido graxo [*Marchantia polymorpha*]; AAX14505, $\Delta 6$ -dessaturase de ácido graxo [*Thalassiosira pseudonana*]; ABP49078, $\Delta 6$ -dessaturase de ácido graxo [*Phaeodactylum tricornutum*]; AAW70159, $\Delta 6$ -dessaturase [*Ostreococcus tauri*]; XP 001421073, proteína prevista [*Ostreococcus lucimarinus* CCE9901]; ABF58685, $\Delta 5$ -dessaturase [*Perkinsus marinus*]; CAJ07076, dessaturase de ácido graxo, suposta [*Leishmania major*]; ABL96295, $\Delta 5$ -dessaturase [*Pavlova salina*]; EDQ92231, proteína prevista [*Monosiga brevicollis* MX1].

[00209] Figura 9. Alinhamento múltiplo da *Ostreococcus tauri* (Ot) (ID de SEQ N°:30), *Ostreococcus lucimarinus* (Ol) (ID de SEQ N°: 10) e *Micromonas* (M) CCMP 1545 sequências de proteína $\Delta 6$ -dessaturase (ID de SEQ N°: 8).

[00210] Figura 10. Árvore filogenética mostrando o

relacionamento entre diversas dessaturases. Pavsa-d5D = $\Delta 5$ -dessaturase *Pavlova salina* (ABL96295); Thr21685-d5D = $\Delta 5$ -dessaturase *Thraustochytrium* sp. ATCC21685 (AAM09687); Mic1545-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Micromonas* CCMP1545 (esta patente); Ostta-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Ostreococcus tauri* (AAW70159); Ostlu-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Ostreococcus lucimarinus* (esta patente); Galga-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Gallus gallus* (XP 421053); Homsa-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Homo sapiens* (AAG23121); Musmu-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Mus musculus* (NP_062673); Danre-d5/6D = $\Delta 5$ -/ $\Delta 6$ -dessaturase *Danio rerio* (AAG25710); Spaau-d6D = suposta $\Delta 6$ -dessaturase *Sparus aurata* (AAL17639); Scoma-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Scophthalmus maximus* (AAS49163); Oncmy-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Oncorhynchus mykiss* (AAK26745); Salsa-d5D = $\Delta 5$ -dessaturase *Salmo salar* (AAL82631); Prifa-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Primula farinosa* (AAP23034); Euggr-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Euglena gracilis*; Borof-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Borago officianalis* (AAC49700); Caeel-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Caenorhabditis elegans* (AAC15586); Rhior-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Rhizopus oryzae* (AAS93682); Moral-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Mortierella alpina* (AAF08685); Moris-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Mortierella isabellina* (AAL73948); Marpo-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Marchantia polymorpha* (AAT85661); Cerpu-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Ceratodon purpureus* (CAB94993); Phatr-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Phaeodactylum tricornutum* (AAL92563); Thaps-d6D = $\Delta 6$ -dessaturase *Thalassiosira pseudonana* (AAX14505); Pavsa-d8D = $\Delta 8$ -dessaturase *Pavlova salina* (ABL96296); Phatr-d5D = $\Delta 5$ -dessaturase *Phaeodactylum tricornutum* (AAL92562); Marpo-d5D = $\Delta 5$ -dessaturase *Marchantia polymorpha* (AAT85663); Moral-d5D = $\Delta 5$ -dessaturase

Mortierella alpina (AAPv28035); Dicdi-d5D = $\Delta 5$ -dessaturase *Dictyostelium discoideum* (BAA37090).

[00211] Figura 11. Resultados GC de T2 semente de *Arabidopsis* transformada com a construção linP-mic1545-d6D-linT. Os níveis de SDA e GLA são mostrados para eventos individuais 1 a 19, com a razão de eficiências de conversão $\omega 3$ a $\omega 6$ demonstrada acima de cada coluna. A $\Delta 6$ -dessaturase *M. pusilla* mostra clara preferência pelo substrato $\omega 3$.

[00212] Figura 12. As eficiências de conversão de enzimas que constituem as vias EPA infiltradas em *N. benthamiana*. As vias EPA contêm uma $\Delta 6$ -dessaturase ($\Delta 6$ -dessaturase *Echium plantagineum*, $\Delta 6$ -dessaturase *Ostreococcus tauri* ou $\Delta 6$ -dessaturase *Micromonas pusilla*), a $\Delta 6$ -elongase *Pyramimonas cordata* e a $\Delta 5$ -dessaturase *Pavlova salina*. O painel **a.** mostra as eficiências de conversão do pool de $\omega 3$ para cada via; **b.** contém comparações diretas entre a via de *E. plantagineum*, a via de *M. pusilla* e uma via que contém ambas estas dessaturases; **c.** contém comparações diretas entre a via de *O. tauri*, a via de *M. pusilla* e uma via que contém ambas as dessaturases acila-CoA.

[00213] Figura 13. Confirmação GC e GC-MS da produção de EPA em *Nicotiana benthamiana* por uma dessaturase $\omega 3$ provisoriamente expressa *Micromonas* RCC299.

[00214] Figura 14. Mapa do vetor binário pJPlO1acq que mostra os recursos do vetor binário incluindo as orientações de promotor, locais de sequência líder TMV, locais de região de espaçamento e posições de clonagem únicos para inserções de gene. NosT = terminador NOS, FPl = terminador de napina truncada, LininT = terminador Linin.

[00215] Figura 15. Mapa do vetor binário pJP107.

[00216] Figura 16. Determinação da concentração de *Agrobacterium* exigida para alcançar atividade de gene próxima à máxima na análise baseada em folha. A atividade da $\Delta 9$ -elongase (*Ig $\Delta 9$ elo*) de *Isochrysis galbana* em *N. benthamiana* após infiltração com densidades de cultura variadas de *Agrobacterium* AGL1 que contém a construção de expressão binária *Ig $\Delta 9$ elo*. A P19 coinfiltrada foi definida a uma concentração de OD_{600nm} de 0,4. O eixo y exibe a soma de ambas as atividades de *Ig $\Delta 9$ elo* para produzir EDA e ETrA.

[00217] Figura 17. Comparação de expressão transgênica de vias de LC-PUFA ao utilizar expressão provisória ou estável em folhas. As eficiências de conversão são baseadas nos perfis de ácidos graxos totais. ^aResultados extraídos de (Qi et al., 2004); ^bresultados extraídos de (Robert et al, 2005).

[00218] Figura 18. Ajuste metabólico em *Nicotiana benthamiana*. O painel **a.** é um traço de cromatografia a gás (GC) de ésteres metila de ácido graxo (FAME) produzido de óleo de atum que contém apenas uma pequena quantidade de EPA, mas uma grande quantidade de DHA. Os painéis **b.** e **c.** são traços de GC de FAME derivados da fração TAG de tecido de folha de *N. benthamiana* provisoriamente transformada com constructos binários de gene único CaMV 35S que contém a $\Delta 6$ -dessaturase de *Micromonas pusilla*, $\Delta 6$ -elongase de *Pyramimonas cordata*, $\Delta 5$ -dessaturase de *Pavlova salina*, $\Delta 5$ -elongase de *P. cordata* (**b.**) ou $\Delta 5$ -elongase de *P. salina* (**c.**) e a $\Delta 4$ -dessaturase de *P. salina*. A acumulação de EPA na amostra ao utilizar a $\Delta 5$ - elongase *P. salina* demonstra a maneira pela qual vias metabólicas podem ser ajustadas pela

seleção cuidadosa de um único gene na via.

[00219] Figura 19. Mapa da região do vetor pJP3075 que compreende transgenes.

[00220] Figura 20. Mapa da região do vetor pJP3059 que compreende transgenes.

[00221] Figura 21. Mapa da região do vetor pJP3060 que compreende transgenes.

[00222] Figura 22. Mapa da região do vetor pJP3115 que compreende transgenes.

[00223] Figura 23. Mapa da região do vetor pJP3116 que compreende transgenes.

CHAVE PARA A LISTA DE SEQUÊNCIA

[00224] ID de SEQ N°:1 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\Delta 6$ -elongase de *Micromonas* CS-0170.

[00225] ID de SEQ N°:2 - $\Delta 6$ -elongase de *Micromonas* CS-0170.

[00226] ID de SEQ N°:3 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\Delta 6$ -elongase/ $\Delta 9$ - elongase de *Pyramimonas* C S-0140.

[00227] ID de SEQ N°:4 - $\Delta 6$ -elongase/ $\Delta 9$ -elongase de *Pyramimonas* CS-0140.

[00228] ID de SEQ N°:5 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\Delta 5$ -elongase.de *Pyramimonas* CS-0140

[00229] ID de SEQ N°:6 - $\Delta 5$ -elongase de *Pyramimonas* CS-0140.

[00230] ID de SEQ N°:7 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\Delta 6$ -dessaturase/ $\Delta 8$ -dessaturase de *Micromonas* CCMP1545.

[00231] ID de SEQ N°:8 - $\Delta 6$ -dessaturase/ $\Delta 8$ -dessaturase de *Micromonas* CCMP1545.

[00232] ID de SEQ N°:9 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\Delta 6$ -dessaturase de *Ostreococcus lucimarinus*.

[00233] ID de SEQ N°:10 - $\Delta 6$ -dessaturase de *Ostreococcus lucimarinus*.

[00234] ID de SEQ N°:11 - Estrutura de leitura aberta de códon otimizado para expressão de $\Delta 6$ -dessaturase de *Ostreococcus lucimarinus* em plantas.

[00235] ID de SEQ N°:12 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\Delta 5$ -dessaturase de *Pyramimonas* CS-0140.

[00236] ID de SEQ N°:13 - $\Delta 5$ -dessaturase de *Pyramimonas* CS-0140.

[00237] ID de SEQ N°:14 - Abrir parcial de estrutura de leitura que codifica $\omega 3$ -dessaturase de *Micromonas* CS-0170.

[00238] ID de SEQ N°:15 - $\omega 3$ -dessaturase parcial de *Micromonas* CS-0170.

[00239] ID de SEQ N°:16 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\omega 3$ -dessaturase de *Micromonas* RCC299.

[00240] ID de SEQ N°:17 - $\omega 3$ -dessaturase de *Micromonas* RCC299.

[00241] ID de SEQ N°:18 - Estrutura de leitura aberta de códon otimizado para expressão de *Micromonas*.

[00242] RCC299 $\omega 3$ -dessaturase em plantas.

[00243] ID de SEQ N°:19 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\omega 3$ -dessaturase de *Micromonas* CCMP1545.

[00244] ID de SEQ N°:20 - $\omega 3$ -dessaturase de *Micromonas* CCMP1545.

[00245] ID de SEQ N°:21 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\Delta 9$ -elongase de *Isochrysis galbana*.

[00246] ID de SEQ N°:22 - $\Delta 9$ -elongase de *Isochrysis*

galbana.

[00247] ID de SEQ N°:23 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\Delta 8$ -dessaturase de *Pavlova salina*.

[00248] ID de SEQ N°:24 - $\Delta 8$ -dessaturase de *Pavlova salina*.

[00249] ID de SEQ N°:25 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\Delta 5$ -dessaturase de *Pavlova salina*.

[00250] ID de SEQ N°:26 - $\Delta 5$ -dessaturase de *Pavlova salina*.

[00251] ID de SEQ N°:27 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\Delta 9$ -elongase de *Emiliana huxleyi* CCMP1516.

[00252] ID de SEQ N°:28 - $\Delta 9$ -elongase de *Emiliana huxleyi* CCMP1516.

[00253] ID de SEQ N°:29 - Estrutura de leitura aberta de códon otimizado para expressão de $\Delta 9$ elongase de *Emiliana huxleyi* em plantas.

[00254] ID de SEQ N°:30 - $\Delta 6$ -dessaturase de *Ostreococcus tauri*.

[00255] ID de SEQ N°:31 - Domínio de consenso de elongase 1.

[00256] ID de SEQ N°:32 - Domínio de consenso de elongase 2.

[00257] ID de SEQ N°:33 - Domínio de consenso de elongase 3.

[00258] ID de SEQ N°:34 - Domínio de consenso de elongase 4.

[00259] ID de SEQ N°:35 - Domínio de consenso de elongase 5.

[00260] ID de SEQ N°:36 - Domínio de consenso de

elongase 6.

[00261] ID de SEQ N°:37 - Domínio de consenso de dessaturase 1.

[00262] ID de SEQ N°:38 - Domínio de consenso de dessaturase 2.

[00263] ID de SEQ N°:39 - Domínio de consenso de dessaturase 3.

[00264] ID de SEQ N°:40 - Domínio de consenso de dessaturase 4.

[00265] ID de SEQ N°s:41-71 e 78-92 - Iniciador de oligonucleotídeo.

[00266] ID de SEQ N°:72 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\Delta 4$ -dessaturase de *Pavlova salina*.

[00267] ID de SEQ N°:73 - $\Delta 4$ -dessaturase de *Pavlova salina*.

[00268] ID de SEQ N°:74 - Estrutura de leitura aberta que codifica diacilglicerol aciltransferase 1 de *Arabidopsis thaliana*.

[00269] ID de SEQ N°:75 - diacilglicerol aciltransferase 1 de *Arabidopsis thaliana*.

[00270] ID de SEQ N°:76 - Domínio de consenso de elongase 7.

[00271] ID de SEQ N°:77 - Domínio de consenso de elongase 8.

[00272] ID de SEQ N°:93 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\Delta 9$ -elongase de *Pavlova pinguis*.

[00273] ID de SEQ N°:94 - $\Delta 9$ -elongase de *Pavlova pinguis*.

[00274] ID de SEQ N°:95 - Estrutura de leitura aberta que codifica $\Delta 9$ -elongase de *Pavlova salina*.

[00275] ID de SEQ N°:96 - $\Delta 9$ -elongase de *Pavlova salina*.

[00276] ID de SEQ N°:97 - Supressor viral P19.

[00277] ID de SEQ N°:98 - Supressor viral V2.

[00278] ID de SEQ N°:99 - Supressor viral P38.

[00279] ID de SEQ N°:100 - Supressor viral Pe-PO.

[00280] ID de SEQ N°:101 - Supressor viral RPV-PO.

[00281] ID de SEQ N°:102 - Estrutura de leitura aberta que codifica supressor viral P19.

[00282] ID de SEQ N°:103 - Estrutura de leitura aberta que codifica supressor viral V2.

[00283] ID de SEQ N°:104 - Estrutura de leitura aberta que codifica supressor viral P38.

[00284] ID de SEQ N°:105 - Estrutura de leitura aberta que codifica supressor viral Pe-PO.

[00285] ID de SEQ N°:106 - Estrutura de leitura aberta que codifica supressor viral RPV-PO.

[00286] ID de SEQ N°:107 - Estrutura de leitura aberta de códon otimizado que codifica diacilglicerol aciltransferase 2 de *Micromonas* CCMP 1545.

[00287] ID de SEQ N°:108 - Diacilglicerol aciltransferase 2 de *Micromonas* CCMP1545.

[00288] ID de SEQ N°s:109 a 124 - Transferir sequências limítrofes de ácido nucléico.

[00289] ID de SEQ N°:125 - Estrutura de leitura aberta de códon otimizado para expressão de $\Delta 6$ -dessaturase/ $\Delta 8$ -dessaturase de *Micromonas* CCMP 1545 em plantas.

[00290] ID de SEQ N°:126 - Estrutura de leitura aberta de códon otimizado para expressão de $\Delta 6$ -elongase/ $\Delta 9$ -

elongase de *Pyramimonas* C S-0140 em plantas (truncada em extremidade 3' e que codifica elongase funcional).

[00291] ID de SEQ N°:127 - Estrutura de leitura aberta de códon otimizado para expressão de $\Delta 5$ -dessaturase de *Pavlova salina* em plantas.

[00292] ID de SEQ N°:128 - Estrutura de leitura aberta de códon otimizado para expressão de $\Delta 5$ -elongase de *Pyramimonas* C S-0140 em plantas.

[00293] ID de SEQ N°:129 - Estrutura de leitura aberta de códon otimizado para expressão de $\Delta 4$ dessaturase de *Pavlova salina* em plantas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições e Técnicas Gerais

[00294] Exceto se definido especificamente em contrário, todos os termos técnicos e científicos utilizados neste documento devem tomar o mesmo significado como comumente entendido pela pessoa de habilidade comum na técnica (por exemplo, em cultura de célula, genética molecular, síntese de ácido graxo, plantas transgênicas, química de proteína, e bioquímica).

[00295] Exceto se indicado em contrário, a proteína recombinante, cultura de célula, e técnicas imunológicas utilizadas na presente invenção são procedimentos típicos, bem conhecidos para aqueles versados na técnica. Tais técnicas são descritas e explicadas por toda a literatura em fontes como, J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volumes 1 e 2, IRL

Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editores), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 e 1996), F.M. Ausubel et al. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates e Wiley-Interscience (1988, incluindo todas as atualizações até agora), Ed Harlow e David Lane (editores), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), e J.E. Coligan et al. (editores), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluindo todas as atualizações até agora).

Definições Seleccionadas

[00296] Como utilizado neste documento, o termo "ácido graxo" se refere a um ácido carboxílico (ou ácido orgânico), frequentemente com uma longa cauda alifática, saturada ou insaturada. De forma típica, ácidos graxos possuem uma cadeia ligada de carbono-carbono de pelo menos 8 átomos de carbono de extensão, mais preferivelmente pelo menos 12 carbonos de extensão. De ocorrência mais natural, os ácidos graxos possuem um número par de átomos de carbono porque suas biossínteses envolvem acetato que possui dois átomos de carbono. Os ácidos graxos podem estar em um estado livre (não-esterificados) ou em uma forma esterificada como parte de uma ligação triglicerídeo, diacilglicerídeo, monoacilglicerídeo, acila-CoA (tio-éster) ou outra forma de ligação. O ácido graxo pode ser esterificado como um fosfolípídeo tal qual uma fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol ou formas de difosfatidilglicerol.

[00297] "Ácidos graxos saturados" não contêm

quaisquer ligações duplas ou outros grupos funcionais ao longo da cadeia. O termo "saturado" se refere a hidrogênio, em que todos os carbonos (fora do grupo ácido carboxílico [-COOH]) contêm tantos hidrogênios quanto possível. Em outras palavras, a extremidade omega (ω) contém 3 hidrogênios (CH₃-) e cada carbono dentro da cadeia contém 2 hidrogênios (-CH₂-).

[00298] "Ácidos graxos insaturados" possuem forma similar aos ácidos graxos saturados, exceto que um ou mais grupos funcionais alceno existem ao longo da cadeia, com cada alceno substituindo uma parte "-CH₂-CH₂-" de ligação simples da cadeia com uma porção "-CH=CH-" de ligação dupla (isto é, um carbono em ligação dupla com outro carbono). Os próximos dois átomos de carbono na cadeia que são ligados a um dos lados da ligação dupla pode ocorrer em uma configuração cis ou trans.

[00299] Como utilizado neste documento, o termo "ácido graxo monoinsaturado" se refere a um ácido graxo que compreende pelo menos 12 átomos de carbono em sua cadeia de carbono e apenas um grupo alceno (ligação dupla carbono-carbono) na cadeia. Como utilizado neste documento, os termos "ácido graxo poliinsaturado" ou "PUFA" se referem a um ácido graxo que compreende pelo menos 12 átomos de carbono em sua cadeia de carbono e pelo menos dois grupos alceno (ligações duplas carbono-carbono).

[00300] Como utilizado neste documento, os termos "ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa" e "LC- PUFA" se referem a um ácido graxo que compreende pelo menos 20 átomos de carbono em sua cadeia de carbono e pelo menos duas ligações duplas carbono-carbono, e logo incluem VLC-

PUFAs. Como utilizado neste documento, os termos "ácido graxo poliinsaturado de cadeia muito longa" e "VLC-PUFA" se referem a um ácido graxo que compreende pelo menos 22 átomos de carbono em sua cadeia de carbono e pelo menos três ligações duplas carbono-carbono. De forma ordinária, o número de átomos de carbono na cadeia de carbono dos ácidos graxos se refere a uma cadeia de carbono não-ramificada. Se a cadeia de carbono é ramificada, o número de átomos de carbono exclui aqueles em outros grupos. Em uma modalidade, o ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa é um ácido graxo $\omega 3$, isto é, que possui uma dessaturação (ligação dupla carbono-carbono) na terceira ligação carbono-carbono a partir da extremidade metil do ácido graxo. Em outra modalidade, o ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa é um ácido graxo $\omega 6$, isto é, que possui uma dessaturação (ligação dupla carbono-carbono) na sexta ligação carbono-carbono da extremidade metil do ácido graxo. Em uma modalidade adicional, o ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa é selecionado do grupo formado por: ácido araquidônico (ARA, 20:4 Δ 5,8,11,14; $\omega 6$), ácido eicosatetraenóico (ETA, 20:4 Δ 8,11,14,17, $\omega 3$), ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 Δ 5,8,11,14,17; $\omega 3$), ácido docosapentaenóico (DPA, 22:5 Δ 7,10,13, 16,19, $\omega 3$), ou ácido docosaheptaenóico (DHA, 22:6 Δ 4,7,10,13, 16,19, $\omega 3$). A LC-PUFA também pode ser ácido dihomo- γ -linoléico (DGLA) ou ácido eicosatrienóico (ETrA, 20:3 Δ 11,14,17, $\omega 3$). Seria prontamente aparente que a LC-PUFA que é produzida de acordo com a invenção pode ser uma mistura de qualquer ou todos acima e pode incluir outra LC-PUFA ou derivados de qualquer destas LC-PUFA. Em uma modalidade preferida, o

ácido graxo $\omega 3$ é EPA, DPA, e/ou DHA, preferivelmente, EPA e/ou DPA, ou preferivelmente DPA e/ou DHA.

[00301] Além disso, como utilizado neste documento os termos "ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa" e "ácido graxo poliinsaturado de cadeia muito longa" se referem ao ácido graxo estando em um estado livre (não-esterificado) ou em uma forma esterificada como parte de um triglicerídeo, diacilglicerídeo, monoacilglicerídeo, ligação acila-CoA ou outra forma de ligação. O ácido graxo pode ser esterificado como a fosfolipídeo tal qual um fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol ou difosfatidilglicerol. Logo, a LC-PUFA pode estar presente como uma mistura de formas no lipídeo de uma célula ou um óleo purificado ou lipídeo extraído de células, tecidos ou organismos. Em modalidades preferidas, a invenção fornece óleo que compreende pelo menos 75% ou 85% triacilgliceróis, com o remanescente presente como outras formas de lipídeo como aquelas mencionadas, com pelo menos os ditos triacilgliceróis que compreendem a LC-PUFA. O óleo pode ser ainda purificado ou tratado, por exemplo, por hidrólise com uma base forte para liberar o ácido graxo livre, ou por fracionamento, destilação ou similar.

[00302] As proteínas e genes dessaturase, elongase e acila transferease que os codificam que podem ser utilizadas na invenção são quaisquer daqueles conhecidos na técnica ou homólogos ou derivados destes. Exemplos de tais genes e tamanhos de proteína codificada são listados na Tabela 1. As enzimas dessaturase que demonstraram participar na biossíntese de LC-PUFA todas pertencem ao

grupo das chamadas dessaturases "front-end".

Tabela 1. Genes clonados envolvidos em biossíntese de LC-PUFA

Enzima	Tipo de organismo	Espécie	Números de Adesão	Tamanho de proteína	Bibliografia
$\Delta 4$ -dessaturase	Protista	<i>Euglena gracilis</i>	AY278558	541	Meyer et al., 2003
	Alga	<i>Pavlonia lutheri</i>	AY332747	445	Tonon et al., 2003
		<i>Isochrysis galbana</i>	AAV33631	433	Pereira et al., 2004b
		<i>Pavlova salina</i>	AAY15136	47	Zhou et al., 2007
	Thraustochytrid	<i>Thraustochytrium aureum</i>	AAN75707 AAN75708 AAN75709 AAN75710	515	N/D
		<i>Thraustochytrium sp.</i> ATCC21685	AAM09688	519	Qiu et al., 2001
$\Delta 5$ -dessaturase	Mamífero	<i>Homo sapiens</i>	AF199596	444	Cho et al., 1999b; Leonard et al., 2000b
	Nematódeo	<i>Caenorhabditis elegans</i>	AF1440, NM_069350	447	Michaelson et al., 1998b; Watts and Browse et

					al., 1999b
	Fungo	<i>Mortierella alpina</i>	AF067654	446	Michaelson et al., 1998 ^a ; Knutzon et al., 1998
		<i>Pythium irregulare</i>	AF419297	456	Hong et al., 2002 ^a
		<i>Dictyostelium discoideum</i>	AB022097	467	Saito et al., 2000
		<i>Saprolegnia diclina</i>		470	W002081668
	Diatomácea	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	AY082392	469	Domergue et al., 2002
	Alga	<i>Thraustochytrium sp</i>	AF489588	439	Qiu et al., 2001
		<i>Thraustochytrium aureum</i>		439	W002081668
		<i>Isochrysis galbana</i>		442	W002081668
	Musgo	<i>Marchantia polymorpha</i>	AY583465	484	Kajikawa et al., 2004
Δ6- dessaturase	Mamífero	<i>Homo sapiens</i>	NM_013402	444	Cho et al., 1999a Leonard et al., 2000
		<i>Mus musculus</i>	NM_019699	444	Cho et al., 1999a
	Nematódeo	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Z70271	443	Napier et al., 1998

	Plantas	<i>Borago officinales</i>	U79010	448	Sayonava et al., 1997
		<i>Echium</i>	AY055117 AY055118		Garcia-Maroto et al., 2002
		<i>Primula vialii</i>	AY234127	453	Sayonava et al., 2003
		<i>Anemole levellei</i>	AF536525	446	Whitney et al., 2003
	Musgos	<i>Ceratodon purpureus</i>	AJ250735	520	Sperling et al., 2000
		<i>Merchantia polymorpha</i>	AY583463	481	Kajikawa et al., 2004
		<i>Physcomitrella patens</i>	CAA11033	525	Girke et al., 1998
	Fungo	<i>Mortierella alpina</i>	AF110510 AB020032	457	Huang et al., 1999; Sakuradani et al., 1999
		<i>Phytium irregulare</i>	AF419296	459	Hong et al., 2002 ^a
		<i>Mucor circinelloides</i>	AB052086	467	NCBI*
		<i>Rhizopus sp.</i>	AY320288	458	Zhang et al., 2004
		<i>Saprolegnia diclina</i>		453	WO02081668
	Diatomácea	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	AY082393	477	Domergue et al., 2002
	Bactéria	<i>Synechocystis</i>	L11421	359	Reddy et al.,

					1993
	Alga	<i>Thraustochytrium aureum</i>		456	W002081668
$\Delta 5/\Delta 6$ - dessaturase bifuncional	Peixe	<i>Danio rerio</i>	AF309556	444	Hastings et al., 2001
$\Delta 8$ - dessaturase C20	Alga	<i>Euglena gracilis</i>	AF139720	419	Wallis and Browse, 1999
	Plantas	<i>Borago officinales</i>	AAG43277	446	Sperling et al., 2001
$\Delta 6$ - dessaturase	Nematódeo	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NM_069288	288	Beaudoin et al., 2000
	Musgos	<i>Physcomitrella patens</i>	AF428243	290	Zank et al., 2002
		<i>Merchantia polymorpha</i>	AY583464	290	Kajikawa et al., 2004
	Fungo	<i>Mortierella alpina</i>	AF206662	318	Parker-Barnes et al., 2000
	Alga	<i>Pavlova lutheri</i> **		501	WO 03078639
		<i>Thraushochytrium</i>	AX951565	271	WO 03093482
		<i>Thraushochytrium sp</i> **	AX214454	271	WO 0159128
elongase PUFA	Mamífero	<i>Homo sapiens</i>	AF231981	299	Leonard et al., 2000b; Leonard et al., 2002
		<i>Rattus norvegicus</i>	AB71985	299	Inagaki et al., 2002

		<i>Rattus</i> <i>novergicus**</i>	AB71985	267	Inagaki et al., 2002
		<i>Mus musculus</i>	AF170907	279	Tvrđik et al., 2000
		<i>Mus musculus</i>	AF170908	292	Tvrđik et al., 2000
	Peixe	<i>Danio rerio</i>	AF532782	291 (282)	Agaba et al., 2004
		<i>Danio rerio**</i>	NM_199632	266	Lo et al., 2003
	Verme	<i>Caenorhabditis</i> <i>elengans</i>	Z68749	309	Abbott et al., 1998 Beaudoin et al., 2000
	Alga	<i>Thraustochytrium</i> <i>aureum**</i>	AX464802	272	WO 0208401-A2
		<i>Pavlova lutheri**</i>		320	WO 03078639
$\Delta 9$ - elongase	Alga	<i>Isochrysis</i> <i>galbana</i>	AF390174	263	Qi et al., 2002
		<i>Euglena gracilis</i>		258	WO 08/128241
$\Delta 5$ - elongase	Alga	<i>Ostreococcus</i> <i>tauri</i>	AAV67798	300	Meyer et al., 2004
		<i>Pyramimonas</i> <i>cordata</i>		268	esta patente
		<i>Pavlova</i> sp. CCMP459	AAV33630	277	Pereira et al., 2004b
		<i>Pavlova salina</i>	AAY15135	302	Robert et al., 2009
	Diatomácea	<i>Thalassiosira</i>	AAV67800	358	Meyer et al.,

		<i>pseudonana</i>			2004
	Peixe	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CAM55862	295	WO 06/008099
	Musgo	<i>Merchantia polymorpha</i>	BAE71129	348	Kajikawa et al., 2006

* [HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) **Função não provada/não demonstrada

[00303] Como utilizado neste documento, o termo "dessaturase de front-end" se refere a um membro de uma classe de enzimas que introduz a ligação dupla entre o grupo carboxila e uma parte insaturada da cadeia acila de lipídeos, que se caracterizam estruturalmente pela presença de um domínio citocromo b5 N-terminal, junto com um domínio típico de dessaturase de ácido graxo que inclui três caixas de histidina altamente conservadas (Napier et al., 1997).

[00304] A atividade de qualquer das elongases ou dessaturases para uso na invenção pode ser testada ao expressar um gene que codifica a enzima em uma célula como, por exemplo, uma célula de levedura ou uma célula vegetal, e determinar se a célula possui uma capacidade aumentada para produzir LC-PUFA comparada a uma célula comparável na qual a enzima não é expressa.

[00305] Em uma modalidade, a dessaturase e/ou elongase para uso na invenção pode ser purificada de uma microalga.

[00306] Enquanto certas enzimas são especificamente descritas neste documento como "bifuncionais", a ausência de tal termo não necessariamente implica que uma enzima em particular não possua uma atividade diferente daquela

especificamente definida.

Dessaturases

[00307] Como utilizado neste documento, o termo "dessaturase" se refere a uma enzima que é capaz de introduzir uma ligação dupla carbono-carbono no grupo acila de um substrato de ácido graxo que está tipicamente em uma forma esterificada como, por exemplo, ésteres CoA de ácido graxo. O grupo acila pode ser esterificado em um fosfolipídeo como fosfatidilcolina (PC), ou em proteína portadora de acila (ACP), ou em uma modalidade preferida em CoA. As dessaturases geralmente podem ser categorizadas conformemente em três grupos. Em uma modalidade, a dessaturase é uma dessaturase front-end.

[00308] Como utilizado neste documento, uma " $\Delta 4$ dessaturase" se refere a uma proteína que realiza uma reação de dessaturase que introduz uma ligação dupla carbono-carbono na 4ª posição a partir da extremidade de carboxila de um substrato de ácido graxo. A " $\Delta 4$ dessaturase" é pelo menos capaz de converter DPA em DHA. A etapa de dessaturação para produzir DHA de DPA é catalisada por uma $\Delta 4$ dessaturase em organismos diferentes de mamíferos, e um gene que codifica esta enzima foi isolado da espécie protista de água doce *Euglena gracilis* e da espécie marinha *Thraustochytrium* sp. (Qiu et al., 2001; Meyer et al., 2003). Em uma modalidade, a $\Delta 4$ dessaturase compreende aminoácidos que possuem uma sequência como fornecida na ID de SEQ N°: 73, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% idêntica à ID de SEQ N°:73. Como utilizado neste documento, uma " $\Delta 5$ dessaturase" se refere a uma proteína

que realiza uma reação de dessaturase que introduz uma ligação dupla carbono-carbono na 5ª posição a partir da extremidade de carboxila de um substrato de ácido graxo. Exemplos de $\Delta 5$ dessaturases são listados na Tabela 1. Em uma modalidade, a $\Delta 5$ dessaturase compreende aminoácidos que possuem uma sequência como fornecida na ID de SEQ N°:26, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% idêntica à ID de SEQ N°:26. Em outra modalidade, a $\Delta 5$ dessaturase compreende aminoácidos que possuem uma sequência como fornecido na ID de SEQ N°: 13, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 53% idêntica à ID de SEQ N°: 13.

[00309] Como utilizado neste documento, uma " $\Delta 6$ dessaturase" se refere a uma proteína que realiza uma reação de dessaturase que introduz uma ligação dupla carbono-carbono na 6ª posição a partir da extremidade de carboxila de um substrato de ácido graxo. Exemplos de $\Delta 6$ dessaturases são listados na Tabela 1.

[00310] Em uma modalidade, uma $\Delta 6$ dessaturase se caracteriza ainda por possuir pelo menos dois, preferivelmente todos os três, e preferivelmente em uma célula vegetal, dos seguintes: i) atividade superior de $\Delta 6$ dessaturase em ácido α -linolénico (ALA, 18:3 $\Delta 9,12,15$, $\omega 3$) do que em ácido linoléico (LA, 18:2 $\Delta 9,12$, $\omega 6$) como substrato de ácido graxo; ii) atividade superior de $\Delta 6$ dessaturase em ALA-CoA como substrato de ácido graxo do que em ALA unida à posição sn-2 de PC como substrato de ácido graxo; e iii) atividade de $\Delta 8$ dessaturase em ETrA.

[00311] Em outra modalidade, a $\Delta 6$ dessaturase possui

atividade superior em um substrato $\omega 3$ do que o substrato $\omega 6$ correspondente e possui atividade em ALA para produzir ácido octadecatetraenóico (ácido estearidônico, SDA, 18:4 $\Delta 6,9,12,15,\omega 3$) com uma eficiência de pelo menos 5%, mais preferivelmente pelo menos 7,5%, ou ainda mais preferivelmente pelo menos 10% quando expresso de um polinucleotídeo exógeno em uma célula recombinante, ou pelo menos 35% quando expresso em uma célula de levedura. Em uma modalidade, a $\Delta 6$ dessaturase possui atividade superior, por exemplo, pelo menos cerca de uma atividade duas vezes superior de $\Delta 6$ dessaturase, em ALA do que LA como substrato de ácido graxo. Em outra modalidade, a $\Delta 6$ dessaturase possui atividade superior, por exemplo, pelo menos atividade cerca de cinco vezes superior de $\Delta 6$ dessaturase ou pelo menos dez vezes superior, em ALA-CoA como substrato de ácido graxo do que em ALA unida à posição sn-2 de PC como substrato de ácido graxo.

[00312] Em uma modalidade, a $\Delta 6$ dessaturase possui atividade de $\Delta 5$ dessaturase não detectável em ETA. Em outra modalidade, a $\Delta 6$ dessaturase compreende aminoácidos que possuem uma sequência como fornecido na ID de SEQ N°: 10, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 77% idêntica à ID de SEQ N°: 10. Em outra modalidade, a $\Delta 6$ dessaturase compreende aminoácidos que possuem uma sequência como fornecido na ID de SEQ N°: 8, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 67% idêntica à ID de SEQ N°:8. A $\Delta 6$ dessaturase também pode possuir atividade de $\Delta 8$ dessaturase.

[00313] Como utilizado neste documento, uma " $\Delta 8$

dessaturase" se refere a uma proteína que realiza uma reação de dessaturase que introduz uma ligação dupla carbono-carbono na 8ª posição a partir da extremidade de carboxila de um substrato de ácido graxo. A $\Delta 8$ dessaturase é pelo menos capaz de converter ETrA em ETA. Exemplos de $\Delta 8$ dessaturases são listados na Tabela 1. Em uma modalidade, a $\Delta 8$ dessaturase compreende aminoácidos que possuem uma sequência como fornecido na ID de SEQ N°:24, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% idêntica à ID de SEQ N°:24.

[00314] Como utilizado neste documento, uma " $\omega 3$ dessaturase" se refere a uma proteína que realiza uma reação de dessaturase que introduz uma ligação dupla carbono-carbono na 3ª posição a partir da extremidade metil de um substrato de ácido graxo. Exemplos de $\omega 3$ dessaturases incluem aqueles descritos por Pereira et al. (2004a), Horiguchi et al. (1998), Berberich et al. (1998) e Spsychalla et al. (1997).

[00315] Em uma modalidade, a $\omega 3$ dessaturase é pelo menos capaz de converter um de ARA em EPA, dGLA em ETA, ácido γ -linolêico (GLA, 18:3 $\Delta 6,9,12$, $\omega 6$) em SDA, ARA em EPA e dGLA em ETA, ARA em EPA e GLA em SDA, ou todos os três destes.

[00316] Em uma modalidade, a $\omega 3$ dessaturase possui atividade de $\Delta 17$ dessaturase em um ácido graxo C20 que possui pelo menos três ligações duplas carbono-carbono, preferivelmente ARA. Em outra modalidade, a $\omega 3$ dessaturase possui atividade de $\Delta 15$ dessaturase em um ácido graxo C18 que possui três ligações duplas carbono-carbono, preferivelmente GLA.

[00317] Como utilizado neste documento, uma " $\Delta 15$ dessaturase" se refere a uma proteína que realiza uma reação de dessaturase que introduz uma ligação dupla carbono-carbono na 15ª posição a partir da extremidade de carboxila de um substrato de ácido graxo.

[00318] Como utilizado neste documento, uma " $\Delta 17$ dessaturase" se refere a uma proteína que realiza uma reação de dessaturase que introduz uma ligação dupla carbono-carbono na 17ª posição a partir da extremidade de carboxila de um substrato de ácido graxo.

[00319] Em outra modalidade, a $\omega 3$ dessaturase possui atividade superior em um substrato de acila-CoA, por exemplo, ARA-CoA, do que em um substrato correspondente de acila-PC. Como utilizado neste documento, um "substrato correspondente de acila-PC" se refere ao ácido graxo esterificado na posição sn-2 de fosfatidilcolina (PC) onde o ácido graxo é o mesmo ácido graxo como no substrato de acila-CoA. Em uma modalidade, a atividade é pelo menos duas vezes superior.

[00320] Em uma modalidade adicional, a $\omega 3$ dessaturase compreende aminoácidos que possuem uma sequência como fornecido na ID de SEQ N°: 15, 17 ou 20, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 35% idêntica à ID de SEQ N°: 15, pelo menos 60% idêntica à ID de SEQ N°: 17 e/ou pelo menos 60% idêntica à ID de SEQ N°:20.

[00321] Ainda em uma modalidade adicional, uma dessaturase para uso na presente invenção possui atividade superior em um substrato de acila-CoA do que em um substrato correspondente de acila-PC. Como destacado acima,

um "substrato correspondente de acila-PC" se refere ao ácido graxo esterificado na posição sn-2 de fosfatidilcolina (PC) onde o ácido graxo é o mesmo ácido graxo como no substrato de acila-CoA. Em uma modalidade, a atividade é pelo menos duas vezes superior. Em uma modalidade, a dessaturase é uma $\Delta 5$ ou $\Delta 6$ dessaturase, exemplos das quais são fornecidas, mas não limitadas a, aquelas listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Dessaturases com atividade superior em um substrato de acila-CoA do que em um substrato correspondente de acila-PC

Enzima	Tipo de organismo	Espécie	N ^{os} de Adesão	Tamanho de proteína (aa)	Bibliografia
$\Delta 6$ -dessaturase	Alga	<i>Mantoniella squamata</i>	CAQ30479	449	Hoffmann et al. 2008
		<i>Ostreococcus tauri</i>	AAW70159	456	Domergue et al. 2005
$\Delta 5$ -dessaturase	Alga	<i>Mantoniella squamata</i>	CAQ30478	482	Hoffmann et al. 2008
	Planta	<i>Anemone leveillei</i>	N/D		Sayanova et al. 2007

Elongases

[00322] Evidência bioquímica sugere que o alongamento de ácido graxo consiste de 4 etapas: condensação, redução, desidratação e uma segunda redução. No contexto desta invenção, uma "elongase" se refere ao

polipeptídeo que catalisa a etapa de condensação na presença dos outros membros do complexo de alongamento, sob condições fisiológicas adequadas. Foi mostrado que expressão de heterólogos ou homólogos apenas em uma célula do componente de condensação ("elongase") do complexo de alongamento de proteína é exigido para o alongamento da respectiva cadeia acila. Logo, a elongase introduzida é capaz de recrutar com êxito as atividades de redução e de desidratação do hospedeiro transgênico para efetuar prolongamentos bem-sucedidos de acila. A especificidade da reação de alongamento com relação à extensão de cadeia e o grau de dessaturação de substrato de ácido graxos se imagina por residir no componente de condensação. Este componente também se imagina como sendo limitador de taxa na reação de alongamento.

[00323] Como utilizado neste documento, a " $\Delta 5$ elongase" é pelo menos capaz de converter EPA to DPA. Exemplos de $\Delta 5$ elongases incluem aqueles divulgados em WO2005/103253. Em uma modalidade, a $\Delta 5$ elongase possui atividade em EPA para produzir DPA com uma eficiência de pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 65%, mais preferivelmente pelo menos 70% ou ainda mais preferivelmente pelo menos 75%. Em uma modalidade adicional, a $\Delta 5$ elongase compreende uma sequência de aminoácido como fornecido na ID de SEQ N°:6, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 47% idêntica à ID de SEQ N°: 6.

[00324] Como utilizado neste documento, uma " $\Delta 6$ elongase" é pelo menos capaz de converter SDA em ETA. Exemplos de $\Delta 6$ elongases incluem aqueles listados na Tabela

1. Em uma modalidade, a elongase compreende aminoácidos que possuem uma sequência como fornecido na ID de SEQ N°:4, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 55% idêntica à ID de SEQ N°:4.

[00325] Como utilizado neste documento, a " $\Delta 9$ elongase" é pelo menos capaz de converter ALA em ETrA. Exemplos de $\Delta 9$ elongases incluem aqueles listados na Tabela 1. Em uma modalidade, a $\Delta 9$ elongase compreende aminoácidos que possuem uma sequência como fornecido na ID de SEQ N°:22, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% idêntica à ID de SEQ N°:22. Em outra modalidade, a $\Delta 9$ elongase compreende aminoácidos que possuem uma sequência como fornecido na ID de SEQ N°:28, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 81% idêntica à ID de SEQ N°:28. Em outra modalidade, a $\Delta 9$ elongase compreende aminoácidos que possuem uma sequência como fornecido na ID de SEQ N°:94, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 50% idêntica à ID de SEQ N°: 94. Em outra modalidade, a $\Delta 9$ elongase compreende aminoácidos que possuem uma sequência como fornecido na ID de SEQ N°:96, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 50% idêntica à ID de SEQ N°: 96. Em uma modalidade adicional, a $\Delta 9$ elongase compreende aminoácidos que possuem uma sequência como fornecido na ID de SEQ N°:94 ou ID de SEQ N°:96, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 50% idêntica à ID de SEQ N°:94 e/ou ID de SEQ N°:96, e em que a elongase possui atividade superior em um substrato $\omega 6$ do

que em substrato correspondente $\omega 3$.

[00326] Como utilizado neste documento, o termo "possui atividade superior em um substrato $\omega 6$ do que substrato correspondente $\omega 3$ " se refere à atividade relativa na enzima em substratos que se diferem pela ação de uma dessaturase $\omega 3$. De preferência, o substrato $\omega 6$ é LA e o substrato $\omega 3$ é ALA. Como utilizado neste documento, uma "elongase com atividade de $\Delta 6$ elongase e $\Delta 9$ elongase" é pelo menos capaz de (i) converter SDA em ETA e (ii) converter ALA em ETrA e possui atividade superior de $\Delta 6$ elongase do que atividade de $\Delta 9$ elongase. Em uma modalidade, a elongase possui uma eficiência de conversão em SDA para produzir ETA que é pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 60%, e/ou uma eficiência de conversão em ALA para produzir ETrA que é pelo menos 6% ou mais preferivelmente pelo menos 9%. Em outra modalidade, a elongase possui pelo menos atividade cerca de 6,5 vezes superior de $\Delta 6$ elongase do que atividade de $\Delta 9$ elongase. Em uma modalidade adicional, a elongase possui atividade de $\Delta 5$ elongase não detectável. Ainda em uma modalidade adicional, a elongase compreende aminoácidos que possuem uma sequência como fornecido na ID de SEQ N°:4, um fragmento biologicamente ativo destes, ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 55% idêntica à ID de SEQ N°:4.

Outras enzimas

[00327] Como utilizado neste documento, o termo "diacilglicerol aciltransferase" (EC 2.3.1.20; DGAT) se refere a uma proteína que transfere um grupo acila-graxo de acila-CoA para um substrato diacilglicerol para produzir um triacilglicerol. Logo, o termo "atividade de diacilglicerol

aciltransferase" se refere à transferência de acila-CoA para diacilglicerol para produzir triacilglicerol. Há três tipos conhecidos de DGAT referidos como DGAT1, DGAT2 e DGAT3, respectivamente. Os polipeptídeos DGAT1 possuem tipicamente 10 domínios transmembrana, DGAT2 possuem tipicamente 2 domínios transmembrana, enquanto DGAT3 é tipicamente solúvel. Exemplos de polipeptídeos DGAT1 incluem polipeptídeos codificados por genes DGAT1 de *Aspergillus fumigatus* (Número de Adesão XP_755172), *Arabidopsis thaliana* (CAB44774), *Ricinus communis* (AAR11479), *Vernicia fordii* (ABC94472), *Vernonia galamensis* (ABV21945, ABV21946), *Euonymus alatus* (AAV31083), *Caenorhabditis elegans* (AAF82410), *Rattus norvegicus* (NP_445889), *Homo sapiens* (NP_036211), assim como variantes e/ou mutações destes. Exemplos de polipeptídeos DGAT2 incluem polipeptídeos codificados por genes DGAT2 de *Arabidopsis thaliana* (Número de Adesão NP_566952), *Ricinus communis* (AAY16324), *Vernicia fordii* (ABC94474), *Mortierella ramanniana* (AAK84179), *Homo sapiens* (Q96PD7, Q58HT5), *Bos taurus* (Q70VD8), *Mus musculus* (AAK84175), *Micromonas* CCMP 1545, assim como variantes e/ou mutações destes. Exemplos de polipeptídeos DGAT3 incluem polipeptídeos codificados por genes DGAT3 de amendoim (*Arachis hypogaea*, Saha, et al., 2006), assim como variantes e/ou mutações destes.

Polipeptídeos/Peptídeos

[00328] A invenção também fornece polipeptídeos que podem ser purificados ou recombinantes. Por "polipeptídeo substancialmente purificado" ou "polipeptídeo purificado" queremos dizer um polipeptídeo que foi ordinariamente

separado dos lipídeos, ácido nucléicos, outros peptídeos, e outras moléculas contaminantes com as quais é associada em uma célula na qual é produzida ou em seu estado nativo. De preferência, o polipeptídeo substancialmente purificado é pelo menos 60% livre, mais preferivelmente pelo menos 75% livre, e mais preferivelmente pelo menos 90% livre de outros componentes na célula na qual é produzido ou com a qual é naturalmente associado.

[00329] O termo "recombinante" no contexto de um polipeptídeo se refere ao polipeptídeo quando produzido por uma célula, ou em um sistema de expressão de célula livre, em uma quantidade alterada ou em uma taxa alterada, comparada ao seu estado nativo se ela é produzida naturalmente. Em uma modalidade célula é uma célula que não produz naturalmente o polipeptídeo. Entretanto, a célula pode ser uma célula que compreende um gene não-endógeno que causa uma quantidade alterada do polipeptídeo a ser produzido. Um polipeptídeo recombinante da invenção inclui polipeptídeos na célula, tecido, órgão ou organismo, ou sistema de expressão de célula livre, nos quais é produzido, ou seja, um polipeptídeo que não foi purificado ou separado de outros componentes da célula transgênica (recombinante) na qual foi produzido, e polipeptídeos produzidos em tais células ou sistemas de célula livre que são subsequentemente purificados de pelo menos alguns outros componentes.

[00330] Os termos "polipeptídeo" e "proteína" são geralmente utilizados alternadamente.

[00331] Um polipeptídeo ou classe de polipeptídeos pode ser definido pelo grau de identidade (% de identidade)

de sua sequência de aminoácido para uma sequência de aminoácido de referência, ou ao possuir uma % de identidade superior para uma sequência de aminoácido de referência do que para outra. A % de identidade de um polipeptídeo para uma sequência de aminoácido de referência é tipicamente determinado pelo programa GCG de Needleman e Wunsch em 1970 para de análise de descontinuidade "GAP", com parâmetros de uma penalidade de criação de descontinuidade = 5 e uma penalidade de extensão de descontinuidade = 0,3. A sequência de consulta possui pelo menos 15 aminoácidos de extensão, e a análise de descontinuidade GAP alinha as duas sequências sobre uma região de pelo menos 15 aminoácidos. Mais preferivelmente, a sequência de consulta possui pelo menos 50 aminoácidos de extensão, e a análise de descontinuidade GAP alinha as duas sequências sobre uma região de pelo menos 50 aminoácidos. Mais preferivelmente, a sequência de consulta possui pelo menos 100 aminoácidos de extensão e a análise de descontinuidade GAP alinha as duas sequências sobre uma região de pelo menos 100 aminoácidos. Ainda mais preferivelmente, a sequência de consulta possui pelo menos 250 aminoácidos de extensão e a análise de descontinuidade GAP alinha as duas sequências sobre uma região de pelo menos 250 aminoácidos. Ainda mais preferivelmente, a análise de descontinuidade GAP alinha duas sequências sobre suas extensões inteiras. O polipeptídeo ou classe de polipeptídeos pode possuir a mesma atividade enzimática como, ou uma atividade diferente de, ou carece da atividade de, o polipeptídeo de referência. De preferência, o polipeptídeo possui uma atividade enzimática de pelo menos 10% da atividade do

polipeptídeo de referência.

[00332] Como utilizado neste documento, um fragmento "biologicamente ativo" é uma porção de um polipeptídeo da invenção que mantém uma atividade definida de um polipeptídeo de referência de extensão completa, por exemplo, que possua atividade de dessaturase e/ou elongase ou outra atividade de enzima. Os fragmentos biologicamente ativos como utilizado neste documento excluem o polipeptídeo de extensão completa. Os fragmentos biologicamente ativos podem ser qualquer porção de tamanho contanto que eles mantenham a atividade definida. De preferência, fragmento biologicamente ativo mantém pelo menos 10% da atividade da proteína de extensão completa.

[00333] Com relação a um polipeptídeo ou enzima definida, será reconhecido que valores de % de identidade maiores do que aqueles fornecidos neste documento abrangerão modalidades preferidas. Logo, onde aplicável, à luz dos valores mínimos de % de identidade, é preferido que o polipeptídeo/enzima compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 65%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 76%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 91%, mais preferivelmente pelo menos 92%, mais preferivelmente pelo menos 93%, mais preferivelmente pelo menos 94%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mais preferivelmente pelo menos 96%, mais preferivelmente pelo menos 97%, mais preferivelmente pelo menos 98%, mais preferivelmente pelo

menos 99%, mais preferivelmente pelo menos 99,1%, mais preferivelmente pelo menos 99,2%, mais preferivelmente pelo menos 99,3%, mais preferivelmente pelo menos 99,4%, mais preferivelmente pelo menos 99,5%, mais preferivelmente pelo menos 99,6%, mais preferivelmente pelo menos 99,7%, mais preferivelmente pelo menos 99,8%, e ainda mais preferivelmente pelo menos 99,9% idêntica à ID de SEQ N° relevante nomeada.

[00334] Em uma modalidade, a $\Delta 6$ dessaturase substancialmente purificada e/ou recombinante da invenção não compreende uma sequência fornecida em número de adesão EEH58637.1 ou XP_001421073.1. Em outra modalidade, a $\omega 3$ dessaturase substancialmente purificada e/ou recombinante da invenção não compreende uma sequência fornecida em número de adesão XP_002505536.1. Em outra modalidade, o DGAT substancialmente purificado e/ou recombinante da invenção não compreende uma sequência fornecido em número de adesão EEH54819.1.

[00335] As mutações da sequência de aminoácido dos polipeptídeos daqueles definidos neste documento podem ser preparadas ao introduzir mudanças apropriadas de nucleotídeo em um ácido nucléico definido neste documento, ou por síntese *in vitro* do polipeptídeo desejado. Tais mutações incluem, por exemplo, supressões, inserções ou substituições de resíduos dentro da sequência de aminoácido. Uma combinação de supressão, inserção e substituição pode ser realizada para chegar aa construção final, contanto que o produto de peptídeo final possua as características desejadas.

[00336] Os peptídeos mutantes (alterados) podem ser

preparados ao utilizar qualquer meio conhecido na técnica. Por exemplo, um polinucleotídeo da invenção pode ser exposto a mutagênese *in vitro*. Tais técnicas mutagênese *in vitro* incluem subclonar o polinucleotídeo em um vetor adequado, ao transformar o vetor em uma cepa "causadora de mutação" como a *E. coli* XL-I vermelho (Stratagene) e propagar a bactéria transformada para um número adequado de gerações. Em outro exemplo, os polinucleotídeos da invenção são expostos a técnicas de shuffling de DNA como largamente descrito por Harayama (1998). Os produtos derivados de DNA com mutação/alterado podem prontamente ser rastreados ao utilizar técnicas descritas neste documento para determinar se eles possuem atividade de dessaturase e/ou elongase.

[00337] Ao projetar mutações de sequência de aminoácido, a posição do local de mutação e a natureza da mutação dependerão de característica(s) a ser modificada(s). As posições para mutação podem ser modificadas individualmente ou em série, por exemplo, por (1) ao substituir primeiro com escolhas de conservativas de aminoácido e então com seleções mais radicais dependendo dos resultados obtidos, (2) ao suprimir o resíduo alvo, ou (3) ao inserir outros resíduos adjacentes à posição localizada.

[00338] As supressões de sequência de aminoácido geralmente variam de cerca de 1 a 15 resíduos, mais preferivelmente cerca de 1 a 10 resíduos e tipicamente cerca de 1 a 5 resíduos contíguos.

[00339] As mutações de substituição possuem pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula removida de polipeptídeo e um resíduo diferente inserido em seu lugar.

Os locais de maior interesse para mutagênese de substituição incluem locais identificados como o(s) local(s) ativo(s). Outros locais de interesse são aqueles nos quais resíduos particulares obtidos de diversas cepas ou espécies são idênticas. Estas posições podem ser importantes para atividade biológica. Estes locais, especialmente aqueles dentro uma sequência de pelo menos três outros locais identicamente conservados, são preferivelmente substituídos de uma amaneira relativamente conservativa. Tais substituições conservativas são mostradas na Tabela 3 sob o cabeçalho de "substituições exemplares".

[00340] Em uma modalidade preferida um polipeptídeo mutante/variante possui apenas, ou não mais do que, um ou dois ou três ou quatro mudanças conservativas de aminoácido quando comparada a um polipeptídeo que ocorre naturalmente. Detalhes de mudanças conservativas de aminoácido são fornecidas na Tabela 3. Como a pessoa versada saberia, tais mudanças menores podem ser previstas logicamente em não alterar a atividade do polipeptídeo quando expresso em uma célula recombinante.

Tabela 3. Substituições exemplares.

Resíduo Original	Substituições Exemplares
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his

Glu (E)	asp
Gly (G)	pro; ala
His (H)	asn; his
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala

[00341] Também incluídos dentro do escopo da invenção estão polipeptídeos definidos neste documento que são modificados diferencialmente durante ou após síntese, por exemplo, por biotinilação, benzilação, glicosilação, acetilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos protetores/bloqueadores, clivagem proteolítica, linkage a uma molécula de anticorpo ou outra ligante celular, etc. Estas modificações podem servir para aumentar a estabilidade e/ou bioatividade do polipeptídeo da invenção.

[00342] Os polipetídeos podem ser produzidos de diversas maneiras, incluindo produção e recuperação de polipeptídeos naturais, produção e recuperação de polipeptídeos recombinantes, e síntese química dos polipeptídeos. Em uma modalidade, um polipeptídeo

recombinante é produzido ao cultivar uma célula capaz de expressar o polipeptídeo sob condições eficazes para produzir o polipeptídeo. O polipeptídeo recombinante pode subsequentemente ser secretado da célula e recuperado, ou extraído da célula e recuperado, e é preferivelmente purificado de contaminantes de moléculas. Ele ainda pode ou não ser modificado quimicamente ou enzimaticamente. Uma célula preferida para cultivar é uma célula recombinante definida neste documento. As condições eficazes de cultura incluem, mas não estão limitadas a, condições de meio eficaz, biorreator, temperatura, pH e oxigênio que permitem a produção de polipeptídeo. Um meio eficaz se refere a qualquer meio no qual uma célula é cultivada para produzir um polipeptídeo definido neste documento. Tal meio tipicamente compreende um meio aquoso que possui fontes assimiláveis de carbono, de nitrogênio e de fosfato, e sais, minerais, metais e outros nutrientes apropriados, como vitaminas. As células definidas neste documento podem ser cultivadas biorreatores de fermentação convencional, frascos de agitação, tubos de ensaio, placas de microtitragem, e placas de petri. O cultivo pode ser realizado a uma temperatura, pH e teor de oxigênio apropriado para uma célula recombinante. Tais condições de cultura estão dentro da experiência da pessoa de habilidade comum na técnica. Uma célula mais preferida para produzir o polipeptídeo é uma célula em uma planta, especialmente em uma semente em uma planta.

[00343] Para os propósitos desta invenção, o termo "anticorpo", exceto de especificado em contrário, inclui fragmentos de anticorpos inteiros que conservam sua

atividade de ligação analito alvo, assim como compostos que compreendem os ditos fragmentos. Tais fragmentos incluem fragmentos de Fv, F(ab') e F(ab')₂, assim como anticorpos de cadeia simples (scFv). Os anticorpos da invenção podem ser monoclonais ou policlonais e podem ser produzidos ao utilizar procedimentos típicos na técnica.

Polinucleotídeos

[00344] A invenção também fornece polinucleotídeos que podem ser, por exemplo, um gene, um polinucleotídeo isolado, ou um DNA quimérico. Pode ser DNA ou RNA de origem genômica ou sintética, de fita dupla ou de fita simples, e combinado com carboidrato, lipídeos, proteína ou outros materiais para realizar uma atividade particular definida neste documento. O termo "polinucleotídeo" é utilizado alternadamente neste documento com o termo "molécula de ácido nucléico". Por "polinucleotídeo isolado" queremos dizer um polinucleotídeo que, se obtido de uma fonte natural fonte, foi separado das sequências de polinucleotídeos com as quais é associado ou ligado em seu estado nativo, ou um polinucleotídeo que não ocorre naturalmente. De preferência, o polinucleotídeo isolado é pelo menos 60% livre, mais preferivelmente pelo menos 75% livre, e mais preferivelmente pelo menos 90% livre de outros componentes com os quais é naturalmente associado.

[00345] Como utilizado neste documento, o termo "gene" deve ser entendido em seu contexto mais abrangente e inclui as sequências de desoxirribonucleotídeo que compreendem a região transcrita e, se traduzida, a região de codificação da proteína, de um gene estrutural e que inclui sequências localizadas adjacente à região de

codificação em ambas as extremidades 5' e 3' para uma distância de pelo menos cerca de 2 kb em quaisquer das extremidades e que são envolvidas na expressão do gene. Neste contexto, o gene inclui sinais de controle como promotores, intensificadores, sinais de terminação e/ou poliadenilação que são naturalmente associadas com um dado gene, ou sinais de controle heterólogos em cujo caso o gene é referido como um "gene quimérico". As sequências que estão localizadas 5' da região de codificação da proteína e que estão presentes no mRNA são referidos como sequências não traduzidas 5'. As sequências que estão localizadas 3' ou após a região de codificação da proteína e que estão presentes no mRNA são referidos como sequências não-traduzidas 3'. O termo "gene" abrange ambas as formas cDNA e genômica de um gene. Uma forma genômica ou clone de um gene contém a região de codificação que pode ser interrompida com sequências de não-codificação chamadas de "íntrons" ou "regiões intervenientes" ou "sequências intervenientes". Os íntrons são segmentos de um gene que são transcritos em RNA nuclear (hnRNA). Os íntrons podem conter elementos regulatórios como intensificadores. Os íntrons são removidos ou "spliced out" da transcrição nuclear ou primária; os íntrons, portanto, estão ausentes da transcrição de RNA mensageiro (mRNA). O mRNA age durante tradução para especificar a sequência ou ordem de aminoácidos em um polipeptídeo nascente. O termo "gene" inclui uma molécula sintética ou de fusão que codifica todas ou parte das proteínas da invenção descrita neste documento e uma sequência de nucleotídeo complementar para qualquer um destes acima.

[00346] Como utilizado neste documento, um "DNA quimérico" se refere a qualquer molécula de DNA que não é uma molécula de DNA nativa em sua posição nativa, também referido neste documento como uma "construção de DNA". De forma típica, um DNA quimérico ou gene quimérico compreende regulatório e transcrito ou sequências de codificação de proteína que não são encontradas juntas na natureza. Por conseguinte, um DNA quimérico ou gene quimérico pode compreender sequências regulatórias e sequências de codificação que são derivadas de diferentes fontes, ou sequências regulatórias e sequências de codificação derivadas da mesma fonte, mas dispostas de uma maneira diferente daquela encontrada na natureza.

[00347] O termo "endógeno" é utilizado neste documento para se referir a uma substância que normalmente está presente ou é produzida em uma planta não-modificada no mesmo estágio de desenvolvimento como a planta sob investigação. Um "gene endógeno" se refere a um gene nativo em sua posição natural no genoma de um organismo. Como utilizado neste documento, "molécula de ácido nucléico recombinante", "polinucleotídeo recombinante" ou variações destes se referem a uma molécula de ácido nucléico que foi construído ou modificado por tecnologia de DNA recombinante. Os termos "polinucleotídeo estrangeiro" ou "polinucleotídeo exógeno" ou "polinucleotídeo heterólogo" e similares se referem a qualquer ácido nucléico que é introduzido no genoma de uma célula por manipulações experimentais. Os genes estrangeiros ou exógenos podem ser genes que são inseridos em um organismo não-nativo, genes nativos introduzidos em uma nova posição dentro do

hospedeiro nativo, ou genes quiméricos. Um "transgene" é um gene que foi introduzido no genoma por um procedimento de transformação. Os termos "geneticamente modificado", "transgênico" e variações destes incluem introduzir genes em células por transformação ou transdução, causar mutação de genes em células e alterar ou modular a regulação de um gene em uma célula ou organismos aos quais estes atos foram realizados ou seus descendentes. Uma "região genômica" como utilizado neste documento se refere a uma posição dentro do genoma onde um transgene, ou grupo de transgenes (também referido neste documento como um agrupamento), foram inseridos em uma célula, ou um ancestral desta. Tais regiões apenas compreendem nucleotídeos que foram incorporados pela intervenção humana como por métodos descritos neste documento.

[00348] O termo "exógeno" no contexto de um polinucleotídeo se refere ao polinucleotídeo quando presente em uma célula em uma quantidade alterada comparada ao seu estado nativo. Em uma modalidade, a célula é uma célula que não compreende naturalmente o polinucleotídeo. Entretanto, a célula pode ser uma célula que compreende um polinucleotídeo não-endógeno que resulta em uma quantidade alterada de produção do polipeptídeo codificado. Um polinucleotídeo exógeno da invenção inclui polinucleotídeos que não foram separados de outros componentes da célula transgênica (recombinante), ou do sistema de expressão de célula livre, no qual estão presentes, e polinucleotídeos produzidos em tais células ou sistemas de célula livre que são subsequentemente purificados de pelo menos alguns outros componentes. O polinucleotídeo exógeno (ácido

nucléico) pode ser um trecho contíguo de nucleotídeos que existe na natureza, ou compreende dois ou mais trechos contíguos de nucleotídeos de diferentes fontes (que ocorrem naturalmente e/ou sintéticas) unidos para formar um único polinucleotídeo. De forma típica, tais polinucleotídeos quiméricos compreendem pelo menos uma estrutura de leitura aberta que codifica um polipeptídeo da invenção ligado de maneira operável a um promotor adequado para guiar transcrição da estrutura de leitura aberta em uma célula de interesse.

[00349] Como utilizado neste documento, o termo "diferentes polinucleotídeos exógenos" ou variações destes significa que a sequência de nucleotídeo de cada polinucleotídeo são diferentes por pelo menos um, preferivelmente mais, nucleotídeos. Os polinucleotídeos codificam RNAs que podem ou não ser traduzidos em uma proteína dentro da célula. Em um exemplo, é preferido que cada polinucleotídeo codifique uma proteína com uma atividade diferente. Em outro exemplo, cada polinucleotídeo exógeno é menos do que 95%, menos do que 90%, ou menos do que 80% idêntico aos outros polinucleotídeos exógenos. De preferência, os polinucleotídeos exógenos codificam proteínas/enzimas funcionais. Além disso, é preferido que os diferentes polinucleotídeos exógenos sejam não-sobrepostos em que cada polinucleotídeo é uma região distinta do, por exemplo, ácido de transferência extracromossomal que não se sobrepõe com outro polinucleotídeo exógeno. No mínimo, cada polinucleotídeo exógeno possui um local de início e de fim de transcrição, assim como o promotor designado. Um polinucleotídeo exógeno

individual pode ou não compreender íntrons.

[00350] Com relação aos polinucleotídeos definidos, será reconhecido que valores de % de identidade maiores do que aqueles fornecidos acima abrangerão modalidades preferidas. Logo, onde aplicável, à luz dos valores mínimos de % de identidade, é preferido que o polinucleotídeo compreenda um polinucleotídeo sequência que é pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 65%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 91%, mais preferivelmente pelo menos 92%, mais preferivelmente pelo menos 93%, mais preferivelmente pelo menos 94%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mais preferivelmente pelo menos 96%, mais preferivelmente pelo menos 97%, mais preferivelmente pelo menos 98%, mais preferivelmente pelo menos 99%, mais preferivelmente pelo menos 99,1%, mais preferivelmente pelo menos 99,2%, mais preferivelmente pelo menos 99,3%, mais preferivelmente pelo menos 99,4%, mais preferivelmente pelo menos 99,5%, mais preferivelmente pelo menos 99,6%, mais preferivelmente pelo menos 99,7%, mais preferivelmente pelo menos 99,8%, e ainda mais preferivelmente pelo menos 99,9% idêntico à ID de SEQ N° relevante nomeada.

[00351] Em uma modalidade, o polinucleotídeo exógeno e/ou isolado que codifica uma $\Delta 6$ dessaturase da invenção não compreende a sequência do genoma de *Micromonas* ou *Ostreococcus* prevista para codificar a sequência de aminoácido fornecido em número de adesão EEH58637.1 ou

XP_001421073.1, respectivamente. Em outra modalidade, o polinucleotídeo exógeno e/ou isolado que codifica a $\omega 3$ dessaturase da invenção não compreende a sequência do genoma de *Micromonas* prevista para codificar a sequência de aminoácido fornecido em número de adesão XP_002505536.1. Em outra modalidade, o polinucleotídeo exógeno e/ou isolado que codifica um DGAT da invenção não compreende a sequência do genoma de *Micromonas* prevista para codificar a sequência de aminoácido fornecido em número de adesão EEH54819.1.

[00352] Um polinucleotídeo da presente invenção pode seletivamente hibridizar, sob condições rigorosas, um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da presente invenção. Como utilizado neste documento, condições rigorosas são aquelas que (1) empregam durante hibridização um agente desnaturante como formamida, por exemplo, albumina de soro bovino 50% (v/v) formamida com 0,1% (w/v), 0,1% Ficoll, 0,1% polivinilpirrolidona, 50 mM de tampão fosfato de sódio em pH 6,5 com 750 mM de NaCl, 75 mM de citrato de sódio a 42°C; ou (2) empregam 50% de formamida, 5 x SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M de citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sódio, 5 x solução de Denhardt, DNA de esperma de salmão sonificada (50 g/ml), 0,1% de SDS e 10% sulfato de dextrano a 42°C in 0,2 x SSC e 0,1% de SDS e/ou (3) empregam baixa força iônica e alta temperatura para lavagem, por exemplo, 0,015 M de NaCl/0,0015 M de citrato de sódio/0,1% de SDS a 50°C.

[00353] Os polinucleotídeos da invenção podem possuir, quando comparados moléculas que ocorrem naturalmente, uma ou mais mutações que são supressões,

inserções, ou substituições de resíduos de nucleotídeo. Os polinucleotídeos que possuem mutações em relação a uma sequência de referência podem ser ocorrer naturalmente (isto é, isolado de uma fonte natural) ou sintética (por exemplo, ao realizar mutagênese direcionada a local ou shuffling de DNA no ácido nucléico como descrito acima). Portanto, é aparente que os polinucleotídeos da invenção podem tanto ser de fonte que ocorre naturalmente ou ser recombinante.

Vetores Recombinantes

[00354] Uma modalidade da presente invenção inclui um vetor recombinante, que compreende pelo menos uma molécula de polinucleotídeo definida neste documento, inserida em qualquer vetor capaz de entregar a molécula de polinucleotídeo a uma célula hospedeira. Os vetores recombinantes incluem expressão de vetores. Os vetores recombinantes contêm sequências de polinucleotídeo heterólogo, isto é, sequências de polinucleotídeo que não são naturalmente encontradas adjacentes às moléculas de polinucleotídeo definidas neste documento que preferivelmente são derivadas de uma espécie diferente espécie da qual a(s) molécula(s) de polinucleotídeo(s) são derivadas. O vetor pode ser RNA ou DNA, procariótica ou eucariótica, e tipicamente é um vetor viral, derivado de um vírus, ou um plasmídeo. Os vetores plasmídeos tipicamente incluem sequências de ácido nucléico adicionais que garantem fácil seleção, amplificação, e transformação do cassete de expressão em células procarióticas, por exemplo, vetores derivados de pUC, vetores derivados de pSK, vetores derivados de pGEM, vetores derivados de pSP, vetores

derivados de pBS, ou vetores binários que contém um ou mais regiões de T-DNA. As sequências adicionais de ácido nucléico incluem origens de replicação para garantir replicação autônoma do vetor, genes marcadores selecionáveis, preferivelmente que codificam resistência antibiótica ou herbicida, locais únicos de clonagem múltipla garantindo locais múltiplos para inserir sequências de ácido nucléico ou genes codificados na construção de ácido nucléico, e sequências que intensificam transformação de células procarióticas e eucarióticas (especialmente planta). O vetor recombinante pode compreender mais do que um polinucleotídeo definido neste documento, por exemplo, três, quatro, cinco ou seis polinucleotídeos da invenção em combinação, cada um ligado de maneira operável a sequências de controle de expressão que são operáveis na célula de interesse. Tal mais do que um polinucleotídeo da invenção, por exemplo, 3, 4, 5 ou 6 polinucleotídeos, são preferivelmente unidos covalentemente em um único vetor recombinante, que pode então ser introduzido como uma única molécula em uma célula para formar uma célula recombinante de acordo com a invenção, e preferivelmente integrada ao genoma da célula recombinante, por exemplo, em uma planta transgênica. Com isso, os polinucleotídeos que são unidos serão herdados junto como um lugar genético único no produto da célula recombinante ou planta. O vetor recombinante ou planta pode compreender dois ou mais de tais vetores recombinantes, cada um que contém múltiplos polinucleotídeos, por exemplo, em que cada vetor recombinante compreende 3, 4, 5 ou 6 polinucleotídeos.

[00355] "Ligado com capacidade de operação" como utilizado neste documento se refere a um relacionamento funcional entre dois ou mais segmentos de ácido nucléico (por exemplo, DNA). De forma típica, ele se refere ao relacionamento funcional de elemento regulatório transcripcional (promotor) para uma sequência transcrita. Por exemplo, um promotor é ligado de maneira operável à sequência de codificação, como um polinucleotídeo definido neste documento, se ele estimula ou modula a transcrição da sequência de codificação em uma célula apropriada. Em geral, elementos regulatórios de transcrição de promotor que são ligados de maneira operável à sequência transcrita são fisicamente contíguos à sequência transcrita, ou seja, eles são ativos *in vivo*. Entretanto, some elementos regulatórios de transcrição, como intensificadores, não precisam ser fisicamente contíguos ou localizados em proximidade às sequências de codificação cuja transcrição eles intensificam.

[00356] Quando há múltiplos promotores presentes, cada promotor pode independentemente ser o mesmo ou diferente.

[00357] As moléculas recombinantes como os DNA quiméricos podem também conter (a) um ou mais sinais de secreção que codificam sequências de peptídeo notáveis, para habilitar um polipeptídeo expresso definido neste documento para ser secretado da célula que produz o polipeptídeo ou que garante localização do polipeptídeo expresso, por exemplo, para retenção do polipeptídeo no retículo endoplasmático (ER) na célula ou transferência em um plastídeo, e/ou (b) conter sequências de fusão que levam

à expressão de moléculas de ácido nucléico como proteínas de fusão. Exemplos de segmentos notáveis adequados incluem qualquer segmento notável capaz de direcionar a secreção ou localização de um polipeptídeo definido neste documento. Os segmentos notáveis preferidos incluem, mas não estão limitados a, peptídeo notável *Nicotiana nectarin* (US 5,939,288), extensina de tabaco notável ou o óleo para corpo de oleosina de soja ligando proteína notável. As moléculas recombinantes também podem incluir sequências intervenientes e/ou não-traduzidas em torno e/ou dentro das sequências de ácido nucléico de moléculas de ácido nucléico definidas neste documento.

[00358] Para facilitar a identificação de transformantes, a construção de ácido nucléico compreende desejavelmente um gene marcador selecionável ou rastreável como, ou em adição a, o polinucleotídeo exógeno ou estrangeiro. Por "gene marcador" se quer dizer um gene que transmite um fenótipo distinto para células que expressa o gene marcador e logo permite que tais células transformadas sejam distintas de células que não possuem o marcador. Um gene marcador selecionável confere um traço pelo qual se pode "selecionar" baseado em resistência para um agente seletivo (por exemplo, um herbicida, antibiótico, radiação, calor, ou outro dano de tratamento a células não-transformadas). Um gene marcador rastreável (ou gene repórter) confere um traço que pode ser identificado através de observação ou teste, ou seja, por "rastreamento" (por exemplo, β -glucuronidase, luciferase, GFP ou outra atividade de enzima que não está presente em células não-transformadas). O gene marcador e a sequência de

nucleotídeo de interesse não precisam ser ligados. A escolha atual de um marcador não é crucial contanto que seja funcional (ou seja, seletivo) em combinação com as células escolhidas como uma célula vegetal. O gene marcador e o polinucleotídeo exógeno ou estrangeiro de interesse não precisam ser ligados, uma vez que cotransformação de genes não ligados como, por exemplo, descrito em US 4,399,216 também é um processo eficiente em transformação de planta.

[00359] Exemplos de marcadores selecionáveis bacteriais são marcadores que conferem resistência antibiótica como resistência a ampicilina, eritromicina, cloranfenicol ou tetraciclina, preferivelmente resistência a canamicina. Os marcadores selecionáveis exemplares para transformantes de seleção de planta incluem, mas não estão limitados a, um gene *hyg* que codifica resistência a hogromicina B; um gene fosfotransferase neomicina (*nptII*) que confere resistência a canamicina, paromomicina, G418; um gene transferase glutathione-S de fígado de rato que confere resistência a herbicidas derivados de glutathione como, por exemplo, descrito em EP 256223; um gene sintetase de glutamina que confere, com superexpressão, resistência inibidores de sintetase de glutamina como fosfinotricina como, por exemplo, descrito em WO 87/05327, um gene acetiltransferase *Streptomyces viridochromo* que confere resistência ao agente seletivo fosfinotricina como, por exemplo, descrito em EP 275957, um gene que codifica uma sintetase 5-enol-ciquimato-3-fosfato (EPSPS) que confere tolerância a N-fosfonometilglicina como, por exemplo, descrito por Hinchey et al. (1988), um gene *bar* que confere resistência contra bialafos como, por exemplo, descrito em

WO91/02071; um gene nitrilase como *bxn* de *Klebsiella ozaenae* que confere resistência a bromoxinila (Stalker et al., 1988); um gene redutase diidrofolato (DHFR) que confere resistência a metotrexato (Thillet et al., 1988); um gene sintase de acetolactato mutante (ALS), que confere resistência a imidazolinona, substâncias químicas que inibem sulfoniluréia ou outro ALS (EP 154,204); um gene sintase de antranilato com mutação que confere resistência a triptofano 5-metil; ou um gene desalogenase de dalapona que confere resistência ao herbicida. Os marcadores rastreáveis preferidos incluem, mas não estão limitados a, um gene *uidA* que codifica uma enzima β -glucuronidase (GUS) para a qual diversos substratos cromogênicos são conhecidos, um gene β -galactosidase que codifica uma enzima para a qual vários substratos cromogênicos são conhecidos, um gene aquorina (Prasher et al., 1985), que pode ser empregado detecção de bioluminescência sensível a cálcio; um gene de proteína verde fluorescente (Niedz et al., 1995) ou derivados deste; um gene luciferase (*luc*) (Ow et al., 1986), que permite detecção de bioluminescência, e outros conhecidos na técnica. Por "molécula repórter" como utilizado na presente especificação significa uma molécula que, por sua natureza química, fornece um sinal analiticamente identificável que facilita a determinação de atividade de promotor por referência ao produto da proteína.

[00360] A transformação de protoplastos de planta pode ser alcançada com o uso de métodos com base na precipitação de fosfato de cálcio, tratamento por polietileno glicol, eletroporação, e combinações desses

tratamentos. A aplicação desses sistemas em diferentes variedades de planta depende da capacidade de regenerar essa cepa de planta em particular a partir de protoplastos. Métodos ilustrativos para a regeneração de cereais a partir de protoplastos são descritos (Fujimura et al., 1985; Toriyama et al, 1986; Abdullah et al, 1986). Outros métodos de transformação celular também podem ser usados, e incluem, mas não se limitam à introdução de DNA em plantas mediante a transferência de DNA direta para um pólen, mediante a injeção direta de DNA em órgãos reprodutores de uma planta, ou mediante a injeção direta de DNA nas células de embriões não maduros seguida pela reidratação de embriões dessecados.

[00361] A regeneração, desenvolvimento, e cultivo de plantas a partir de transformantes de protoplasto de planta únicos ou a partir de várias plantas transformadas são bem conhecidos na técnica (Weissbach et al., In: *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, Calif, (1988). Esse processo de regeneração e cultivo inclui tipicamente as etapas de seleção de células transformadas, cultivando aquelas células individualizadas através dos estágios normais de desenvolvimento embriônico através do estágio de plântula com raiz. As sementes e os embriões transgênicos são regenerados de maneira similar. Os caules com raiz transgênicos resultantes são, então, plantados em um meio de cultivo de planta adequado tal como solo.

[00362] O desenvolvimento ou regeneração das plantas contendo o gene exógeno estrangeiro é bem conhecido na técnica. Com preferência, as plantas regeneradas são autopolinizadas fornecendo plantas transgênicas

homozigotas. Por outro lado, o pólen obtido a partir das plantas regeneradas é cruzado com plantas propagadas por semente de linhas agronomicamente importantes. Inversamente, o pólen das plantas dessas linhas importantes é usado em plantas regeneradas polinizadas. A planta transgênica da presente invenção que contém um ácido nucléico exógeno desejado é cultivada com o uso de métodos bem conhecidos pelo versado na técnica.

[00363] Métodos para a transformação de dicotiledôneas, primeiramente mediante a utilização de *Agrobacterium tumefaciens*, e a obtenção de plantas transgênicas foram publicados com relação ao algodão (US 5.004.863. US 5.159.135. US 5.518.908); semente de soja (US 5.569.834. US 5.416.011); Couve (US 5.463.174); amendoim (Cheng et al., 1996); e ervilha (Grant et al., 1995).

[00364] Métodos para a transformação de plantas cereais tal como trigo e cevada para a introdução de uma variação genética em uma planta mediante a introdução de um ácido nucléico exógeno e para a regeneração de plantas a partir de protoplastos ou embriões de planta imaturos são bem conhecidos na técnica, veja por exemplo, os documentos CA 2.092.588, AU 61781/94, AU 667939, US 6.100.447, PCT/US97/10621, US 5.589.617, US 6.541.257, e outros métodos são apresentados no relatório de patente WO99/14314. Com preferência, as plantas de trigo ou cevada transgênicas são produzidas por procedimentos de transformação mediados por *Agrobacterium tumefaciens*. Os vetores que carregam a construção de ácido nucléico desejado podem ser introduzidos em células de trigo regeneráveis de plantas ou explantes cultivados em tecido,

ou sistemas de planta adequados tal como protoplastos.

[00365] As células de trigo regeneráveis, com preferência, são provenientes do escutelo de embriões não maduros, embriões maduros, calos derivados dos mesmos, ou tecido meristemático. Mediante a confirmação da presença dos transgenes em células e plantas transgênicas, uma amplificação da reação da cadeia em polimerase (PCR) ou análise Southern blot pode ser executada com o uso de métodos conhecidos pelos versados na técnica. Os produtos da expressão dos transgenes podem ser detectados em qualquer uma dentre uma pluralidade de maneiras, dependendo da natureza do produto, e incluem o ensaio Western blot e enzimático. Uma maneira particularmente útil para quantificar a expressão da proteína e para detectar a replicação em diferentes tecidos de planta é a utilização de um gene repórter, tal como GUS. Uma vez que as plantas transgênicas foram obtidas, elas podem ser cultivadas para produzir tecidos ou partes de planta que tenham o fenótipo desejado. Um tecido de planta ou partes de planta podem ser colhidos, e/ou a semente coletada. A semente pode servir como uma fonte para o cultivo de plantas adicionais com tecidos ou partes tendo as características desejadas.

[00366] A planta transgênica formada com o uso de *Agrobacterium* ou outros métodos de transformação contém tipicamente um único local genético em um cromossomo. Essas plantas transgênicas podem ser chamadas como sendo hemizigotos para o(s) gene(s) adicionado(s). Mais preferencial é a planta transgênica que é homozigota para o(s) gene(s) adicionado(s); ou seja, a planta transgênica que contém dois genes adicionados, um gene no mesmo local

em cada cromossomo de um par de cromossomos. Uma planta transgênica homozigota pode ser obtida mediante a autofertilização de uma planta transgênica homozigota, germinando uma parte da semente produzida, e analisando as plantas resultantes quanto ao gene de interesse.

[00367] Deve-se compreender, também, que duas plantas transgênicas diferentes que contêm dois genes ou locais exógenos independentemente segregantes também podem ser cruzadas (acasaladas) para produzir uma descendência que contenha ambos os conjuntos de genes ou locais. A autopolinização de progênie F1 adequada pode produzir plantas que são homozigotas para ambos os genes ou locais exógenos. Um retrocruzamento de uma planta parental e o cruzamento não relacionado com uma planta não-transgênica também são contemplados, assim como a propagação vegetativa. Descrições de outros métodos de reprodução que são usados normalmente em diferentes traços e plantios podem ser encontradas em Fehr, In: *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

Animais não-humanos transgênicos

[00368] Um "animal não-humano transgênico" refere-se a um animal, além de um ser-humano, que contém uma construção de gene ("transgene") não encontrado em um animal do tipo selvagem da mesma espécie ou raça. Um "transgene", conforme referido nesse contexto, tem o significado normal na técnica de biotecnologia, e inclui uma sequência genética que foi produzida ou alterada pela tecnologia de RNA ou DNA recombinante, e que foi introduzida em uma célula animal. O transgene pode incluir

sequências genéticas derivadas de uma célula animal, que pode ser da mesma, ou de uma espécie diferente, ou variedade assim como a célula em que o transgene é introduzido. Tipicamente, o transgene foi introduzido no animal mediante a manipulação humana tal como, por exemplo, pela transformação, mas qualquer método pode ser usado assim como um versado na técnica reconhecerá.

[00369] Técnicas para a produção de animais transgênicos são bem conhecidas na técnica. Um livro útil, de maneira geral, sobre esse assunto é Houdebine, Transgenic animals, Generation and Use (Harwood Academic, 1997). A transformação de uma molécula de polinucleotídeo em uma célula pode ser realizada através de qualquer método através do qual uma molécula de polinucleotídeo pode ser inserida na célula. As técnicas de transformação incluem, mas não se limitam a transfecção, eletroporação, microinjeção, lipofecção, adsorção, e fusão celular. Uma célula recombinante pode permanecer unicelular, ou pode ser cultivada em um tecido, órgão ou organismo multicelular. As moléculas de polinucleotídeo transformadas podem permanecer extracromossômicas, ou podem integrar um ou mais sítios dentro de um cromossomo da célula transformada (ou seja, recombinante) de uma maneira que sua capacidade a ser expressa é retida. O DNA heterólogo pode ser introduzido, por exemplo, em uma ova mamífera fertilizada. Por exemplo, as células tronco totipotentes ou pluripotentes podem ser transformadas por microinjeção, precipitação mediada por fosfato de cálcio, fusão liposoma, infecção retroviral ou outros meios, sendo que as células transformadas são, então, introduzidas no embrião, e o embrião, então, se

desenvolve em um animal transgênico. Em um método altamente preferencial, os embriões em desenvolvimento são infectados com um retrovírus contendo o DNA desejado, e animais transgênicos produzidos a partir do embrião infectado. Em um método mais preferencial, entretanto, os DNAs adequados são coinjetados no pró-núcleo ou citoplasma de embriões, com preferência no estágio de célula única, e os embriões permitidos para o desenvolvimento em animais transgênicos maduros.

[00370] Outro método usado para produzir um animal transgênico envolve a microinjeção de um ácido nucléico em ovos de estágio pró-nuclear através de métodos padrão. Os ovos injetados são, então, cultivados antes da transferência para os ovidutos de recipientes pseudopregnantes.

[00371] Os animais transgênicos também podem ser produzidos por tecnologia de transferência nuclear. Com o uso desse método, os fibroblastos de animais doadores são estavelmente transfectados com um plasmídeo que incorpora as sequências de codificação para um domínio de ligação ou parceiro de interesse de ligação mediante o controle de sequências regulatórias. Os transfectantes estáveis são, então, fundidos em oócitos enucleados, cultivados e transferidos para recipientes femininos.

Níveis de RNA Exógeno Melhorados e Expressão Estabilizada

Supressores silenciadores

[00372] O silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) é um mecanismo de defesa específico de sequência nucleotídica que pode alvejar tanto os mRNAs celulares

quanto virais para que a degradação de PTGS ocorra em plantas ou fungos estavelmente ou transientemente transformados com DNA estrangeiro (heterólogo) ou endógeno e resulte na acumulação reduzida de moléculas de RNA com similaridade de sequências no ácido nucléico introduzido.

[00373] Considera-se amplamente que a co-expressão de um supressor silenciador com um transgene de interesse aumentará os níveis de RNA presente na célula transcrita do transgene. Enquanto isso se prova verdadeiro para células *in vitro*, efeitos colaterais significantes são observados em muitos estudos de co-expressão de toda a planta. Mais especificamente, conforme descrito em Mallory et al. (2002), Chapman et al. (2004), Chen et al. (2004), Dunoyer et al. (2004), Zhang et al. (2006), Lewsey et al. (2007) e Meng et al. (2008), as plantas que expressam supressores silenciadores, em geral, mediante promotores constitutivos, são frequentemente anormais fenotipicamente à medida que não são úteis para a produção comercial.

[00374] Conforme descrito acima, os presentes inventores revelaram que os níveis de molécula de RNA podem ser aumentados e/ou os níveis de molécula de RNA podem ser estabilizados ao longo de numerosas gerações, pela limitação da expressão do supressor silenciador em um órgão de armazenagem de uma planta ou parte da mesma. Conforme o uso na presente invenção, um "supressor silenciador" é qualquer polinucleotídeo ou polipeptídeo que possa ser expresso em uma célula vegetal que acentua o nível do produto de expressão de um transgene diferente na célula vegetal, particularmente ao longo de gerações repetidas a partir da planta inicialmente transformada. Em uma

modalidade, o supressor silenciador é um supressor silenciador viral ou mutante do mesmo. Um grande número de supressores silenciadores virais é conhecido na técnica e inclui, mas não se limita a P19, V2, P38, Pe a Po e RPV a PO. Em uma modalidade, o supressor silenciador viral compreende aminoácidos que têm uma sequência conforme fornecida em qualquer uma das SEQ ID NOS 97 a 101, um fragmento biologicamente ativo do mesmo ou uma sequência de aminoácido que é pelo menos 50% idêntica à qualquer uma ou mais dentre SEQ ID NOS 97 a 101 e que tem uma atividade como um supressor silenciador.

[00375] Conforme o uso na presente invenção, os termos "expressão de estabilização", "estavelmente expresso", "expressão estabilizada" e variações dos mesmos referem-se ao nível da molécula de RNA que é essencialmente igual ou superior em plantas da progênie ao longo de gerações repetidas, por exemplo, pelo menos três, pelo menos cinco ou pelo menos 10 gerações, quando comparado às plantas isogênicas desprovidas do polinucleotídeo exógeno que encodifica o supressor silenciador. Entretanto, esse(s) termo(s) não exclui a possibilidade de que ao longo de gerações repetidas exista alguma perda de níveis da molécula de RNA quando comparada a uma geração anterior, por exemplo, não menor que uma perda de 10% por geração.

[00376] O supressor pode ser selecionado a partir de qualquer fonte, por exemplo, vegetal, viral, mamífera etc. O supressor pode ser, por exemplo:

um vírus Flock House B2;

um vírus Pothos Latent P14;

um vírus Pothos Latent AC2;
um vírus do mosaico africano da mandioca AC4;
uma doença do mosaico da nervura amarela do quiabo
C2;
uma doença do mosaico da nervura amarela do quiabo
C4;
uma doença do mosaico da nervura amarela do quiabo
βC1 ;
um vírus da clorose do tomateiro p22;
um vírus da clorose do tomateiro CP;
um vírus da clorose do tomateiro CPm;
um vírus do mosaico dourado do tomateiro AL2;
um vírus Java do enrolamento da folha do tomateiro
βC1
um vírus do enrolamento amarelo da folha do tomateiro
V2;
um vírus do enrolamento amarelo da folha do tomateiro
China C2
um vírus do enrolamento amarelo da folha do tomateiro
China isolado Y10 βC1 ;
um isolado de Israel do enrolamento da folha amarela
do tomateiro V2;
um vírus do mosaico amarelo do munguba Vigna AC2;
um vírus da mancha anelar clorótica do Ibiscus CP;
um vírus do encrespamento do nabo P38;
um vírus do encrespamento do nabo CP;
um vírus do mosaico da couve-flor P6;
um vírus do amarelão da beterraba p21 ;
um vírus da tristeza dos citros p20;
um vírus da tristeza dos citros p23;

um vírus da tristeza dos citros CP;
um vírus do mosaico do feijão-de-corda SCP;
um vírus do nanismo clorótico da batata doce p22
um vírus do mosaico do pepino 2b;
um vírus "aspermy" do tomateiro HC-Pro
um vírus vira-cabeça da beterraba L2;
um vírus do mosaico do trigo transmitido pelo solo
19K;
um vírus do mosaico em faixa da cevada Gammab;
um vírus semilatente da poa;
um pecluvírus do amendoim de moita P15;
um vírus do nanismo do arroz Pns10 ;
um vírus do amarelão das cucurbitáceas transmitido
por afídeo PO;
um vírus do amarelo da beterraba do Oeste PO;
um vírus X da batata P25;
um vírus do amarelecimento da nervura do pepino PIb;
um vírus sharca em ameixeira HC-Pro;
um vírus do mosaico da cana HC-Pro
um vírus Y da batata cepa HC-Pro;
um vírus "etch" do fumo Pl/HC-Pro;
um vírus do mosaico do nabo Pl/HC-Pro;
um vírus do mosqueado do capim P1;
um vírus do mosqueado do capim isolado da Noruega P1;
um vírus do mosqueado amarelo do arroz P1;
um vírus do mosqueado amarelo do arroz isolado da
Nigéria P1;
um vírus da folha branca do arroz NS3
um vírus da faixa do arroz NS3
um vírus do mosaico do fumo que infecta crucíferas

126K;

um vírus do mosaico do fumo que infecta crucíferas
p122;

um vírus do mosaico do fumo p122;

um vírus do mosaico do fumo 126

um vírus do mosaico do fumo 130K;

um vírus do "rattle" do fumo 16K;

um vírus do nanismo arbustivo do tomateiro P19;

um vírus do vira-cabeça do tomateiro NSs;

um vírus da folha anelar clorótica da maçã P50;

um vírus da uva A p10;

um vírus 2 associado ao enrolamento da folha da uva homólogo de BYV p21, bem como variantes/mutantes do mesmo. A lista acima fornece o vírus a partir do qual o supressor pode ser obtido e a proteína (por exemplo, B2, P 14, etc) ou designação de região de codificação para o supressor a partir de cada vírus particular.

[00377] Múltiplas cópias de um supressor podem ser usadas. Diferentes supressores podem ser usados juntos (por exemplo, em conjunto).

Moléculas de RNA

[00378] Essencialmente, qualquer molécula de RNA que é desejável para ser expressa em um órgão de armazenagem de planta pode ser co-expressa como supressor silenciador. A molécula de RNA pode influenciar um traço agrônomo, resistência a insetos, resistência a doenças, resistência a herbicida, esterilidade, características de grão e similares. Os polipeptídeos encodificados podem ser envolvidos no metabolismo de óleo, amido, carboidratos, nutrientes, etc., ou podem ser responsáveis pela síntese de

proteínas, peptídeos, ácidos graxos, lipídeos, ceras, óleos, amidos, açúcares, carboidratos, sabores, odores, toxinas, carotenóides, hormônios, polímeros, flavonóides, proteínas de armazenamento, ácidos fenólicos, alcalóides, ligninas, taninas, celulosas, glicoproteínas, glicolipídeos, etc.

[00379] Em um exemplo particular, as plantas produzidas aumentaram os níveis de enzimas para a produção de óleo em plantas tal como Brassicas, por exemplo, semente de colza oleaginosa ou girassol, açafrão, linhaça, algodão, óleo de soja ou milho; enzimas envolvidas em síntese de amido em plantas tal como batata, milho e cereais, tal como cevada ou arroz; enzimas que sintetizam, ou proteínas que são propriamente medicamentos naturais, tal como produtos farmacêuticos ou veterinários.

[00380] Tipos de polipeptídeos que são contemplados para a produção em um método da presente invenção incluem proteínas farmacêuticas para a utilização em mamíferos, incluindo seres humanos, tal como insulina, preproinsulina, proinsulina, glucagon, interferonas tal como α -interferona e γ -interferona, fatores de coagulação sanguínea tal como Fator VII, VIII, IX, X, XI, e XII, hormônios de fertilização tal como hormônio luteinizante, fatores de crescimento de hormônio folículo estimulante tal como fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento derivado de plaqueta, fator estimulante de colônia granulócita, prolactina, oxitocina, hormônio estimulante da tireóide, hormônio adrenocorticotrópico, calcitonina, hormônio paratireóide, somatostatina, eritropoietina (EPO), enzimas tal como β -glucocerebrosidase, haemoglobina, albumina

sérica, colágeno, hormônio do crescimento, albumina sérica humana, fosfatase alcalina secretada humana, aprotinina, α 1-antitripsina, IgG1 (éster fosfonato), IgM (neuropeptídeo hapteno), SIgA/G (adesina *Streptococcus mutans*), imunotoxina scFv-briodina 1 (CD 40), IgG (HSV), LSC (HSV) e similares.

[00381] De forma adicional, o método da invenção pode ser utilizado para a produção de anticorpos específicos, incluindo moléculas relacionadas a anticorpo ou fragmentos ativos destas que ligam, por exemplo, um tipo de proteína receptora morfogenética de osso IB; E16; STEAP1; MPF; Napi3b; Sema 5b; PSCA; receptor tipo B Endotelina; MSG783; STEAP2; TrpM4; CRIPTO; CD21; CD79b; FcRH2; HER2; NCA; MDP; IL20R α ; Brevican; EphB2R; ASLG659; PSCA; GEDA; um receptor de fator de ativação de célula B; CD22; CD79a; CXCR5; HLA a DOB; P2X5; CD72; LY64; FcRH1; IRTA2; TENB2; CD20; VEGF incluindo VEGF_A, B, C ou D; p53; EGFR; receptor progesterona; catepsina D; Bcl-2; caderina E; CEA; Lewis X; Ki67; PCNA; CD3; CD4; CD5; CD7; CD11c; CD11d; c-Myc; tau; PrPSC; ou A β .

[00382] Em adição, o método da invenção pode ser utilizado para a produção de um antígeno, que pode ou não ser entregue por consumo do órgão de armazenagem, exemplos dos quais incluem proteína do envelope do vírus da Hepatite B, glicoproteína do vírus da raiva, enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*, proteína de capsídeo do vírus de Norwalk, autoantígeno de diabetes, subunidade B da toxina da cólera, subunidades B e A2 da toxina da cólera, fusões de antígeno fimbrial de enterotoxina e enterotoxigênico de rotavírus de *E. coli*, glicoproteína S de vírus de

gastroenterite transmissível suína, epítomos de rinovírus humano 15 (HRV a 14) e tipo vírus humano da imunodeficiência (HIV a I), epítomos de Vírus da Enterite Mink, proteína estrutural VP1 de vírus de doença de boca e pé, glicoproteína B de citomegalovírus humano, antígenos de cáries dentais (*S. mutans*), e antígenos de vírus sincicial respiratório.

Níveis de LC-PUFA produzidas

[00383] Os níveis de LC-PUFA ou combinação de LC-PUFAs que são produzidas na célula recombinante são importantes. Os níveis podem ser expressos como uma composição (em porcentagem) do total de ácido graxo que é um grupo particular de LC-PUFA ou grupo de LC-PUFA relacionada, por exemplo, a LC-PUFA $\omega 3$ ou a LC-PUFA $\omega 6$, ou a VLC-PUFA, ou outra que possa ser determinada por métodos conhecidos na técnica. O nível também pode ser expresso como um teor de LC-PUFA, tal como, por exemplo, a porcentagem de LC-PUFA no peso seco de material compreendendo as células recombinantes, por exemplo, a porcentagem do peso seco de semente que é LC-PUFA. Será apreciado que a LC-PUFA produzida em uma semente oleaginosa pode ser consideravelmente maior em termos de teor de LC-PUFA do que em um vegetal ou um grão que não é cultivado para produção de óleo, mas ambos possuem composições similares de LC-PUFA, e ambos podem ser utilizados como fontes de LC-PUFA para consumo humano ou animal.

[00384] Os níveis de LC-PUFA podem ser determinados quaisquer dos métodos conhecidos na técnica. Em um método preferido, lipídio é totalmente extraído das células, tecidos ou organismos e o ácido graxo convertido em ésteres

metil antes de análise por cromatografia a gás (GC). Tais técnicas são descritas no Exemplo 1. A posição de pico no cromatograma pode ser utilizada para identificar cada ácido graxo em particular, e a área sob cada pico integrada para determinar a quantidade. Conforme o uso na presente invenção, exceto se mencionado em contrário, a porcentagem de ácido graxo em particular em uma amostra é determinada como a área sob o pico para aquele ácido graxo como uma porcentagem do total de área para ácidos graxos no cromatograma. Isto corresponde essencialmente em uma porcentagem em peso (w/w). A identidade de ácidos graxos pode ser confirmada por GC-MS. Lipídio total pode ser separado por técnicas conhecidas na técnica para purificar frações tal como fração TAG. Por exemplo, cromatografia de camada fina (TLC) pode ser realizada em uma escala analítica em TAG separado de outras frações de lipídio tal como DAG, acil-CoAs ou fosfolipídio para determinar a composição de ácido graxo especificamente de TAG.

[00385] Em uma modalidade, a soma total de ARA, EPA, DPA e DHA nos ácidos graxos na célula compreende pelo menos 15%, com mais preferência pelo menos 20% ou pelo menos 25% do total de ácidos graxos na célula. Em uma modalidade mais preferencial, a soma total destes ácidos graxos é pelo menos 29%, pelo menos 30% ou pelo menos 31% do total de ácidos graxos na célula. Em uma outra modalidade, o ácido graxo total na célula possui menos que 1% C20:1. Em outra modalidade, a quantidade de DHA nos ácidos graxos na célula é pelo menos 3%, com mais preferência pelo menos 4%, com mais preferência pelo menos 5% ou pelo menos 7%, ou com preferência ainda pelo menos 10%, do total de ácidos graxos

na célula. Em modalidades preferenciais, a TAG que pode ser extraída na célula compreende os ácidos graxos nos níveis referidos neste parágrafo. Cada combinação possível destes aspectos também é abrangida. Por exemplo, a soma total de ARA, EPA, DPA e DHA nos ácidos graxos na célula pode compreender pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 29%, pelo menos 30% ou pelo menos 31% do total de ácidos graxos na célula, dos quais pelo menos 3%, pelo menos 4%, pelo menos 5%, pelo menos 7% ou pelo menos 10% do total de ácidos graxos na célula é DHA, enquanto o nível de C20:1 pode ser menos que 1%.

[00386] Em cada uma destas modalidades, a célula recombinante pode ser uma célula de um organismo que é adequada para fermentação tal como, por exemplo, um microorganismo unicelular que pode ser uma procariota ou uma eucariota tal como levedura, ou uma célula vegetal. Em uma modalidade preferencial, a célula é uma célula de uma angiosperma (planta maior). E uma modalidade preferencial adicional, a célula é uma célula em uma semente tal como, por exemplo, uma semente de oleaginosa ou um grão ou cereal.

[00387] O nível de produção de LC-PUFA na célula recombinante também pode ser expresso como uma razão de conversão, ou seja, a quantidade da LC-PUFA formada como uma porcentagem de um ou mais substrato PUFA ou LC-PUFA. Com relação a EPA, por exemplo, isto pode ser expresso como a razão do nível de EPA (como uma porcentagem no ácido graxo total) para o nível de um substrato de ácido graxo (ALA, SDA, ETA ou ETrA).

[00388] Em uma modalidade, a eficiência de conversão

de ALA em EPA é pelo menos 80%, ou com mais preferência em 90%. Em outra modalidade, a eficiência de conversão de ALA em EPA, DPA ou DHA (calculada como a soma de todas as porcentagens para EPA, DPA e DHA/ a soma das porcentagens para ALA e todos os produtos de ácido graxo $\Delta 6$ -dessaturado de ALA) é pelo menos 17,3%, ou pelo menos 23%. Em outra modalidade, a eficiência de conversão de ALA em DPA ou DHA (calculada como a soma das porcentagens para DPA e DHA/ a soma das porcentagens para ALA e todos os produtos de ácido graxo $\Delta 6$ -dessaturado de ALA) é pelo menos 15,4%, ou pelo menos 21%. Em outra modalidade, a eficiência de conversão de ALA em DHA (calculada como a soma das porcentagens para DPA e DHA/ a soma das porcentagens para ALA e todos os produtos de ácido graxo $\Delta 6$ -dessaturado de ALA) é pelo menos 9,5%, ou pelo menos 10,8%. Em outra modalidade, a eficiência de conversão de EPA em DHA (calculada como a porcentagem para DHA/ a soma das porcentagens para EPA e todos os produtos de ácido graxo $\Delta 5$ -alongado de EPA) é pelo menos 45%, ou pelo menos 50%. Em outra modalidade, a eficiência de conversão de SDA para produzir ETA (calculada como a soma das porcentagens para ETA e produtos de ácido graxo $\Delta 5$ -dessaturado de ETA/a soma das porcentagens para SDA e todos os produtos de ácido graxo $\Delta 6$ -alongado de SDA) é pelo menos 50%, com mais preferência pelo menos 60%. Em outra modalidade, a eficiência de conversão de ALA em ETrA é pelo menos 6%, com mais preferência pelo menos 9%. Em outra modalidade, a eficiência de conversão de EPA em DPA (calculada como a soma das porcentagens para DPA e DHA/ a soma das porcentagens para EPA, DPA e DHA) através de uma etapa de $\Delta 5$ -elongase é pelo menos 60%, com mais preferência

pelo menos 65%, com mais preferência pelo menos 70% ou com preferência ainda pelo menos 75%.

[00389] A transformação de protoplastos vegetais pode ser realizada com o uso de métodos baseados na precipitação de fosfato de cálcio, tratamento de polietilenoglicol, eletroporação, e combinações desses tratamentos. A aplicação desses sistemas a diferentes variedades de plantas depende da capacidade de regenerar essa cepa de planta em particular a partir de protoplastos. Métodos ilustrativos para a regeneração de cereais a partir de protoplastos são descritos (Fujimura et al., 1985; Toriyama et al, 1986; Abdullah et al, 1986). Outros métodos de transformação celular também podem ser usados e incluem, mas não estão limitados, a introdução de DNA em plantas por transferência direta de DNA para o pólen, por injeção direta de DNA nos órgãos reprodutivos de uma planta ou por injeção direta de DNA nas células de embriões não maduros, seguido pela reidratação de embriões dissecados.

[00390] A regeneração, desenvolvimento e cultivo de plantas a partir de transformantes de um único protoplasto vegetal ou de vários explantes transformados são amplamente conhecidos na técnica (Weissbach et al., In: Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, Calif., (1988). Esse processo de regeneração e crescimento inclui tipicamente as etapas de seleção de células transformadas, cultivo dessas 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 subsequentemente

plantados em um meio de crescimento vegetal apropriado, como o solo.

[00391] O desenvolvimento ou a regeneração de plantas contendo o gene exógeno estrangeiro é amplamente conhecido(a) na técnica. De preferência, as plantas regeneradas são autopolinizadas para fornecerem plantas transgênicas homozigotas. Caso contrário, o pólen obtido das plantas regeneradas é cruzado com plantas propagadas por semente de linhagens agronomicamente importantes. Reciprocamente, o pólen de plantas dessas linhagens importantes é usado para polinizar plantas regeneradas. Uma planta transgênica da presente invenção contendo um ácido nucleico exógeno desejado é cultivada com o uso de métodos amplamente conhecidos por um elemento versado na técnica.

[00392] Métodos para a transformação de dicotiledôneas, essencialmente pelo uso de *Agrobacterium tumefaciens*, e obtenção de plantas transgênicas foram publicados para o algodão (US 5.004.863, US 5.159.135, US 5.518.908); semente de soja (US 5.569.834, US 5.416.011); brássica (US 5.463.174); amendoim (Cheng et al., 1996); e ervilha (Grant et al., 1995).

[00393] Métodos para a transformação de plantas cereais, como trigo e cevada, para a introdução de variação genética em uma planta pela introdução de um ácido nucleico exógeno, e para a regeneração de plantas a partir de protoplastos ou embriões vegetais imaturos são amplamente conhecidos na técnica, ver, por exemplo, CA 2.092.588, AU 61781/94, AU 667939, US 6.100.447, PCT/US97/10621, US 5.589.617, US 6.541.257, e outros métodos são definidos no relatório descritivo da patente WO99/14314. De preferência,

plantas transgênicas de trigo ou de cevada são produzidas por meio de procedimentos de transformação mediados por *Agrobacterium tumefaciens*. Vetores transportando a construção de ácido nucleico desejado podem ser introduzidos em células de trigo regeneráveis de plantas ou explantes de tecidos cultivados, ou sistemas vegetais adequados, como protoplastos.

[00394] As células de trigo regeneráveis são, de preferência, oriundas do escutelo de embriões não maduros, de embriões maduros, do calo derivado dos mesmos, ou do tecido meristemático. Para confirmar a presença dos transgenes em células e plantas transgênicas, uma amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) ou uma análise de Southern blot pode ser realizada com o uso de métodos conhecidos por aqueles elementos versados na técnica. Os produtos da expressão dos transgenes podem ser detectados de qualquer dentre uma variedade de maneiras, dependendo da natureza do produto, e incluem o ensaio de Western blot e o ensaio enzimático. Uma maneira particularmente útil para quantificar expressão da proteína e detectar a replicação em diferentes tecidos vegetais é utilizar um gene repórter, como o GUS. Uma vez que as plantas transgênicas foram obtidas, estas podem ser cultivadas para produzir tecidos ou partes de plantas com o fenótipo desejado. Um tecido de planta ou parte de planta pode ser colhido(a), e/ou a semente coletada. A semente pode servir como uma fonte para o cultivo de plantas adicionais com tecidos ou partes contendo as características desejadas.

[00395] Uma planta transgênica formada com o uso de

Agrobacterium ou outros métodos de transformação contêm tipicamente um único locus genético em um cromossomo. Tais plantas transgênicas podem ser denominadas de hemizigotas para o(s) gene(s) adicionado(s). Mais preferencial é a planta transgênica que é homozigota para o(s) gene(s) adicionado(s); isto é, uma planta transgênica que contém dois genes adicionados, um gene no mesmo locus em cada cromossomo de um par de cromossomos. Uma planta transgênica homozigota pode ser obtida por autofertilização da planta transgênica homozigota, germinação de algumas das sementes produzidas e análise das plantas resultantes para o gene de interesse.

[00396] Também deve ser compreendido que duas plantas transgênicas diferentes contendo dois genes ou loci exógenos independentemente segregantes também podem ser cruzadas (correspondidas) para a produção de descendência que contenha tanto conjuntos de genes ou de loci. A autofecundação do progênie F1 apropriado pode produzir plantas que são homozigotas tanto para os genes como para os loci exógenos. O retrocruzamento com uma planta parental e a fecundação cruzada com uma planta não transgênica também são contemplados, uma vez que se trata de propagação vegetativa. Descrições de outros métodos de reprodução que são comumente usados para diferentes traços e culturas podem ser encontrados em Fehr, In: *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

Animais Não Humanos Transgênicos

[00397] Um "animal não humano transgênico" refere-se a um animal, que não um humano, que contém uma construção

de gene ("transgene") não encontrado em um animal do tipo selvagem da mesma espécie ou raça. Um "transgene", conforme denominado neste contexto, apresenta o significado normal na técnica de biotecnologia e inclui uma sequência genética que foi produzida ou alterada por meio de tecnologia de DNA ou RNA recombinante e que foi introduzida em uma célula animal. O transgene pode incluir sequências genéticas derivadas de uma célula animal, que pode ser de uma espécie ou raça idêntica ou diferente da célula na qual o transgene é introduzido. Tipicamente, o transgene foi introduzido no animal por manipulação humana como, por exemplo, por transformação, mas qualquer método pode ser usado na forma reconhecida por um elemento versado na técnica.

[00398] Técnicas para a produção de animais transgênicos são amplamente conhecidas na técnica. Um livro didático de uso geral útil a respeito desse assunto é o Houdebine, Transgenic animals - Generation and Use (Harwood Academic, 1997). A transformação de uma molécula de polinucleotídeo em uma célula pode ser realizada por meio de qualquer método pelo qual uma molécula de polinucleotídeo possa ser inserida na célula. As técnicas de transformação incluem, mas não são limitadas a, transfecção, eletroporação, microinjeção, lipofecção, adsorção e fusão celular. Uma célula recombinante pode permanecer unicelular ou pode ser cultivada em um tecido, órgão ou organismo multicelular. As moléculas de polinucleotídeo transformadas podem permanecer extracromossômicas ou podem integrar um ou mais sítios no interior de um cromossomo da célula transformada (isto é, recombinante) de tal maneira que a sua capacidade de serem

expressas seja mantida. O DNA heterólogo pode ser introduzido, por exemplo, em óvulos de mamíferos fertilizados. Por exemplo, células-tronco totipotentes ou pluripotentes podem ser transformadas por microinjeção, precipitação mediada por fosfato de cálcio, fusão de lipossomas, infecção retroviral ou outros meios, as células transformadas são então introduzidas no embrião, e o embrião, em seguida, se desenvolve em um animal transgênico. Em um método altamente preferencial, os embriões em desenvolvimento são infectados com um retrovírus contendo o DNA desejado, e os animais transgênicos são produzidos a partir dos embriões infectados. Em um método ainda mais preferencial, no entanto, os DNAs apropriados são coinjetados no pronúcleo ou citoplasma dos embriões, de preferência no estágio de célula única, e os embriões são desenvolvidos em animais transgênicos maturos.

[00399] Adicionalmente, as rações animais da invenção podem ser usadas em aquacultura para aumentar os níveis de ácidos graxos em peixes para consumo humano ou animal.

[00400] As rações animais preferenciais da invenção são as plantas, as sementes e outras partes de planta, tal como folhas e caules, que podem ser usadas diretamente como produtos alimentícios ou rações para seres humanos ou outros animais. Por exemplo, os animais podem pastar diretamente em tais plantas cultivadas no campo ou podem ser alimentados com quantidades mais mensuradas em uma alimentação controlada. A invenção inclui a utilização de tais plantas e partes de planta como alimentação para

aumentar os níveis de LC-PUFA em seres humanos e outros animais.

Composições

[00401] A presente invenção também abrange composições, particularmente composições farmacêuticas, compreendendo uma ou mais dos ácidos graxos e/ou óleos resultantes produzidos com o uso dos métodos da invenção.

[00402] Uma composição farmacêutica pode compreender uma ou mais dos ácidos graxos e/ou óleos, em combinação com um carreador, adjuvante ou veículo farmacêuticamente aceitável, não-tóxico bem conhecido e padrão, tal como solução salina tamponada por fosfato, água, etanol, polióis, óleos vegetais, um agente umectante ou uma emulsão, tal como uma emulsão de água/óleo. A composição pode estar em uma forma líquida ou sólida. Por exemplo, a composição pode estar na forma de um tablete, cápsula, líquido ou pó ingeríveis, injetável ou pomada ou creme tópico. A fluidez pode ser mantida, por exemplo, através da manutenção do tamanho de partícula exigido no caso de dispersões e através da utilização de tensoativos. Pode ser desejável, ainda, incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, cloreto de sódio, e similares. Além de tais diluentes inertes, a composição também pode incluir adjuvantes, tais como agentes umectantes, agente de emulsificação e suspensão, agentes adoçantes, agentes flavorizantes e agentes perfumantes.

[00403] As suspensões, além dos compostos ativos, podem compreender agentes de suspensão, tal como isoestearil alcoóis etoxilados, polioxietileno sorbitol e ésteres de sorbitano, celulose microcristalina,

metahidróxido de alumínio, bentonita, ágar ágar, e tragacanto ou misturas dessas substâncias.

[00404] As formas de dosagem sólida, tal como tabletes e cápsulas, podem ser preparadas com o uso de técnicas conhecidas na técnica. Por exemplo, os ácidos graxos produzidos de acordo com a presente invenção podem estar em formato de tablete com bases de tablete convencionais, tais como lactose, sacarose e amido de milho em combinação com aglutinantes, tais como acácia, amido de milho ou gelatina, agentes de desintegração, tais como amido de batata ou ácido algínico, e um lubrificante, tal como ácido esteárico ou estearato de magnésio. As cápsulas podem ser preparadas através da incorporação desses excipientes em uma cápsula de gelatina junto com os antioxidantes e os ácido(s) graxo(s) relevantes.

[00405] Para administração intravenosa, os ácidos graxos produzidos de acordo com a presente invenção ou derivados dos mesmos, podem ser incorporados em formulações comerciais.

[00406] Uma dosagem típica de um ácido graxo particular é de 0,1 mg em 20 g, obtida cinco vezes por dia (até 100 g diariamente) e está, com preferência, na faixa de cerca de 10 mg em cerca de 1, 2, 5 ou 10 g diariamente (obtida em uma ou múltiplas doses). Conforme conhecido na técnica, um mínimo de cerca de 300 mg/dia de ácido graxo, especialmente LC-PUFA, é desejável. No entanto, será observado que qualquer quantidade de ácido graxo será benéfica para o indivíduo.

[00407] As vias possíveis de administração das composições farmacêuticas da presente invenção incluem, por

exemplo, enteral (por exemplo, oral e retal) e parenteral. Por exemplo, uma preparação líquida pode ser administrada oral ou retalmente. Adicionalmente, uma mistura homogênea pode ser completamente dispersa em água, misturada sob condições estéreis com diluentes fisiologicamente aceitáveis, conservantes, tampões ou propelentes em forma de uma aspersão ou inalante.

[00408] A dosagem da composição a ser administrada ao paciente pode ser determinada por uma pessoa de habilidade comum na técnica e depende de diversos fatores, tais como peso do paciente, idade do paciente, saúde geral do paciente, antecedentes do paciente, situação imunológica do paciente, etc.

[00409] Adicionalmente, as composições da presente invenção podem ser utilizadas para propósitos cosméticos. Pode-se adicionar em composições cosméticas pré-existentes de tal modo que uma mistura seja formada ou um ácido graxo produzido de acordo com o assunto da invenção possa ser usado como o único ingrediente "ativo" em uma composição cosmética.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Materiais e métodos

Cultura de microalgas

[00410] *Micromonas* CS-0170 e *Pyramimonas* CS-0140 isoladas da CSIRO Collection of Living Microalgas (<http://www.marine.csiro.au/microalgae>) foram cultivadas sob condições de cultura padrão. Uma cultura em estoque da Collection foi sub-cultivada e aumentada em escala em uma diluição de 1 em 10 em transferências consecutivas em 1L de frascos Erlenmeyer e, então, em 10L de policarbonato

carbóis. O meio de cultura era f/2, uma modificação do meio f de Guillard e Ryther's (1962) que continha metade de nutrientes de resistência, com uma temperatura de crescimento de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Outras condições de cultura incluíam uma intensidade de luz de $100 \mu\text{mol}$ fótons de $\text{PAR.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de claro:escuro de 12:12 horas, e borbulhando com 1% de CO_2 no ar a uma taxa de $200 \text{ mL.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Isolamento de DNA genômico de microalgas

[00411] O DNA genômico de *Micromonas* CS-0170 e *Pyramimonas* CS-0140 foi isolado com o uso do sistema de DNeasy Planta Mini Kit, conforme descrito no manual de instruções em anexo (QIAGEN, catálogo nº 69106).

Isolamento de RNA total de microalgas

[00412] O RNA total foi isolado das células de *Micromonas* CS-0170 e *Pyramimonas* CS-0140 com o uso do seguinte método. Uma quantidade de 2 g (pelo úmido) de células foi transformada em pó com o uso de um almofariz e um pilão em nitrogênio líquido e pulverizada vagarosamente em um béquer que contém 22 mL de tampão de extração que estava sendo agitado constantemente. À mesma, uma quantidade de 5% de polivinilpirrolidona insolúvel, 90 mM de 2-mercaptoetanol, e 10 mM de ditioneitol foi adicionada e a mistura foi agitada por mais 10 minutos antes de ser transferida para um tubo Corex™. Uma quantidade de 18,4 mL de 3M de acetato de amônio foi adicionada e bem misturada. A amostra foi, então, centrifugada a 6000 xg durante 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o ácido nucléico precipitado através da adição de 0,1 volume de 3M de NaAc (pH de 5,2) e 0,5 volume de isopropanol frio. Após 1 hora de incubação a 20°C , a

amostra foi centrifugada a 6000 xg durante 30 minutos em um rotor de oscilação. O pélete foi ressuspenso em 1 mL de água extraída com fenol/clorofórmio. A camada aquosa foi transferida para um novo tubo e ácidos nucleicos foram precipitados novamente através da adição de 0,1 volume de 3M NaAc (pH de 5,2) e 2,5 volumes de etanol congelado. O pélete foi ressuspenso em água e a concentração de ácido nucleico foi determinado pelo espectrofotômetro.

Vetores e cepas

[00413] O plasmídeo pYES2 e a cepa de levedura INVSC1 foram obtidos junto à Invitrogen, o vetor de plasmídeo pGEMT-Easy junto à Promega e vetor de plasmídeo pBluescript II KS- junto à Stratagene. A cepa *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 foi citada por Lazo et al. (1991) e pela série de vetor binário pORE de Coutu et al. (2007).

Condições de PCR

[00414] Para ampliar os fragmentos de DNA através de reação em cadeia da polimerase (PCR), as condições padrão foram usadas, a menos que fosse especificado de outra maneira. A otimização das condições foi executada através da variação do número de ciclos de amplificação, da temperatura para recozimento dos iniciadores, da concentração de Mg^{2+} e de outros parâmetros, conforme é tipicamente realizado na técnica. Os tampões eram aqueles especificados pelos fornecedores das polimerases. Tipicamente, as condições de reação eram as que se seguem. Após uma desnaturação inicial a 94°C durante 2 a 3 minutos, as misturas de reação foram tratadas por 20 a 40 ciclos de desnaturação/recozimento/extensão com desnaturação a 94°C durante 30 a 60 segundos, recozimento iniciador a 40 a 60°C

durante 30 segundos e extensão de polimerase durante 30 a 60 segundos a 70 a 72°C, sucedida por uma etapa de extensão adicional de 3 minutos a 70 a 72°C.

[00415] A amplificação de transcrição reversa a PCR (RT a PCR) foi tipicamente executada com o uso do sistema Superscript III One a Step RT a PCR (Invitrogen) em um volume de 25 µL com o uso de 10 pmol do iniciador direto e 30 pmol do iniciador reverso, MgSO₄ em uma concentração final de 2,5 mM, 400 ng de RNA total com tampão e componentes de nucleotídeo de acordo com as instruções do fabricante. Os regimes tópicos de temperatura foram: 1 ciclo de 45 °C por 30 minutos para a transcrição reversa em ocorrência; então 1 ciclo de 94°C por 2 minutos seguido por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 70°C por 1 minuto; então 1 ciclo de 72°C por 2 minutos antes de resfriar as misturas em reação a 5°C. 5' e 3' a RACE.

[00416] Para obter cDNAs de comprimento completo que correspondem a fragmentos de gene de comprimento parcial, as extremidades 5' e/ou 3' de cDNAs foram obtidas por métodos de 5' e 3' a RACE (Amplificação Rápida de Extremidades de cDNA). A extremidade 3' de um cDNA foi isolada com o uso de um iniciador direto específico de gene conforme especificado nos Exemplos e um iniciador reverso oligo a dT 5' a ATTTAGGTGACACTATAGTTTTTTTTTTTTTTTTTV a 3' (ID de SEQ N°:41), onde V representa tanto A, G ou C, que foi em comum em todas as reações de 3' a RACE. Uma amplificação RT a PCR foi executada com o uso do sistema Superscript III One a Step RT a PCR (Invitrogen) em um volume de 25 µL com o uso de 10 pmol do iniciador direto e

30 pmol do iniciador reverso, MgSO₄ em uma concentração final de 2,5 mM, 400 ng de RNA total como modelo para a síntese de cDNA, e componentes de tampão e nucleotídeo conforme especificado pelo fornecedor. As condições de ciclos foram tipicamente: 1 ciclo de 45°C por 30 minutos para transcrição reversa; então 1 ciclo de 94°C por 2 minutos; seguido por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 70°C por 1 minuto e 1 ciclo de 72°C por 2 minutos antes de resfriar a 5°C. Os amplicons gerados na reação foram ligados em pGEM a T Easy, clonados em *E. coli* e sequenciados por métodos padrão.

[00417] A não ser que de outra forma especificado, a extremidade 5' de cDNAs foram isoladas com o uso de um terminal modificado a método de transferase com 2 µg de RNA total como modelo para síntese de cDNA. 10 pmol de um iniciador reverso específico de gene foram adicionados ao RNA total e 10,8 µL de água antes de a mistura ser aquecida a 65 °C por 5 minutos e resfriada em gelo por 2 minutos. Os seguintes componentes foram então adicionados: 4 µL de tampão de cDNA de primeiro filamento Superscript III (Invitrogen), 1 µL de 0,1 M ditioneitol, 1 µL de RNaseOUT (Invitrogen) e 1 µL de transcriptase reversa Superscript III. A mistura foi então incubada a 55°C por 60 minutos e a reação terminada por uma incubação adicional a 70°C por 15 minutos. Após ser resfriada brevemente em gelo, a reação foi então tratada com 2 unidades de RNaseH a 37°C por 20 minutos. O cDNA foi então purificado com o uso do Kit de Purificação QIAQUICK PCR (QIAGEN, catálogo #28106). 25 µL do eluato foi então A caudado com o uso de 10 unidades de TdT (NEB), 5 µL de Tampão NEB #4, 5 µL de 2,5 mM de CoCl₂,

0,5 µL de 10 mM de dATP em um total de 50 µL. A reação foi realizada 37°C por 30 minutos seguido por inativação da enzima a 70°C por 10 minutos. Uma reação PCR foi então realizada com o uso de 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (NEB) na mistura da reação incluindo 5 µL do cDNA A caudado, 10 pmol do iniciador reverso específico de gene, 30 pmol de um iniciador oligo a dT modificado 5' a ATTTAGGTGACACTATAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT a 3' (ID de SEQ N°:41), onde V representa tanto A, G ou C, e componentes de tampão e nucleotídeo conforme especificado no manual associado. As condições de ciclo foram tipicamente: 1 ciclo de 94°C por 2 minutos; 5 ciclos de 94°C por 20 segundos, 54°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto; 1 ciclo de 72°C por 5 minutos; 4°C mantido. Se nenhuma faixa de produto clara estiver visível na faixa de tamanho esperado após eletroforese em gel, a região do gel foi excitada e produtos de DNA foram purificados a partir do gel. Uma amostra de 1 µL de uma diluição a 1:20 do eluato foi usada como modelo em uma segunda rodada de PCR. Os amplicons gerados na reação foram ligados em pGEM a T Easy e sequenciados.

Cultura e alimentação de levedura com precursores de ácidos graxos

[00418] Plasmídeos foram introduzidos em levedura por choque térmico e transformantes foram selecionados em placas de meio mínimo de levedura (YMM) que continham 2% de rafinose como a única fonte de carbono. As culturas de inóculo clonal foram estabelecidas em YMM líquido com 2% rafinose como a única fonte de carbono. As culturas

experimentais foram inoculadas a partir deste, em YMM + 1% de NP a 40, em um OD₆₀₀ inicial de 0,3. As culturas foram cultivadas a 30°C com agitação (~60 rpm) até que o OD₆₀₀ fosse de aproximadamente 1,0. Neste ponto, galactose foi adicionada a uma concentração final de 2% e ácidos graxos precursores foram adicionados a uma concentração final de 0,5 mM. As culturas foram incubadas a 20°C com agitação por mais 48 horas antes da coleta por centrifugação. Os grãos de células foram lavados com 1% de NP a 40, 0,5% de NP a 40 e água para remover quaisquer ácidos graxos não incorporados da superfície das células.

Expressão de genes em células de plantas em um sistema de expressão transiente

[00419] Os genes foram expressos em células de plantas em um sistema de expressão transiente essencialmente conforme descrito por Voinnet et al. (2003). Os plasmídeos que continham a região codificante a ser expressa a partir de um iniciador constitutivo forte como o iniciador 35 S foram introduzidos em cepas AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*. Um gene quimérico 35 S :p 19 para expressão do silenciador de supressão viral p19 foi separadamente introduzido em AGL1. As células recombinantes foram cultivadas a 28°C em caldo LB suplementado com 50 mg/mL de canamicina e 50 mg/mL de rifampicina em fase estacionária. As bactérias foram então granuladas por centrifugação a 5000 g por 15 min a temperatura ambiente sendo resuspensas em OD₆₀₀ = 1,0 em um tampão de infiltração que continha 10 mM de MES com pH de 5,7, 10 mM de MgCl₂ e 100 uM de acetosiringona. As células foram então incubadas a 28°C com agitação por 3 horas antes de volumes iguais de

culturas de *Agrobacterium* que continham 35S:pl9 e o(s) gene(s) quimérico(s) de teste de interesse serem misturados antes da infiltração em tecido de folha. As plantas foram tipicamente cultivadas por mais cinco dias após a infiltração antes que discos de folha serem tomados para análise GC dos ácidos graxos.

[00420] Onde tecido de folha foi fornecido com ácidos graxos exógenos, os ácidos graxos foram preparados por aquecimento do ácido graxo apropriado em 2M de solução de hidróxido de amônia por 20 minutos a 60°C após o qual a solução foi evaporada, também a 60°C. O sal resultante foi então resuspenso em 0,1M de tampão de fosfato (pH 7,2) a uma concentração final de 0,5 µg/mL. O sal de ácido graxo foi injetado na folha quatro dias após a infiltração de *Agrobacterium* e discos de folha tomados em vários pontos no tempo após a alimentação, por exemplo, de 2 a 48 horas após a adição do ácido graxo exógeno, para análise da composição de ácido graxo. Os controles foram incluídos onde o ácido graxo exógeno foi omitido, ou onde a cepa de *Agrobacterium* usada para a infiltração não continha o gene de interesse.

Análise de cromatografia a gás (GC) de preparação de ácidos graxos

[00421] Onde uma amostra continha uma grande quantidade de água, incluindo todas as amostras de folha de *Nicotiana benthamiana* e outros tecidos de não semente, o total de lipídios foi extraído com o uso do método descrito por Bligh e Dyer (1959) antes da metilação. Os metil ésteres de ácido graxo (FAME) foram formados por transesterificação dos grãos de levedura centrifugados, sementes de *Arabidopsis*, o total de lipídios de *Nicotiana*

benthamiana ou outras amostras de lipídios totais por aquecimento com MeOH a CHCl₃ a HCl (10:1:1, v/v/v) em 90 a 100°C por 2 horas em um tubo de teste de vidro adaptado com um parafuso alinhado de remate. Os FAME foram extraídos formando hexano e diclorometano (4:1, v/v) e analisados por GC e GC a MS.

[00422] O comprimento total de uma sequência de aminoácido encodificado pelo gene está presente como SEQ ID NO:2. A análise BLAST da sequência de proteína revelou que o cDNA isolado encodificou tanto um $\Delta 5$ - quanto um $\Delta 6$ -elongase. Estes dois tipos de elongases são similares no nível do aminoácido e foi incerto a partir da sequência de aminoácido individualmente, cuja atividade foi encodificado. Quando usada como uma sequência de dúvida no banco de dados da sequência do Genbank com o uso de BLASTP, o grau máximo de identidade entre os *Micromonas* CS-0170 elongase e outras elongases foi de 65% com o Acesso nº CAL55414 que é na sequência para o ácido graxo elongase 2 poliinsaturado *Ostreococcus tauri*. O domínio familiar GNS1/SUR4 conservado (pfam01151 de domínio conservado NCBI) é representado nesta sequência nos aminoácidos 49 a 274, que indica tipicamente que a proteína está envolvida em sistemas de ácido graxo elongase de cadeia longa.

[00423] Uma relação de sequência baseada em árvore no alinhamento múltiplo de sequências similar a *Micromonas* CS-0170 elongase, incluindo aquelas usadas no projeto dos iniciadores originais de degeneração, é apresentada na Figura 3.

Caracterização funcional do $\Delta 6$ -elongase Micromonas CS-0170 em levedura

[00424] Toda a região de codificação deste clone, contida dentro de um fragmento *Sal/I/SphI* em pGEM-T Easy foi inserida no pYES2 nos sítios de *XhoI/SphI*, gerando o vetor pYES2+MicElo1 para introdução e caracterização funcional em levedura. As células de cepa de levedura INVSC1 foram transformadas por pYES2+MicElo1 e os transformantes foram selecionados no meio sem uracila. As células de levedura que continham pYES2+MicElo1 se proliferaram em cultura e o promotor GAL promoter foi induzido por galactose para expressão do gene MicElo1. Após adição de ALA, SDA ou EPA (0,5 mM) ao meio de cultura e 48 horas de cultura adicional a 30°C, os ácidos graxos em lipídeos celulares totais foram analisados. Quando ALA foi adicionado ao meio, a presença de ETrA no lipídeo celular dos transformantes de levedura foi detectada a 0,2% do total de ácidos graxos, representando uma eficiência de conversão baixa porém mensurável a 0,4%. Similarmente, quando SDA foi adicionado ao meio, a presença de ETA na lipídeo celular dos transformantes de levedura foi detectada a 0,2%, representando 0,4% de eficácia de conversão, o que indica um nível baixo de atividade $\Delta 6$ -elongase. Entretanto, quando o EPA foi adicionado ao meio, a presença de DPA no lipídeo celular dos transformantes de levedura não foi detectada, indicando uma ausência de atividade $\Delta 5$ -elongase nas células de levedura (Tabela 5).

Tabela 5. Conversão de ácidos graxos em células de levedura transformadas por construções genéticas expressando elongases isoladas de *Micromonas* CS-0170 e *Pyramimonas* CS-0140.

	Precursor de ácido	Ácido graxo	Taxa de
--	--------------------	-------------	---------

Clone	graxo/% do FA total	formado/% de FA total	conversão
pYES2+Mic-Elo1	ALA, 18:3 ω 3/52,2%	ETrA, 20:3 ω 3/0,2%	0,4%
pYES2+Mic-Elo1	DAS, 18:4 ω 3/54,3%	ETA, 20:4 ω 3/0,2%	0,4%
pYES2+Mic-Elo1	EPA, 20:5 ω 3/2,0%	DPA, 22:5 ω 3/0%	0%
pYES2+Pyrco-Elo1	ALA, 18:3 ω 3/51,4%	ETrA, 20:3 ω 3/5,3%	9,3%
pYES2+Pyrco-Elo1	DAS, 18:4 ω 3/17,9%	ETA, 20:4 ω 3/34,1%	65,6%
pYES2+Pyrco-Elo1	EPA, 20:5 ω 3/2,1%	DPA, 22:5 ω 3/traço	-
pYES2+Pyrco-Elo2	ALA, 18:3 ω 3/56,4%	ETrA, 20:3 ω 3/0,3%	0,5%
pYES2+Pyrco-Elo2	DAS, 18:4 ω 3/51,7%	ETA, 20:4 ω 3/0,7%	1,3%
pYES2+Pyrco-Elo2	EPA, 20:5 ω 3/0,6%	DPA, 22:5 ω 3/1,8%	75,0%

Isolamento e caracterização de um *Pyramimonas* CS-0140

Δ 6-elongase

Isolamento de um fragmento genético Pyramimonas CS-0140 Δ 6-elongase

[00425] A partir de um alinhamento das sequências de aminoácido elongase a partir dos números de acesso do GenBank ABO94747, CAI58897, CAJ30869, CAL23339 e AAV67797, identificaram-se os blocos-consenso de sequência de aminoácido KIYEFVDT (SEQ ID NO:33) e VHVCMYT (SEQ ID NO:34) correspondendo às posições de aminoácido 143 a 150 e 199 a 205, respectivamente, de AAV67797. Os iniciadores de degeneração 5'-AARATMTAYGAGTTYGTIGATAC-3' (SEQ ID NO:50) e 5'-T-AIGTGTACATGCACACRTGWACCC-3' (SEQ ID NO:51) (abreviações conforme acima) foram sintetizados com base nas sequências destes dois blocos. Uma amplificação RT-PCR foi realizada com o uso do sistema Superscript III One-Step RT-PCR com 100 ng RNA total de *Pyramimonas* CS-0140. Um amplicon de 191 bp foi gerado, ligado a pGEM-T Easy e

seqüenciado.

Isolamento de um gene Δ6-elongase Pyramimonas CS-0140 de comprimento total

[00426] Os iniciadores foram projetados para estenderem o fragmento 191 bp por 5'- e 3'-RACE. A extremidade 3' do gene foi isolada com o uso do iniciador de avanço específico de gene 5'-TTCGTGGATACGTTTCATCATGC-3' (SEQ ID NO:52), conforme descreve o Exemplo 1. Um amplicon de 45 bp foi gerado, ligado no pGEM-T Easy e sequenciado. A extremidade 5' do gene foi isolada a partir de 1µg de *Pyramimonas* CS-0140 RNA total com o uso do kit GeneRacer, junto a uma incubação de transcrição reversa de 55°C por 1 hora a fim de gerar cDNA 5'-adaptado, conforme descrito no manual anexado. O iniciador GeneRacer 5' Primer e o iniciador reverso específico de gene 5'-AGTTGAGCGCCGCGAGAAGTAC-3' (SEQ ID NO:53) foram usados em uma amplificação de PCR com o uso de polimerase de DNA PFU Ultra II Fusion. Este produto foi em seguida diluído de 1:10 e 1µl utilizado como molde em uma segunda rodada de PCR com o uso do iniciador GeneRacer 5' Nested, 5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3' (SEQ ID NO:47) e iniciador reverso específico de gene 5'-ACCTGGTTGACGTTGCCCTTCA-3' (SEQ ID NO:54) com o uso das mesmas condições utilizadas na primeira rodada da amplificação. Um amplicon de 743 bp foi gerado, ligado em pGEM-T Easy e sequenciado. As três seqüências parciais foram então montadas formando uma seqüência predita de comprimento total.

[00427] A região de codificação com comprimento total com uma região curta de 5' UTR foi então amplificada a partir do RNA total por um RT-PCR. O iniciador de avanço

5'-GCTATGGAGTTCGCTCAGCCT-3' (SEQ ID NO:55) e o iniciador reverso 5'-TTACTACTGCTTCTTGCTGGCCAGCT-3' (SEQ ID NO:56) foram usados com 100 ng de *Pyramimonas* CS-0140 total de RNA. Um amplicon de 900 bp foi gerado, ligado a pGEM-T Easy e sequenciado. A sequência de nucleotídeo da frase aberta de leitura do amplicon é dada como SEQ ID NO: 3 e a sequência de aminoácido da proteína encodificada é dada como SEQ ID NO:4.

[00428] Análise do BLAST indicou que o comprimento total da sequência aminoácida fornecida como ID de SEQ N°:4) possui similaridades com outros $\Delta 5$ e $\Delta 6$ elongases. O grau máximo de identidade entre a *Pyramimonas* CS-0140 elongase e outras proteínas (BLASTX) foi 54% com AAV67797, o ácido graxo poli-insaturado *Ostreococcus tauri* elongase 1. Uma árvore de relação sequencial baseada em alinhamentos múltiplos de sequências similares à elongase de *Pyramimonas* CS-0140, incluindo aquelas usadas para desenhar os iniciadores degenerados originais, é fornecida na Figura 4. O domínio familiar GNS1/SUR4 conservado (NCBI domínio conservado pfam01 151) é representado nessa sequência nos aminoácidos 52 a 297, o que tipicamente indica que a proteína está envolvida em ácido graxo de cadeia longa em sistemas de alongamento.

Caracterização de função da $\Delta 6$ elongase de Pyramimonas CS-0140 em levedura

[00429] A região codificante da proteína deste clone por inteiro, contida em um fragmento EcoK1 em pGEM-T Easy foi inserida em pYES2 no sítio *EcoRI*, gerando o vetor pYES2+Pyrco-Elol para introdução e caracterização funcional na levedura. Células de cepa de levedura INVSC1 foram

transformadas com pYES2+Pyrco-Elol e transformantes foram selecionados em meio sem uracil. As células de levedura que continham pYES2+Pyrco-Elol foram cultivadas em cultura e então induzidas por galactose para expressar o Pyrco-Elol cDNA. Ácidos graxos foram adicionados ao meio de cultura para uma concentração final de 0,5 mM e adicionalmente cultivados em 30°C por 48 horas, quando então os ácidos graxos foram analisados em lipídios celulares totais. Quando ALA foi adicionado ao meio, a presença de ETrA nos transformantes do lipídio celular da levedura foi detectada em 5.3% dos ácidos graxos totais, representando uma eficiência de conversão (atividade $\Delta 9$ -elongase) de 9.3%. Quando SDA foi adicionado ao meio, a presença de ETA nos transformantes do lipídio celular da levedura foi detectada em 34.1%, representando 65.6% de eficiência de conversão, um alto nível de atividade $\Delta 6$ -elongase. Entretanto, quando EPA foi adicionado ao meio, a presença de DPA nos transformantes do lipídio celular da levedura não foi detectada (Tabela 5), indicando a atividade $\Delta 6$ -elongase codificado em cDNA com alguma atividade $\Delta 9$ -elongase, mas nenhuma atividade $\Delta 5$ -elongase nas células de levedura.

[00430] Os dados descritos acima para os dois genes $\Delta 6$ -elongase mostra que o gene proveniente de *Pyramimonas* codificou uma enzima que era muito mais ativa que o gene proveniente de *Micromonas*. Isso foi inesperado. As possibilidades de a região codificada amplificada do DNA genômico *Micromonas* conter uma mutação ou de a região codificada estar incompleta não foram excluídas.

Exemplo 3. Isolamento e caracterização das codificações de cDNAs $\Delta 5$ -elongase provenientes de microalga

Isolamento de um fragmento de gene $\Delta 5$ -elongase de uma Pyramimonas CS-0140

[00431] A cepa *Pyramimonas* CS-0140 na Coleção Viva de Microalga CSIRO foi identificada como uma cepa de microalga que teve alto nível nativo de alongamento de $\Delta 5$ e $\Delta 6$ (Tabela 4).

[00432] Um alinhamento foi posto em prática a partir de sequências de aminoácidos elongase provenientes dos números de acesso AAV67798 e ABO98084 de GenBank. A partir de numerosas sequências semelhantes, foram escolhidos por consenso os blocos aminoácidos sequenciais YLELLDT (ID de SEQ N°:35) e MYSYY (ID de SEQ N°:36) correspondentes às posições de aminoácidos 136-142 e 198-202, respectivamente, de AAV67798. Os iniciadores degenerados 5'-ARTAYYTSGARYTRYTGAYAC-3' (ID de SEQ N°:57) e 5'-CATKARRTARTASGAGTACAT-3' (ID de SEQ N°:58) (abreviações acima) foram sintetizados tendo como base as sequências desses dois blocos. Uma amplificação RT-PCR foi realizada utilizando o sistema Superscript III One-Etapa RT-PCR conforme descrito no Exemplo 1. 0,5 μ l desta reação foi então usada como modelo em uma segunda série de PCR usando polimerase Taq DNA (NEB) com os mesmos iniciadores. Um amplicon de 200 bp foi gerado, ligado em um pGEM-T Easy e sequenciado.

Isolamento de comprimento total de um gene Pyramimonas CS-0140 $\Delta 5$ -elongase

[00433] Iniciadores foram projetados para estender os 200 fragmentos bp por 5'- e 3'-RACE. A ponta do gene 3' foi isolada usando o gene específico iniciador dianteiro 5'-CATCATACCCTGTTGATCTGGTC-3' (ID de SEQ N°:59) e um

iniciador oligo-dT reverso como no Exemplo 1. Um amplicon de 408 bp foi gerado, ligado em um pGEM-T Easy (Promega) e sequenciado. A ponta do gene 5' foi isolada de 1 µg de um total de RNA de *Pyramimonas* CS-0140 com uso do Kit GeneRacer com uma incubação por transcrição-reversa de 55°C por 1 hora a fim de gerar 5'-adaptado cDNA conforme descrito no manual associado. O gene específico iniciador reverso 5'-CCAGATCAACAGGGTATGATGGT-3' (ID de SEQ N°:60) foi usado na amplificação PCR com uso de PFU Ultra II Fusion DNA polimerase conforme especificado pelo fabricante. Tal produto foi então diluído a 1:10 e 1 µl usado como modelo em uma segunda série de PCR com uso do GeneRacer 5' Nested Iniciador 5'- GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3' (ID de SEQ N°:47) e o gene específico iniciador reverso 5'-CGAAAGCTGGTCAAACCTTCTTGCGCAT-3' (ID de SEQ N°:61). Um amplicon de 514 bp foi gerado, ligado em um pGEM-T Easy (Promega) e sequenciado. A sequência em seu comprimento completo foi montada a partir de três sequências parciais.

[00434] A região codificante de comprimento completo com uma região curta de 5' UTR foi então amplificada a partir do RNA total por RT-PCR. O iniciador dianteiro 5'-AACATGGCGTCTATTGCGATTCCGGCT-3' (ID de SEQ N°:62) e o iniciador reverso 5'-TTATTACTGCTTCTTGGCACCCCTTGCT-3' (ID de SEQ N°:63) foram usados em uma amplificação RT-PCR conforme descrito no Exemplo 1. Um amplicon de 810 bp foi gerado, ligado em um pGEM-T Easy e sequenciado. A sequência de nucleotídeo da estrutura de leitura aberta do suplemento conforme fornecido como ID de SEQ N°:5 e a sequência de aminoácido codificado prevista pelo cDNA são mostradas como ID de SEQ N°:6.

[00435] A análise BLAST indicou que a sequência de aminoácido de comprimento completo teve homologia com outras $\Delta 5$ e $\Delta 6$ elongases. A análise BLASTP mostrou que o grau máximo de identidade entre a elongase CS-0140 *Pyramimonas* e outras proteínas na base de dados Genbank foi de 46%, com o N° de Acesso ABR67690 correspondente a uma elongase *Pavlova viridis* C20. Uma árvore de relação de sequência baseada em múltiplos alinhamentos de sequências similares à elongase *Pyramimonas* CS-0140, incluindo aquelas usadas para projetar os iniciadores degenerados originais, é fornecida na Figura 5.

Caracterização Funcional da $\Delta 5$ elongase de Pyramimonas CS-0140 em levedura

[00436] Toda a região codificante de proteína deste clone, contido dentro de um fragmento *EcoKl* do cDNA em pGEM-T Easy foi inserido em pYES2 no local *EcoRI*, gerando pYES2+Pyrco-Elo2 para introdução e caracterização funcional em levedura. As células da cepa de levedura INVSC1 foram transformadas com pYES2+Pyrco-Elo2 e os transformantes foram selecionados em meio sem uracil. As células de levedura que continham pYES2+Pyrco-Elo2 foram cultivadas em cultura e então induzidas por galactose para expressar o cDNA. Após a adição de ácidos graxos ao meio de cultura e 48 horas de mais cultivo a 30°C, os ácidos graxos em lipídios celulares foram analisados. Quando ALA foi adicionado ao meio, a presença de ETrA no lipídio celular dos transformantes de levedura foi detectada em 0,3% do total de ácidos graxos, representando uma eficiência de conversão de 0,5% (atividade de $\Delta 9$ elongase). Quando SDA foi adicionado ao meio, a presença de ETA no lipídio

celular dos transformantes de levedura foi detectada a 0,7%, representando uma eficiência de conversão de 1.3% (atividade de $\Delta 6$ elongase). Quando EPA foi adicionado ao meio, a presença de DPA no lipídio celular dos transformantes de levedura foi detectada a 1,8%, representando uma eficiência de conversão surpreendentemente alta de 75%, indicando forte atividade de $\Delta 5$ elongase nas células de levedura (Tabela 6).

[00437] Os presentes inventores acreditam que tal conversão eficiente de EPA a DPA em uma célula recombinante não tenha sido reportada anteriormente. Prevê-se que a eficiência de conversão em planta para esta enzima será similarmente alta. O domínio de família GNS1/SUR4 conservado (domínio conservado NCBI pfam01151) é representado nesta sequência nos aminoácidos 50 a 267, o que tipicamente indica que a proteína está envolvida em sistemas de alongamento de ácido graxo de cadeia longa.

Tabela 6. Conversão de ácidos graxos em células de levedura transformadas com construções genéticas que expressam elongases isoladas a partir de *Micromonas* CS-0170 e *Pyramimonas* CS-0140.

Clone	Precursor de ácido graxo/% de FA total	Ácido graxo formado/% de FA total	Taxa de conversão
pYES2+Mic-Elo1	ALA, 18:3 ω 3/52,2%	ETrA, 20:3 ω 3/0,2%	0,4%
pYES2+Mic-Elo1	SDA, 18:4 ω 3/54,3%	ETA, 20:4 ω 3/0,2%	0,4%
pYES2+Mic-Elo1	EPA, 20:5 ω 3/2,0%	DPA, 22:5 ω 3/0%	0%
pYES2+Pyrco-Elo1	ALA, 18:3 ω 3/51,4%	ETrA, 20:3 ω 3/5,3%	9,3%
pYES2+Pyrco-Elo1	SDA, 18:4 ω 3/17,9%	ETA, 20:4 ω 3/34,1%	65,6%

pYES2+Pyrco-Elo1	EPA, 20:5ω3/2,1%	DPA, 22:5ω3/residual	-
pYES2+Pyrco-Elo1	ALA, 18:3ω3/56,4%	ETrA, 20:3ω3/0,3%	0,5%
pYES2+Pyrco-Elo1	SDA, 18:4ω3/51,7%	ETA, 20:4ω3/0,7%	1,3%
pYES2+Pyrco-Elo1	EPA, 20:5ω3/0,6%	DPA, 22:5ω3/1,8%	75,0%

Exemplo 4. Isolamento e caracterização de genes que codificam Δ6 dessaturase a partir de microalga

[00438] A síntese de um gene de Δ6 dessaturase de *Micromonas* CCMP 1545 de comprimento completo

[00439] A sequência de genoma de modelos de proteína filtrada de *Micromonas* CCMP 1545 produzida pelo *US Department of Energy Joint Genome Institute* (<http://www.jgi.doe.gov/>) foi analisada com o programa BLASTP com uso da sequência de aminoácido Δ6 dessaturase de *Ostreococcus tauri*, N° de Acesso de Genbank AAW70159, como a sequência de consulta. Esta análise revelou a presença de uma proteína prevista em *Micromonas* CCMP 1545 que tinha homologia com AAW70159. A sequência de proteína prevista de *Micromonas* CCMP 1545 foi usada para projetar e sintetizar uma sequência de nucleotídeo otimizada por códon que foi a mais adequada para expressão em plantas dicotiledôneas tais como *Brassica napus*. A sequência de nucleotídeo da região codificante de proteína é dada no ID de SEQ N°:7. A construção plasmídica foi designada pGA4. A sequência de aminoácido é mostrada como ID de SEQ N°:8.

[00440] A análise BLASTP com uso da sequência de aminoácido de dessaturase de *Micromonas* CCMP 1545 ID de SEQ N°: 8 como consulta para outras proteínas na base de dados Genbank mostrou que a proteína tinha homologia com Δ6 dessaturases. O mais alto grau de identidade foi 66% ao

longo do comprimento completo com a sequência de aminoácido de N° de Acesso AAW70159, a sequência de uma $\Delta 6$ dessaturase de *Ostreococcus tauri*. Uma árvore de relação de sequência baseada em múltiplos alinhamentos de sequências similares à dessaturase de *Micromonas* CCMP 1545 é fornecida na Figura 6. Esta dessaturase front-end contém um domínio b5 de citocromo (domínio conservado de NCBI pfam00173) nos aminoácidos 54 a 104 e o domínio conservado do tipo $\Delta 6$ -FADS (domínio conservado de NCBI cd03506) nos aminoácidos 172 a 428. Os três indicativos de histidina-boxes de uma dessaturase front-end estão presentes nesta sequência em 190 a 195, 227 a 232 e 401 a 405, respectivamente. As proteínas que contêm ambos destes domínios são tipicamente dessaturases front-end necessárias para a síntese de ácidos graxos altamente insaturados. De forma interessante, esta dessaturase se agrupa proximamente com AAW70159, a única dessaturase acil-CoA do tipo planta bioquimicamente confirmada publicada até hoje.

*Caracterização de função da $\Delta 6$ dessaturase de *Micromonas* CCMP 1545 em células de levedura*

[00441] Toda a região codificante da dessaturase de *Micromonas*, contida dentro de um fragmento KpnI-SacI a partir de plasmídeo pGA4 foi inserida em vetor de levedura pYES2 no local KpnI-SacI, gerando pYES2+Micd6D para introdução e caracterização funcional em levedura. As células de cepa de levedura INVSC1 foram transformadas com pYES2+Micd6D e transformantes foram selecionados em meio sem uracil. As células de levedura que continham pYES2+Micd6D foram cultivadas em cultura e então induzidas por galactose. Após a adição de 0,5 mM de LA, ALA, ETrA,

DGLA ou ETA ao meio de cultura e 48 horas de mais cultura a 30°C, os ácidos graxos em total de lipídios celulares foram analisados. Quando LA foi adicionado ao meio, a presença de GLA no lipídio celular dos transformantes de levedura foi detectada em 3,9% do total de ácidos graxos, representando uma eficiência de conversão de dessaturação $\Delta 6$ de 11,4%. Quando ALA foi adicionado ao meio, a presença de SDA no lipídio celular dos transformantes de levedura foi detectada em 13,9% do total de ácidos graxos, representando uma eficiência de conversão de dessaturação $\Delta 6$ de 39,0%. Isto é, a eficiência de conversão para substratos de ácido graxo $\omega 3$ foi 3,5 vezes maior que para o substrato de ácido graxo $\omega 6$ correspondente. Quando ETrA foi adicionado ao meio, a presença de ETA no lipídio celular dos transformantes de levedura foi detectada em 0,21% do total de ácidos graxos, representando uma eficiência de conversão de dessaturação $\Delta 8$ de 8,0%. No entanto, quando ou DGLA ou ETA foram adicionados ao meio, a presença de ARA ou EPA, respectivamente, não foi detectada. Isto indicou a ausência de qualquer atividade de dessaturação $\Delta 5$ (Tabela 7).

Tabela 7. Conversão de ácidos graxos em células de levedura transformadas com construções genéticas que expressam dessaturases isoladas a partir de *Micromonas* CCMP 1545, *Ostreococcus lucimarinus* e *Pyramimonas* CS-0140.

Clone	Precursor de ácido graxo/% de FA total	Ácido graxo formado/% de FA total	Taxa de conversão
pYES2+Mic-d6D	LA, 18:2 ω 6/30,3%	GLA, 18:3 ω 6/3,9%	11,4%
pYES2+Mic-d6D	ALA, 18:3 ω 3/21,7%	SDA, 18:4 ω 3/13,9%	39,0%

pYES2+Mic-d6D	ETrA, 20:3 ω 3/2,4%	ETA, 20:4 ω 3/0,21%	8,0%
pYES2+Mic-d6D	DGLA, 20:3 ω 6/2,6%	ARA, 20:4 ω 6/0%	-
pYES2+Mic-d6D	ETA, 20:4 ω 3/6,2%	EPA, 20:5 ω 3/0%	-
pYES2+Ostlu-d6D	LA, 18:2 ω 6/29,5%	GLA, 18:3 ω 6/2,1%	6,6%
pYES2+Ostlu-d6D	ALA, 18:3 ω 3/21,8%	SDA, 18:4 ω 3/13,8%	38,8%
pYES2+Ostlu-d6D	EtrA, 20:3 ω 3/2,2%	ETA, 20:4 ω 3/0%	-
pYES2+Ostlu-d6D	GLA, 18:3 ω 6/29,2%	18:4 ω 6/0%	-
pYES2+Ostlu-d6D	SDA, 18:4 ω 3/41,7%	18:5 ω 3/0%	-
pYES2+Ostlu-d6D	DGLA, 20:3 ω 6/2,3%	ARA, 20:4 ω 6/0%	-
pYES2+Ostlu-d6D	ETA, 20:4 ω 3/4,9%	EPA, 20:5 ω 3/0%	-
pYES2+Pyrco-d5D	LA, 18:2 ω 6/35,1%	GLA, 18:3 ω 6/0%	-
pYES2+Pyrco-d5D	ALA, 18:3 ω 3/40,9%	SDA, 18:4 ω 3/0%	-
pYES2+Pyrco-d5D	DGLA, 20:3 ω 6/2,9%	ARA, 20:4 ω 6/0,12%	4,0%
pYES2+Pyrco-d5D	ETA, 20:4 ω 3/7,2%	EPA, 20:5 ω 3/0,26%	3,5%

Caracterização de função da $\Delta 6$ dessaturase de Micromonas CCMP 1545 em células vegetais

[00442] As atividades de enzima da $\Delta 6$ dessaturase de *Micromonas CCMP1545* (Mic1545- d6D) e uma $\Delta 6$ dessaturase de *Echium plantagineum* (Echpl-d6D; Zhou et al., 2006), usadas aqui como uma amostra de controle positivo, foram demonstradas em planta com uso de um sistema de expressão transiente de *Nicotiana benthamiana* melhorado conforme descrito no Exemplo 1. Um vetor designado 35S-pORE04 foi feito inserindo-se um fragmento PstI que contém um promotor 35 S no local Sfol de vetor pORE04 após tratamento de polimerase de DNA T4 para despontar as extremidades (Coutu et al., 2007). Uma construção genética 35S:Mic1545-d6D foi feito inserindo-se toda a região codificante de pGA4, contida dentro de um fragmento Swal, em 35S-pORE04 no local

Smal-*EcoRV*, gerando pJP2064. Esses vetores quiméricos foram introduzidos em cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* e células de culturas desses infiltradas em tecido de folha de plantas *Nicotiana benthamiana* na estufa. As plantas foram cultivadas por mais cinco dias após a infiltração antes de discos de folha serem tomados para análise GC que revelou que ambos os genes estavam funcionando como $\Delta 6$ dessaturases em *Nicotiana benthamiana*.

[00443] O tecido de folha transformado com a $\Delta 6$ dessaturase de *Echium plantagineum* continha GLA (0.4%) e SDA (1.2%), que representou eficiências de conversão de 3,8% e 4,4%, respectivamente. O tecido de folha transformada com a $\Delta 6$ dessaturase de *Micromonas* CCMP 1545 continha SDA (2,2%) que representou uma eficiência de conversão de 6,9% mas nenhum GLA detectável. A ausência de GLA no tecido de folha poderia ser devida a uma preferência extrema na planta pelo substrato $\omega 3$ ALA comparado com o substrato $\omega 6$ LA, ou em parte à presença de atividade de $\omega 3$ dessaturase de *Nicotiana benthamiana* nativa que poderia converter parte do GLA produzido por dessaturação $\Delta 6$ em SDA. Tais efeitos foram notados como prováveis em experimentos anteriores que descrevem $\Delta 6$ dessaturases acil-PC com preferência de substrato $\omega 3$ (Sayanova et al., 2006), embora a extensão em que isto ocorre não tenha sido quantificada naquele estudo.

Preferência de substrato Ômega 3 de $\Delta 6$ dessaturase de Micromonas

[00444] A $\Delta 6$ dessaturase isolada a partir de *Micromonas* teve uma preferência surpreendentemente forte por substratos $\omega 3$ em planta assim como em levedura. A

enzima expressa em células de levedura foi observada tendo 3,5 vezes mais atividade em substratos de ácido graxo dessaturado de $\omega 3$ que os substratos de ácido graxo dessaturado de $\omega 6$ correspondentes. A preferência observada por substratos $\omega 3$ foi inteiramente surpreendente e inesperada com base na falta de preferência relatada pela enzima *O. tauri* (Domergue et al., 2005). Os relatórios sobre expressão da $\Delta 6$ dessaturase de *O. tauri* em levedura ou em semente vegetal indicam atividade similar sobre LA e ALA.

[00445] O uso deste gene ou outros genes com tal alta especificidade por substratos de ácido graxo dessaturado de $\omega 3$ juntamente com outras dessaturases de ácido graxo e elongases como parte de uma via VLC-PUFA recombinante em plantas foi então previsto para aumentar os níveis de EPA, DPA e DHA relativos ao uso de dessaturases sem preferência por substratos dessaturados de $\omega 3$. Tal aumento foi previsto que ocorresse como resultado da redução da conversão de LA a GLA e os subsequentes $\omega 6$ PUFA's DGLA e ARA que não são eficientemente convertidos em planta para suas contrapartes $\omega 3$ por $\Delta 17$ dessaturases de fungo ou levedura. Enquanto uma $\Delta 6$ dessaturase com uma preferência por substratos de ácido graxo $\omega 3$ foi isolada (Sayanova et al., 2003), teve atividade em cadeias de acilo ligadas por fosfolipídio. Em contraste, é previsto que a dessaturase obtida a partir de *Micromonas* tenha atividade em substratos de acil-CoA.

Função $\Delta 6/\Delta 8$ dupla de $\Delta 6$ dessaturase de Micromonas CCMP 1545

[00446] Foi interessante notar que a $\Delta 6$ dessaturase

de *Micromonas* CCMP 1545 exibiu um nível significativo de atividade de $\Delta 8$ dessaturase e assim teve atividades duplas significantes, em contraste à enzima de *Ostreococcus lucimarinus* que não teve atividade de $\Delta 8$ dessaturase detectável (abaixo). A atividade dupla de dessaturase é prevista como sendo útil na construção de caminhos duplos de $\Delta 6/\Delta 8$ dessaturase em planta, ou onde a elongase que é usada na construção de tais caminhos tem ambas as atividades de $\Delta 9$ elongase e $\Delta 6$ elongase. O uso de tal gene poderia ajudar a reduzir a acumulação de ETrA convertendo-o em ETA, que poderia então ser dessaturado de $\Delta 5$ a EPA.

Síntese de um gene de $\Delta 6$ dessaturase de *Ostreococcus lucimarinus* de comprimento completo

[00447] A base de dados GenBank de sequências de proteína não redundante foi analisada por BLASTX com uso da sequência de nucleotídeo de $\Delta 6$ dessaturase de *Ostreococcus tauri* (Nº de Acesso AY746357) como a sequência de consulta. A partir desta análise, um gene de *Ostreococcus lucimarinus* foi identificado, o qual codificou uma proteína de comprimento parcial com sequência de aminoácido de Nº de Acesso XP OO 1421073. As sequências de DNA genômico que divisam a região codificante para XP OO 1421073 foram então examinadas para identificar códons de início e parada de translação supostos para definir a região codificante de proteína de comprimento completo, a sequência de nucleotídeo da qual é dada como a ID de SEQ Nº:9. A região codificante foi então transladada em uma sequência de proteína, dada como ID de SEQ Nº: 10. Esta sequência de aminoácido foi usada para projetar e sintetizar uma sequência de nucleotídeo otimizada por códon que foi a mais

adequada para expressão em *Brassica napus* e outras plantas dicotiledôneas, que têm a sequência de nucleotídeo mostrada no ID de SEQ N°: 11.

[00448] Análise BLASTP com uso da sequência de aminoácido de dessaturase de *Ostreococcus lucimarinus* como consulta para outras proteínas na base de dados Genbank que mostrou que a ID de SEQ N°: 10 tinha homologia com $\Delta 6$ dessaturases. O maior grau de identidade ao longo da sequência de comprimento completo foi 76% com a sequência de aminoácido de N° de Acesso AAW70159, a sequência para a $\Delta 6$ dessaturase de *Ostreococcus tauri*. Uma árvore de relação de sequência com base em múltiplos alinhamentos de sequências similares à dessaturase de *Ostreococcus lucimarinus* é fornecida na Figura 7. Esta dessaturase de front-end continha um domínio b5 conservado (domínio conservado de NCBI pfam00173) nos aminoácidos 55 a 108 e o domínio conservado do tipo $\Delta 6$ FADS (domínio conservado de NCBI cd03506) nos aminoácidos 198 a 444. As três histidina-boxes indicativas de uma dessaturase front-end estão presentes nesta sequência nos aminoácidos 207 a 212, 244 a 249 e 417 a 421. As proteínas que contêm ambos estes domínios são tipicamente dessaturases front-end necessárias para a síntese de ácidos graxos altamente insaturados. De forma interessante, esta dessaturase se agrupa proximamente com AAW70159, a única dessaturase acil-CoA quimicamente confirmada do tipo planta publicada até hoje.

*Caracterização funcional da $\Delta 6$ dessaturase de *Ostreococcus lucimarinus* em células de levedura*

[00449] Toda a região codificante do gene de *Ostreococcus* (ID de SEQ N°: 11), que continha dentro um

fragmento NotI em pGEM-T Easy foi inserida em pYES2 no local NotI, gerando o vetor quimérico pYES2+OstIud6D, por introdução e caracterização funcional em levedura. Células da cepa INVSC1 de levedura foram transformadas com pYES2+OstIud6D e os transformantes foram selecionados em meio sem uracil. As células de levedura que continham pYES2+OstIud6D foram cultivadas em cultura e então induzidas por galactose. Após a adição de LA, ALA, SDA ou EPA, cada um a uma final concentração de 0,5 mM no meio de cultura, e 48 horas de mais cultura a 30°C, os ácidos graxos em lipídios celulares foram analisados. Quando substrato LA foi adicionado ao meio, a presença de produto GLA no lipídio celular dos transformantes de levedura foi detectada em 2,1% do total de ácidos graxos, representando uma eficiência de conversão de dessaturação $\Delta 6$ de 6,6%. Quando substrato ALA foi adicionado ao meio, a presença de produto SDA foi detectada em 13,8% do total ácidos graxos no lipídio celular dos transformantes de levedura, representando uma eficiência de conversão de dessaturação $\Delta 6$ de 38,8%. No entanto, quando qualquer um dentre ETrA, DGLA ou ETA foram adicionados ao meio, a presença de ETA, ARA ou EPA, respectivamente, não foi detectado. Isto indicou a ausência que qualquer atividade de dessaturação $\Delta 5$ ou $\Delta 8$ (Tabela 7), e também uma preferência pelo substrato de ácido graxo $\omega 3$ relativo ao ácido graxo $\omega 6$ correspondente do mesmo comprimento e padrão de insaturação.

Especificidade de substrato de Acil-CoA de dessaturases

[00450] As dessaturases descritas neste Exemplo

estavam mais proximamente relacionadas à $\Delta 6$ dessaturase previamente isolada a partir de *Ostreococcus tauri* do que a outras $\Delta 6$ dessaturases (Figura 9). Esta similaridade foi ainda mais acentuada quando uma árvore filogenética desses genes ao lado de outros membros da família dessaturase foi produzida (Figura 10). A $\Delta 6$ dessaturase de *Ostreococcus tauri* foi reportada como sendo ativa em substratos de acil-CoA (Domergue et al, 2005). Com base nessas observações, foi previsto que as $\Delta 6$ dessaturases codificadas pelos genes descritos acima poderia também ser ativa em substratos de acil-CoA ao invés de substratos de acil-PC. De forma interessante, a $\Delta 5$ dessaturase *Pavlova salina* também se agrupou com a $\Delta 6$ dessaturase de *O. tauri* e a $\Delta 8$ dessaturase formada em uma ramificação separada.

[00451] Para estabelecer se a $\Delta 6$ dessaturase de *M. pusilla* (*Micromonas* CCMP 1545) é capaz de ser usada em ácidos graxos acil-CoA como substratos e assim produzir ácidos graxos acil-CoA dessaturado de $\Delta 6$, *S. cerevisiae* foi transformada com uma construção de gene que codifica a dessaturase sozinho e culturas triplicadas das linhagens de células transformantes crescem na presença de 250 μM exógenos 18:3 $\Delta 9,12,15$. O total de lipídios foi então extraído a partir das culturas e fracionado em classes de lipídios neutros (NL), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE) por cromatografia de camada fina (TLC), após a qual FAME foi produzido a partir de cada classe e analisado por GC. Os dados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Composição de ácido graxo (percentagem de ácidos graxos totais) do total de lipídios e lipídios

neutros fracionados (NL), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE) de *S. cerevisiae* transformados com a $\Delta 6$ dessaturase de *M. pusilla* clonada em pYES2.

Ácido graxo	Total	NL	PC	PI	PS	PE
16:0	24,4 $\pm$ 1,5	24,5 $\pm$ 4,3	36,8 $\pm$ 3,4	45,6 $\pm$ 2,4	45,8 $\pm$ 3,9	37,0 $\pm$ 3,9
16:1 Δ^{3t}	14,7 $\pm$ 0,4	12,1 $\pm$ 0,9	15,7 $\pm$ 0,5	8,1 $\pm$ 0,7	19,4 $\pm$ 1,0	21,5 $\pm$ 3,5
18:0	8,1 $\pm$ 0,7	11,5 $\pm$ 1,4	11,7 $\pm$ 0,7	17,4 $\pm$ 3,1	0,9 $\pm$ 1,3	3,6 $\pm$ 3,8
18:1 Δ^9	11,0 $\pm$ 1,3	10,0 $\pm$ 2,0	7,0 $\pm$ 1,2	14,6 $\pm$ 0,9	26,3 $\pm$ 1,8	18,6 $\pm$ 2,5
18:3 $\Delta^{9,12,15}$	12,1 $\pm$ 0,7	12,2 $\pm$ 2,4	7,1 $\pm$ 0,8	5,6 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 2,0	6,9 $\pm$ 2,3
18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$	19,4 $\pm$ 0,9	29,4$\pm$1,9	21,0$\pm$0,2	7,7 $\pm$ 0,7	4,1 $\pm$ 0,3	9,9 $\pm$ 1,9
Outros	0,3	0,3	0,8	1,1	1,2	2,5
Total	100	100	100	100	100	100

[00452] No total de lipídios, 71% de 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ foi dessaturado de $\Delta 6$ para 18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$. Nenhum enriquecimento do produto na fração PC foi detectado quando comparado com o total de extrato de lipídio. De fato, houve uma percentagem substancialmente inferior de 18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$ na fração PC do que no total de lipídios (21,0% vs. 29,4%), o que indica que a dessaturase estava produzindo 18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$ como um tioéster acil-CoA (Domergue et al., 2003).

[00453] O gene que codifica a $\Delta 6$ dessaturase de *M. pusilla* foi também introduzido em plantas *Arabidopsis* por transformação. Uma construção genético Linin:Micpu-d6D foi gerada inserindo-se toda a região codificante da $\Delta 6$ dessaturase de *vM. pusilla*, contida dentro de um fragmento Swal, em Linin-pWVEC8 no local Smal, gerando linP-mic1545-d6D-linT. O promotor para esta construção foi o promotor de linina específica por semente a partir de linhaça. Esta

construção foi transformada em *A. thaliana* ecotipo *Columbia* e a composição de ácido graxo nas sementes T2 dos vegetais analisados por GC (Figura 11).

[00454] Estudos bioquímicos tanto em levedura e *N. benthamiana* forneceram evidências de que a $\Delta 6$ dessaturase a partir de *M. pusilla* é uma dessaturase acil-CoA. A análise da cinética de uma etapa de alongamento posterior foi usada em outros estudos como um método indireto para determinar a habilidade de um dessaturase render um produto acil-CoA: a disponibilidade do produto dessaturado de $\Delta 6$ (SDA) para a subsequente etapa de alongamento de $\Delta 6$, que ocorre no agrupamento metabólico acil-CoA, é afetada pela especificidade de substrato da $\Delta 6$ dessaturase (Domergue et al, 2003, 2005; Hoffmann et al, 2008). Taxas similares de alongamento de $\Delta 6$ foram obtidas quando as $\Delta 6$ dessaturases a partir de *O. tauri* e *M. pusilla* foram usadas, em contraste com o nível significativamente inferior de alongamento observado quando a $\Delta 6$ dessaturase acil-PC de *E. plantagineum* foi usada (Figura 12a). Ainda mais evidências foram observadas quando a distribuição do SDA de produto de $\Delta 6$ dessaturase nas classes de lipídio de levedura foi analisada (Tabela 8). Nenhum enriquecimento na fração PC foi observado quando comparado com a fração total de lipídio embora tal enriquecimento pudesse ser esperado se e quando o SDA fosse produzido por uma dessaturase acil-PC (Domergue et al., 2005). Os níveis relativamente baixos de dessaturação de $\Delta 6$ observados em nosso estudo (Figura 12) eram esperados já que a maior parte dos substratos LA e ALA em folhas de *N. benthamiana* estão localizados no plastídeo e não estão disponíveis para dessaturação. No entanto, como

esses ácidos graxos são também isolados durante a preparação de FAME, sua presença efetivamente reduz a eficiência de conversão geral calculada. As eficiências de conversão específicas por semente poderiam ser então esperadas como sendo muito mais altas com os mesmos genes.

Comparação entre $\Delta 6$ dessaturases acil-CoA e acil-PC

[00455] Comparações adicionais foram feitas entre a $\Delta 6$ dessaturase de *Micromonas* CCMP 1545, $\Delta 6$ dessaturase de *Echium plantagineum* e $\Delta 6$ dessaturase de *Ostreococcus tauri* (Domergue et al., 2005) em células vegetais. As Construções genéticas 35S: Mic1545-d6D e 35S: Echpl-d6D conforme descritas no Exemplo 4 foram comparadas com uma construção genética 35S: Ostta-d6D que foi feita inserindo-se toda a região codificante da $\Delta 6$ dessaturase de *Ostreococcus tauri*, contida dentro de um fragmento SwaI, em 35S-pORE04 no local SmaI-EcoRV, gerando pJP3065. Comparações diretas entre o *E. plantagineum* e ambos os caminhos de *O. tauri* e *M. pusilla* EPA mostraram que os caminhos de dessaturase acil-CoA renderam de longe níveis mais altos de EPA devido a ambas a dessaturação de $\Delta 6$ mais eficiente e o alongamento de $\Delta 6$ subsequente mais eficiente (Figura 12a). A $\Delta 6$ dessaturase de *E. plantagineum* catalisou a conversão de 14% do substrato $\omega 3$ ($18:3^{\Delta 9,12,15}$ para $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$) e 30% do substrato $\omega 6$ ($18:2^{\Delta 9,12}$ para $18:3^{\Delta 6,9,12}$). O uso da $\Delta 6$ dessaturase de *O. tauri* resultou em 24% de conversão de $\omega 3$ e 40% de conversão de $\omega 6$ enquanto o uso da $\Delta 6$ dessaturase de *M. pusilla* resultou em 27% de conversão de $\omega 3$ e 15% de conversão de $\omega 6$. Essas conversões resultaram na produção de 1,3% de $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ e 3,4% de $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$ para o caminho de *E. plantagineum*, 1,2% de $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ e 9,6% de

20:5^{Δ5,8,11,14,17} para o caminho de *O. tauri* e 0,6% de 20:4^{Δ5,8,11,14} e 10,7% de 20:5^{Δ5,8,11,14,17} para o caminho de *M. pusilla*.

[00456] O alongamento de Δ6 foi de longe mais alto quando ambas as Δ6 dessaturases de *O. tauri* ou de *M. pusilla* produziram o substrato 18:4^{Δ6,9,12,15} comparado a quando a dessaturase de *E. plantagineum* foi usada (Figura 12a). Em adição à especificidade do substrato ω3 mostrada pela Δ6 dessaturase de *M. pusilla*, a Δ6 elongase de *P. cordata* (vide Exemplo 2) provou ser altamente específica e converteu o 18:4^{Δ6,9,12,15} substrato ω3 em uma taxa muito mais alta do que o 18:3^{Δ6,9,12} (89% e 21%, respectivamente, para o caminho EPA de *M. pusilla*).

Uso de caminhos duplos de Δ6 dessaturase

[00457] Comparações foram feitas em que a possibilidade de aumentar a dessaturação de Δ6 usando um caminho que contém duas Δ6 dessaturases foram exploradas. Primeiro, a combinação da dessaturase acil-PC de *E. plantagineum* e a dessaturase acil-CoA de *M. pusilla* não aumentou significativamente as eficiências de conversão acima daquelas vistas em um caminho que contém somente a dessaturase de *M. pusilla* (Figura 12b). Resultados similares foram obtidos quando as Δ6 dessaturases de *E. plantagineum* e de *O. tauri* foram combinadas. Um caminho duplo de Δ6 dessaturase acil-CoA em que ambas as dessaturases de *O. tauri* e *M. pusilla* foram combinadas também não resultou em eficiências de conversão de ω3 aumentadas quando comparadas com ambos os caminhos de *O. tauri* ou de *M. pusilla* (Figura 12c).

[00458] O efeito de usar Δ6 dessaturases duplas

caminho que produz EPA foi também testado. O primeiro teste foi combinar a dessaturase acil-PC a partir de *E. plantagineum* com ambas as dessaturases acil-CoA em experimentos separados. Foi criada a hipótese de que a adição de uma dessaturase ligada por lipídio pudesse aumentar a conversão de qualquer LA ou ALA de substrato acil-PC para GLA ou SDA, respectivamente. Similarmente, testou-se também se o uso de duas dessaturases acil-CoA poderia aumentar a acumulação de EPA. Nenhum desses cenários foi provado verdadeiro nos ensaios transitórios em *N. benthamiana*.

Exemplo 5. Isolamento e caracterização de genes que codificam $\Delta 5$ -dessaturase a partir de microalga

Isolamento de um fragmento de gene de $\Delta 5$ dessaturase de Pyramimonas CS-0140

[00459] Um alinhamento de sequências de aminoácido de dessaturase a partir dos números de acesso do GenBank ABL96295, ABP49078, XP 001421073, AAM09687, AAT85661, AAW70159 e AAX 14505 identificou os blocos de sequência de aminoácido em consenso WKNMHNKHHA (ID de SEQ N°:37) e HHLFPSMP (ID de SEQ N°:38) que correspondem as posições de aminoácido 197-206 e 368-375, respectivamente, de ABL96295. Os iniciadores degenerados 5'-GGTGAAGAACAAGCACAAACrdncaycaygc-3' (ID de SEQ N°:64) e S'-GGGCATCGTGGGGwanarrtgrtg-3' (ID de SEQ N°:65) foram designados com uso do programa CODEHOP (Rose et al, 1998) com base nas sequências desses dois blocos. Uma amplificação de *touchdown* PCR foi executada com uso de uma Taq DNA polimerase (NEB) em um volume de 20 μ L com uso de 10 pmol de cada iniciador, 50 ng de DNA genômico de

Pyramimonas CS-0140 com componentes de tampão e nucleotídeo conforme especificado no manual associado. As condições cíclicas foram: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos; 20 ciclos de 94°C por 1 minuto, 70°C por 2 minutos (-1°C por ciclo), 72°C por 1 minuto; 20 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; 1 ciclo de 72°C por 5 minutos; 4°C mantido. Um amplicon de 551 bp foi gerado, ligado em pGEM-T Easy (Promega) e sequenciado.

Isolamento de um gene de $\Delta 5$ dessaturase de Pyramimonas CS-0140 com comprimento completo

[00460] Iniciadores foram designados para estender o fragmento 551 bp por 5'- e 3'-RACE e usado conforme descrito no Exemplo 1. A extremidade 3' do cDNA para o gene que codifica a $\Delta 5$ dessaturase foi isolada com uso do iniciador direto específico de gene 5'-AGCGAGTACCTGCATTGGGT-3' (ID de SEQ N°:66) e o iniciador reverso oligo-dT modificado como no Exemplo 1. Um amplicon 477 bp foi gerado, ligado em pGEM-T Easy e sequenciado. A extremidade 5' do gene foi isolada pelo método de transferase por terminal modificado como no Exemplo 1. O iniciador reverso específico de gene foi o 5'-ATAGTGCTTGGTGC GCAAGCTGTGCCT-3' (ID de SEQ N°:67). Após duas rodadas de amplificação PCR, um amplicon 317 bp foi gerado, ligado em pGEM-T Easy (Promega) e sequenciado. As três sequências parciais foram montadas formando a sequência prevista do gene de comprimento completo.

[00461] A região codificante de proteína de comprimento completo com uma região curta de 5' UTR foi então amplificada a partir de DNA genômico. O iniciador direto 5'- CACCATGGGAAAGGGAGGCAATGCT-3' (ID de SEQ N°:68) e

o iniciador reverso 5'-TTACTAGTGCGCCTTGGAGTGAGAT-3' (ID de SEQ N°:69) foram usados em uma amplificação PCR com uso de PFU Ultra II Fusion DNA polimerase (Stratagene) em um volume de 20 µL com uso de 4 pmol de cada iniciador e 50 ng de DNA genômico de *Pyramimonas* CS-0140 com componentes de tampão conforme especificado no manual associado de PFU Ultra II Fusion. Um amplicon 1336 bp representando o cDNA de comprimento completo foi gerado, ligado em pGEM-T Easy e sequenciado. A sequência de nucleotídeo da estrutura de leitura aberta do cDNA é dada na ID de SEQ N°: 12.

[00462] A análise BLAST mostrou que a sequência de aminoácido de comprimento completo codificada pelo gene, dada como a ID de SEQ N°: 13, codificou uma proteína com similaridade a $\Delta 5$ ou $\Delta 6$ dessaturases conhecidas. Esses dois tipos de dessaturases são similares ao nível de aminoácido e foi incerto a partir da sequência de aminoácido sozinha que a atividade foi codificada. A análise de atividade de enzima foi executada conforme descrito a seguir, mostrando que a proteína codificada teve atividade de $\Delta 5$ dessaturase. O mais alto grau de identidade entre a dessaturase de *Pyramimonas* CS-0140 e outras dessaturases na base de dados Genbank conforme determinado pelo BLASTP foi de 52%, para o N° de Acesso EDQ92231, que foi a sequência de aminoácido de uma proteína com atividade de enzima não identificada a partir de *Monosiga brevicollis* MX1. Uma árvore de relação de sequência com base em múltiplos alinhamentos de sequências similares à dessaturase de *Pyramimonas* CS-0140, incluindo aquelas usadas para projetar os iniciadores degenerados originais, é fornecida na Figura 8. Esta front-end dessaturase contém um domínio de citocromo b5 (domínio

conservado NCBI pfam00173) nos aminoácidos 16 a 67 e o domínio conservado do tipo $\Delta 6$ -FADS (domínio conservado NCBI cd03506) nos aminoácidos 159 a 411. As três de histidina-boxes indicativas de uma front-end dessaturase estão presentes na sequência dos aminoácidos 175 a 180, 212 a 217 e 384 a 388. As proteínas que contém esses domínios são tipicamente front-end dessaturases necessárias para a síntese de múltiplos ácidos graxos insaturados.

Caracterização de função da $\Delta 5$ -dessaturase de Pyramimonas CS-0140 em levedura

[00463] Toda a região codificante deste clone, contida dentro de um fragmento NotI em pGEM-T Easy foi inserida em pYES2 (Invitrogen) no local NotI, gerando pYES2+Pyrco-des2 para introdução e caracterização funcional em levedura. As células da cepa INVSC1 de levedura (Invitrogen) foram transformadas com pYES2+Pyrco-des2 e os transformantes foram selecionados em meio sem uracil. As células de levedura que continham pYES2+Pyrco-des2 foram cultivadas em cultura e então induzidas por galactose. Após a adição de 0,5 mM de LA, ALA, DGLA ou ETA ao meio de cultura e 48 horas do cultivo adicional a 30°C, os ácidos graxos em lipídios celulares foram analisados. Quando DGLA foi adicionado ao meio, ARA foi detectado no lipídio celular dos transformantes de levedura a 0,12% do total de ácidos graxos, representando uma eficiência de conversão de dessaturação de $\Delta 5$ de 4,0%. Quando ETA foi adicionado ao meio, EPA foi detectado no lipídio celular dos transformantes de levedura a 0,26% do total de ácidos graxos, representando uma eficiência de conversão de dessaturação de $\Delta 6$ de 3,5%. No entanto, quando tanto LA

como ALA foram adicionados ao meio, GAL ou SDA, respectivamente, não foram produzidos nos transformantes de levedura. Isto indicou que a proteína não teve qualquer atividade de dessaturação de $\Delta 6$ nas células de levedura (Tabela 7).

Expressão da $\Delta 5$ dessaturase cordata de Pyramimonas em células vegetais

[00464] As atividades de enzima da $\Delta 6$ dessaturase de *Micromonas* CCMP 1545 (ID de SEQ N°:8 codificada pela ID de SEQ N°:7), $\Delta 6$ elongase de *Pyramimonas* CS-0140 (ID de SEQ N°:4 codificada pela ID de SEQ N°:3) e $\Delta 5$ dessaturase de *Pyramimonas* CS-0140 (ID de SEQ N°: 13 codificada pela ID de SEQ N°: 12) juntamente com a *Arabidopsis thaliana* DGAT1 (ID de SEQ N°:74 codificada pela ID de SEQ N°:75) foram demonstradas em vegetal com uso de um sistema de expressão transiente de *Nicotiana benthamiana* intensificado conforme descrito no Exemplo 1.

[00465] Uma construção genético 35S:Pyrco-d5D que codifica a $\Delta 5$ dessaturase sob o controle do promotor constitutivo 35 S foi feita inserindo-se toda a região codificante da $\Delta 5$ dessaturase *Pyramimonas* CS-0140, contida dentro de um fragmento EcoK1, em 35S-pORE04 (Exemplo 4, acima) no local EcoR1, gerando 35S:Pyrco-d5D. Os vetores quiméricos 35S:Mic1545-d6D (Exemplo 10), 35S:Pyrco-d6E (Exemplo 10) e 35S:Pyrco-d5D foram introduzidos individualmente na cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* e células transgênicas de culturas dessa foram misturadas e a mistura se infiltrou na tecido de folha de vegetais *Nicotiana benthamiana* na estufa. Esses vegetais foram cultivados por mais cinco dias após a infiltração antes de

discos de folha serem tomados para análise GC, que revelou que esses genes estavam funcionando para produzir EPA na *Nicotiana benthamiana*. O tecido de folha transformado com esses genes continha SDA (1,0%), ETA (0,1%), EPA (10,0%). O tecido de folha também continha níveis residuais de GLA, ETA e ARA. A eficiência de conversão de $\Delta 5$ dessaturase foi calculada como sendo de 98,8%.

[00466] Este experimento demonstrou que as $\Delta 5$ dessaturases de microalga são capazes de converter ETA em EPA com uma eficiência de ao menos 90% ou ao menos 95% em células vegetais.

Exemplo 6. Isolamento e caracterização de genes que codificam $\omega 3$ dessaturase a partir de microalga

Isolamento de um fragmento de gene de $\omega 3$ dessaturase de Micromonas CS-0170

[00467] Em uma tentativa de determinar se uma microalga tal como a *Micromonas* tem genes que codificam $\omega 3$ dessaturases e talvez identificar tal gene, uma pesquisa foi feita sobre a sequência genômica da cepa RCC299 de *Micromonas* em busca de genes que mostram homologia a FAD3. No entanto, essa pesquisa falhou em identificar quaisquer genes candidatos. Os inventores então consideraram se uma $\omega 3$ dessaturase poderia ser representada em outros tipos de dessaturases em *Micromonas*. Esta hipótese foi suportada pela descoberta (Exemplo 4) de que a $\Delta 6$ dessaturase na mesma cepa foi do tipo front-end, dependente de acil-CoA. No entanto, quando examinado, o genoma da *Micromonas* RCC299 pareceu conter genes para ao menos 30 dessaturases de ácido graxo putativo e não havia informações sobre qual desses, se de fato algum, poderia codificar uma $\omega 3$ dessaturase.

[00468] Em um experimento, um alinhamento de sequências de aminoácidos de dessaturase a partir dos números de acesso do Genbank BAD91495, ABL63813, BAD1 1952 e AAR20444 identificou os blocos de sequência de aminoácido em consenso WCIGHDCG (ID de SEQ N°:39) e TFLQHHDEDM (ID de SEQ N°:40) que correspondem as posições de aminoácido 106 a 113 e 296 a 305, respectivamente, de BAD91495. Os iniciadores degenerados 5'- TGTGGTGCATCGGCCAYGANKSNGG-3' (ID de SEQ N°:70) e 5'- TGTCCTCGTCGTTGTGCTGNARRWANGT-3' (ID de SEQ N°:71) foram designados com uso do programa CODEHOP com base nas sequências desses dois blocos. Uma amplificação de *touchdown* PCR foi executada com uso de Taq DNA polimerase (NEB) em um volume de 20 µL com uso de 10 pmol de cada iniciador, 50 ng de DNA genômico de *Micromonas* CS-0170 com componentes de tampão e nucleotídeo conforme especificado no manual associado. As condições de ciclagem foram: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos; 20 ciclos de 94°C por 1 minuto, 70°C por 2 minutos (-1°C por ciclo), 72°C por 1 minuto; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; 1 ciclo de 72°C por 5 minutos; 4°C mantido. Um amplicon 528 bp foi gerado, ligado em pGEM-T Easy (Promega) e sequenciado. A sequência de nucleotídeo deste amplicon é fornecida como o ID de SEQ N°: 14, e a sequência de proteína parcial codificada é fornecido como ID de SEQ N°:15.

Síntese de um gene de ω 3 dessaturase de Micromonas RCC299 de comprimento completo

[00469] O fragmento 528 bp gerado por PCR degenerado foi comparado com os modelos de sequência de genoma de proteína filtrada de *Micromonas* RCC299 (produzidos pelo US

Department of Energy Joint Genome Institute <http://www.jgj.doe.gov/>). A análise BLAST revelou regiões de alta homologia entre uma região de cromossomo 13 de *Micromonas* RCC299 e a ID de SEQ N°: 14. Com base na identidade próxima das duas sequências era provável que as cepas de *Micromonas* CS-0170 e RCC299 fossem muito proximamente relacionadas (sequência de nucleotídeo de *Micromonas* RCC299 fornecido como ID de SEQ N°: 16). A sequência de proteína prevista de *Micromonas* RCC299 (ID de SEQ N°: 17) foi usada para projetar e sintetizar uma sequência de nucleotídeo otimizada por códon que foi a mais adequada para expressão em *Brassica napus* ou outras plantas dicotiledôneas (ID de SEQ N°: 18). Uma versão mais curta deste gene que se inicia no nucleotídeo 164 do ID de SEQ N°: 18 foi testada em levedura, mas nenhuma atividade de ω 3 dessaturase foi detectada.

[00470] A análise BLAST indicou que a sequência de aminoácido de comprimento completo (ID de SEQ N°: 17) tinha homologia com FAT-I, FAT-2 e ω 3 dessaturases. Não foi possível prever na sequência sozinha que atividade foi codificada. O grau máximo de identidade entre a dessaturase de *Micromonas* CS-0170 e outras proteínas na base de dados Genbank por BLASTX foi de 35% com XP_001899085.1, que foi uma proteína de *Brugia malayi* na família da dessaturase de ácido graxo. Esta front-end dessaturase continha um domínio conservado do tipo Δ 12 FADS (domínio conservado NCBI cd03507). As proteínas que contêm ambos estes domínios são tipicamente front-end dessaturases necessárias para a síntese de ácidos graxos, incluindo a família da ω 3 dessaturase.

Caracterização funcional da coS-dessaturase de Micromonas RCC299 em vegetal

[00471] A função enzimática da $\omega 3$ dessaturase putativa codificada pelo gene isolado de cadeia completa a partir de *Micromonas* RCC299 (Mic299-w3D, conforme descrito acima) e a $\Delta 17$ dessaturase *Phytophthora infestans* (Phyin-dl7D, N° de Acesso do GenBank CAM55882), usadas aqui como uma amostra de controle positivo, foram testadas em vegetal com uso do sistema de expressão transiente de *Nicotiana benthamiana* intensificado conforme descrito acima.

[00472] A construção 35S:Mic299-w3D foi construído por clonagem de toda a região codificante de proteína da ID de SEQ N°: 18, contida dentro de um fragmento *EcoRI*, no vetor 35S- pORE04 (Exemplo 4) no local *EcoRI*, gerando a construção genético designada pJP2073. A construção 35S:Phyin-dl7D foi feito por clonagem de toda a região codificante da $\Delta 17$ dessaturase de *Phytophthora infestans*, contida dentro de um fragmento *EcoRI*, em 35S-pORE04 no local *EcoRI*, gerando pJP2074. Similarmente, uma construção 35S:Arath-DGAT1 foi construído por clonagem de toda a região codificante da *Arabidopsis thaliana* DGAT1 (AF051849), contida dentro do fragmento *EcoRI*, em 35S-pORE04 no local *EcoRI*, gerando pJP2078.

[00473] A cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* foi cultivada a 28°C em caldo LB suplementado com 50 mg/mL de canamicina e 50 mg/mL de rifampicina para a fase estacionária. As bactérias foram então comprimidas por centrifugação a 5000 g por 15 min a temperatura ambiente antes serem resuspensas a OD600 = 1,0 em um tampão de infiltração que continha 10 mM de MES com pH 5,7, 10 mM de

MgCl₂ e 100 µM de acetoseringona. As células foram então incubadas a 28°C com agitação por 3 horas antes de volumes iguais de células de *Agrobacterium* que continham 35S:pl9, 35S:Arath-DGAT1 e ou culturas de 35S:Phyin-dl7D ou de 35S:Mic299-w3D serem misturados antes da infiltração no tecido de folha. Um sal ácido araquidônico foi preparado e alimentado ao tecido de folha transformado conforme descrito acima com discos de folha sendo tomados para análise tanto em 5 horas como em 24 horas após a alimentação de substrato. Pontos da folha infiltrados com a construção 35S:Phyin-dl7D ou, separadamente, a construção 35S:Mic299-w3D, todos demonstraram a conversão de ARA (20:4co6) em EPA, (20:5ω3) a 37% e 50% de eficiência, respectivamente (Figura 13), o que indica que a proteína teve atividade de Δ17-dessaturase.

Discussão: Caracterização da primeira coS-dessaturase de microalga com atividade de Δ17 dessaturase

[00474] A ω3 dessaturase de *Micromonas* RCC299 descrita neste estudo é a primeira de Δ17 dessaturase microalga, isto é, similar a planta, descrita que tem atividade em um substrato de ácido graxo C20 ou mais longo. Plantas terrestres não são conhecidas por ter ω3 dessaturases do tipo front-end dessaturase, mas, ao invés deste, do tipo FAD3. Foi então surpreendente descobrir que uma cepa de microalga, que é mais relacionada às plantas do que aos fungos, possuía uma ω3 dessaturase do tipo front-end dessaturase.

[00475] Foi considerado provável, com base em homologia a outras dessaturases, que a dessaturase fungosa de *Phytophthora infestans* usada como um gene de controle

nos experimentos descritos acima fosse ativa em substratos acil-PC enquanto a dessaturase de *Micromonas* RCC299 fosse ativa em substratos acil-CoA. Outras dessaturases fungosas são conhecidas por serem ativas em substratos acil-PC. Esta conclusão se com relação ao gene de *Micromonas* gene foi consistente com sua similaridades observada ao gene de $\Delta 6$ dessaturase a partir da mesma cepa (Exemplo 4). Esta preferência de substrato pode ser ademais examinada por estudos de alimentação de substrato onde substratos, tal como ARA, alimentados ao tecido transformado estarão imediatamente disponíveis para o agrupamento acil-CoA, mas disponíveis para o agrupamento acil-PC somente após a conversão por aciltransferases de planta nativa (por exemplo, *Nicotiana benthamiana*).

[00476] O gene $\omega 3$ dessaturase de *Micromonas* RCC299 será muito útil na construção de caminhos recombinantes designados para render EPA e ácidos graxos DPA e DHA a jusante, e outro $\omega 3$ VLC-PUFA em vegetais, em particular por causa de sua capacidade de converter substratos $\omega 6$, tal como ARA, em produtos $\omega 3$. A atividade em substratos acil-CoA intensifica esta utilidade quando combinada com elongases, tal como $\Delta 5$ elongases, que também operam no agrupamento acil-CoA. Além disso, o perfil de ácido graxo de cepas de *Micromonas* indicou que a enzima de *Micromonas* enzima pode ter também a capacidade de converter ácidos graxos $\omega 6$ C 18, tal como GLA ou LA, em suas contrapartes $\omega 3$, tal como SDA ou ALA, respectivamente. A conversão de GLA em SDA pode ser demonstrada tanto em células de levedura com em planta por alimentação de substrato conforme descrito acima para o substrato ARA, enquanto a

conversão de LA em ALA é melhor demonstrada em células de levedura por causa da presença de $\Delta 15$ dessaturases endógenas em plantas.

Identificação de outras $\omega 3$ dessaturases

[00477] A sequência de genoma de modelos de proteína filtrada de *Micromonas* CCMP 1545 produzida pelo *US Department of Energy Joint Genome Institute* (<http://www.jgi.doe.gov/>) foi analisada com o programa BLASTP com uso da ID de SEQ N°: 17 como a query sequência de consulta. Esta análise revelou a presença de um gene em *Micromonas* CCMP 1545 (EuGene.0000150179) que tinha homologia com a ID de SEQ N°: 17. A sequência de estrutura de leitura aberta é fornecida na ID de SEQ N°: 19 e a sequência de proteína é fornecido na ID de SEQ N°:20.

[00478] A análise BLAST indicou que a sequência de aminoácido de comprimento completo ID de SEQ N°:20 tem homologia com FAT-I, FAT-2 e $\omega 3$ dessaturases. O grau máximo de identidade entre a dessaturase de *Micromonas* CCMP 1545 e outras proteínas na base de dados do Genbank (BLASTP) foi de 59% juntamente com o comprimento completo com ID de SEQ N°: 17. Esta front-end dessaturase continha um domínio conservado do tipo $\Delta 12$ -FADS (domínio conservado NCBI cd03507). As proteínas que contém ambos esses domínios são tipicamente front-end dessaturases necessárias para a síntese de ácidos graxos, incluindo a família de $\omega 3$ dessaturase. Previu-se que esta proteína também funcionaria como uma $\omega 3$ dessaturase com atividade de $\Delta 17$ dessaturase em planta.

Exemplo 7. Isolamento e caracterização de mais genes que codificam $\Delta 9$ elongase a partir de microalga

*Isolamento e caracterização da $\Delta 9$ elongase de *Emiliana huxleyi* CCMP 1516*

[00479] A sequência de genoma de modelos de proteína filtrada de *Emiliana huxleyi* CCMP 1516 produzida pelo *US Department of Energy Joint Genome Institute* (<http://www.jgi.doe.gov/>) foi analisada com o programa BLASTP com uso da sequência de aminoácido de N° de Acesso no GenBank AF390174 como a sequência de consulta. Esta análise revelou a presença de um gene previsto em *Emiliana huxleyi* CCMP 1516 que tinha homologia com AF390174. A sequência de proteína é fornecida na ID de SEQ N°:28 e a sequência de nucleotídeo codificante como a ID de SEQ N°:27. A análise BLAST indicou que a sequência de aminoácido de comprimento completo tem homologia com PUFA elongases. O grau máximo de identidade entre a elongase de *Emiliana huxleyi* CCMP 1516 e outras proteínas (BLASTP) foi de 80% com AF390174. O domínio da família GNS1/SUR4 conservado (NCBI domínio conservado pfam01151) foi representado nesta sequência, que tipicamente indicou que a proteína estava envolvida em sistema de alongamento de ácido graxo de cadeia longa.

[00480] A sequência de proteína prevista de *Emiliana huxleyi* CCMP 1516 foi usada para projetar e sintetizar uma sequência de nucleotídeo otimizada por códon que foi a mais adequada para expressão em plantas dicotiledôneas, tal como *Brassica napus* (ID de SEQ N°:29). A construção plasmídeo foi designado 0835668_Emihu-d9E_pMA.

*Isolamento e caracterização das $\Delta 9$ -elongases de *P. pinguis* e *P. salina**

[00481] Para identificar possíveis regiões conservadas dentro das $\Delta 9$ elongases de *P. pinguis* e *P.*

salina, um alinhamento foi executado de sequências de aminoácidos deduzidas de elongase a partir da $\Delta 9$ elongase de *E. huxleyi*, PLL00000665 (a sequência EST de *P. lutheri* a partir de TBestDB identificado por análise BLAST com uso das sequências de elongase de *E. huxleyi* como consulta) e acesso a Genbank AAL37626 ($\Delta 9$ elongase de *I. galbana*). Isto revelou os blocos de sequência de aminoácido em consenso VDTRKGAYR (ID de SEQ N°: 76) e F1HTIMYTY (ID de SEQ N°: 77) que correspondem às posições de aminoácido 40-48 e 170-178, respectivamente, de Emihu-d9E. os iniciadores degenerados 5'- TGGTGGAC ACAAGGAAGGGNGCNTAYMG-3' (ID de SEQ N°:78) e 5'- GTAGGTGT ACATGATGGTRTGDATRAA-3' (ID de SEQ N°:79) foram sintetizado com base nas sequências desses dois blocos e amplificações RT-PCR e PCR com uso de RNA a partir de *P. pinguis* e uma biblioteca de cDNA a partir de *P. salina* (Zhou et al., 2007) foi executada com uso do sistema Superscript III(TM) Platinum® One-Etapa RT-PCR ou Taq DNA polimerase (NEB, Ipswich, MA, EUA).

[00482] Um amplicon de 641 pares de base foi gerado a partir de *P. pinguis* por RT-PCR, ligado em pGEM-T Easy® e sequenciado. Os iniciadores foram designados para estender o fragmento de 641 pares de base por 5' e 3' RACE, a extremidade 3' do gene sendo isolada por RT-PCR com uso do iniciador direto específico de gene 5' - GTCCTTGCTCCAGGGCTTCCACCA-3' (ID de SEQ N°: 80) e o iniciador reverso oligo-dT-SP6 5'- ATTTAGGTGACACTATAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (ID de SEQ N°:81). Este produto foi diluído a 1:10 e 1,0 μ l foi usado como modelo em uma segunda série de PCR com uso de Taq DNA polimerase (NEB) com o iniciador direto específico de gene

5'- TTCCAGAACGAGGGCATCT ACGT-3' (ID de SEQ N°:82) e o mesmo iniciador reverso. Um amplicon de 1079 pares de base foi gerado, ligado em pGEM- T® Easy e sequenciado. A extremidade 5' do gene foi isolada a partir de 1,0 µg de cDNA de *P. pinguis* gerado com o iniciador reverso específico de gene 5'- TTGGGTGATCTGCATGAGCGTGATG-3' (ID de SEQ N°:83) e A-caudado por transferase terminal. Este cDNA foi então usado como modelo para uma reação PCR com uso do iniciador oligo-dT-SP6 e o iniciador específico de gene 5'- CGAAT ACTTGAAGAGCTTGTGGAGA-3' (ID de SEQ N°:84). Este produto foi diluído a 1:10 e 1,0 µl foi usado como modelo em uma segunda série de PCR com uso do iniciador oligo-dT-SP6 e o iniciador específico de gene 5'-GGGCT ACGAGCTGGCAGATGAAGC A-3' (ID de SEQ N°: 85). Um amplicon de 323 pares de base foi gerado, ligado em pGEM-T® Easy e sequenciado. A sequência de comprimento completo foi montada a partir das três sequências parciais. A região codificante de comprimento completo com uma região curta de 5' UTR foi amplificada a partir de RNA total por RT-PCR com uso do iniciador direto 5 '-GAAAAAATGGTTGCGCCACCCATCA-3' (ID de SEQ N°:86) e do iniciador reverso 5 '-TCACTACTTCTTCTTCTTGCCCGCGGC-3' (ID de SEQ N°: 87). Um amplicon de 828 pares de base, Pavpi-Elol, foi gerado e este foi ligado em pGEM- T® Easy e sequenciado (ID de SEQ N°:93). A sequência de aminoácido deduzida da Δ9 elongase de *P. pinguis* é fornecida como ID de SEQ N°: 94.

[00483] Similarmente, um amplicon de 425 pares de base foi gerado a partir de *P. salina* por PCR com uso dos iniciadores degenerados, ligado em pGEM-T Easy® e sequenciado. Os iniciadores foram designados para

estenderem o fragmento de 425 pares de base por 5' e 3' RACE, sendo a extremidade 3' do gene isolada por RT-PCR com uso do iniciador direto específico de gene 5'- TTCCGGTACTC AGCGGTGGCG-3' (ID de SEQ N°:88) e o iniciador reverso oligo-dT-SP6. Um amplicon 776 de pares de base foi gerado, ligado em pGEM- T® Easy e sequenciado. A extremidade 5' do gene foi isolada por PCR a partir da biblioteca de cDNA de *P. salina* com uso do iniciador M13R 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (ID de SEQ N°:89) e um iniciador reverso específico de gene 5'-ACGTAGATGCCCTCGTTCTG-3' (ID de SEQ N°: 90) com PfuUltra II® Fusion DNA polimerase conforme especificado pelo fabricante. Um amplicon 710 de pares de base foi gerado, ligado em pGEM-T® Easy e sequenciado. A sequência de comprimento completo foi montada a partir das três sequências parciais. A região codificante de comprimento completo com uma região curta de 5' UTR foi amplificada a partir do RNA total por RT-PCR com uso do iniciador direto 5 '-CACCGAATGGCGACTGAAGGGATGCC-3' (ID de SEQ N°:91) e o iniciador reverso 5 '-CTACTCGGTTTTTCATGCGGTTGCTGGA-3' (ID de SEQ N°:92). Um amplicon de 846 pares de base, Pavsa-Elo3, foi gerado e este foi ligado em pGEM-T® Easy e sequenciado (ID de SEQ N°:95). A sequência de aminoácido deduzida da $\Delta 9$ elongase de *P. salina* é fornecida como a ID de SEQ N°:96.

Caracterização de função da $\Delta 9$ -elongases em células vegetais

[00484] Todas as regiões codificantes da elongase de *Emiliana* (Emihu-d9E), da elongase de *Pavlova pinguis* (Pavpi-d9E) e da elongase de *Pavlova salina* (Pavsa-d9E), contidas dentro de fragmentos *EcoRI*, a partir dos plasmídeos 0835668_Emihu-d9E_pMA, pGEMT+Pavpi-d9E e

pGEMT+Pavsa-d9E, respectivamente, foram inseridas em 35S-pORE04 no local EcoR1 para gerar 35S:Emihu-d9E (designado pJP3027), 35S:Pavpi-d9E (designado pJP3103), 35S:Pavsa-d9E (designado pJP3081) e 35S:Isoga-d9E (designado pJP2062). As atividades de enzima de Emihu-d9E, Pavpi-d9E e Pavsa-d9E juntamente com Isoga-d9E (Qi et al., 2002), usadas aqui como uma amostra de controle positivo, foram demonstradas em planta com uso de um sistema de expressão transiente de *Nicotiana benthamiana* intensificado conforme descrito no Exemplo 1.

[00485] Esses vetores quiméricos foram introduzidos na cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* e células de culturas dessas infiltradas em tecido de folha de plantas *Nicotiana benthamiana* na estufa. As plantas foram cultivadas por mais cinco dias após a infiltração antes de discos de folha serem tomados para análise GC, que revelou, pela presença do produto de ácido graxo, que ambos os genes estavam funcionando como $\Delta 9$ elongases em células vegetais, tal como da *Nicotiana benthamiana*.

[00486] O tecido de folha transformado a $\Delta 9$ elongase de *Emiliania huxleyi* CCMP1 516 continha 20:2 $\Delta^{11,14}$ (6,6%) e 20:3 $\Delta^{11,14,17}$ (6,4%), que representou eficiências de conversão de LA e ALA de 39,9% e 12,4%, respectivamente. O tecido de folha transformado com a $\Delta 9$ elongase de *Pavlova pinguis* continha 20:2 $\Delta^{11,14}$ (10,1%) e 20:3 $\Delta^{11,14,17}$ (6,6%) que representou eficiências de conversão de 56,0% e 13,3%, respectivamente. O tecido de folha transformado com a $\Delta 9$ elongase de *Pavlova salina* continha 20:2 $\Delta^{11,14}$ (7,7%) e 20:3 $\Delta^{11,14,17}$ (4,6%), que representou eficiências de conversão de 45,0% e 9,2%, respectivamente. O tecido de folha

transformado com a $\Delta 9$ elongase de *Isochrysis galbana* continha 20:2 $\Delta^{11,14}$ (9,2%) e 20:3 $\Delta^{11,14,17}$ (7,5%), que representou eficiências de conversão de 48,9% e 15,4%, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9. Composição de ácido graxo (percentual de total de ácidos graxos) de tecido de folha de *Nicotiana benthamiana* transientemente transformada com $\Delta 9$ elongases. Os desvios padrão entre infiltrações separadas realizadas em triplicata são mostradas.

Ácido graxo	Controle	Emihu- $\Delta 9E$	Pavsa- $\Delta 9E$	Pavpi- $\Delta 9E$	Isoga- $\Delta 9E$
FA Usual					
16:0	15,7 $\pm$ 0,6	14,6 $\pm$ 0,1	15,2 $\pm$ 0,6	14,5 $\pm$ 0,8	14,2 $\pm$ 0
16:1 Δ^{3t}	1,5 $\pm$ 0	1,4 $\pm$ 0	1,3 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0	1,3 $\pm$ 0,1
16:3 $\Delta^{9,12,15}$	6,8 $\pm$ 0,7	6,5 $\pm$ 0,8	6,1 $\pm$ 0,8	6,1 $\pm$ 1,4	7,4 $\pm$ 0,5
18:0	3,0 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,5	3,1 $\pm$ 0,2
18:1 Δ^9	2,2 $\pm$ 0	2,9 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 0,7	3,2 $\pm$ 0,1
18:2 $\Delta^{9,12}$	11,8 $\pm$ 0,4	9,9 $\pm$ 0,1	9,4 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,5	9,7 $\pm$ 0,4
18:3 $\Delta^{9,12,15}$	56,0 $\pm$ 1,4	45,3 $\pm$ 2,2	46,0 $\pm$ 1,4	43,4 $\pm$ 1,8	41,5 $\pm$ 1,3
Outros menores	3,0 $\pm$ 0	3,0 $\pm$ 0	2,3 $\pm$ 0	3,1 $\pm$ 0	2,9 $\pm$ 0
Total	100	87,0	87,7	83,3	83,3
Novo PUFA $\omega 6$					
20:2 $\Delta^{8,11}$	-	6,6 $\pm$ 1,0	7,7 $\pm$ 0,7	10,1 $\pm$ 0,7	9,2 $\pm$ 0,8
20:3 $\Delta^{8,11,14}$	-	-	-	-	-
20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$	-	-	-	-	-
22:4 $\Delta^{7,10,13,16}$	-	-	-	-	-
22:5 $\Delta^{4,7,10,13,16}$	-	-	-	-	-
Total	0	6,6	7,7	10,1	9,2

Novo PUFA $\omega 3$					
20:3 $\Delta^{11,14,17}$	-	6,4 $\pm 1,5$	4,6 $\pm 0,7$	6,6 $\pm 0,4$	7,5 $\pm 0,2$
20:4 $\Delta^{8,11,14,17}$	-	-	-	-	-
20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$	-	-	-	-	-
22:5 $\Delta^{7,10,13,16,19}$	-	-	-	-	-
22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$	-	-	-	-	-
Total	0	6,4	4,6	6,6	7,5
Total novo FA	0	13,0	12,3	16,7	16,7
Total FA	100	100	100	100	100

[00487] A aparentemente alta preferência pelo ALA de substrato $\omega 3$ no tecido de folha era esperado já que a maior parte do substrato de ALA em folhas de *N. benthamiana* está localizada no plastídeo e assim indisponível para alongamento extra plastídico e já que ambos os ALA plastídico e citoplásmico foram isolados da folha durante a metilação direta, a taxa de conversão $\omega 3$ se reduziu artificialmente. As $\Delta 9$ elongases de *E. huxleyi* e *I. galbana* exibiram preferências de substrato idênticas em *N. benthamiana* com taxa de conversão de $\omega 3$ em $\omega 6$ de 0,31. A conversão mais eficiente no agrupamento $\omega 6$ foi vista com a $\Delta 9$ elongase de *P. salina* com 56,0% de substrato sendo convertido. Em contraste, 13,3% do substrato $\omega 3$ foram convertidos, a uma taxa de 0,24. A enzima de *P. pinguis* exibiu a preferência mais alta por substratos $\omega 6$ com uma taxa de conversão de 0,20, que resultou em 45,0% de conversão de $\omega 6$, mas somente 9,2% de conversão de $\omega 3$.

Exemplo 8. Construção de um caminho biossintético,

incluindo $\Delta 9$ elongase para render ARA

Construção de um caminho de delta 9 elongase transgênico

[00488] Um vetor binário que contém a $\Delta 9$ elongase de *Isochrysis galbana* (Nº de Acesso de sequência de aminoácido no GenBank AF390174 - estrutura de leitura aberta fornecida como ID de SEQ Nº:21, sequência de aminoácido como ID de SEQ Nº:22), $\Delta 8$ dessaturase de *Pavlova salina* (Nº de Acesso ABL96296 - estrutura de leitura aberta fornecida como ID de SEQ Nº:23, sequência de aminoácido como ID de SEQ Nº:24) e $\Delta 5$ dessaturase de *Pavlova salina* (Nº de Acesso ABL96295 - estrutura de leitura aberta fornecida como ID de SEQ Nº:25, sequência de aminoácido como ID de SEQ Nº:26) foi construído a partir do vetor binário pJP10lacq. O projeto deste vetor sem os acréscimos de gene é mostrado esquematicamente na Figura 14.

[00489] Primeiro, o fragmento Smal-EcoBN de um clone pBluescript que continha a $\Delta 9$ elongase de *Isochrysis galbana* foi ligado no local Smal de pJP10lacq para render pJP105. O fragmento XhoI de um clone pBluescript que continha a $\Delta 5$ dessaturase de *Pavlova salina* foi ligado no local XhoI de pJP105 para render pJP106. O fragmento NotI de um clone pBluescript que continha a $\Delta 8$ dessaturase de *Pavlova salina* foi ligado no local NotI de pJP106 para render pJP107, o que é mostrado esquematicamente na Figura 15.

[00490] Diversos pontos devem ser notados sobre projeto. Em primeiro lugar, dois dos três genes foram transcritos divergentemente no T-DNA, isto é, distantes um do outro. Isto foi feito para prevenir a transcrição de

qualquer um dos genes sendo direcionada para, e potencialmente interferindo com, a expressão do outro gene e assim maximizando a expressão de ambos. Em segundo lugar, o terceiro gene na construção genético, neste caso codificando a $\Delta 8$ dessaturase, foi espaçado em separado do segundo gene orientado na mesma direção, codificando a $\Delta 9$ elongase, pela inserção de um espaçador. Foi através desta distância de ao menos 1,0kb entre o códon de parada do gene a montante e o códon de iniciação do gene a jusante que se pode reduzir o risco de transcrição do formador que interfere com o seguinte, ou que causa potencialmente o silenciamento de gene. Em terceiro lugar, o 5'-UTR de cada um dos três genes foi modificado para incluir uma sequência líder TMV que era conhecida por fornecer translação eficiente. Qualquer outra sequência 5'UTR que é conhecida por conferir alta eficiência de translação poderia ter sido usada ao invés da sequência TMV. O pJP107 foi introduzido na cepa AGLI de *Agrobacterium* por eletroporação e a cepa transformada usada para introduzir a construção genético em *Arabidopsis thaliana*, ecotipo MC49, que foi um mutante fad3/fael com altos níveis de LA ao substrato de ácido graxo com início potencial para a $\Delta 8$ dessaturase. A análise e transformação vegetal foram executadas com uso do método de imersão floral (Clough e Bent, 1998). As sementes (sementes T1) das plantas tratadas (plantas T0) foram plantadas em meio seletivo com higromicina (20 mg/L) e as plantas transformadas foram selecionadas para solo para estabelecer 24 plantas transgênicas T1 confirmadas. Esperava-se que a maioria dessas plantas T1 fosse heterozigótica pela construção genética introduzida. As

sementes T2 das 24 plantas transgênicas foram coletadas em maturidade e analisadas por composição de ácido graxo. Essas linhas T2 incluíram linhas que eram homozigóticas pela construção genética assim como aquelas que eram heterozigóticas. As plantas T2 foram estabelecidas a partir das sementes T2 para as 6 linhas que continham os mais altos níveis de ARA, usando seleção em meio MS que continha higromicina (20 mg/mL) para determinar a presença dos transgenes. Por exemplo, as sementes T2 foram plantadas a partir da planta T1 designada FW-IO, que continha 5,8% de ARA e mostrava a 3:1 de taxa de segregação de resistência à progênie no meio de higromicina, o indica que a FW-IO continha a construção genético em um único local genético single. Os perfis de ácido graxo de sementes T3 divididas a partir da FW-10 foram analisadas e os dados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Composição de ácido graxo de semente transformada de *Arabidopsis* com a construção genético pJP107 que contém os genes $\Delta 9$ elongase de *Isochrysis galbana*, $\Delta 8$ dessaturase de *Pavlova salina* e $\Delta 5$ dessaturase de *Paylova salina*.

	FW10-23	Controle MC49
Amostra	P1235	P1254
14:0	0,0	0,1
16:1 ω 7	0,6	0,4
16:0	9,5	8,4
18:2 ω 6	30,9	50,9
18:3 ω 3	0,0	1,0
18:1 ω 9	21,4	30,9

18:1 ω 7	3,3	3,5
18:0	4,3	3,4
20:4 ω 6	21,0	0,0
20:5 ω 3	1,3	0,0
20:3 ω 6	1,1	0,0
20:4 ω 3*	0,2	0,0
20:2 ω 6	2,6	0,0
20:3 ω 3	0,2	0,0
20:1 ω 9/ ω 1	1,6	0,2
20:0	0,7	0,5
22:4 ω 6	0,8	0,0
22:5 ω 3	0,0	0,0
22:0	0,0	0,2
24:1 ω 11/13	0,2	0,1
24:0	0,2	0,2
Soma	100	100
Soma PUFA ω 6	56	51
% de conversões		
Δ 9E		
LA $\rightarrow$ 20:2 ω 6	45	0
ALA $\rightarrow$ 20:3 ω 3	100	0
Δ 8D		
20:2 ω 6 $\rightarrow$ 20:3 ω 6	90	0
20:3 ω 3 $\rightarrow$ 20:4 ω 3	88	0
Δ 5D		
20:3 ω 6 $\rightarrow$ 20:4 ω 6	95	0

20:4 ω 3 $\rightarrow$ 20:5 ω 3	90	0
---	----	---

[00491] Conforme sumarizado na Tabela 10, semente de *Arabidopsis* formada não trans (ecotipo MC49) continha quantidades significantes do LA de substrato ω 6 de precursor, mas não continha qualquer ARA ou os ácidos graxos intermediários que se esperava que ocorressem ao longo do caminho de Δ 9 elongase. Em contraste, a semente da planta transformada FW 10-23 que continha a construção pJP107 continha níveis significantes de 20:2n-6, 20:3n-6 e 20:4n-6 (ARA), incluindo 21% de ARA, o produto das três etapas enzimáticas que se iniciou com LA. Além disso, o baixo nível de ALA no óleo de semente (1,0% em controle MC49) foi muito eficientemente convertido em EPA, que estava presente a um nível de 1,3% na linha transformada FW 10-23.

Discussão: Eficiências de conversão e implicações bioquímicas

[00492] As eficiências relativas das etapas enzimáticas individuais codificadas pela construção pJP107 poderiam ser avaliadas examinando-se a percentagem de conversão de substrato de ácido graxo em produtos de ácidos graxo (incluindo subsequentes derivativos) em FW-IO- 23. No agrupamento ω 6, a Δ 9 elongase de *Isochrysis galbana* mostrou 45% de conversão de LA em EDA e subsequentemente ácidos graxos dessaturados. Na mesma semente, a Δ 8 dessaturase e a Δ 5 dessaturase de *Pavlova salina* mostraram eficiências de conversão de 90% e 95%, respectivamente dos ácidos graxos ω 6 em seus produtos relevantes. Em comparação, no agrupamento ω 3, a Δ 9 elongase de *Isochrysis galbana* mostrou essencialmente 100% de conversão de ALA em produtos

alongados, enquanto a $\Delta 8$ dessaturase e a $\Delta 5$ dessaturase *Pavlova salina* mostraram eficiências de conversão de 88% e 90%, respectivamente. Essas etapas enzimáticas resultaram na síntese de 1,3% de EPA, mesmo que a *Arabidopsis thaliana* MC49 antecedente contivesse somente baixos níveis de ALA. No resultado mais dramático, foi notado que o ALA não foi detectado no óleo de semente, o que indica essencialmente 100% de conversão de ALA em produtos alongados de ALA pela $\Delta 9$ elongase.

[00493] É interessante notar que os níveis de ácidos graxos intermediários incomuns encontrados em FW- 10-23 foram baixos (<0,4% no agrupamento $\omega 3$) e comparáveis àqueles encontrados na cadeia alimentícia em vários frutos do mar (Tabela 11). Mesmo que óleos de semente MC49 formados sem trans contivessem somente baixos níveis de ALA e isto pudesse ter contribuído para os baixos níveis observados, por exemplo, do ácido graxo intermediário ETrA, era previsto que quando o mesmo caminho fosse montado em um antecedente genético que tem níveis altos de ALA, o óleo de semente resultante poderia ainda ter níveis relativamente baixos (<3%) de ETrA. A presença de tais baixos níveis desses intermediários foi provável devido à dessaturação bastante eficiente dos intermediários de $\Delta 9$ alongada.

Tabela 11. Comparação dos ácidos graxos em semente transformada de *Arabidopsis* com a construção genético pJP107 que contém os genes $\Delta 9$ elongase de *Isochrysis galbana*, $\Delta 8$ dessaturase de *Pavlova salina* e $\Delta 5$ dessaturase de *Pavlova salina* e os ácidos graxos intermediários encontrados em uma faixa de amostras de frutos do mar.

	P1235	Frutos do Mar	
--	-------	---------------	--

Amostra		Média	faixa - máximo
14:0	0,0	1,7	31,1
16:1 ω7	0,6	2,9	8,2
16:0	9,5	18,7	53,6
18:2 ω6	30,9	1,9	14,6
18:3 ω3*	0,0	0	0
18:1 ω9	21,4	13,9	59,5
18:1 ω7	3,3	3	7,9
18:0	4,3	8,5	14,7
20:4 ω6	21,0	6,7	19,1
20:5 ω3	1,3	7,1	22,2
20:3 ω6	1,1	0,3	1,5
20:4 ω3	0,2	0,5	2,8
20:2 ω6	2,6	0,4	1,8
20:3 ω3*	0,2	0	0
20:1 ω9/ω11	1,6	2,2	21,1
20:0	0,7	0,4	4,2
22:4 ω6	0,8	1	4,4
22:5 ω3	0,0	2,4	14,9
22:0	0,0	0,2	0,7
24:1 ω911/13*	0,2	0	0
24:0	0,2	0,2	1,6
Soma PUFA ω6	56	10	41
% de conversão			
Δ9E			
LA → 20:2 ω6	45	82	
ALA → 20:3 ω3	100	100	

$\Delta 8D$			
20:2w6 $\rightarrow$ 20:3 $\omega 6$	90	95	
20:3w3 $\rightarrow$ 20:4 $\omega 3$	88	100	
$\Delta 5D$			
20:3w6 $\rightarrow$ 20:4 $\omega 6$	95	96	
20:4w3 $\rightarrow$ 20:5 $\omega 3$	90	95	

[00494] Vale a pena notar que a $\Delta 8$ dessaturase de *Pavlova salina* foi consideravelmente mais eficiente na conversão de ETrA em ETA do que outras $\Delta 8$ dessaturases reportadas, em particular quando co-expressa com a $\Delta 9$ elongase e a $\Delta 5$ dessaturase. Por exemplo, foi reportado que quando a $\Delta 8$ dessaturase de *Euglena gracilis* foi co-expressa com qualquer uma dentre a $\Delta 9$ elongase de *Euglena gracilis* ou de *Isochrysis galbana* em embriões de soja, as eficiências de conversão de substratos $\omega 3$ e $\omega 6$ foram de 64% e 73%, respectivamente. A eficiência de cada etapa observada no experimento descrito acima e a eficiência de conversão geral de ALA em EPA foi também muito mais alta que a reportada por Qi et al. (2004) em folhas de *Arabidopsis*, onde se observou somente 3,0% de EPA e níveis substanciais dos intermediários não desejados incluindo ETrA (4,6%).

[00495] As elongases são conhecidas por somente acessarem substratos no agrupamento acil-CoA. O fato de que as etapas subsequentes de $\Delta 8$ dessaturase e $\Delta 5$ dessaturase terem sido observadas funcionando em eficiência extremamente alta nas sementes transformadas mesmo que o

produto de $\Delta 9$ alongada tenha sido produzido indubitavelmente no agrupamento acil-CoA foi uma forte indicação de que ambas as dessaturases de *Pavlova salina* eram capazes de acessar substratos acil-CoA com altas eficiências.

Biossíntese de altos níveis de ARA e EPA com uso do caminho de $\Delta 9$ elongase

[00496] A partir desses dados e das observações sobre eficiência das etapas individuais, foi que seria possível gerar altos níveis de ARA e EPA e subsequentemente DPA e DHA em plantas transgênicas, tal como a *Arabidopsis*, canola, soja, linhaça ou algodão com uso de um caminho de $\Delta 9$ elongase modificado. Foi ademais previsto que mesmo níveis mais altos podem ser produzidos com mais adição de qualquer uma das três funções enzimáticas, especialmente uma função de $\Delta 12$ dessaturase acil-CoA para aumentar a quantidade de substrato de LA disponível no agrupamento acil-CoA para alongamento de $\Delta 9$, em segundo lugar, a adição de uma $\Delta 15$ dessaturase para aumentar o nível de ALA para conversão direta em EPA, e em terceiro lugar uma $\Delta 17$ dessaturase que pode converter ARA em EPA tal como o descrito no Exemplo 6. Mais preferencialmente, a adição de ambas uma $\Delta 12$ dessaturase acil-CoA e qualquer uma dentre a $\Delta 15$ dessaturase ou a $\Delta 17$ dessaturase poderia fornecer níveis máximos. Assim, espera-se que o uso de enzimas capazes de acessar substratos no agrupamento acil-CoA resulte em conversão mais eficiente em EPA, DHA e DHA.

[00497] A síntese observada de 1,3% EPA foi extraordinária e inesperada considerando-se que o antecedente de *Arabidopsis thaliana* MC49 continha mutação

afad3 que resultou em baixos níveis de acumulação de ALA (1 a 3%). Previu-se que quando estes, ou similares, caminhos de $\Delta 9$ elongase ($\Delta 9$ elongase, $\Delta 8$ dessaturase e $\Delta 5$ dessaturase) fossem transformados em uma planta que contém altos níveis de ALA, altos níveis de EPA resultariam. Por exemplo, previu-se que a transformação deste caminho em uma linha de *Arabidopsis* que expressam altamente a $\Delta 15$ dessaturase de *Perilla frutescens* ou outros genes de $\Delta 15$ dessaturase resultaria em níveis de EPA de ao menos 25% do total de ácido graxo em óleo de semente.

Exemplo 9. Expressão de genes de caminho PUFA em células vegetais

[00498] Uma alternativa à transformação estável de plantas é a expressão transiente de transgenes em folhas, tal como aquela primeira introduzida por Kapila et al (1997). Com esta técnica, núcleos de células de folha permissivas (Zipfel et al., 2006) são transformadas por meio de infiltração de espaços de ar abaxiais com culturas de *Agrobacterium* que abrigam construções de expressão dentro de fronteiras de TDNA. A expressão de transgenes em folhas é significativamente intensificado pela co-introdução de proteínas de supressão viral, tal como P19 (Voinnet et al., 2003) e HC-Pro (Johansen e Carrington, 2001; Kasschau et al., 2003), que inibem o aparelho que silencia transgenes das células hospedeiras e estendem a expressão por um período mais longo de tempo.

[00499] As folhas têm um metabolismo de lipídio complexo que é dominado pelos grandes agrupamentos de galactolipídios plastidiais monogalactosil diacilgliceróis (MGDG) e digalactosil diacilgliceróis (DGDG). Agrupamentos

menores de ácidos graxos existem fora dos compartimentos plastidiais incluindo aqueles esterificados em fosfatidilcolina (PC), coenzima A (CoA) e mono e diacilglicerídeos (MAG, DAG; Ohlrogge e Browse, 1995). As enzimas de síntese de LC-PUFA usadas neste Exemplo residem no retículo endoplasmático (ER; Napier, 2007) onde têm acesso aos agrupamentos de lipídio relativamente menores esterificados em PC e CoA. Os produtos metabólicos de reações ligadas de PC-CoA, tais como aquelas ativas no ER, podem ser acumulados em triacilglicerídeos (TAG) pela alta expressão de um diacilglicerídeo-O-aciltransferase (DGAT; Bouvier-Nave et al., 2000). Comparados a MAG ou DAG, os ácidos graxos que residem em TAG são mais metabolicamente inertes e são menos propensos a reentrar em caminhos biossintético de lipídio ou trafegar em plastídeos. De forma importante, o TAG pode ser facilmente separado das classes de lipídio mais abundantes que residem em plastídeos de folha com uso de técnicas de cromatografia de camada fina padrão (TLC). Sendo assim, uma combinação de acumulação de TAG intensificada e purificação de classe de TAG/lipídio poderiam ser úteis para entender mais completamente as reações da enzima LC-PUFA no ER de folha.

[00500] Este sistema foi testado para produção de LC-PUFA com uso de genes que codificam dessaturases e elongases neste Exemplo.

Construção de plasmídeos para expressão transiente

[00501] Vetores binários foram preparados clonando-se a região codificante do gene formando uma versão modificada do vetor binário pORE04 descrito por Coutu et al (2007) em que o promotor de Vírus do Mosaico de Couve-flor

(CaMV) 35S foi clonado no local Sfol site para render 35S-pORE04. A região codificante do gene de $\Delta 9$ elongase de *I. galbana* (Acesso do Genbank AAL37626) (ID de SEQ N°:21) foi amplificada a partir do DNA genômico clonado formando 35S-pORE04 no local *EcoRI*. Versões otimizadas por códon de expressão vegetal das três dessaturases de *P. salina* (acessos do Genbank ABL96296, ABL96295 e AAY15136 - cada uma descrita na WO 2005/103253) foram clonadas nos locais *EcoRV*-*SmaI* do 35S-pORE04 como inserções *SmaI*. A $\Delta 5$ elongase de *P. salina* não otimizada (acesso do Genbank AAY15135) foi clonada como um fragmento *XhoI*-*XbaI* formando 35S-pORE04 nos locais *XhoI*-*NheI*. Uma versão do 35S-driven CaMV do supressor viral P19 foi gentilmente doada pelo Dr. Peter Waterhouse. A região codificante do gene de *A. thaliana* DGAT1 (acesso do Genbank AAF 19262) (ID de SEQ N°: 74) foi obtida por RT-PCR e foi clonada como um fragmento *BamHI*-*EcoRV* nos locais correspondentes em 35S-pORE04. O RNA total foi isolado a partir de *Phytophthora infestans* com uso de um mini kit RNeasy (QIAGEN) e Platinum Superscript III One-Etapa (QIAGEN) RT-PCR realizado. O amplicon resultante que continha a região codificante de proteína de $\Delta 17$ dessaturase de *P. infestans* (WO 2005/012316) foi clonado formando pGEMT-Easy (Promega) e sequenciado. O fragmento *EcoRI* foi então clonado formando 35S-pORE04.

Infiltrações de bactéria do solo e condições de cultivo de N. benthamiana

[00502] A cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* que abriga cada vetor binário foi cultivada a 28°C in LB caldo suplementado com os antibióticos apropriados. As culturas foram centrifugadas e suavemente resuspensas em dois

volumes de tampão de infiltração (5 mM de MES, 5 mM de MgSO₄, pH de 5,7, 100 µM acetosiringona) e cultivados por mais 3 horas. As densidades óticas de cada cultura foram medidas e uma combinação final de culturas foi preparada de forma que cada construção de *Agrobacterium* se igualou a OD_{600nm} 0,2 ou conforme de outra forma indicado pela Figura 16. As células foram infiltradas, conforme descrito por Voinnet et al. (2003), na parte de baixo de folhas de plantas *N. benthamiana* de um mês de vida que foram abrigadas em um ambiente de cultivo 23°C com 10:14 de ciclo claro/escuro. As áreas infiltradas foram circuladas por um marcador permanente. Seguindo-se à infiltração, as plantas foram deixadas a 28°C por uma hora após a qual foram transferidas para um ambiente de cultivo de planta a 24°C até a análise. A não ser que de outra forma indicado, todas as agroinfiltrações de *N. benthamiana* foram realizadas na presença de uma construção binário que continha a proteína de supressão viral P19.

Análise de lipídio

[00503] Os perfis de ácido graxo de tecidos de folha amostras de classe de lipídio foram analisadas neste Exemplo por GC e GC-MS após a transmetilação com uso de uma solução de metanol/ HCl/ diclorometano (DCM; 10/1/1 por volume) a 80°C por 2 horas para produzir metilésteres de ácido graxo (FAME). Os FAME foram extraídos em hexano:DCM (4:1, v/v) e reconstituídos em DCM antes da análise por GC e GC-MS.

[00504] Para a análise de classe de lipídio, os lipídios totais foram extraídos duas vezes de aproximadamente 50 mg de peso fresco de tecido de folha

infiltrado com uso do método descrito por Bligh e Dyer (1959). Lipídios neutros foram purificados por TLC em placas de gel de sílica pré-revestidas (Silica gel 60, Merck) com hexano/ dietil éter/ ácido acético (70/30/1 por vol.), enquanto lipídios polares foram fracionados com uso de TLC bidimensional, clorofórmio/ metanol/ água (65/25/4 por vol.) para a primeira direção e clorofórmio/ metanol/ NH₄OH/ etilpropilamina (130/70/10/1 por vol.) para a segunda direção (Khozin et al., 1997). Os pontos de lipídio foram visualizados por vapor de iodo, coletados em frascos e transmetilados para produzir FAME para análise GC conforme descrito acima. O TAG foi quantificado como a quantidade total de ácidos graxos presentes, que foi estimada por análise GC conforme mencionado acima e de acordo com a quantidade conhecida de padrões externos injetados para cada ácido graxo.

[00505] A GC foi realizada com uso de um Agilent Technologies 6890N GC (Palo Alto, Califórnia, EUA) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida Equity™-1 não polar (15 m x 0,1 mm i.d., 0,1 µm de espessura de filme), um FID, um injetor com/sem divisor e um amostrador e injetor automático Agilent Technologies 7683 Series com uso de hélio como o gás portador. As amostras foram injetadas em modo sem divisão a uma temperatura de secagem de 120°C e após a injeção, a temperatura de secagem foi elevada a 201°C em 10°C.min⁻¹ e finalmente a 270°C e mantida por 20 min. Os picos foram quantificados com o software Agilent Technologies ChemStation (Rev B.03.01 (317), Palo Alto, Califórnia, EUA). As respostas de pico foram similares para os ácidos graxos de padrão-411 de GLC Nu-Check autêntico

(Nu-Check Prep Inc, MN, EUA) que contém proporções iguais de 31 diferentes metil ésteres de ácido graxo, na faixa de octanoato a DHA e diversos outros LC-PUFAs. Variações leves de respostas de pico dentre os picos foram equilibradas multiplicando-se as áreas de pico por fatores de normalização de cada pico. A proporção de cada ácido graxo no total de ácidos graxos foi calculada com base em áreas de pico individuais e totais dos graxos.

[00506] A GC-MS foi realizada para confirmar a identidade de todos os novos ácidos graxos formados e foi executada em uma armadilha de íons (*ion-trap*) Finnigan GCQ Plus GC-MS adaptado com conjunto de injeção sobre coluna a 45°C. As amostras foram injetadas com uso de um amostrador automático AS2000 em uma lacuna de retenção presa a uma coluna de fase HP-5 Ultra 2 não polar (50 m x 0,32 mm i.d. x 0,17 µm de espessura de filme). A temperatura inicial de 45°C foi mantida por 1 minuto, seguida por uma programação de temperatura com um aumento de 30°C.min⁻¹ a 140°C então a 3°C.min⁻¹ a 310°C onde foi mantida por 12 minutos. Foi usado hélio como o gás portador. As condições de operação do espectrômetro de massa foram: energia de impacto de elétron de 70 eV; corrente de emissão de 250 µamp, linha de transferência de 310°C; temperatura de fonte de 240°C; taxa de varredura de 0,8 scans.s⁻¹ e faixa de massa de 40 a 650 Dalton. Os espectros de massa foram adquiridos e processados com o software Xcalibur™.

[00507] Modificando o perfil de ácido graxo de *N. benthamiana* com uma elongase de ácido graxo expressa transientemente

[00508] Para estimar a concentração de *Agrobacterium*

necessária para gerar produção máxima de uma enzima transgênica funcional, um gene foi expresso, o qual codifica a $\Delta 9$ -elongase de *Isochrysis galbana* (Ig $\Delta 9$ elo; Qi et al., 2002), que era conhecida por agir sobre o ácido linoleico ligado (LA) por CoA e substratos os ALA eram conhecidos por serem abundantes em folhas de *N. benthamiana*. Seguindo-se à transferência deste gene em um vetor binário a jusante do promotor 35S do Vírus do Mosaico de Couve-flor (CaMV), esta construção foi agroinfiltrado em folhas de *N. benthamiana* na presença da proteína de supressão viral P19 para suprimir silenciador de transgenes mediado por hospedeiro e o nível de $\Delta 9$ -elongation avaliado. Os produtos de alongamento de LA e ALA, EDA e ETrA, respectivamente, foram detectados com atividade de gene próxima ao máximo obtida com culturas de *Agrobacterium* que têm $OU_{600} = 0,2$ (Figura 16). Foi interessante notar, no entanto, que as agroinfiltrações de concentrações bem diluídas da cultura (tão baixa quanto $OU_{600} = 0,05$) também resultaram em níveis facilmente detectáveis de atividade de enzima.

Efeito de expressão de DGAT transiente em acumulação de triacilglicerol

[00509] Foi em seguida investigado se o tamanho do agrupamento TAG em folhas de *N. benthamiana* poderia ser aumentado para fornecer um tanque maior no qual se capturassem os produtos das enzimas biossintéticas de ácido graxo introduzidas no ER. Uma construção que continha o gene de *Arabidopsis thaliana* DGAT1 (AtDGAT1) que catalisa a última etapa na biossíntese de TAG pelo caminho Kennedy foi testado com o um possível meio de aumentar o agrupamento

TAG nas folhas, já que as folhas naturalmente produzem somente baixos níveis de TAGs. A construção foi introduzida em folhas de *N. benthamiana* por agroinfiltração conforme acima. Para testar a presença de TAGs, segmentos de folhas infiltradas de aproximadamente 1 cm de tamanho foram submersas em uma pequena placa de Petri que continha 1% de Nile Blue aquoso (BDH, Poole, UK), infiltrado a vácuo por 3 minutos, lavado brevemente em água, incubado em 1% de ácido acético por 3 minutos e montado em água para observação. A emissão de fluorescência foi coletada em 570 a 670 nm com uso de uma excitação de 488 nm em um microscópio confocal de varredura a laser Leica SP2 (Leica Microsystems, Sydney, Austrália). Os vetores não transformados das mesmas folhas foram usados como controles. As quantidades relativas de acumulação de TAG em cada ensaio foram estimadas com uso do software ImageJ.

[00510] A expressão transiente da *Arabidopsis thaliana* DGAT1 (*AtDGAT1*) resultou na produção de significativamente mais corpos de lipídio que foram marcados com Nile Blue e observados com uso de um microscópio confocal. O aumento em TAG foi quantificado fracionando-se o total de lipídios em TAG, com uso de separação de TLC de fase neutra neutra a partir de outras classes de lipídios de folha, após a qual a quantidade de TAG foi medida como a quantidade de ácidos graxos totais na fração de TAG. A expressão transiente de P19 ou P19 e *AtDGAT1* juntamente resultaram em um aumento em TAG de 46 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco para 206 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco, respectivamente, o que mostra que a adição do gene DGAT1 aumentou os níveis de TAG que se acumulou em tecido de folha. Sendo assim, este gene

foi incluído em experimentos subsequentes, a não ser que de outra forma indicado.

Disponibilidade de substratos de ácido graxo exógeno para genes transientemente expressos

[00511] Foi em seguida examinado se um substrato de ácido graxo exógeno que não era nativo a *N. benthamiana* poderia ser fornecido à folha e se tornar disponível para conversão mediada por transgenes, permitindo assim que etapas enzimáticas individuais sejam testadas em isolamento. Para este teste, $\Delta 17$ dessaturase de *Phytophthora infestans* que codifica gene (*Pi $\Delta 17$ des*) que age sobre o ARA, um substrato não naturalmente presente em *N. benthamiana*, foi agroinfiltrado para produzir EPA. Quatro dias após a infiltração com *Pi $\Delta 17$ des*, a folha foi alimentada com um sal de amônia ARA por injeção de uma maneira similar àquela realizada para transformar a folha com culturas de *Agrobacterium*. Permitiu-se então que a folha metabolizasse o substrato por quatro horas antes que os lipídios totais fossem extraídos do tecido de folha. A análise GC e GC-MS desses lipídios totais mostrou que 37% do ARA alimentado de forma exógena foram convertidos por dessaturação de $\Delta 17$ em EPA, uma eficiência comparável àquela reportada em ensaios baseados em levedura (WO 2005/012316).

Montagem rápida de caminhos de LC-PUFA em cinco etapas a partir de vetores binários separados

[00512] Tendo sido estabelecido que o sistema de *N. benthamiana* foi uma ferramenta útil para determinar a função de um único transgene e acumulação de TAG intensificada, a extensão na qual o sistema poderia ser

usado para montar todos os caminhos de LC-PUFA foi investigada. Neste estudo, genes que codificam cinco enzimas metabólicas LC-PUFA foram testadas, que produzem dois caminhos de LC-PUFA lineares paralelos, principalmente o caminho $\omega 6$, que converte LA em DPA $\omega 6$, e o caminho $\omega 3$, que converte ALA em DHA (Figura 1). Os genes biossintético usados foram a $\Delta 9$ elongase de *Isochrysis galbana* (*Ig $\Delta 9$ elo*), $\Delta 8$ dessaturase de *Pavlova salina* (*Ps $\Delta 8$ des*), $\Delta 5$ dessaturase de *P. salina* (*Ps $\Delta 5$ des*), $\Delta 5$ elongase de *P. salina* (*Ps $\Delta 5$ elo*) e $\Delta 4$ dessaturase de *P. salina* (*Ps $\Delta 4$ des*; Qi et al., 2004; Robert et al., 2009; Zhou et al., 2007). Cada gene foi clonado separadamente em um vetor de expressão binário a jusante do promotor 35 S de CaMV conforme descrito acima e uma mistura dessas construções, cada um presente a uma concentração de OD_{600nm} = 0,2, foi agroinfiltrado nas superfícies abaxiais de folhas de *N. benthamiana* ao longo de AtDGAT1 e P 19, fazendo um total de sete construções individuais com um total de OD_{600nm} = 1 a 4.

[00513] Cindo dias após a infiltração, discos de folha foram amostrados e metil ésteres de ácido graxo (FAME) foram produzidos diretamente a partir do tecido fresco e analisados e identificados por GC/MS (Tabela 12). Ficou claro que todas as enzimas de caminho foram capazes de aceitar tanto o PUFA $\omega 6$ quanto $\omega 3$ como substratos e que sua ação sequencial sobre LA ou ALA, levou à síntese do LC-PUFA, ARA e DHA, respectivamente. Uma percentagem total de LC-PUFA recentemente produzidos de 16,9% foi identificada, incluindo 9,8% de LC-PUFA $\omega 6$ e 7,1% de LC-PUFA $\omega 3$. De todos esses LC-PUFA recentemente formados, ARA, EPA e DHA são considerados nutricionalmente importantes e constituíram

3,6%, 2,6% e 1,1%, respectivamente, do total de ácidos graxos nos tecidos de folha. As eficiências enzimáticas de conversão foram calculadas para cada grupo dos caminhos $\omega 6$ e $\omega 3$ e comparadas àquelas de relatórios prévios (Figura 17). As três primeiras etapas de ambos os caminhos em cinco etapas de $\omega 6$ e $\omega 3$ foram similares em eficiência comparados àqueles descritos por Qi et al. (Qi et al., 2004), enquanto as eficiências das duas últimas etapas dos caminhos foram as mesmas que aquelas usadas por Robert et al. (Robert et al., 2005). Esta comparação de genes expressos transientemente indicou que ambos os métodos para introduzir caminhos geram fluxos ou eficiências metabólicas similares. Essas eficiências de conversão calculadas sobre os perfis de total de ácido graxo são provavelmente para serem subestimadas, especialmente para a primeira etapa, um alongamento $\Delta 9$, devido ao efeito de diluição de grandes agrupamentos de LA e ALA no plastídeo. Este problema foi tratado por fracionamento de classes de lipídio conforme segue.

Tabela 12. Perfis de ácido graxo de pontos de folha de *N. benthamiana* que produzem ambos os LC-PUFAs $\omega 6$ e $\omega 3$. Cada infiltração continha uma mistura de culturas de *Agrobacterium* que abrigam construções de expressão ectópica do supressor viral P19 isolado a partir do Vírus de Atrofia do Tomateiro e o diacilglicerol O-aciltransferase de *Arabidopsis thaliana* (AtDGKIX). As infiltrações de caminho de LC-PUFA incluem cinco genes extras, que são, $\Delta 9$ elongase de *Isochrysis galbana* (Ig $\Delta 9$ elo), $\Delta 8$ dessaturase de *Pavlova salina* (Ps $\Delta 8$ des), $\Delta 5$ dessaturase de *P. salina* (Ps $\Delta 5$ des), $\Delta 5$ elongase de *P. salina* (Ps $\Delta 5$ elo) e $\Delta 4$ dessaturase de *P.*

salina (*PsΔ4des*). Para esclarecimento, ácidos graxos saturados e menores não foram incluídos na tabela, mas foram usados para cálculo de percentagens. O símbolo (-) indica quantidades não detectáveis de ácido graxo. Os dados foram gerados a partir de 3 réplicas e erros padrão são mostrados.

Total FAME (%)

Ácido graxo	Controle	5 genes LC-PUFA
16:0	15,9 _{±0,2}	20,1 _{±0,9}
16:1 ^{Δ3t}	1,7 _{±0,1}	1,5 _{±0,2}
16:3 ^{Δ9,12,15}	6,3 _{±0,3}	5,2 _{±0,3}
18:0	3,6 _{±0,3}	3,7 _{±0,2}
18:1 ^{Δ9}	2,8 _{±0,1}	3,1 _{±0,7}
18:2 ^{Δ9,12} (LA)	18,6 _{±0,1}	8,0 _{±0,7}
18:3 ^{Δ9,12,15} (ALA)	45,5 _{±1,4}	38,0 _{±1,9}
20:0	1,3 _{±0,4}	0,8 _{±0}
Outros menores	4,1	2,6
Total	100	83,1
Novo PUFA ω6		
20:2 ^{Δ11,14} (EDA)	0	1,4 _{±0,2}
20:3 ^{Δ8,11,14} (DGLA)	0	0,3 _{±0}
20:4 ^{Δ5,8,11,14} (AA)	0	3,6 _{±0,4}
22:4 ^{Δ7,10,13,16} (DTA)	0	1,5 _{±0,1}
22:5 ^{Δ4,7,10,13,16} (DPA ^{ω6})	0	3,0 _{±0,4}
Total	0	9,8
Novo PUFA ω3		
20:3 ^{Δ11,14,17} (ETrA)	0	2,3 _{±0,1}

20:4 ^{Δ8,11,14,17} (ETA)	0	0,2 ₊₀
20:5 ^{Δ5,8,11,14,17} (EPA)	0	2,6 _{+0,3}
22:5 ^{Δ7,10,13,16,19} (DPA ^{ω3})	0	0,9 _{+0,1}
22:6 ^{Δ4,7,10,13,16,19} (DHA)	0	1,1 _{+0,1}
Total	0	7,1
Total de novos ácidos graxos	0	16,9
Total de ácidos graxos	100	100

Partição de Classes de Lipídio de LC-PUFA

[00514] A fim de avaliar a partição do LC-PUFA sintetizado recentemente entre fosfolipídios TAG e galactolipídios plastidiais, os lipídios totais de folhas de *N. benthamiana* que expressam transientemente os genes de caminho LC-PUFA foram sujeitos a fracionamento de classe de lipídio conforme descrito acima e seus perfis de ácido graxo foram determinados (Tabela 13). Os lipídios da folha de *N. benthamiana* contêm classes de lipídios e perfis de ácido graxo típicos de folhas de plantas mais altas (Fraser et al., 2004; Moreau et al., 1998). Ambos os LC-PUFA $\omega 6$ e $\omega 3$ recentemente sintetizados foram predominantemente confinados em classes de lipídio tipicamente encontradas fora do plastídeo enquanto os lipídios plastidiais foram essencialmente esvaziados desses ácidos graxos. Por exemplo, TAG e fosfolipídios (PC, PE e PA) - os lipídios de folha extraplastidiais dominantes - continham até 20,4% e 16,9% de LC-PUFA $\omega 6$ e $\omega 3$ recentemente sintetizados, respectivamente. Extraordinariamente, as folhas que expressam os caminhos completos de LC-PUFA, AtDGAT1 e P19 produziram TAG enriquecido com 37% de LC-PUFA. De

particular interesse foi a acumulação dos ácidos graxos de importância nutricional importantes ARA, EPA e DHA, presente a 7,2%, 5,9% e 3%, respectivamente, no TAG da folha. O fracionamento revelou que as classes de lipídios plastidiais dominantes, MGDG, DGDG e PG, continham somente 1,1% e 0,3% do LC-PUFA $\omega 6$ e $\omega 3$ recentemente sintetizados, respectivamente. Embora essas classes de lipídios plastidiais representem os maiores agrupamentos de ácidos graxos na folha, coletivamente, essas classes continham somente uma pequena quantidade de LC-PUFA $\omega 6$ e $\omega 3$ comparada ao TAG. De forma interessante, a classe de lipídio SQDG foi totalmente esvaziada do LC-PUFA recentemente sintetizado.

[00515] Os fracionamentos de classes de lipídio foram também usados para calcular as eficiências enzimáticas em cada etapa dos caminhos de LC-PUFA que estão associados ao ER para os ácidos graxos em TAG, que não têm acesso aos lipídios plastidiais (Figura 17). A remoção das classes de lipídios plastidiais desses cálculos teve o efeito mais drástico sobre a etapa de alongamento de $\Delta 9$ para ALA formando ETrA, o que aumenta as eficiências de conversão de 16% para 55%. Este aumento de três vezes na eficiência de conversão de enzima nesta etapa se deve à grandes agrupamentos de ALA em plastídios que estão indisponíveis para esta enzima ligada por ER (Tabela 13).

Tabela 13. Perfis de ácido graxo de classes de lipídio de *N. benthamiana* que expressam P 19, AtDGAT1 e os cinco genes LC-PUFA conforme descrito na Tabela 12. Os dados para TAG foram gerados a partir de separações de classe de lipídio com uso de TLC unidimensional e as outras classes de lipídio foram separadas em TLC bidimensional. Os

experimentos foram conduzidos em triplicata e os erros padrão são mostrados.

	Extra-Plastidial				Plastidial			
Ácido Graxo	TAG	PC	PE	PA	MGDG	DGDG	SQDG	PG
16:0	22,6 $\pm$ 0,6	24,3 $\pm$ 0,8	23,0 $\pm$ 0,4	22,5 $\pm$ 0,8	4,7 $\pm$ 0,5	20,9 $\pm$ 0,7	52,7 $\pm$ 0,1	31,9 $\pm$ 0,9
16:1 Δ^3	0,2 $\pm$ 0	0	0	0,8 $\pm$ 0,7	0	0	0,5 $\pm$ 0,5	21,6 $\pm$ 0,5
16:3 $\Delta^9,12,15$	0,4 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 0,1	0	0	17,1 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1	0
18:0	7,8 $\pm$ 0,7	8,9 $\pm$ 0,5	8,6 $\pm$ 0,6	8,7 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 0,1	5,2 $\pm$ 0,7
18:1 Δ^9	3,2 $\pm$ 0,9	6,7 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,6	5,6 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,3	11,8 $\pm$ 0,2
18:2 $\Delta^9,12$ (LA)	9,2 $\pm$ 0,2	16,6 $\pm$ 0,2	21,2 $\pm$ 0,5	18,1 $\pm$ 0,6	2,7 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,1	12,9 $\pm$ 0,5
18:3 $\Delta^9,12,15$ (ALA)	13,8 $\pm$ 0,6	12,7 $\pm$ 0,6	13,6 $\pm$ 0,7	14,4 $\pm$ 0,2	70,5 $\pm$ 0,9	66,8 $\pm$ 0,9	30,7 $\pm$ 0,2	15,1 $\pm$ 0,8
20:0	2,2 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0	1,0 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,3	0	0	0	0
Outros menores	3,3	2,8	4,2	1,1	1,3	1,0	0,1	0,9
Total	62,7	72,7	73,4	71,6	98	99,1	100	99,4
Novo PUFA ω 6								
20:2 $\Delta^{11,14}$ (EDA)	4,2 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 0,1	0	0
20:3 $\Delta^8,11,14$ (DGLA)	0,6 $\pm$ 0	0,8 $\pm$ 0	0,7 $\pm$ 0	0,5 $\pm$ 0	0	0	0	0
20:4 $\Delta^5,8,11,14$	7,2 $\pm$ 0,7	5,3 $\pm$ 0,3	8,4 $\pm$ 0,3	7,3 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1	0	0	0,5 $\pm$ 0

(AA)								
22:4 ^{Δ7,10,13,16} (DTA)	1,7_{±0,5}	5,8_{±0,1}	3,7_{±0,3}	5,6_{±0,2}	0,2_{±0}	0	0	0,1_{±0,2}
22:5 ^{Δ4,7,10,13,16} (DPA ^{ω6})	6,7_{±0,4}	1,9_{±0,1}	2,5_{±0,3}	1,8_{±0,4}	0,2_{±0}	0,2_{±0}	0	0
Total de novo LC-PUFA ω6	20,4	17,0	17,2	18,0	1,1	0,3	0	0,6
Novo PUFA ω3								
20:3 ^{Δ11,14,17} (EtrA)	6,7_{±0,6}	3,3_{±0,2}	2,2_{±0,1}	3,0_{±0,2}	0,5_{±0,1}	0,6_{±0}	0	0
20:4 ^{Δ8,11,14,17} (EtA)	0,5_{±0}	0,1_{±0,2}	0,1_{±0,2}	0,1_{±0,2}	0	0	0	0
20:5 ^{Δ5,8,11,14,17} (EPA)	5,9_{±0,4}	2,3_{±0,3}	3,4_{±0,2}	3,1_{±0,3}	0,3_{±0}	0	0	0
22:5 ^{Δ7,10,13,16,19} (DPA ^{ω3})	0,8_{±0}	3,2_{±0,3}	2,1_{±0,1}	3,2_{±0,6}	0,1_{±0}	0	0	0
22:6 ^{Δ4,7,10,13,16,19} (DHA)	3,0_{±0,2}	1,4_{±0,1}	1,6_{±0,2}	1,0_{±0,8}	0	0	0	0
Total novo LC-PUFA ω3	16,9	10,3	9,4	10,4	0,9	0,6	0	0
Total novo	37,3	27,3	26,6	28,4	2,0	0,9	0	0,6
Total ácidos graxos	100	100	100	100	100	100	100	100

Discussão

[00516] Esses experimentos mostraram que a expressão transiente de uma série de genes de caminho em *N. benthamiana* ou outras folhas vegetais imitaram a expressão em plantas estavelmente transformadas e foi então bem adequado e previsível a expressão dos caminhos em sementes para produção de óleos de LC-PUFA. O sistema de expressão transiente forneceu uma plataforma de expressão alternável que deu resultados rápidos e confiáveis para todo o caminho, onde componentes únicos poderiam ser facilmente trocados em caminhos recombinantes de múltiplas etapas. A montagem transiente de biossíntese de LC-PUFA foi robusta e reproduzível. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e produziram pontos de dados estreitos, tipicamente com um erro padrão menos que 5%.

[00517] A primeira etapa nos caminhos de LC-PUFA montados, um alongamento de $\Delta 9$, mostraram uma taxa mais alta de alongamento de LA do que de ALA, conforme observado previamente em plantas estavelmente transformadas (Fraser et al., 2004). Esta diferença não pode ser contada por preferências de substrato de ácido graxo da enzima como a expressão em levedura mostrou a Ig $\Delta 9$ elongase tendo preferência igual por LA e ALA (Qi et al., 2002). É mais provável que a taxa mais alta de alongamento observada para LA tenha sido um reflexo da existência de uma quantidade mais alta de LA do que de ALA no agrupamento acil-CoA extraplastidial da folha - o local de ação da elongase (Domergue et al., 2003; Fraser et al., 2004).

[00518] A análise de classe de lipídio demonstrou que todos os LC-PUFA recentemente formados foram encontrados em taxas aproximadamente iguais em ambos o

agrupamento PC e em TAG. Houve pequenas variações nesta taxa para os produtos da segunda última etapa dos caminhos, um alongamento de $\Delta 5$ que produziu DTA e DPA, o qual foi menos abundante em TAG comparado a PC. De modo contrário, os produtos da dessaturação final de $\Delta 4$, DPA $^{\omega 6}$ e DHA, foram preferencialmente acumulados em TAG comparado a PC. Essas variações podem refletir uma influência sutil da membrana que edita enzimas ou o AtDGAT1 para esses produtos. Vale a pena notar que ambos os alongamentos de $\Delta 5$ e atividades de DGAT ocorrem em agrupamentos CoA, e a competição entre essas enzimas pelo substrato pode alterar a presença de ácidos graxos nesses agrupamentos PC e TAG.

[00519] Há diversas implicações que surgem a partir deste estudo. Primeiro, o ensaio baseado em folha transiente mostrou ser adequado para avaliar enzimas de ácido graxo, tanto unicamente quanto em combinações complexas. Isto é particularmente apropriado para enzimas que produzem ácidos graxos que são facilmente distintos do perfil de ácido graxo endógeno de *N. benthamiana*, tal como o LC-PUFA neste estudo. A demonstração de ensaios de alimentação por ácido graxo a enzimas isoladas e a rápida montagem de LC-PUFA em óleos indicou que o ensaio de folha transiente foi bem adequado para dessaturação associada por ER, alongamento e montagem de TAG. Segundo, embora os óleos de LC-PUFA sejam um alvo atual de tecnologias de transformação vegetal, células de folha fornecem uma variedade de vantagens para outras plataformas de expressão heterólogas. As células de folha fornecem uma ampla variedade de metabólitos não disponíveis em outros hospedeiros de expressão, e esses podem agora tornarem-se

alvos para modificação que requer caminhos recombinantes. Além disso, as plantas processam de forma mais confiável transgenes eucarióticos, incluindo edição de RNA, modificações pós-modificação e localização de organelas.

[00520] Finalmente, o ensaio de *N. benthamiana* poderia ser adequado para ensaios de varredura de biblioteca de cDNA. Esta sugestão se baseia na detecção de atividade próxima ao máximo para sete diferentes genes em uma única zona de infiltração na folha, sugerindo que, nesta configuração, bibliotecas de cDNA clonadas dentro de um vetor de expressão binária poderiam ser sistematicamente infiltradas em folhas. Os cálculos sugerem que ao menos 7 clones diferentes, incluindo P19 em OD_{600nm}0,2, poderiam ser expressos em um único ponto. Alternativamente, os genes que formam caminhos incompletos ou parciais poderiam ser adicionados a cada infiltração e assim clones de biblioteca agrupados poderiam ser repetidamente testados por novas etapas ou fluxos melhorados.

Exemplo 10. Biossíntese eficiente de DHA em células vegetais

[00521] As atividades de enzima para a $\Delta 6$ dessaturase de *Micromonas* CCMP 1545 (ID de SEQ N°:8 codificado por ID de SEQ N°:7), $\Delta 6$ elongase de *Pyramimonas* CS-0140 (ID de SEQ N°:4 codificado por ID de SEQ N°:3), $\Delta 5$ dessaturase de *Pavlova salina* (ID de SEQ N°:26 codificado por ID de SEQ N°:25), $\Delta 5$ elongase *Pyramimonas* CS-0140 (ID de SEQ N°:6 codificado por ID de SEQ N°:5) e $\Delta 4$ dessaturase de *Pavlova salina* (ID de SEQ N°:73 codificado por ID de SEQ N°:72) juntamente com a *Arabidopsis thaliana* DGAT1 (ID de SEQ N°:74 codificado por ID de SEQ N°:75) foram

demonstradas em planta com uso de um sistema de expressão transiente de *Nicotiana benthamiana* intensificado conforme descrito no Exemplo 1.

[00522] Uma construção genética 35S:Mic1545-d6D que codifica a $\Delta 6$ dessaturase sob o controle do promotor constitutivo 35 S foi feito inserindo-se toda a região codificante de pGA4, contido dentro de um fragmento Swal, em 35S-pORE04 (Exemplo 4, acima) no local Smal-EcoKV, gerando pJP2064. Uma construção genético 35S:Pyrco-d6E que codifica a $\Delta 6$ elongase foi feito inserindo-se toda a região codificante of 0804673_Pyrco-elol_pGA18, contida dentro de um fragmento Swal, em 35S-pORE04 no local Smal-EcoBN, gerando pJP2060. Uma construção genético 35S:Pavsa-d5D que codifica a $\Delta 5$ dessaturase foi feito inserindo-se toda a região codificante de 0804674_Pavsa-d5D_pGA15, contida dentro de um fragmento Swal, em 35S-pORE04 no local Smal-EcoKV, gerando pJP2067. Uma construção genético 35S:Pyrco-d5E que codifica a $\Delta 5$ elongase foi feito inserindo-se toda a região codificante de 0804675_Pyrco-elo2_pGA4, contida dentro de um fragmento Swal, em 35S-pORE04 no local Smal-EcoRV, gerando pJP2061. Uma construção genético 35S:Pavsa-d4D que codifica a $\Delta 4$ dessaturase foi feito inserindo-se toda a região codificante de 0804676_Pavsa-d4D_pGA15, contida dentro de um fragmento Swal, em 35S-pORE04 no local Smal-EcoRV, gerando pJP2068. Uma construção genético 35S:Arath-DGAT1 que codifica a enzima DGAT1 foi feito inserindo-se toda a região codificante de pXZP513E, contida dentro de um fragmento BamH1-EcoRV, em 35S-pORE04 no local BamH1-EcoRY, gerando pJP2078.

[00523] Esses vetores quiméricos foram introduzidos

individualmente na cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* e células transgênicas de culturas desta foram misturadas e a mistura foi infiltrada no tecido de folha de plantas *Nicotiana benthamiana* na estufa. As plantas foram cultivadas por mais cinco minutos após a infiltração antes que discos de folha fossem tomados para análise GC que revelou que esses genes estavam funcionando para produzir DHA em *Nicotiana benthamiana*. O tecido de folha transformado com esses genes continha SDA (2,3%), ETA (0,7%), EPA (0,8%), DPA (2,8%) e DHA (4,4%) (Tabela 14). O tecido de folha também continha níveis residuais de GLA, ETA e ARA. As eficiências de conversão foram conforme se segue: 17,4% no ALA produzido na foi convertido a EPA (incluindo EPA subsequentemente convertido em DPA ou DHA); 15,5% de ALA foi convertido em DPA ou DHA; 9,6% do ALA produzido na célula foi convertido em DHA; enquanto 40% do ALA produzido na célula que foi dessaturado de $\Delta 6$ foi subsequentemente convertido em DHA. Devido à expressão transiente dos transgenes neste experimento, eficiências mais altas que as acima poderiam ser esperadas em células transformadas estavelmente.

[00524] Quando o total de lipídio extraído do tecido de folha foi fracionado por TLC para separar as classes de lipídio, e as frações de TAG e lipídio polar foram analisadas por composição de ácido graxo por FAME, foi observado que o nível de DHA no TAG foi de 7% como uma percentagem do total de ácido graxo, e no lipídio polar o nível de DHA foi de 2,8%. Pensou-se que o nível mais baixo na classe de lipídio polar fosse devido à relativa contribuição de lipídios cloroplastos nas folhas,

favorecendo lipídios polares, e a expressão transiente dos genes ao invés de inserção estável dos transgenes no genoma das células do hospedeiro.

Tabela 14. Composição de ácido graxo de lipídio de folhas transformadas com uma combinação de dessaturases e elongases.

Ácido graxo	Ácido graxo	Células não transformadas	células transformadas
16:0	palmitico	17,1	20,4
16:1d7		0,1	0,4
16:1d9		0,2	0,2
C6:1d?		0,5	0,4
16:1d?		0,5	0,4
17:1d9		0,9	0,7
16:2		0,9	0,9
16:3		6,6	5,4
18:0	esteárico	2,1	3,6
18:1d7		0,0	0,0
18:1d9	oléico	0,8	2,6
18:1d11		0,0	0,0
18:1d12		0,3	0,6
18:1d13		0,2	0,2
18:2n6	LA	5,1	10,8
18:3n6	GLA	0,7	1,9
18:3n3	ALA	57,8	35,0
20:0		0,4	0,7
20:1d5		0,4	0,3
18:4n3	SDA	0,4	2,3
20:1d8		0,0	0,0

20:1d11		0,0	0,0
20:2n6	EDA	0,1	0,2
20:3n6	DGLA	0,3	0,4
20:4n6	ARA	0,4	0,5
20:3n3	ETrA	0,2	0,2
22:0		0,2	0,2
20:4n3	ETA	0,0	0,7
22:1d9		0,0	0,9
20:5n3	EPA	0,8	0,8
22:2n6		0,1	0,2
22:4n6		0,1	0,1
22:3n3		1,1	1,2
24:0		0,4	0,4
22:5n6		0,4	0,2
24:1d9		0,8	0,1
22:5n3	DPA	0,2	2,8
22:6n3	DHA	0,1	4,4

[00525] Este experimento demonstrou que a $\Delta 6$ dessaturase de *Micromonas* CCMP 1545 isolada tinha uma preferência substancial pelo ALA de substrato $\omega 3$ comparado ao LA de substrato $\omega 6$. O experimento também demonstrou que a expressão de genes adequados pode resultar na acumulação de percentagens substanciais de LC-PUFA na folha, de forma mais notável EPA, DPA e DHA.

[00526] Este experimento também mostrou que o uso do sistema de ensaio transiente de *Nicotiana benthamiana* para a testagem rápida de vários caminhos de biossíntese de ácido graxo e para selecionar combinações ideais de genes. Este sistema poderia ser usado para comparar de forma

rápida as atividades relativas de genes com função homóloga, assim como a comparação de todos os caminhos biossintéticos.

Discussão: Síntese eficiente de DHA em tecido de folha e semente

[00527] Com base nestes dados, foi previsto que os mesmos níveis de EPA, DPA e DHA, ou mesmo níveis mais altos, poderiam ser produzidos em sementes quando promotores específicos de semente são usados para expressar esta combinação de genes, ou um conjunto similar. O fluxo eficiente observado de ácidos graxos a partir de ALA para EPA e direto para DPA e DHA pensou-se ser devido à combinação de elongases eficientes com dessaturases acil-CoA, assim operando sobre ácidos graxos predominantemente no agrupamento acil-CoA. Além disso, foi previsto que a produção de EPA, DPA, DHA e outros LC-PUFA em ambas as folha e semente de uma planta transgênica, ou em semente e outro tecido que não as folhas, poderia ser alcançada pelo uso de promotores com a especificidade de tecido apropriada ou combinações de promotores. Promotores fundidos poderiam ser capazes de acionar a produção das enzimas em ambos os tipos de tecido. A planta resultante poderia ser provavelmente útil para ambos a extração de óleo, particularmente de semente, e matéria-prima com mínimo processamento.

Exemplo 11. Biossíntese mais eficiente de DHA em células vegetais

[00528] As atividades de enzima da $\Delta 6$ dessaturase de *Micromonas* CCMP 1545 (ID de SEQ N°:8 codificado por ID de SEQ N°:7), $\Delta 6$ elongase de *Pyramimonas* CS-0140 (ID de SEQ

Nº:4 codificado por ID de SEQ Nº:3), $\Delta 5$ dessaturase de *Pavlova salina* (ID de SEQ Nº:26 codificado por ID de SEQ Nº:25), $\Delta 5$ elongase de *Pyramimonas* CS-0140 (ID de SEQ Nº:6 codificado por ID de SEQ Nº:5) e $\Delta 4$ dessaturase de *Pavlova salina* (ID de SEQ Nº:73 codificado por ID de SEQ Nº:72) juntamente com a *Arabidopsis thaliana* DGAT1 (ID de SEQ Nº:74 codificado por ID de SEQ Nº:75) foram demonstradas em planta com uso de um sistema de expressão transiente de *Nicotiana benthamiana* intensificado conforme descrito no Exemplo 1 e Exemplo 10. Este experimento foi otimizado pelo uso de plantas *N. benthamiana* mais jovens e mais saudáveis.

[00529] Esses vetores quiméricos descritos no Exemplo 10 foram introduzidos individualmente na cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* e células transgênicas de culturas dessas foram misturadas e a mistura foi infiltrada no tecido de folha de plantas *Nicotiana benthamiana* na estufa. As plantas foram cultivadas por mais cinco dias após a infiltração antes que discos de folha fossem tomados para análise GC, que revelou que esses genes estavam funcionando para produzir DHA em *Nicotiana benthamiana* (Tabelas 15 e 16). O tecido de folha transformado com esses genes continha SDA (2,0%), ETA (0,4%), EPA (0,7%), DPA (4,3%) e DHA (4,4%). O tecido de folha também continha níveis residuais de GLA, ETA e ARA. As eficiências de conversão foram conforme segue: 23,4% do ALA produzido na célula foram convertidos em EPA (incluindo EPA subsequentemente convertido em DPA ou DHA); 21,6% de ALA foram convertidos em DPA ou DHA; 10,9% do ALA produzido na célula foram convertidos em DHA; enquanto 37,2% do ALA

produzido na célula dessaturado de $\Delta 6$ foi subsequentemente convertido em DHA. Devido à expressão transiente dos transgenes neste experimento, eficiências mais altas que as acima poderiam ser esperadas em células transformadas estavelmente.

[00530] Quando o total de lipídio extraído do tecido de folha foi fracionado por TLC para separar as classes de lipídios, e as frações de TAG e lipídio polar foram analisadas por composição de ácido graxo por FAME, foi observado que o nível de DHA no TAG foi de 15,9% como uma percentagem do total de ácido graxo, e no lipídio polar o nível de DHA foi de 4,4%. O nível mais baixo na classe de lipídio polar pensou-se ser devido à relativa contribuição de cloroplasto lipídios de cloroplasto nas folhas, favorecendo lipídios polares, e a expressão transiente dos genes ao invés de inserção estável dos transgenes no genoma das células do hospedeiro.

Tabela 15. Composição de ácido graxo de lipídio de folhas transformadas com uma combinação de dessaturases e elongases.

	Controle	Caminho DHA Pavsa-D5E		Caminho DHA Pyrco-D5E	
Ácido Graxo	Total de Lipídio	Total de Lipídio	TAG	Total de Lipídio	TAG
FA Usual					
16:0	15,9 $\pm$ 0,2	17,0 $\pm$ 0,1	20,2	16,6 $\pm$ 0,1	21,6
16:1 Δ^{3t}	1,7 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,2	0,3	1,5 $\pm$ 0,1	0,3
16:3 $\Delta^{9,12,15}$	6,3 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,1	0,4	5,6 $\pm$ 0,1	0,6
18:0	3,6 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,1	5,9	3,3 $\pm$ 0,1	6,5

18:1 ^{Δ9}	2,8 _{±0,1}	3,4 _{±0,1}	5,1	2,8 _{±0,2}	5,6
18:1 ^{Δ9,12}	18,7 _{±0,1}	14,1 _{±0,4}	15,2	13,0 _{±0,1}	17,3
18:3 ^{Δ9,12,15}	45,6 _{±1,4}	39,1 _{±0,4}	6,9	40,2 _{±0,5}	6,7
20:0	1,3 _{±0,4}	0,7 _{±0}	1,8	0,6 _{±0}	2,0
Outros menores	4,1	2,5	6,3	2,3	6,2
Total	100	87,0	62,1	85,9	66,8
Novo PUFA ω6					
18:3 ^{Δ6,9,12}	-	1,6 _{±0,1}	3,3	2,1 _{±0,2}	4,3
20:3 ^{Δ8,11,14}	-	-	-	-	-
20:3 ^{Δ5,8,11,14}	-	0,3 _{±0,1}	0,5	0,2 _{±0}	-
Total	0	1,9	3,8	2,3	4,3
Novo PUFA ω3					
18:4 ^{Δ6,9,12,15}	-	1,5 _{±0,1} (22% D6D)	3,8	2,0 _{±0} (23% D6D)	6,4
20:4 ^{Δ8,11,14,17}	-	0,5 _{±0} (86% D6E)	1,5	0,4 _{±0} (83% D6E)	1,6
20:5^{Δ5,8,11,14,17}	-	4,1 _{±0,2} (95% D5D)	14,2	0,7 _{±0} (96% D5D)	1,5
22:5 ^{Δ7,10,13,16,19}	-	2,4 _{±0,1} (55% D5E)	1,6	4,3 _{±0} (93% D5E)	3,5
22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}	-	2,6 _{±0,1} (52% D4D)	13,0	4,4 _{±0,1} (51% D4D)	15,9
Total	0	11,1	34,1	11,8	28,9
Total Novo FA	0	13,0	37,9	14,0	33,2
Total FA	100	100	100	100	100

Tabela 16. Eficiências de conversão de folhas

transformadas com uma combinação de dessaturases e elongases.

Ácido Graxo	Total		Enzima	Eficiência de Conversão			
LA	13						
GLA	2,1	15,0%	d6D				
DGLA	0	8,7%	d6E				
AA	0,2	100,00%	d5D				
ALA	40,2						
SDA	2	22,7%	d6D	18,1%	d6D em EPA+DPA+DHA		
ETA	0,4	83,1%	d6E	16,7%	d6D em DPA+DHA		
EPA	0,7	95,9%	d5D	8,5%	ALA em DHA		
DPA	4,3	92,6%	dRE	46,8%	EPA em DHA		
DHA	4,4	50,6%	d4D				
	TAG						
LA	17,3						
GLA	4,3	19,9%	d6D				
DGLA	0	0,0%	d6E				
AA	0	0,0	d5D				
ALA	6,7						
SDA	6,4	81,2%	d6D	58,7%	d6D EM EPA+DPA+DHA		
ETA	1,6	77,9%	d6E	54,5%	d6D EM DPA+DHA		
EPA	1,5	92,9%	d5D	44,7%	ALA EM DHA		
DPA	3,5	92,8%	d5E	76,1%	EPA EM DHA		

DHA	15,9	82,0%	d4D		
-----	------	-------	-----	--	--

Discussão: A síntese mais eficiente de DHA em tecido de folha e semente

[00531] Este resultado provavelmente abrirá caminho para avanços similares em rendimento em TAG de semente devido à conservação substancial de mecanismos de síntese de lipídio extra-plastidial entre tecidos de folha e semente (Ohlrogge e Browse, 2004; Bates et al, 2007). Postulou-se que diversos elementos são provavelmente responsáveis por este grande aumento na produção: 1. o uso de uma $\Delta 6$ dessaturase acil-CoA específica para $\omega 3$ aumenta o fluxo abaixo do caminho $\omega 3$ e diminui a competição com substratos $\omega 6$ paralelos para etapas metabólicas subsequentes; 2. uma $\Delta 5$ elongase altamente eficiente claramente aumenta a quantidade de DPA disponível para dessaturação $\Delta 4$ em DHA; 3. a redução de silenciamento de gene pelo uso de unidades transcripcionais independentes e o uso de uma proteína de supressão viral (P 19).

[00532] A forte preferência por $\omega 3$ exibida pela $\Delta 6$ dessaturase é claramente desejável quando se tenta projetar uma planta terrestre que acumule o EPA e DHA de LC-PUFA $\omega 3$ já que a atividade de $\Delta 17$ dessaturase adicional necessária para converter AA (20:4^{D5,8,11,14}) em EPA não é necessária, assim simplificando ambos a engenharia metabólica e desafios regulatórios.

[00533] Em adição à etapa acima otimizada, o uso da $\Delta 5$ elongase altamente eficiente de *P. cordata* resultou em um perfil de ácido graxo da fração de TAG (óleo) que remontam proximamente óleo de atum, um óleo de peixe notável pelo alto teor de DHA e baixo teor intermediário

(Figura 18). Além disso, a atividade exibida pela $\Delta 5$ alongase de *P. cordata* em *N. benthamiana* é de longe o alongamento de $\Delta 5$ by mais eficiente que se tem experimentado e o uso deste gene efetivamente sobrepõe o estrangulamento de alongamento de $\Delta 5$ que foi experimentado em outras tentativas na produção de DHA transgênico.

[00534] Finalmente, enquanto o uso de genes ideais é claramente necessário, considera-se provável que o método pelo qual esses transgenes foram introduzidos (isto é, como cassetes de expressão independente e na presença de um supressor de silenciamento de gene) que exerce um papel chave nos altos níveis de DHA alcançados neste estudo. A engenharia metabólica para produção de LC-PUFA tem assim em alto grau contado com relativamente grandes construções de múltiplos genes sendo aleatoriamente inseridos no genoma hospedeiro e enquanto muitos grupos têm tido bons resultados com este método, há indicações de que é difícil obter eventos que emitam expressão igual de todos os transgenes (WO 2004/017467). Em adição, os efeitos de silenciamento podem reduzir a eficiência por gerações (Matzke et al., 2001). É possível que abordagens de transformação alternativas tal como cromossomos artificiais que envolvem de novo formação de centrômero em uma unidade independentemente montada e mini-cromossomos projetados podem em último caso serem requeridos para engenharia metabólica de LC-PUFA estável bem-sucedida (Yu et al., 2007).

Exemplo 12. Montagem transgênica de um ALA inteiro para caminho de DHA com uso de genes a partir de um único organismo

[00535] O ALA inteiro para caminho de DHA foi reconstituído com uso de genes que codificam as enzimas de *P. salina*, que consistem da $\Delta 9$ elongase, $\Delta 8$ dessaturase, $\Delta 5$ dessaturase, $\Delta 5$ elongase e $\Delta 4$ dessaturase, e montado em *N. benthamiana*. A análise GC do total de tecido de folha cinco dias após a agroinfiltração demonstrou a produção de 0,7% de DHA (Tabela 17). Esta é a primeira vez que um caminho transgênico de ALA para DHA que consiste de genes de um único organismo foi reportado.

Tabela 17. Composição de ácido graxo (percentual de ácidos graxos totais) de tecido de folha de *Nicotiana benthamiana* transientemente transformado com construções binários de CaMV 35 S de único gene. O caminho de DHA consiste da $\Delta 9$ elongase, $\Delta 8$ dessaturase, $\Delta 5$ dessaturase, $\Delta 5$ elongase e $\Delta 4$ dessaturase de *P. salina*. Os desvios padrão entre infiltrações separadas realizadas em triplicata são indicados.

Ácido Graxo	Controle	Pavpi- $\Delta 9E$ DHA
FA Usual		
16:0	15,7 $\pm$ 0,6	15,9 $\pm$ 0,2
16:1 $\Delta 3t$	1,5 $\pm$ 0	1,4 $\pm$ 0,1
16:3 $\Delta 9,12,15$	6,8 $\pm$ 0,7	5,9 $\pm$ 0,3
18:0	3,0 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,2
18:1 $\Delta 9$	2,2 $\pm$ 0	2,7 $\pm$ 0,3
18:2 $\Delta 9,12$	11,8 $\pm$ 0,4	8,6 $\pm$ 0,6
18:3 $\Delta 9,12,15$	56,0 $\pm$ 1,4	49,0 $\pm$ 1,4
Outros menores	3,0 $\pm$ 0	2,8 $\pm$ 0
Total	100	90,0

Novo PUFA $\omega 6$		
20:2 $\Delta 8,11$	-	1,7 $\pm$ 0,2
20:3 $\Delta 8,11,14$	-	0,5 $\pm$ 0
20:4 $\Delta 5,8,11,14$	-	2,4 $\pm$ 0,1
22:4 $\Delta 7,10,13,16$	-	1,2 $\pm$ 0
22:5 $\Delta 4,7,10,13,16$	-	-
Total	0	5,8
Novo PUFA $\omega 3$		
20:3 $\Delta 11,14,17$	-	1,5 $\pm$ 0,2
20:4 $\Delta 8,11,14,17$	-	0,2 $\pm$ 0
20:5 $\Delta 5,8,11,14,17$	-	1,2 $\pm$ 0,1
22:5 $\Delta 7,10,13,16,19$	-	0,6 $\pm$ 0
22:6 $\Delta 4,7,10,13,16,19$	-	0,7 $\pm$ 0,1
Total	0	4,1
Total novo FA	0	10,0
Total FA	100	100

Exemplo 13. Expressão específico de VSPs em sementes em desenvolvimento de plantas

[00536] As regiões de codificação de proteína de cinco proteínas de supressão viral (VSP), que são P 19, V2, P38, PePo e RPV-PO, foram inicialmente inseridas em um vetor binário pART27 (Gleave, 1992) sob o controle do promotor 35 S promoter para expressão constitutiva forte em tecidos de planta. Essas proteínas foram caracterizadas como VSPs conforme segue. P19 é uma proteína supressora de Vírus de Atrofia do Tomateiro (TBSV) que se liga a siRNAs longos de nucleotídeo antes de guiarem a clivagem guiada por Argonaute de RNA homólogo (Voinnet et al., 2003). V2,

uma proteína supressora de Vírus de Enrolamento de Folha amarela do Tomateiro (TYLRV), se liga à proteína de planta SGS3 (Glick et al., 2008), pensou-se ser necessária uma proteína para a produção de intermediários de RNA de cadeia dupla a partir de substratos de ssRNA (Beclin et al., 2002). P38 é uma proteína supressora de Vírus do Mosaico do Nabo (TCV) e inibe a atividade de polimerase dependente de RNA (RdRP) crítica para a produção de siRNA e se une à proteína Dicer DCL4 (Ding e Voinnet, 2007). As proteínas PO tal como PePo e RPV-PO, de polerovírus, proteínas Argonaut alvo para degradação intensificada (Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007). A fim de estabelecer a função dessas proteínas para aumentar a expressão de transgene como supressores de silenciamento, as cinco construções VSP acionadas por 35 S em *Agrobacterium* foram co-infiltradas com uma construção GFP acionado por 35S em folhas de *Nicotiana benthamiana*. Em todos os casos, a presença do VSP aumentou e estendeu a expressão do GFP, conferindo níveis aumentados de atividade do gene GFP particularmente após 4 dias pós-inoculação com as cepas de *Agrobacterium*, conformando a função das proteínas como supressoras de silenciamento neste formato de ensaio.

[00537] As cinco regiões de codificação de VSP foram, cada uma, inseridas em um segundo vetor binário, pXRZ393, com base em um vetor principal pART27, de forma que a expressão dos VSPs foi sob o controle de um promotor FPl específico por semente (Ellerstrom et al., 1996) que fornece a expressão dos VSPs em cotilédôneas de desenvolvimento de sementes em plantas dicotilédôneas. As construções foram usadas para gerar plantas *Arabidopsis*

transformadas de acordo com os métodos descritos no Exemplo 1. Ao menos 20 plantas transformadas foram obtidas para cada gene quimérico que codifica VSP. As plantas eram viáveis e fenotipicamente normal em sua maioria conforme indicado por seu crescimento em meio de seleção e no solo, crescendo normalmente em plantas adultas férteis que criam sementes viáveis. O único fenótipo morfológico que pareceu ser alterado nas mudas foi nas cotiledôneas que emergiram de algumas das sementes após a germinação por P19, PePo e RPV-PO. Plântulas transformadas com a construção que codifica especificamente por semente P19 tiveram cotiledôneas em forma de chave achatada com sem enrolamento para baixo distintivo de plântulas do tipo selvagem. As plântulas transformadas com a construção que codifica PePo produziram um fenótipo 'bailarina', onde as cotilédones estavam apontando para cima com um enrolamento para dentro ou côncavo. As folhas verdadeiras nessas plantas foram normalmente desenvolvidas. As plântulas que expressaram RPV-PO eram frondosas e tendiam a reter um hábito de crescimento frondoso durante todo o crescimento vegetativo. As plântulas de V2 e P38 não exibiram nenhum fenótipo significativo aparente.

[00538] Outro desenvolvimento que o cotilédones, as plântulas transformadas com os construções P19 e PoPe cresceram normalmente e eram indistinguíveis de plantas de controle em crescimento de desenvolvimento subsequente. O promotor que expressa os VSPs neste experimento, FPl, é bem caracterizado com uma expressão limitada, mas em cotilédones em desenvolvimento de *Arabidopsis* durante o desenvolvimento da semente (Ellerstrom et al., 1996). Com

base nos fenótipos de cotilédone emergentes, sugeriu-se que a expressão acionada por FPl de P 19, PePo ou RPV-PO em sementes em desenvolvimento poderia sobrepor com pequena biogênese de RNA necessária para o desenvolvimento normal de cotilédone. Essas alterações relacionadas a VSP no desenvolvimento de cotilédone não impactou o desenvolvimento geral das plantas transgênicas, e o subsequente crescimento e desenvolvimento normal das plantas indicou que qualquer expressão infiltrada de VSPs a partir do promotor FPl em tecidos outros que não o da semente em desenvolvimento foi menor e insignificante. Isto foi um contraste com relação a estudos prévios onde a expressão constitutiva de muitos VSPs em tecidos vegetais foi altamente deletéria (Mallory et al., 2002; Chapman et al., 2004; Chen et al., 2004; Dunoyer et al., 2004; Zhang et al., 2006; Lewsey et al., 2007; Meng et al., 2008).

[00539] A falta de um fenótipo para os VSPs V2 e P38 pode refletir em que esses VSPs se direcionarem a metabolismos de pequeno RNA de forma que não afetam a biogênese ou reconhecimento de pequeno RNA desenvolvido. A funcionalidade de cada VSP foi verificada com uso de um ensaio GFP em *Nicotiana benthamiana*.

Exemplo 14. Desenvolvimento de um marcador visual específico por semente para encontrar e acessar sementes transformadas T1 com construções VSP

[00540] Os dados descritos no Exemplo 13 indicaram que as sementes, e as plantas de progênie subsequente, poderiam tolerar a expressão de VSPs a partir de promotores específicos por semente sem efeitos deletérios significantes. Os inventores também consideraram se as

plantas transformadas geradas, conforme descrito acima, estavam expressando somente baixos níveis dos VSPs, assim permitindo que a semente sobrevivesse, efetivamente selecionando contra sementes transformadas que expressam potencialmente quantidades letais de VSP que não poderia então ser recuperadas sob as condições usadas.

[00541] Para estimar mais precisamente a expressão de transgenes em sementes T1, um marcador visual de transformação e expressão foi desenvolvido para uso em sementes. As sementes de *Arabidopsis*, como outras sementes de dicotiledôneas contêm um embrião paternal e endosperma cercado por um revestimento de semente maternal. Durante a transformação mediada por *Agrobacterium* de *Arabidopsis*, o tecido paternal se torna transformado pelo T-DNA enquanto o tecido maternal permanece não transformado. O tecido maternal transformado não é obtido até a produção de semente T2 da próxima geração. Para fornecer um sistema de varredura útil, um gene que codifica proteína fluorescente verde (GFP) foi modificado para promover secreção forte da proteína fora da célula. Tal localização de GFP tem disso mostrada para permitir reconhecimento visual de sementes T1 transformadas (Nishizawa et al., 2003) por detecção do GFP secretado produzido no embrião e endosperma de T1 transformada, através do fino, mas não transformado revestimento de semente (Fuji et al., 2007).

[00542] Um gene quimérico que codifica um GFP foi secretado construído conforme segue. O gene continha dois íntrons, um na região não transladada 5' (5'UTR) e um segundo na região codificante de proteína de GFP. Esses íntrons foram incluídos para intensificar a expressão do

gene quimérico (Chung et al., 2006) e para garantir que qualquer sinal de GFP detectado nas sementes poderia somente resultar da expressão do gene em células vegetais ao invés de expressão infiltrada das células de *Agrobacterium*. Uma versão interrompida por íntron de GFP humanizado (Clontech) que codifica uma proteína GFP que poderia estar localizada no citoplasma (Brosnan et al., 2007) foi modificada para promover secreção para o apoplasto por meio do retículo endoplasmático (ER) de acordo com o relatório de Nishizawa et al. (2003). A construção GFP modificado para secreção apoplástica incluiu um peptídeo de secreção de conglucina adicionado como uma fusão translacional em estrutura no N-terminal de GFP e quatro resíduos de glicina adicionados no C-terminal para facilitar a secreção a partir do ER. Essas adições ao gene GFP quimérico foram realizadas por síntese de gene pela região 5' e modificações de sequência mediadas por PCR pelas adições de glicina do C-terminal. A região codificante para este GFP secretado foi inserida a jusante de um promotor FPl que tinha um íntron de um gene catalase na 5'UTR. Toda sequência GFP secretada por FPl foi inserida a montante de um sinal de poliadenilação de nos3' dentro de um vetor binário de série pORE. A construção que continha o gene quimérico que codifica o GFP secretado foi designado pCW141.

[00543] Para confirmar a expressão e secreção da proteína GFP, a região do gene que codifica a sequência de GFP secretado, mas sem o promotor FPl ou o 5'UTR de pCW141 foi subclonada em um cassete de expressão pCaMV35S-OCS3', para produzir pCW228, e foi introduzida por transformação

mediada por *Agrobacterium* em folhas de *N. benthamiana*. A expressão do gene e secreção de proteína GFP foi confirmada com uso de um microscópio confocal (Leica).

[00544] Com base em que a construção foi correta, pCW141 foi introduzido em plantas *Arabidopsis* ecotipo Col-0 por meio de métodos mediados por Agrobactéria conforme descrito no Exemplo 1. As sementes de plantas *Arabidopsis* submersas com pCW141, a construção GFP secretado acionado por FP1, foram coletados e classificados por semente GFP positivas com uso de um microscópio de dessecamento equipado para detecção de fluorescência (Leica MFZIII). As sementes que tiveram fluorescência verde foram facilmente identificadas mesmo que a vasta maioria das sementes T1 nas populações não fossem transformadas. Essas sementes GFP positivas foram selecionadas e cultivadas em meio seletivo para confirmar a presença do gene marcador selecionável resistente a canamicina ligado aa construção de gene quimérico no T-DNA. Mais 20 sementes positivas foram agrupadas e a expressão de proteína GFP foi confirmada por Western Blotting com uso de um GFP contra anticorpo.

Seleção da expressão VSP n em sementes T1 usando marcador secretado GFP

[00545] Cada um dos quatro genes quiméricos codificando os VSPs: P19, P38, V2 e P38, cada um sob o controle do promotor FP1 para desenvolver uma expressão específica para cotilédone, foram inseridos no vetor de seleção GFP pCW141 descrito acima para produzir pCW161, pCW162, pCW163 e pCW164, respectivamente. Estes vetores binários cada um tinham genes quiméricos ligados para a expressão de um VSP e o GFP secretado, e, portanto,

permitiram que a semente transgênica transformada com as construções fosse identificada, selecionada e analisada pelo fenótipo GFP sem crescimento na mídia seletiva. Era esperado que na maioria dos transformantes, o gene codificando o VSP seria integrado e, portanto, ligado com o gene codificando GFP.

[00546] Sementes obtidas de plantas *arabidopsis thaliana* que foram inoculadas com Agrobactéria contendo a combinação de construções VSP-GFP, de acordo com o método do Exemplo 1, foram coletadas e selecionadas por fluorescência GFP como descrito acima. Sementes que floresceram verdes foram coletadas à mão e germinadas em mídias seletivas para determinar se elas também foram transformadas com o gene marcador selecionável. Em todos os casos a semente GFP-positiva cresceu na mídia de seleção, e exibiu os mesmos fenótipos de cotilédones de plantas que foram transformadas com os genes VSP sem o gene GFP como descrito acima. Em nenhum caso sementes GFP positivas foram observadas que não cresceram na mídia seletiva. Tais sementes poderiam ser esperadas se alguns eventos de transformação dessem origem a células nas sementes em desenvolvimento nas quais os níveis de expressão de VSP fossem muito altos e causasse letalidade. A ausência de tais sementes nas populações transformadas indicou que a expressão VSP foi tolerada em sementes quando expressara do promotor FPl. A ausência de tais efeitos deletérios foi em contraste com relatos de efeitos deletérios quando muitos VSPs foram expressos constitutivamente (Mallory et al., 2002; Chapman et al., 2004; Chen et al., 2004; Dunoyer et al., 2004; Zhang et al., 2006; Lewsey et al., 2007; Meng et

al., 2008). Assim, o uso de um marcador visualmente detectável como um GFP provou ser uma maneira ponderosa e eficiente de se identificar, selecionar e analisar eventos transgênicos incorporando genes ligados como aqueles VSPs codificantes, dessaturase, elongases ou outras enzimas modificadoras de ácidos graxos.

Quantificação da expressão GFP em sementes expressando VSP pós-embrionicamente

[00547] A expressão GFP foi quantificada em sementes T1 e T2 expressando VSP do promotor FPl usando microscopia fluorescente e análise digital de imagens. Estas análises claramente mostraram que a expressão GFP não foi afetada pela co-introdução de um VSP codificador de gene sob o controle de um promotor específico para cotilédone em desenvolvimento. Extensos estudos sobre o desempenho de construções GFP-VSP sobre gerações subsequentes e em eventos de transformação independentes serão analisados. É previsto que a presença do VSP irá resultar em níveis de expressão médios mais altos e mais estáveis em gerações sucessivas de sementes.

Exemplo 15. Co-expressão de VSPs com genes para síntese LC-PUFA em sementes

[00548] Para estabelecer que VSPs sejam capazes de proteger ou melhorar o desempenho transgênico em sementes, alguns vetores de expressão foram projetados que foram considerados como sendo mais suscetíveis à supressão mediada pelo hospedeiro (silenciamento) que um vetor com apenas um único gene, para aumentar a efetividade relativa dos VSPs. Uma série de vetores cada um contendo cinco genes de destaurase ou elongase para síntese DHA em sementes

foram construídas, usando a mesma configuração dos genes em cada. Um fator que foi pensado como responsável por fazer estas construções mais suscetivas ao silenciamento (expressão reduzida) foi o uso do mesmo promotor (FP1) para acionar cada gene. O promotor FP1 foi usado por ser relativamente pequeno e reduzia o tamanho de vetor geral e o espaçamento entre cada região codificante. Além do mais, cada cassete de gene tinha a mesma orientação, que foi considerada que iria melhorar a probabilidade de silenciamento. Três genes da via LC-PUFA tinham regiões codificantes que tinham tido otimização códon (A-B-C) para expressão ótima da planta enquanto dois (E-D) eram seqüências nativas como obtidas das microalgas. A mesma suíte de cinco genes tinha sido expressada previamente em folhas para montar uma via biossintética LC-PUFA completa (Exemplo 11). Um gene adicional codificando o VSP P19 foi incluído no primeiro vetor da série, uma codificação de gene V2 foi incluída no segundo vetor, enquanto o terceiro vetor na série não tinha VSP.

[00549] Estes vetores pJP3057 (Figura 19), pJP3059 (Figura 20) e (Figura 21) foram construídos e transformados em paralelo como segue. Genes de dessaturase ou elongase ou genes supressores virais foram primeiro clonados entre um Promotor FP1 e terminador nos contido dentro de um vetor de clonagem. Os cassetes promotores-gene-terminadores foram então clonados sequencialmente e na mesma orientação para dentro de uma espinha dorsal de vetor binário. pJP3057 continha toda a via DHA enquanto pJP3059 e pJP3060 diferenciavam-se apenas pela adição de um cassette FP1-P19-NOS ou FP1-V2-NOS, respectivamente. As etapas de construção

foram como segue. Primeiro, um fragmento *Ascl-Pacl* contendo a *Micromonas pusilla* foi clonado para dentro do sítio *Ascl-Pacl* do pJP2015 antes de um fragmento *SwaI* deste vetor contendo a totalidade do cassete promotor-gene-terminador foi clonada para o sítio *EcoRV* do pORE02 para gerar pJP3050. Em seguida, um fragmento *Ascl-Pacl* contendo a *Pyramimonas cordata* $\Delta 6$ -elongase foi clonada para o sítio *Ascl-Pacl* do pJP2015TMV (uma versão levemente modificada do pJP2015 onde o líder TMV estava presente à jusante do promotor e à montante do gene) antes de um fragmento *SwaI* deste vetor contendo a totalidade do cassete promotor-gene-terminador foi clonada para o sítio *Sad* tratado com polimeríase T4 DNA de pJP3050 para gerar pJP3051. A seguir, um fragmento *Ascl-Pacl* contendo a *Pavlova salina* $\Delta 5$ - dessaturase foi clonada para dentro do sítio *Ascl-Pacl* de pJP2015TMV antes de um fragmento *SwaI* deste vetor contendo a totalidade do cassete promotor-gene-terminador a ser clonado para dentro do sítio *SfoI* de pJP3051 para gerar pJP3052. A seguir, um fragmento *Ascl-Pacl* contendo a *Pavlova salina* $\Delta 5$ -dessaturase foi clonada para dentro do sítio *Ascl-Pacl* de pJP2015TMV antes de um Fragmento *SwaI* deste vetor contendo a totalidade do cassete promotor-gene-terminador foi clonada para dentro do sítio *SfoI* de pORE02 para gerar pJP3054. A seguir, um Fragmento *Ascl-Pacl* contendo a *Pyramimonas cordata* $\Delta 5$ -elongase foi clonada para dentro do sítio *Ascl-Pacl* de pJP2015TMV antes de um fragmento *SwaI* deste vetor contendo a totalidade do cassette promotor- gene-terminador foi clonada para dentro do sítio *StuI* de pJP3054 para gerar pJP3055. A seguir, um fragmento *Ascl-Pacl* contendo a *Pavlova salina* $\Delta 4$ -dessaturase foi

clonado para dentro do Sítio Ascl-Pacl of pJP2015TMV ante de um fragmento SwaI deste vetor contendo a totalidade do cassete promotor-gene-terminador foi clonada para dentro do sítio Sfol de pJP3056 para gerar pJP3056. O fragmento Pmel-NotI do pJP3056 foi então clonado para dentro do sítio Pmel-NotI do pJP3051 para gerar pJP3057, um vetor binário contendo os cinco genes para a produção de DHA do ALA. A seguir, um fragmento Ascl-Pacl contendo o gene quimérico codificando o supressor viral P19 foi clonado para dentro do sítio Ascl-Pacl do pJP2015TMV antes de um fragmento SwaI deste vetor contendo a totalidade do cassete promotor-gene-terminador ser clonada para dentro do sítio Zral do pJP3057 para gerar pJP3059. Semelhantemente, um Fragmento Ascl-Pacl contendo o gene quimérico codificando o supressor viral V2 foi clonado para dentro do sítio Ascl-Pacl do pJP2015TMV antes de um fragmento SwaI deste vetor contendo a totalidade do cassete promotor-gene-terminador ser clonada para dentro do sítio Zral do pJP3057 para gerar pJP3060.

[00550] Todas as três construções foram transformadas em *Arabidopsis* (ecotipo Columbia). Plantas *arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) foram transformadas com cada uma das construções e pJP3057 foi usado para transformar canola. Sementes T1 serão coletadas, analisadas em mídia contendo herbicida, e a resultante semente T2 analisada para verificar mudanças morfológicas gerais e síntese de LC-PUFA.

[00551] As plantas transformadas (*Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia) geradas com as três construções pJP3057, pJP3059 e pJP3060 foram auto-fertilizadas e sementes T1 foram coletadas. Estas foram semeadas em mídia

contendo canamicina para determinar a heterozigosidade/homozigosidade das plantas T1, e a resultante semente T2 de cada uma das plantas T1 foram analisadas para verificar mudanças morfológicas gerais e síntese de LC-PUFA (Tabela 18).

[00552] A semente representativa T2 de plantas transformadas com pJP3057 continham, no total de ácidos graxos no óleo das sementes, SDA (0.4%), ETA (0.6%), EPA (0.2%), DPA (0.3%) e DHA (2.4%). O óleo de semente das plantas T2 também continha GLA (1.4%) e níveis residuais de ETrA e ARA. As eficiências de conversão na semente foram as seguintes: 18.4% do ALA produzido na célula era $\Delta 6$ -dessaturado; 89.7% do SDA produzido na célula era $\Delta 6$ -alongado; 82.9% do ETA dentro da célula era $\Delta 5$ -dessaturado; 93.1% do EPA dentro da célula era $\Delta 5$ -alongado; 88.9% do DPA dentro da célula era $\Delta 4$ -dessaturado para produzir DHA (Tabela 18).

[00553] Sementes representativas T2 de plantas transformadas com pJP3059 continham SDA (0.7%), ETA (0.3%), EPA (0.2%), DPA (0.9%) e DHA (1.3%). O óleo de semente também continha GLA (0.8%) e níveis residuais de ETrA e ARA. As eficiências de conversão foram as seguintes: 15.7% do ALA produzido na célula era $\Delta 6$ -dessaturado; 79.4% do SDA produzido na célula era $\Delta 6$ -alongado; 88.9% do ETA dentro da célula era $\Delta 5$ - dessaturado; 91.7% do EPA dentro da célula era $\Delta 5$ -alongado; 59.1% do DPA dentro da célula era $\Delta 4$ -dessaturado para produzir DHA (Tabela 18).

Tabela 18. Perfis de ácidos graxos representativos de sementes T2 de *Arabidopsis* transformadas com pJP3057, pJP3059, JP3060.

Amostra	Columbia	pJP3057	pJP3059	pJP3060
16:0	7,7	7,6	8,3	7,4
16:1d9	0,3	0,3	0,3	0,3
18:0	3,1	3,7	3,8	3,4
20:0	2,1	1,8	1,8	1,9
22:0	0,3	0,3	0,3	0,3
24:0	0,2	0,2	0,2	0,2
18:1d9	12,9	12,8	12,2	13,6
18:1d11	1,5	1,8	1,9	1,6
20:1d11	18,3	16,3	14,7	16,0
20:1d13	1,7	1,5	2,0	1,9
22:1d13	1,6	1,2	1,2	1,3
24:1d15	0,2	0,2	0,2	0,2
Outros	2,5	2,3	2,6	2,5
18:2n6	27,8	27,2	28,2	27,9
18:3n6	0,0	1,4	0,8	0,4
20:3n6	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4n6	0,0	0,0	0,0	0,0
18:3n3	19,7	17,3	18,2	18,2
18:4n3	0,0	0,4	0,7	0,6
20:4n3	0,0	0,06	0,3	0,7
20:5n3	0,0	0,2	0,2	0,3
22:5n3	0,0	0,3	0,9	0,2
22:6n3	0,0	2,4	1,3	1,0
	100,0	100,0	100,0	100,0

[00554] Sementes representativas T2 de plantas transformadas com pJP3060 continham SDA (0.6%), ETA (0.7%), EPA (0.3%), DPA (0.2%) e DHA (1.0%). O óleo de semente

também continha níveis residuais de GLA, ETrA e ARA. As eficiências de conversão foram as seguintes: 13.3% do ALA produzido na célula era $\Delta 6$ -dessaturado; 78.6% do SDA produzido na célula era $\Delta 6$ -alongado; 68.2% do ETA dentro da célula era $\Delta 5$ -dessaturado; 80.0% do EPA dentro da célula era $\Delta 5$ -alongado; 83.3% do DPA dentro da célula era $\Delta 4$ -dessaturado para produzir DHA (Tabela 18).

Resultados

[00555] Todos os genes na construção pJP3057 mostraram alta atividade/alta eficiência da conversão com a exceção do $\Delta 6$ -dessaturase. Isto indica que as $\Delta 6$ -, $\Delta 5$ -e $\Delta 4$ -dessaturases estão provavelmente agindo em substratos de acil-CoA já que o substrato nativo ALA é produzido por um acil-PC dessaturase, resultando numa $\Delta 6$ -desaturação mais baixa, e os substratos transgênicos de dessaturase ETA e DPA são produzidos por elongases que são conhecidos por agir no grupo acil-CoA. Além do mais, a alta eficiência das etapas $\Delta 6$ - e $\Delta 5$ -elongase (>80% eficiência) indicou que as dessaturases imediatamente precedentes ($\Delta 6$ - e $\Delta 5$ -dessaturases, respectivamente) estavam agindo sobre substratos acil-CoA. É razoavelmente esperado que a atividade destes genes irá aumentar em gerações subsequentes de plantas transgênicas quando a homozigossidade for alcançada, e que níveis dos produtos LC-PUFA irão aumentar como consequência.

[00556] A presença do supressor de silenciamento nas construções pJP3057 e pJP3059 aumentaram tanto o nível total dos novos ácidos graxos no óleo de semente, e o nível final do produto da via, DHA.

Discussão

[00557] Com relação aos Exemplos 13 a 15, ácidos nucleicos exogenous introduzidos podem ser detectados por plantas como DNA ou RNA estranho levando a uma expressão reduzida devido a mecanismos de supressão de transgenes mediados pelo hospedeiro. Estes mecanismos de supressão podem ter como alvo transgenes via a biogênese de pequenas populações de RNA, e estes pequenos RNAs guiam o aparato de supressão para limitar a expressão do transgene (Matzke et al., 2001). A expressão do transgene pode ser limitada de diversas maneiras incluindo modificações diretas ao DNA no sítio da inserção no cromossomo, como por metilação, ou por silenciamento pós transcricional no RNA (Hamilton and Baulcombe, 1999; Voinnet et al., 2003) ou nível de proteína (Brodersen et al., 2008). As características do DNA ou RNA estranhos que desencadeiam tal mecanismo de supressão não são bem compreendidos (Lindbo et al., 1993; Lechtenberg et al., 2003). Porém, tal supressão mediada pelo hospedeiro da expressão do transgene é mais provável para traços que requerem alta expressão, transgenes múltiplos e transgenes com regiões de similaridade uns com os outros ou com o genoma hospedeiro (Schubert et al., 2004). Além do mais o desempenho transgênico pode degradar progressivamente com cada geração subsequente, mais provavelmente devido a DNA-metilação do promotor e regiões codificantes de transgenes (Hagan et al., 2003).

[00558] Aqui nós demonstramos que proteínas supressoras virais (VSP) expressadas de post-embriogênese promotor específico para sementes são desenvolvimenticamente tolerados em Arabidopsis. Co-expressão de diversos VSP com um traço quantificável, GFP,

indicou que traços recombinantes também eram tolerados na semente expressando VSP (Exemplo 14). Como os VSP são conhecidos por bloquear pequenos metabolismos de RNA que constituem o aparato de supressão de transgene, nós sugerimos que a co-expressão de um VSP com traços recombinantes em sementes irá assegurar que estes traços desempenhem a um nível alto e constante por muitas gerações.

[00559] Como as plantas toleraram a expressão VSP como P19 e PePo após embriogênese, isto sugeriu que sinais de desenvolvimento endógenos, pelo menos aqueles usando pequenos RNAs, são menores ou menos críticos neste estágio avançado do desenvolvimento da planta. Os quatro VSPs escolhidos para este estudo irão provavelmente atuar sobre diferentes partes da biogênese de RNA pequeno e, portanto, funcionar em extensões diferentes e, portanto, funcionar até diferentes extensões. Ao reduzir o efeito silenciador nos cassetes transgênicos multi-gene via o uso de um VSP co-introduzido, um número de mudanças nas estratégias de expressão transgênica pode ser vislumbrado. Primeiro, os mesmos cassetes de expressão podem ser usados repetidamente com um menor requerimento de se evitar a repetição de seqüências entre regulatórias ou regiões codificantes. Esta característica, portanto, pode permitir que grandes vetores de expressão multi-gene sejam construídos usando os mesmos sinais de poliadenilação promotores. Alternativamente, múltiplas cópias de um único gene podem ser usadas para aumentar os níveis de expressão com uma probabilidade de ocorrência ou menor extensão dos efeitos silenciadores, ou com maior estabilidade de expressão sobre gerações de

plantas.

Exemplo 16. Expressão transiente de genes em células de folha de planta usando um promotor específico para sementes

[00560] As atividades de enzima de proteínas codificadas pelos genes de *Micromonas* CCMP 1545 $\Delta 6$ -dessaturase (SEQ ID NO:8 codificado por SEQ ID NO:7), *Pyramimonas* CS-0140 $\Delta 6$ -elongase (SEQ ID NO:4 codificado por SEQ ID NO:3), *Pavlova salina* $\Delta 5$ -dessaturase (SEQ ID NO:26 codificado por SEQ ID NO:25), *Pyramimonas* CS-0140 $\Delta 5$ -elongase (SEQ ID NO:6 codificado por SEQ ID NO:5) e *Pavlova salina* $\Delta 4$ -dessaturase (SEQ ID NO:73 codificado por SEQ ID NO:72), cada um sob o controle de um promotor específico para sementes, foram demonstrados no tecido da folha, na planta, usando uma expressão melhorada de *Nicotiana benthamiana* expressão transiente *sycuale*, como a seguir.

[00561] O vetor quimérico pJP3057 descrito no Exemplo 15 e contendo cinco genes de biossíntese DHA, cada um sob o controle do promotor de napina truncado específico para semente, FPl, era introduzido na cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. Um vetor quimérico, designado 35S:LEC2, era gerado ao clonar a otimização códon *Arabidopsis thaliana* COTILÉDONE FOLHUDO2 (Arath-LEC2) gene no sítio EcoR1 site de 35S:pORE04. A construção 35S:LEC2 era introduzido separadamente nas culturas de cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. Células transgênicas de culturas separadas de AGL1 contendo ou pJP3057 ou 35S:LEC2 foram misturadas e a mistura infiltrada no tecido da folha das plantas *Nicotiana benthamiana*. As plantas foram crescidas por mais quatro dias após a infiltração antes de

discos de folhas serem levados para análise GC do total de ácidos graxos no lipídio de folha, e de frações de lipídios separadas. Isto revelou que estes genes estavam funcionando para produzir DHA em *Nicotiana benthamiana* (Tabela 19). Tecido da folha transformado com estes genes continha SDA (1.2%), ETA (2.0%), EPA (0.6%), DPA (1.7%) e DHA (2.5%). O tecido da folha também continha GLA (2.4%) e níveis residuais de outros ω 6 ácidos graxos de cadeia longa.

[00562] Os vetores quiméricos pJP3115 e pJP3116 (Exemplo 17) foram introduzidos na Cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. Células transgênicas das quatro culturas separadas de AGL1 contendo um dos pJP3115, pJP3116, 35S:P19 e 35S:LEC2 foram misturadas e a mistura infiltrada no tecido da folha das plantas *Nicotiana benthamiana*. As plantas foram crescidas por mais quatro dias após a infiltração antes de discos de folhas serem levados para análise GC que revelou que estes genes estavam funcionando para produzir DHA na *Nicotiana benthamiana* (Tabela 19). Tecido da folha transformado com estes genes continha SDA (5.6%), ETA (1.4%), EPA (0.2%), DPA (1.7%) e DHA (2.4%). O tecido da folha também continha níveis residuais de ácidos graxos ω 6 de cadeia longa.

[00563] Este experimento confirmou que as construções duais pJP3115 e pJP3116 estavam funcionando em combinação para produzir DHA tão eficientemente quanto uma única construção contendo todos os oito genes.

Tabela 19. Composição de ácido graxo (porcentagem do total de ácidos graxos) do tecido da folha de *Nicotiana benthamiana* transientemente transformado com várias construções. Erros denotam desvio padrão entre infiltrações

separadas executadas em tréplica.

				pJP3057
				+
		35S:LEC		35S:LEC
FA normal	Apenas	2	pJP3057	2
	P19			
16:0	13,2 ±	12,8 ±	13,3 ±	13,2 ±
	0,5	1,0	0,1	0,6
16:1 ^{Δ3t}	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,0
16:3 ^{Δ9,12,15}	7,6 ± 0,3	8,2 ± 0,4	7,1 ± 0,3	7,5 ± 0,4
18:0	1,7 ± 0,2	2,0 ± 0,4	1,8 ± 0,1	2,4 ± 0,3
18:1 ^{Δ9}	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,5 ± 0,2
18:2 ^{Δ9,12}	12,6 ±	12,8 ±	13,8 ±	12,7 ±
	1,1	0,6	0,1	0,4
18:3 ^{Δ9,12,15}	58,3 ±	56,3 ±	56,3 ±	44,8 ±
	1,9	2,6	0,7	2,1
20:0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1
Outros menores	3,8	4,6	3,9	4,8
Total	99,9	99,6	98,9	88,5
Novo Δ6 PUFA				
18:3 ^{Δ6,9,12}	-	0,1 ± 0,0	-	2,4 ± 0,1
20:3 ^{Δ8,11,14}	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
20:4 ^{Δ5,8,11,14}	-	-	-	-
22:4 ^{Δ7,10,13,16}	-	-	-	0,6 ± 0,1
22:5 ^{Δ4,7,10,13,16}	-	-	-	0,3 ± 0,0
Total	0,1	0,4	0,2	3,5
Novo Δ3 PUFA				
18:4 ^{Δ6,9,12,15}	-	-	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1
20:4 ^{Δ8,11,14,17}	-	-	-	2,0 ± 0,1
20:5 ^{Δ5,8,11,14,17}	-	-	-	0,6 ± 0,0

22:5 ^{Δ7,10,13,16,19}	-	-	-	1,7 ± 0,1
22:6 ^{Δ4,7,10,13,16,19}	-	-	-	2,5 ± 0,2
Total	-	-	0,9	8,0
FA total novo	0,1	0,4	1,1	11,5
FA total	100,0	100,0	100,0	100,0

Discussão: Falha rápida e validação de contrutos específicos para sementes

[00564] Os experimentos usando um fator de transcrição, neste caso LEC2, em combinação com uma suite de genes cada um sob o controle de um promotor específico para tecido como um promotor específico para semente mostrou que tais construções podem ser testadas em um sistema heterólogo, como folhas, onde o promotor específico para tecido não seria normalmente expressado, e são proféticos de expressão na semente. A habilidade de expressar transientemente um promotor específico para semente em uma célula de folha permite uma validação rápida do projeto da construção. Experimentos para determinar a efetividade do promotor específico para sementes, especialmente em um contexto de construção multi-gene, anteriormente confiavam em transformação estável em uma planta modelo de óleo de semente ou colheita, seguido pela geração de linhas de prole antes que a análise fenotípica pudesse determinar a efetividade da construção em uma semente de planta. O fato que os níveis de ácidos graxos obtidos em *N. benthamiana* eram semelhantes a aqueles vistos na transformação *Arabidopsis* estável com esta mesma construção como descrito Exemplo 15 aumenta a confiança na aplicabilidade deste ensaio.

Exemplo 17. Construções duais para síntese de DHA

[00565] O vetor pJP3115 (Figura 22) foi construído como a seguir. Primeiro, o Fragmento SbfI-ApaI do vetor pJP10lacq (Figura 14) foi clonado para dentro do sítio PstI-ApaI de pORE03 para render pJP3011. A seguir, um fragmento SwaI contendo a otimização códon *Micromonas pusillum* $\Delta 6$ -dessaturase (SEQ ID NO: 125) era clonado para um sítio T4 DNA tratado com polimeríase XhoI em pJP3011 para render pJP3108. Um fragmento SwaI contendo a otimização códon Pavlova Sali numa $\Delta 5$ -dessaturase (SEQ ID NO: 127) era então clonado para um sítio T4 DNA tratado com polimeríase NotI em pJP3108 para render pJP3109. Um fragmento SwaI contendo a otimização códon *Pyramimonas cordata* $\Delta 6$ -elongase (SEQ ID NO: 126) foi clonada para dentro do Sítio SfoI em pJP3109 para render pJP3110. A construção era então convertida de um BASTA-resistente construção em uma construção resistente a canamicina ao clonar o fragmento BsiWI-AsiSI de pJP3110 para o sítio BsiWI- AsiSI de pORE04, rendendo pJP3111. Um fragmento NcoI (T4 DNA tratado com polimeríase) *sbfi* contendo o promotor truncado de napina FPl e a *Crepis palestina* $\Delta 12$ -dessaturase foi clonada para dentro do sítio EcoBN-PstI in pJP3111 para render pJP3115.

[00566] O vetor pJP3116 (Figure 23) era construçãoed como a seguir. Primeiro, um fragmento SwaI contendo the otimização códon *Pyramimonas cordata* $\Delta 5$ -elongase (SEQ ID NO: 128) era clonado into a T4 DNA tratado com polimeríase sítio XhoI em pJP3011 para render pJP3112. Um fragmento SwaI contendo a otimização códon *Pavlova salina* $\Delta 4$ -dessaturase (SEQ ID NO: 129) foi clonada para dentro do Sítio SfoI em pJP3112 para render pJP3113. Um fragmento

NotI contendo a *Perilla frutescens* $\Delta 15$ -dessaturase foi então clonado para dentro do sítio NotI em pJP3113 para render pJP3114. A construção era então convertida de uma construção resistente a BASTA em uma construção resistente a higromicina ao clonar um fragmento XbaI-MluI contendo um cassette de resistência à higromicina (consistindo do vírus do mosaico da couve-flor 35 S promotor seguido pelo gene fósforotransferase higromicina B CAT-I intron- interrompido obtido do vetor binário pWVEC8 e o terminador NOS) para o sítio AvrII-MluI de pJP3114 para render pJP3116.

[00567] Os vetores quiméricos pJP3115 e pJP3116 foram introduzidos individualmente na cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 e células transgênicas de culturas delas foram misturadas com AGL1 transformado com 35S:P19 e a mixture infiltrada no tecido da folha de Plantas *Nicotiana benthamiana* na estufa. As plantas foram crescidas por mais cinco dias após a infiltração antes de discos de folhas serem levados para análise GC que revelou que estes genes estavam funcionando para produzir DHA na *Nicotiana benthamiana* (Tabela 20). Tecido da folha transformado com estes genes continha SDA (5.6%), ETA (1.4%), EPA (0.2%), DPA (1.7%) e DHA (2.4%). O tecido da folha também continha níveis residuais de GLA, ETA e ARA. As eficiências de conversão foram as seguintes: 98.9% do ácido oleico dentro da célula era $\Delta 12$ -dessaturado (não sendo significativamente diferente da amostra de controle); 95.4% do LA dentro da célula era $\Delta 15$ -dessaturado; 18.1% do ALA produzido na célula era $\Delta 6$ -dessaturado; 50.4% do SDA produzido na célula era $\Delta 6$ -alongado; 75.4% do ETA dentro da célula era $\Delta 5$ -dessaturado; 95.4% do EPA dentro da célula era $\Delta 5$ -alongado;

58.5% do DPA dentro da célula era Δ^4 -dessaturado para produzir DHA.

[00568] Ambos os construções foram usados para transformar canola. Sementes T1 serão coletadas e analisadas por mudanças morfológicas gerais e níveis de síntese de LC-PUFA.

Tabela 20. Composição de ácidos graxos (porcentagem do total de ácidos graxos) do tecido da folha de *Nicotiana benthamiana* transientemente transformada com diversos construções. Erros denotam desvio padrão entre infiltrações separadas feitas em tréplica.

FA Usual	35S:LEC		
	Somente	2	pJP3115+ pJP3116+
	P19		35S:LEC2
16:0	13,2 ± 0,5	12,8 ± 1,0	16,1 ± 0,1
16:1 ^{Δ3t}	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1
16:3 ^{Δ9,12,15}	7,6 ± 0,3	8,2 ± 0,4	6,8 ± 0,1
18:0	1,7 ± 0,2	2,0 ± 0,4	3,4 ± 0,0
18:1 ^{Δ9}	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,0
18:2 ^{Δ9,12}	12,6 ± 1,1	12,8 ± 0,6	2,6 ± 0,1
18:3 ^{Δ9,12,15}	58,3 ± 1,9	56,3 ± 2,6	51,0 ± 0,1
20:0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,0
Outros menores	3,8	4,6	5,7
Total	99,9	99,6	88,3
Novo Δ6 PUFA			
18:3 ^{Δ6,9,12}	-	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
20:3 ^{Δ8,11,14}	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1

20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$	-	-	-
22:4 $\Delta^{7,10,13,16}$	-	-	-
22:5 $\Delta^{4,7,10,13,16}$	-	-	0,1 $\pm$ 0,0
Total	0,1	0,4	0,4
Novo Δ^3 PUFA			
18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$	-	-	5,6 $\pm$ 0,1
20:4 $\Delta^{8,11,14,17}$	-	-	1,4 $\pm$ 0,1
20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$	-	-	0,2 $\pm$ 0,0
22:5 $\Delta^{7,10,13,16,19}$	-	-	1,7 $\pm$ 0,0
22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$	-	-	2,4 $\pm$ 0,1
Total	-	-	11,3
Total de FA			
	0,1	0,4	11,7
Novo			
Total de FA	100,0	100,0	100,0

Discussão

[00569] pJP3115 e pJP3116 foram projetados para fornecer, em combinação, todos os genes para a produção de DHA, mais especificamente os dois vetores recombinantes se complementam para constituir a via. O ácido graxo produzido pela Δ^{12} -dessaturase codificado pelo pJP3115 era usada como substrato pela Δ^{15} -dessaturase codificado por pJP3116 que também continha genes para as subsequentes Δ^6 -dessaturase, Δ^6 -elongase e Δ^5 -dessaturase. O produto do Δ^5 -dessaturase, EPA, era então agido sobre pela Δ^5 -elongase codificado por pJP3115, o produto do qual era convertido em DHA pela Δ^4 -dessaturase também codificada por pJP3115. O princípio de dividir os transgenes entre dois construções, que foram usados para separadamente transformar estavelmente plantas

com subsequente cruzamento de plantas de elite para constituir a via completa, evitou alguns dos problemas associados com conter numerosos transgenes em uma única construção, como eficiência de informações reduzida devido ao aumento de tamanho e a reduzida expressão dos genes. A combinação de transformação estável das construções, ou por super-transformação ou por cruzar duas linhas transgênicas, irá resultar em uma planta transgênica contendo o complemento total de genes requeridos para síntese DHA.

[00570] Era também notado que a construção pJP3115 continha quatro genes expressos em um formato invertido, ou seja, dois genes em uma orientação e dois genes na outra, para que os pares fossem transcritos de forma divergente (afastando-se uns dos outros). Quando comparado ao projeto invertido usado para expressar três genes na construção pJP107 (Exemplo 8), foi concluído que a adição de um quarto gene neste formato não atrapalharia a expressão dos genes. Era interessante notar que a relativamente baixa eficiência de alongamento $\Delta 6$ - (50.4%) comparado com outros experimentos descritos acima, que era provável devido ao fato que os genes codificando as enzimas para as três etapas prévias de desaturação foram todas expressadas do Promotor FP1 enquanto que o gene codificando a $\Delta 6$ -elongase era dirigido pelo promotor *Arabidopsis thaliana* FAEl. Isto era pensado como a causa da diferença na temporização do promotor, com o promotor FAEl sendo ativado após o promotor FP1. Comparado com experimentos prévios onde a $\Delta 6$ -elongase era dirigida pelo Promotor FP1, isto resultou em uma maior acumulação de SDA que era então removida do grupo metabólico acessado pela $\Delta 6$ -elongase antes que pudesse ser

agida sobre pela $\Delta 6$ -elongase.

Exemplo 18. Isolamento e caracterização de um gene codificando uma DGAT2 microalgal

Síntese de um gene de Micromonas pusilla DGAT2 de extensão completa

[00571] Os modelos de proteína de sequência de genoma filtrados de Micromonas CCMP 1545 produzidos pelo US Department of Energy Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov>) era analisado com um programa BLASTP usando uma sequência putativa de amino ácidos de *Ostreococcus lucimarinus*, Genbank Accession No. XP 00141576, como a penalidade de extensão de descontinuidade. Esta análise revelou a presença de uma proteína prevista na *Micromonas* CCMP1545 que tinha homologia com XP 00141576. A sequência de proteínas previstas *Micromonas* CCMP 1545 era usada para projetar e sintetizar uma sequência de nucleótido códon-otimizado que era mais adequada para expressão em plantas dicotiledíneas plantas como a *Brassica napus*. A sequência nucleótida da região codificante da proteína é dada no documento SEQ ID NO: 107. A construção plasmida era designado 0928814_Mic1545-DGAT2_pMA. A sequência de amino ácidos é mostrada como SEQ ID NO: 108. Análise BLASTP usando a sequência de amino ácidos *Micromonas* CCMP 1545 dessaturase SEQ ID NO: 108 como penalidade para outras proteínas na base de dados Genbank mostrou que a proteína tinha homologia com DGATs. O maior grau de identidade era de 53% ao longo da extensão total com com a sequência de amino ácidos de Accession No. XP 002503155, a sequancia de uma *Micromonas* RCC299 proteína putativa. Este gene contém um motivo aciltransferase

diaglicerol (NCBI domínio conservado pfam03982) nos amino ácidos 74 a 334.

[00572] Uma construção genética 35S:Mic1545-DGAT2 codificando o DGAT2 sob o controle do constitutivo 35 S promotor era feito ao inserir a região codificante toda de 0928814_Mic1545-DGAT2_pMA, continha um fragmento *EcoR*I, em 35S- pORE04 (Exemplo 4, acima) no sítio *EcoR*I, gerando pJP3128. Este vetor quimérico era introduzido na cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 e células transgênicas de culturas destes foram misturadas com 35S:P19 AGL1 e a mistura infiltrada no tecido da folha de plantas *Nicotiana benthamiana* na estufa. As plantas foram crescidas por mais further cinco days após infiltração antes de discos de folhas serem levados para análise de lipídios que revelou que o gene codificando DGAT2 estava funcionando para aumentar o total de TAG em células de folhas transformadas, com preferência para poli não-saturados ácidos graxos (Tabela 21). Em particular, o nível de poli não-saturados ácidos graxos no TAG nas células transformadas aumentou em pelo menos 3 vezes.

[00573] Será apreciado pelos elementos versados na técnica que numerosas variações e/ou modificações podem ser feitas à invenção como mostrado nas realizações específicas sem abandonar o espírito ou âmbito da invenção como descrito de forma ampla. As presentes realizações devem, portanto, ser consideradas em todos os aspectos como sendo ilustrativas e não restritivas.

[00574] O presente pedido de patente reivindica prioridade do documento US 61/199,669 arquivado em 18 de novembro de 2008, e US 61/270,710 arquivado em 9 de julho

de 2009, o conteúdo de ambos dos quais são incorporados aqui por referência.

[00575] Todas as publicações discutidas e/ou referidas aqui são incorporadas aqui na sua totalidade.

[00576] Qualquer discussão de documentos, atos, materiais, dispositivos, artigos e semelhantes que tem sido incluído nas presentes especificações são apenas para o propósito de fornecer um contexto para a presente invenção. Não deve ser levado como uma admissão que qualquer ou todos dos materiais que formam a base da técnica anterior ou eram de conhecimento geral comum no campo relevante a presente invenção como ela existiu antes da data de prioridade de cara reivindicação deste pedido.

Quantidade em Perfil TAG					Quantidade em Perfil PL				
TAG, ug					PL, ug				
P19	DGAT2	P19	DGAT2		P19	DGAT2	P19	DGAT2	
C16:0	0,73	0,86	55,8	32,7	C16:0	26,33	20,37	14,2	14,5
C16:1d7	0,00	0,00	0,0	0,0	C16:1d7	0,00	0,00	0,0	0,0
16:1d13t	0,00	0,00	0,0	0,0	16:1d13t	3,4	2,96	1,8	2,1
16:2w6	0,00	0,00	0,0	0,0	16:2w6	1,60	1,19	0,9	0,8
16:2w4	0,00	0,05	0,0	1,7	16:2w4	1,15	1,00	0,6	0,7
16:3w3	0,00	0,00	0,0	0,0	16:3w3	12,65	9,05	6,8	6,4
C18:0	0,27	0,32	20,7	12,0	C18:0	4,50	3,56	2,4	2,5
C18:1d9	0,00	0,21	0,0	8,0	C18:1d9	1,89	1,82	1,0	1,3
C18:1d11	0,00	0,00	0,0	0,0	C18:1d11	0,85	0,78	0,5	0,6
C18:2n6	0,14	0,68	11,0	25,9	C18:2n6	24,36	16,52	13,2	11,7
C18:3n6	0,00	0,00	0,0	0,0	C18:3n6	0,00	0,00	0,0	0,0
C18:3n3	0,16	0,52	12,5	19,6	C18:3n3	106,38	82,16	57,6	58,4
C20:0	0,00	0,00	0,0	0,0	C20:00	0,59	0,51	0,3	0,4
C18:4n3	0,00	0,00	0,0	0,0	C18:4n3	0,00	0,00	0,0	0,0

C20:3n3	0,00	0,00	0,0	0,0	C20:3n3	0,34	0,00	0,2	0,0
C22:0	0,00	0,00	0,0	0,0	C22:0	0,37	0,37	0,2	0,3
C20:4n3	0,00	0,00	0,0	0,0	C20:4n3	0,00	0,00	0,0	0,0
C20:5n3	0,00	0,00	0,0	0,0	C20:5n3	0,00	0,00	0,0	0,0
C22:3n3	0,00	0,00	0,0	0,0	C22:3n3	0,00	0,00	0,0	0,0
C24:0	0,00	0,00	0,0	0,0	C24:0	0,43	0,41	0,2	0,3
C22:5n6	0,00	0,00	0,0	0,0	C22:5n6	0,00	0,00	0,0	0,0
C22:5n3	0,00	0,00	0,0	0,0	C22:5n3	0,00	0,00	0,0	0,0
C22:6n3	0,00	0,00	0,0	0,0	C22:6n3	0,00	0,00	0,0	0,0
TFA	26,2	52,7	100,0	100,0	TFA	3.696,9	2.814,0	100,0	100,0
(ug/g se					(ug/g se				
FW)					FW)				

REFERÊNCIAS

- Abbadi et al. (2004) Plant Cell 16: 2734-2748.
- Abbott et al. (1998) Science 282:2012-2018.
- Abdullah et al. (1986) Biotech. 4:1087.
- Agaba et al. (2004) Marine Biotechnol. (NY) 6:251-261.
- Al-Mariri et al. (2002) Infect. Immun. 70:1915-1923.
- Alvarez et al. (2000) Theor Appl Genet 100:319-327.
- Bates et al. (2007) J. Biol. Chem. Vol. 282:31206-31216.
- Baumberger et al. (2007) Curr. Biol. 17:1609-1614.
- Baumlein et al. (1991) MoI. Gen. Genet. 225:459-467.
- Baumlein et al. (1992) Plant J. 2:233-239.
- Beaudoin et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:6421-6426.
- Beclin et al. (2002) Curr. Biol. 12:684-688.
- Berberich. et al. (1998) Plant MoI. Biol. 36:297-306.
- Bligh and Dyer (1959) Canadian J. Biochem. 37: 911-917.

- Bortolamiol et al. (2007) *Curr. Biol.* 17:1615-1621.
- Bouvier-Nave et al. (2000) *Euro. J. Biochem.* 267:85-96.
- Brodersen et al. (2008) *Science* 320:1185-1190.
- Broothaerts et al. (2005) *Nature* 433:629-633.
- Brosnan et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:14741-14746.
- Broun et al. (1998) *Plant J.* 13:201-210.
- Capecchi (1980) *Cell* 22:479-488.
- Chapman et al. (2004) *Gen. Dev.* 18:1179-1186.
- Chen et al. (2004) *The Plant Cell* 16:1302-1313.
- Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-657.
- Chikwamba et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:11127-11132.
- Cho et al. (1999a) *J. Biol. Chem.* 274:471-477.
- Cho et al. (1999b) *J. Biol. Chem.* 274:37335-37339.
- Chung et al. (2006) *BMC Genomics* 7:120.
- Clapp (1993) *Clin. Perinatal.* 20:155-168.
- Clough and Bent (1998) *Plant J.* 16:735-43.
- Courvalin et al (1995) *Life Sci.* 318:1209-1212.
- Coutu et al. (2007) *Transgenic Res.* 16: 771-781.
- Curiel et al. (1992) *Hum. Gen. Ther.* 3:147-154.
- Darji et al. (1997) *Cell* 91:765-775. Denic and Weissman (2007) *Cell* 130:663-677.
- Dietrich et al. (1998) *Nature Biotech.* 18:181-185.
- Dietrich et al. (2001) *Vaccine* 19:2506.
- Ding and Voinnet (2007) *Cell* 130:413-426.
- Domergue et al. (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:4105-4113.
- Domergue et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 35115-35126.
- Domergue et al. (2005) *Biochem. J.* 1 389: 483-490.

- Dunoyer et al. (2004) *The Plant Cell* 16:1235-1250.
- Eglitis et al. (1988) *Biotechniques* 6:608-614.
- Ellerstrom et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:1019-1027.
- Fennelly et al. (1999) *J. Immunol.* 162:1603-1610.
- Fraser et al. (2004) *Plant Physiol.* 135:859-866.
- Fuji et al. (2007) *Plant Cell* 19:597-609.
- Fujimura et al. (1985) *Plant Tissue Culture Lett.* 2:74.
- Garcia-Maroto et al. (2002) *Lipids* 37:417-426.
- Girke et al. (1998) *Plant J.* 15:39-48.
- Gleave (1992) *Plant Mol. Biol.* 20:1203-1207.
- Glevin et al (2003) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:16-37.
- Glick et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 105-157-161.
- Graham et al. (1973) *Virology* 54:536-539.
- Grant et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 15:254-258.
- Guillard and Rythers (1962) *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.
- Grillot-Courvalin et al. (1998) *Nature Biotech.* 16:862-866.
- Grillot-Courvalin (1999) *Curr. Opin. Biotech.* 10-477-481.
- Hagan et al. (2003) *Plant. Biotech. J.* 1:479-490.
- Hamilton and Baulcombe (1999) *Science* 286:950-952.
- Harayama (1998). *Trends Biotechnol.* 16:76-82.
- Temtings et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:14304-14309.
- Hense et al. (2001) *Cell Microbiol.* 3:599-609.

- Hinchee et al. (1988) *Biotechnology* 6:915-922.
- Hoffmann et al. (2008) *J Biol. Chem.* 283:22352-22362.
- Hong et al. (2002a) *Lipids* 37:863-868.
- Horiguchi et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39:540-544.
- Horvath et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:1914-1919.
- Huang et al. (1999) *Lipids* 34:649-659.
- Huang et al. (2004) *Biochimie* 86(11): 793-8. Inagaki et al. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:613-621.
- Johansen and Carrington (2001) *Plant Physiol.* 126-930-938.
- Kajikawa et al. (2004) *Plant MoI. Biol.* 54:335-52.
- Kajikawa et al. (2006) *FEBS Lett* 580:149-154.
- Kapila et al. (1997) *Plant Sci.* 122:101-108.
- Kasschau et al. (2003) *Devel. Cell* 4:205-217.
- Khozin et al. (1997) *Plant Physiol.* 114:223-230.
- Knutzon et al. (1998) *J. Biol Chem.* 273:29360-6.
- Koziel et al. (1996) *Plant MoI. Biol.* 32:393-405.
- Kunik et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:1871-1876.
- Lacroix et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:15429-15434.
- Lazo et al. (1991) *Biotechnol.* 9:693-697.
- Lechtenberg et al. (2003) *Plant J.* 507-517.
- Leonard et al. (2000) *Biochem. J.* 347:719-724.
- Leonard et al. (2000b) *Biochem. J.* 350:765-770.
- Leonard et al. (2002) *Lipids* 37:733-740.
- Lewsey et al. (2007) *Plant J.* 50:240-252.
- Lindbo et al. (1993) *Plant Cell* 5:1749-1759.

- Lo et al. (2003) *Genoma Res.* 13:455-466.
- Lu et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178:2089-2096.
- Mallory et al (2002) *Nat. Biotech.* 20:622-625.
- Marillonnet et al. (2005) *Nature Biotechnology* 23:718-723.
- Matzke et al. (2001) *Science* 293:1080-1083.
- Meng et al. (2008) *J. Gen. Virol.* 89:2349-2358.
- Meyer et al. (2003) *Biochem.* 42:9779-9788.
- Meyer et al. (2004) *Lipid Res* 45:1899-1909.
- Michaelson et al. (1998a) *J. Biol. Chem.* 273:19055-19059.
- Michaelson et al. (1998b) *FEBS Lett.* 439:215-218.
- Moreau e al. (1998) *Progress Lip. Res.* 37:371-391.
- Napier (2007) *Ann. Rev. Plant. Biol.* 58:295-319.
- Napier et al. (1998) *Biochem. J.* 330:611-614.
- Needleman and Wunsch (1970) *J. MoI. Biol.* 48:443-453.
- Niedz et al (1995) *Plant Cell Reports* 14:403.
- Nishizawa et al. (2003) *Plant J.* 34:647-659.
- Ohlrogge and Browse (1995) *Plant Cell* 7:957-970.
- Ow et al. (1986) *Science* 234:856-859. Parker-Barnes et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8284-8289.
- Pereira et al. (2004a) *Biochem. J.* 378:665-671.
- Pereira et al. (2004b) *Biochem. J.* 384:357-366.
- Perrin et al. (2000) *MoI Breed* 6:345-352.
- Potenza et al. (2004) *In Vitro Cell Dev Biol - Planta* 40:1-22.
- Prasher et al (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127:31-36.
- Qi et al. (2002) *FEBS Lett.* 510:159-165.
- Qi et al. (2004) *Nat. Biotech.* 22: 739-745.

- Qiu et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:31561-31566.
- Reddy and Thomas (1996) Nat. Biotech. 14:639-642.
- Reddy et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:293-300.
- Robert et al. (2005) Func. Plant Biol. 32:473-479.
- Robert et al. (2009) Marine Biotech 11:410-418.
- Rose et al. (1998) Nucleic Acids Res. 26:1628-1635.
- Saha et al. (2006) Plant Physiol. 141:1533-1543.
- Saito et al. (2000) Eur. J. Biochem. 267:1813-1818.
- Sakuradani et al. (1999) Gene 238:445-453.
- Sato et al. (2004) Colheita Sci. 44: 646-652.
- Sayanova et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:4211-4216.
- Sayanova et al. (2003) FEBS Lett. 542:100-104.
- Sayanova et al. (2006) Plant 224:1269-1277.
- Sayanova et al. (2007) Plant Physiol 144:455-467.
- Schaffner et al (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:2163-2167.
- Schubert et al. (2004) Plant Cell 16:2561-2572.
- Singh et al. (2005) Curr. Opin. in Planta Biol. 8:197-203.
- Sizemore et al (1995) Science 270:299-302.
- Shianu et al (2001) Vaccine 19:3947-3956.
- Sperling et al. (2000) Eur. J. Biochem. 267:3801-3811.
- Sperling et al. (2001) Arch. Biochem. Biophys. 388:293-8.
- Sprecher et al. (1995) J. Lipid Res. 36:2471-2477.
- Spychalla et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:1142-1147.
- Stalker et al (1998) J. Biol. Chem. 263:6310-6314.
- Thillet et al (1988) J. Biol. Chem 263:12500-12508.

- Tonon et al. (2003) FEBS Lett. 553:440-444.
- Toriyama et al. (1986) Theor. Appl. Genet. 205:34.
- Trautwein (2001) European J. Lipid Sci. and Tech. 103:45-55.
- Tvrdik (2000) J. Cell Biol. 149:707-718.
- Tzfira & Citovsky (2006) Curr. Opin. Biotech. 17:147-154.
- Voinnet et al, (2003) Plant J. 33:949-956.
- Wagner et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6099-6103.
- Wallis and Browse (1999) Arch. Biochem. Biophys. 365:307-316.
- Watts and Browse (1999b) Arch. Biochem. Biophys. 362:175-182.
- Weiss et al (2003) Int. J. Med. Microbiol. 293:95:106.
- Whitney et al. (2003) Plant 217:983-992.
- Wu et al. (2005) Nat. Biotech. 23:1013-1017.
- Yang et al. (2003) Plant 216:597-603.
- Yu et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 104:8924-8929.
- Zank et al. (2002) Plant J. 31:255-268.
- Zank et al. (2005) WO 2005/012316
- Zhang et al. (2004) FEBS Lett. 556:81-85.
- Zhang et al. (2006) 20:3255-3268.
- Zhang et al. (2007) Yeast 25: 21-27.
- Zhou et al. (2006) Plant Sci. 170: 665-673.
- Zhou et al. (2007) Phytochem. 68:785-796.
- Zipfel et al

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo isolado e/ou exógeno que não ocorre de forma natural **caracterizado** por codificar uma $\Delta 5$ elongase cuja sequência de aminoácidos é fornecida como SEQ ID NO: 6, em que a sequência de nucleotídeos do quadro de leitura aberta que codifica a $\Delta 5$ elongase é fornecida como SEQ ID NO: 5 ou suas sequências degeneradas que codificam a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, em que a sequência de nucleotídeos está operacionalmente ligada a um promotor específico de semente.

2. Vetor **caracterizado** por compreender o polinucleotídeo conforme definido na reivindicação 1.

3. Método para produzir óleo contendo ácidos graxos insaturados **caracterizado** por extrair óleo de sementes de plantas transgênicas que compreendem uma célula recombinante compreendendo o polinucleotídeo, conforme definido na reivindicação 1, ou o vetor, conforme definido na reivindicação 2.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** por compreender ainda a purificação do óleo.

5. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** por compreender ainda a produção de uma substância alimentar que compreende o óleo.

6. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** por compreender ainda a produção de uma bebida que compreende o óleo.

7. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** por compreender ainda a produção de uma composição farmacêutica que compreende o óleo.

8. Método, de acordo com a reivindicação 4,

caracterizado por compreender ainda a produção de uma substância alimentar compreendendo o óleo purificado.

9. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** por compreender ainda a produção de uma bebida compreendendo o óleo purificado.

10. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** por compreender ainda a produção de uma composição farmacêutica compreendendo o óleo purificado.

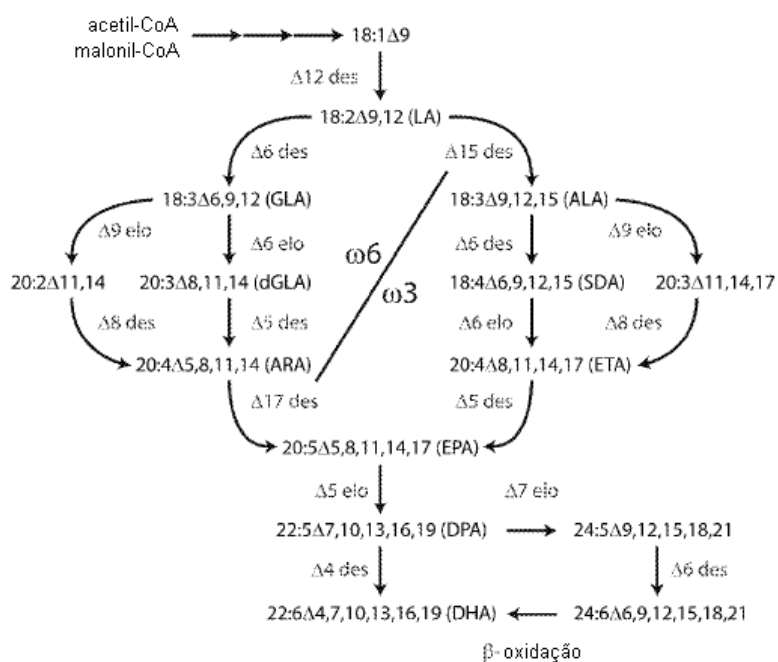


Figura 1

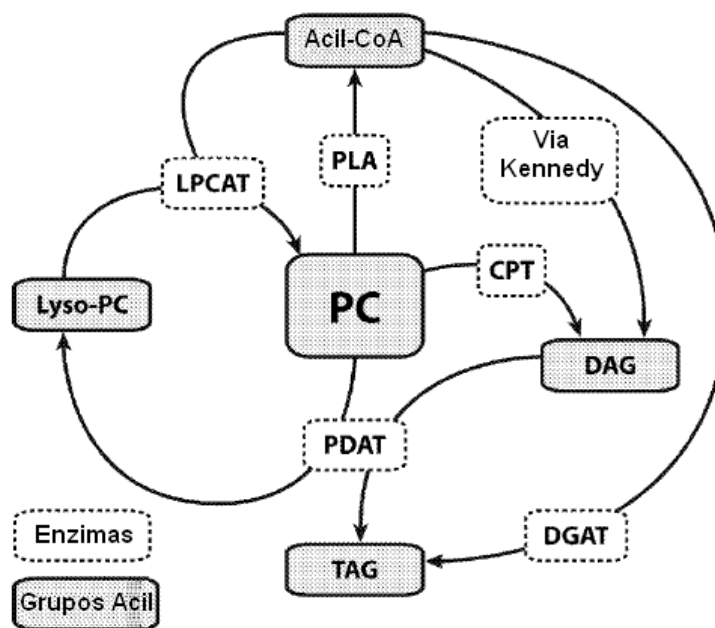


Figura 2

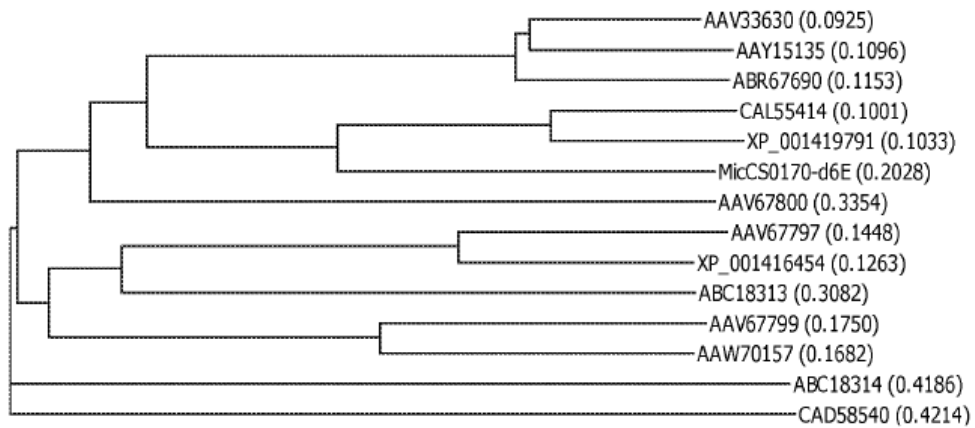


Figura 3

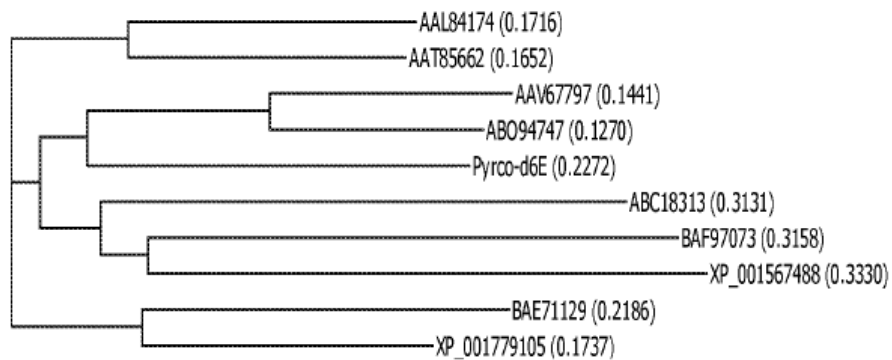
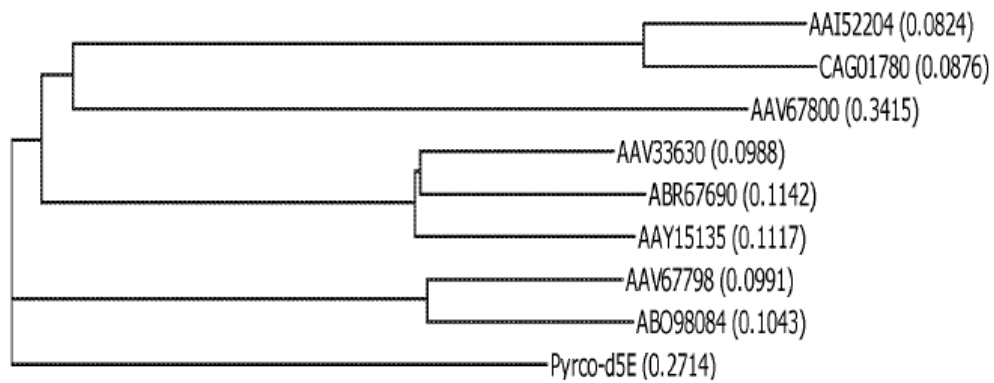
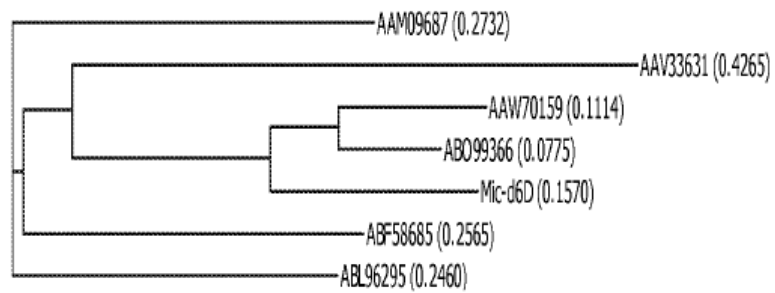


Figura 4

**Figura 5****Figura 6**

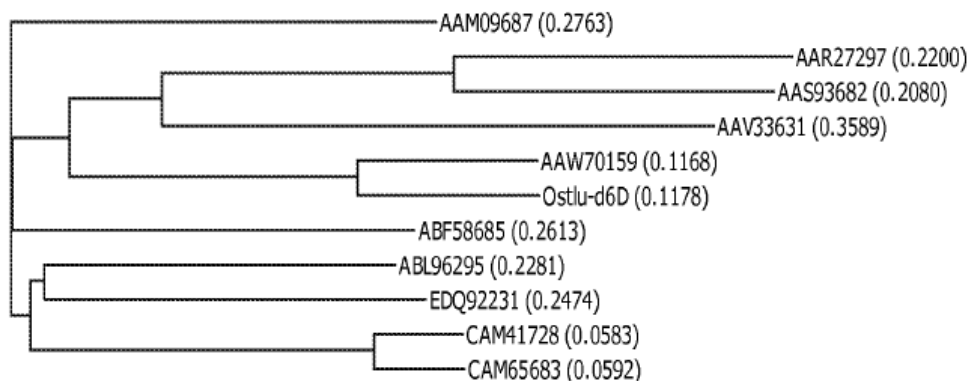


Figura 7

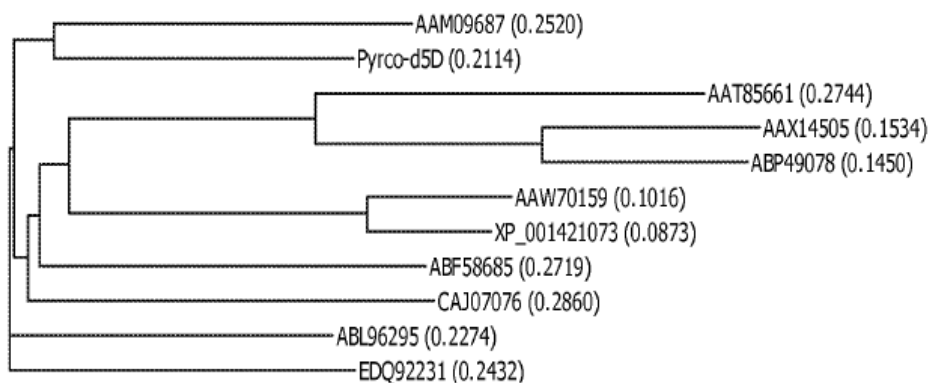
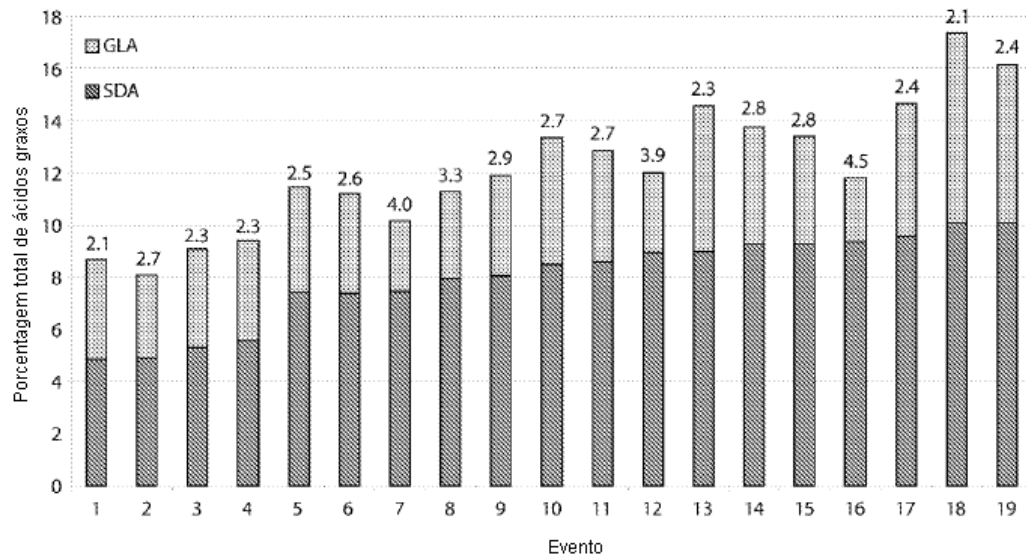


Figura 8

M	(1)	MPPKTDG-----RSPRSPLTRESKSSAEALDAKDASTAPVDLKTLEPHELAAFTETRWVRVED	150
O1	(1)	MVETEGTSRTMANERTSSSSSLSEGTPWTVMGSEDAGKTRNASVTAWTKELEPHALAKTFERRYVVTIEG	76
Ot	(1)	MVETEN-----N-DGIP TVEIAFDGE---RERAEANVKLSAEKMEPAALAKTFARRYVVIEG	150
M	(60)	VEYDVTFKHPGGSVIFYMLANTGADATEAFKEFHRSCLKAWQLRALPSEPÆIKRSE-SEDAPILEDFARWRA	225
O1	(76)	VEYDVTFKHPGGSVICYMLSNTGADATEAFKEFHRSKKARKALAAPLHPKPVDAATREPÆEDEAMIKDFAQWRK	151
Ot	(55)	VEYDVTFKHPGGTVIFYALSNTGADATEAFKEFHRSKKARKALAAPLSEPÅKTAK---VDDÆEMLODFAKWRK	225
M	(134)	ELERDGEFFKPSITHVAYRILLELLTALGTALMYAGYPIIASVVYGAFFGARCWWQHEGGHNSLTGSVYVDKRI	300
O1	(151)	ELEREGFFKPSÆAHVAYRFAELAMFALGTALMHARHIVASVTIVYSCFFGARCWWQHEGGHNSLTGNINWDKRI	226
Ot	(127)	ELERDGEFFKPSÆAHVAYRFAELAMXALGTYLMYARYVVS SVLYACFFGARCWWQHEGGHNSLTGHIWDKRI	300
M	(209)	QAMFCGFGLSGEMNQMHNKHHATPQKVRRHDMDLDTTPAVAFFNTAVEIDNRPRGFSRAWARLQAWTFVPTSG	375
O1	(226)	QAFAGFGGLASSGTMNNHMHKHHTATPQKVRRHDMDLDTTPTVAFFNSAVEENRPRGFSKLWRLQAWTFVPTSG	301
Ot	(202)	QAFAGFGLAGSGTMNNSMHKHHTATPQKVRRHDMDLDTTPAVAFFNTAVEIDNRPRGFSKYWRLQAWTFVPTSG	375
M	(284)	LEVQAFWLYVLHPQVLRKKNYEEASMMQVSHVVRTAVIKLATGYSNP VAYVWFTFGNWLYMYLFAHFSTSHTH	450
O1	(301)	-MVLFFWMFVVLHPRHALRPKSEEEAMMFSAHVIRTAVIKAVTCYSWIASYGLFAAMWASGCCYLF AHFSTSHTH	376
Ot	(277)	-LVLLFWMEFFLHP SKALKGGKVEELVWMLAAHVIRTTWIKAVTGTTAQSYGLFLATSWSGCCYLF AHFSTSHTH	450
M	(359)	LPVVP SDKHL SWVNYAVDHTVDIDP SRGYVNWLMGYLNCQV IHHLFPBMPQFRQPEVSRRFVVPFAKKWGLNKKVL	483
O1	(375)	LDVVP SDKHL SWVRYAVDHTIDINPNNSVWNWLMGYLNCQV IHHLFPBMPQFRQPEVSRRFVVPFAKKWGLNKKVL	451
Ot	(351)	LDVVP ADEHL SWVRYAVDHTIDIDP SQGWVNWLMGYLNCQV IHHLFP SLPQFRQPEVSRRFVVPFAKKWGLNKKVL	483
M	(434)	SYGAWKATFSNLDKVGQHYVYVHGKAEKAH---	483
O1	(450)	TYGAWKATFGNLNDVGKHYVYVHGSQRVKS KSA	483
Ot	(426)	TYGAWKATLGNLDNVGKHYVYVHGQHS GKTA---	483

Figura 9

**Figura 11**

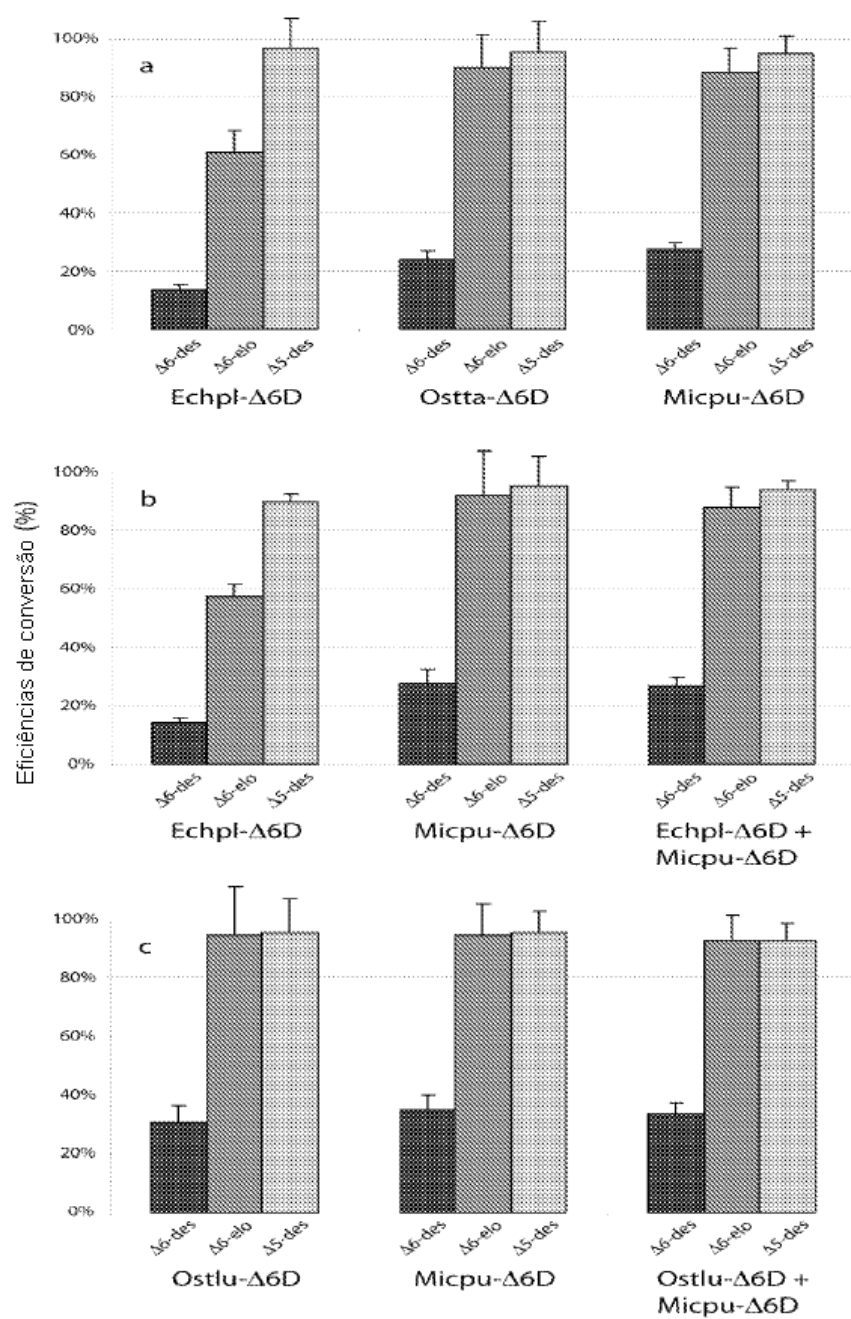
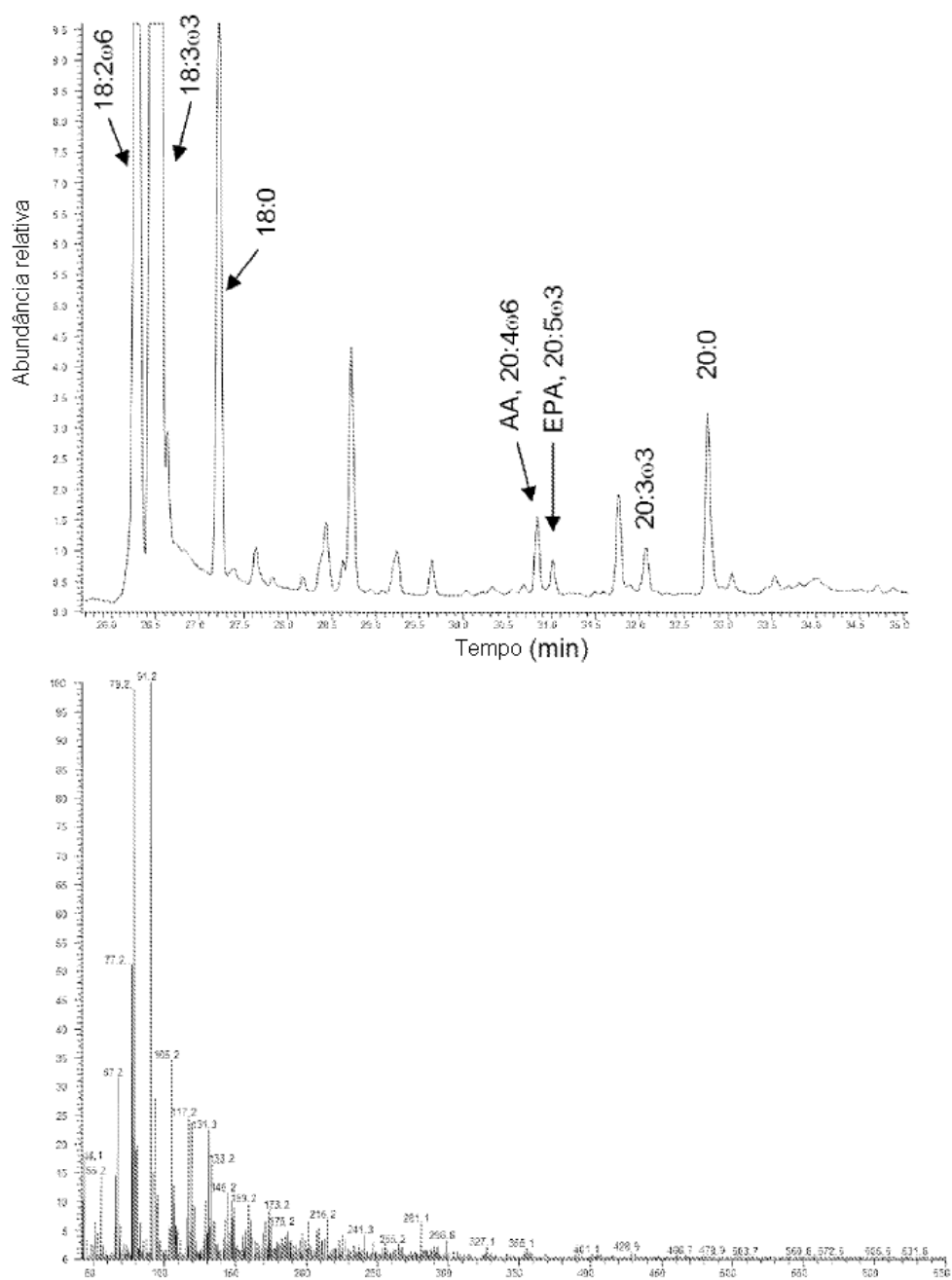


Figura 12

**Figura 13**

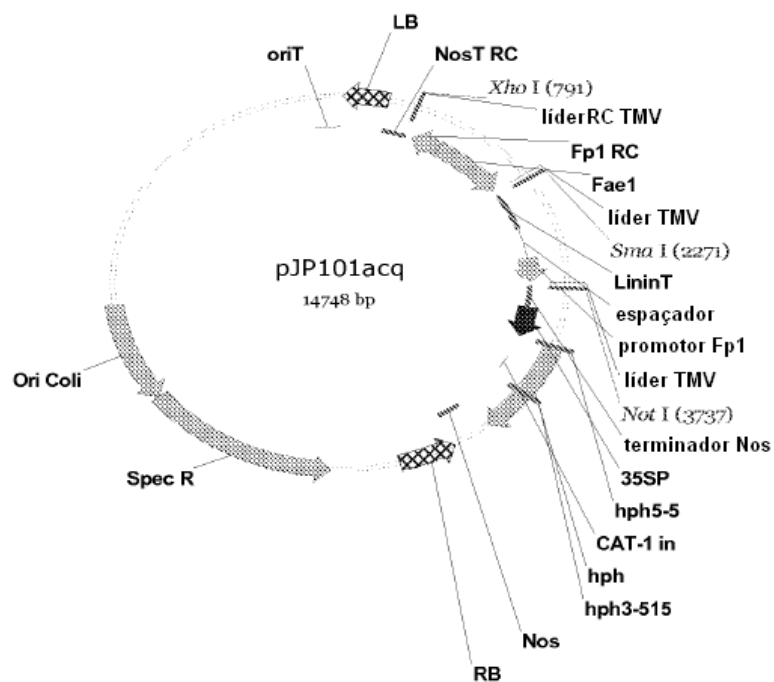


Figura 14

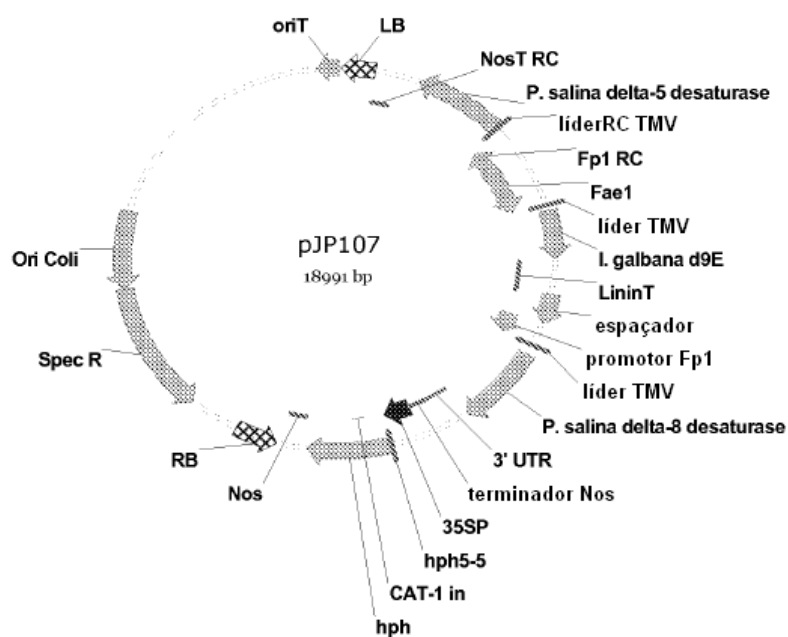


Figura 15

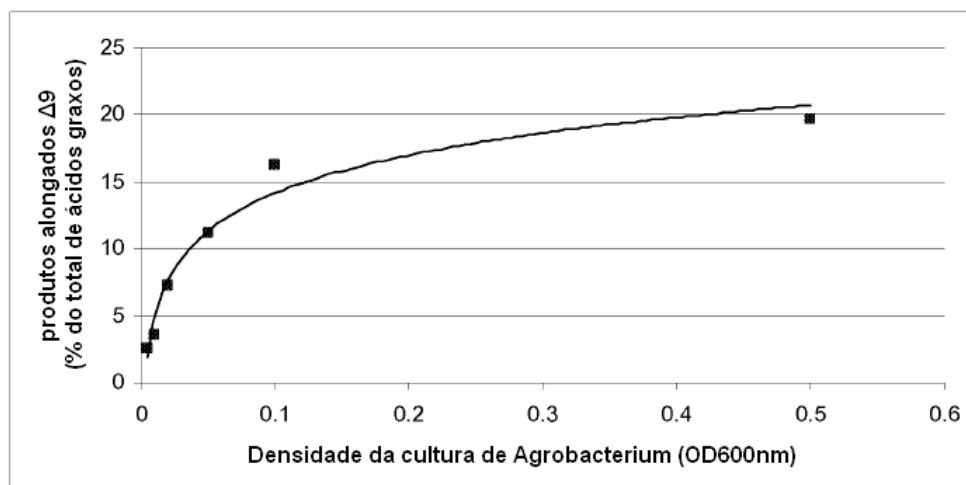
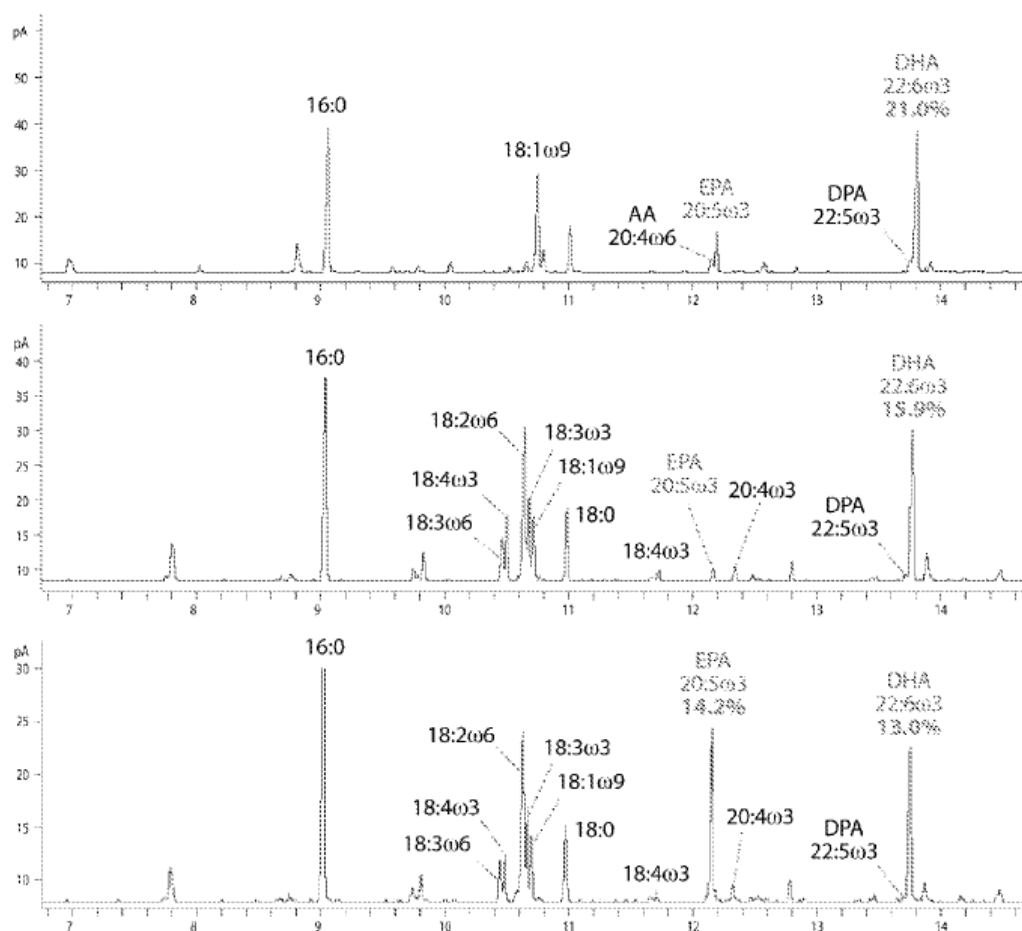


Figura 16

Estável	Transiente	LA	ALA	Transiente	Estável
59% ^a	55%	Δ9 elo ↓ EDA	↓ Δ9 elo ETrA	16%	22% ^a
75% ^a	86%	Δ8 des ↓ DGLA	↓ Δ8 des ETA	68%	48% ^a
84% ^a	96%	Δ5 des ↓ AA	↓ Δ5 des EPA	96%	71% ^a
9% ^b	56%	Δ5 elo ↓ DTA	↓ Δ5 elo DPA ^{ω3}	43%	20% ^b
100% ^b	67%	Δ4 des ↓ DPA ^{ω6}	↓ Δ4 des DHA	55%	83% ^b

Figura 17

**Figura 18**

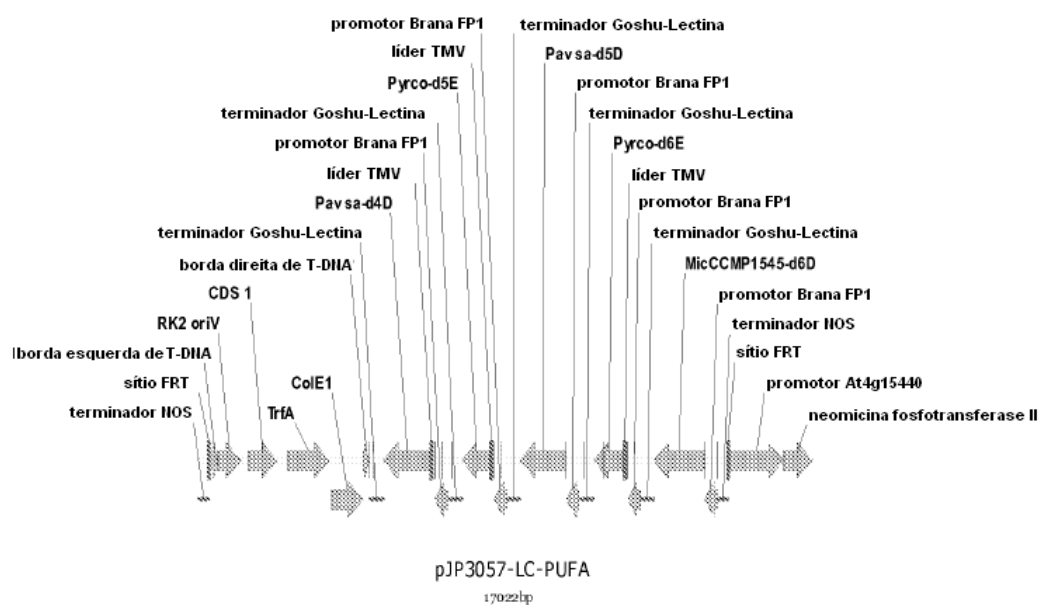


Figura 19

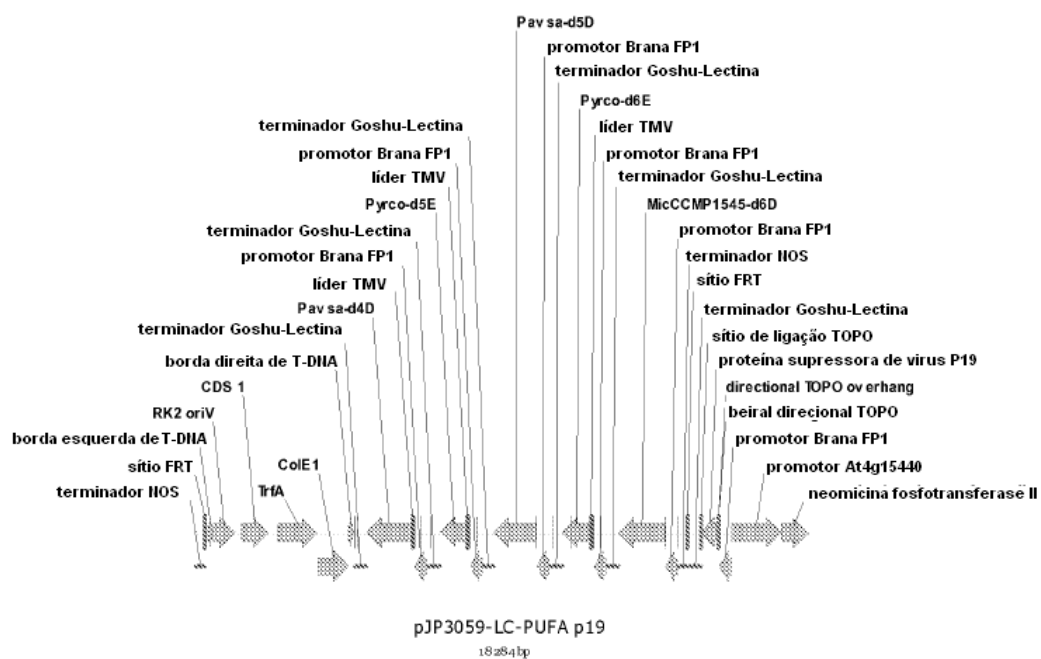


Figura 20

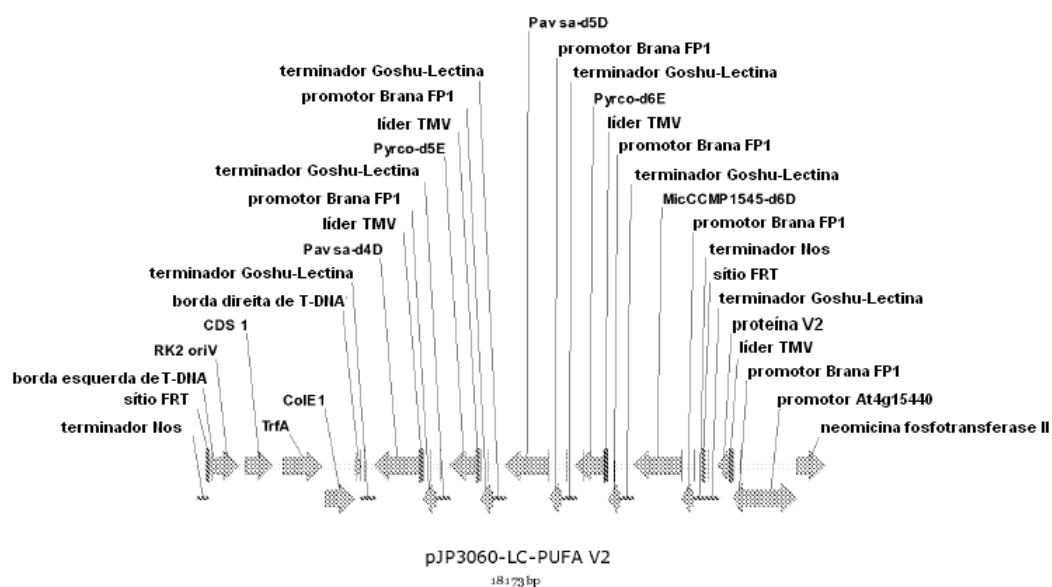


Figura 21

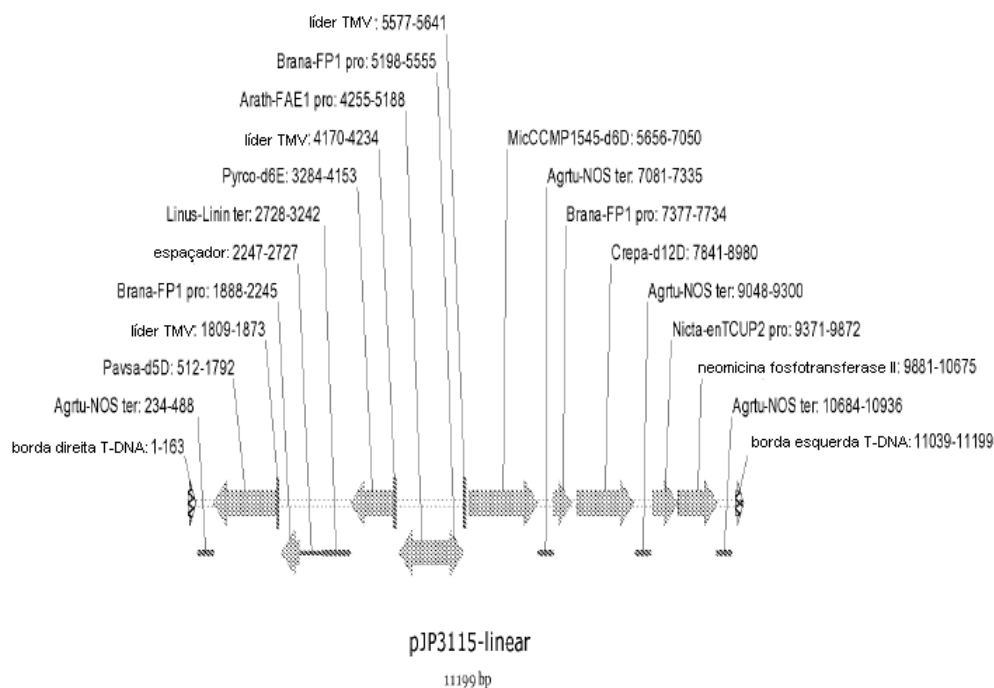


Figura 22

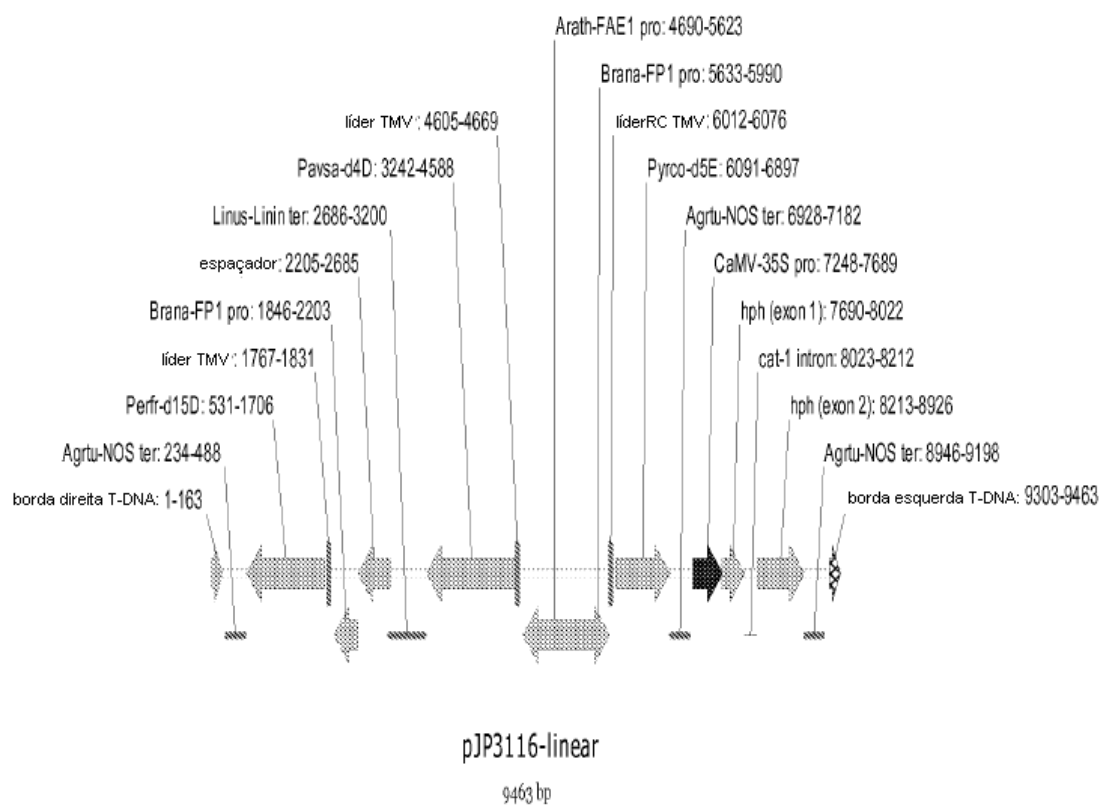


Figura 23