

Cristiane Teresinha Citadin

Clonagem e caracterização do gene da enzima $\Delta 6$ -
dessaturase de ácido graxo e análise de parte do genoma
funcional de *Thalassiosira fluviatilis*

Brasília, DF

2007

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

Clonagem e caracterização do gene da enzima $\Delta 6$ -
dessaturase de ácido graxo e análise de parte do genoma
funcional de *Thalassiosira fluviatilis*

Cristiane Teresinha Citadin

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Departamento de Biologia Celular do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade de Brasília
como requisito parcial à obtenção do Grau de
Mestre em Biologia Molecular.**

Brasília, DF

2007

Trabalho realizado no Laboratório de Nutrigenômica Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, com suporte financeiro da EMBRAPA e CAPES-UnB.

Orientadora: Dra. Damares de Castro Monte

Coorientadora: Dra. Elionor Rita Pereira de Almeida

Colaborador: Dr. Roberto Bianchini Derner

Banca Examinadora:

Dra. Damares de Castro Monte (Orientadora) – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes – Universidade de Brasília

Dr. Francisco José Lima Aragão – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dedico de todo meu coração este trabalho:

Aos meus pais Lauro e Nelice, ao meu irmão Fernando, as minhas sobrinhas maravilhosas Amanda e Isabella. Especialmente a minha querida irmã Lilian. Com muito amor.

“Pode ser que nessa vida eu não possa mais voltar para amar quem não amei, consertar o que estraguei, o perdão que eu não pedi, a solidão que eu não desfiz, o sorriso que eu neguei e aquele esforço que eu não fiz... Eu sei que o tempo vai passar, as pessoas vão e vem, mais sei que algumas vão ficar, pelo mal ou pelo bem, não morrerá quem soube amar e que seja sempre assim, que eu deixe só o bem que existe em mim”

(Pe. Fabio de Melo)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Dra. Damares de Castro Monte, pela orientação científica na realização deste trabalho, pela oportunidade de trabalhar com uma linha de pesquisa tão gratificante e principalmente por sua presença e palavras inspiradoras.

À minha coorientadora, Dra. Elionar Rita Pereira de Almeida, pela orientação, me ensinando a maior parte do que sei de biologia molecular e acima de tudo por ser exemplo de humildade, bondade e competência.

Ao Departamento de Biologia Celular desta Universidade (UnB).

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo suporte técnico e financeiro à pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo durante a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), especialmente ao Professor Dr. Roberto Bianchini Derner por ceder as microalgas e colaborar com este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, pelos dons, pela proteção, pela natureza, sua beleza e diversidade, pela felicidade de trabalhar com ácidos graxos ômega-3 e pela realização do sonho de fazer Mestrado “Biologia Molecular” e pela lista de pessoas “presentes” que me enviaste ao longo destes 2 anos especiais, aos quais também quero agradecer:

Aos meus pais, Lauro e Nelice pelo amor e dedicação com que acolheram essa tarefa e pelas pessoas maravilhosas que são.

À minha irmã Lilian que me incentivou e apoiou desde o início e que fez toda a diferença.

Às minhas sobrinhas, por existirem e serem tão encantadoras...

Ao meu querido irmão por ser tão simples e me dar orgulho de ser sua irmã.

À amiga Caren, pela sua amizade e apoio desde que cheguei a Brasília e por sua ajuda especial na escrita desta dissertação. Ao amigo Rogério, por me “trazer” para Brasília e ainda hoje ser o “Amigão”.

À minha “amigona” Silane e a amiga Claudete que na distância, se fizeram presente. As amigas Silvia e Fabiana, que no tempo em que estiveram presente me deram a sensação do quanto é maravilhoso ter amigos no laboratório. Às atuais parceiras de laboratório Norma, Kelly, Candice, Marli, Daniele e Viviane pelo carinho e encorajamento. Agradeço especialmente a Dani pela ajuda nos experimentos e nas discussões. À Marília que me apoiou em momentos de fragilidade e foi minha primeira amiga no Cenargen.

À Dra. Luzia Helena, pela troca de idéias fundamentais, pela sua ajuda prática e pelo carinho com que sempre me tratou.

A Dra. Natália, aos Drs. Roberto e Marcos por sua ajuda nas análises de bioinformática e especialmente por sua simpatia.

Aos colegas do PBI, pelos reagentes emprestados, equipamentos disponibilizados, informações trocadas e pelas gentilezas nos corredores e laboratórios deixando o ambiente muito mais gostoso. Ao pessoal da Plataforma de seqüenciamento da Embrapa-Cenargen, pelas reações de seqüenciamento.

A secretária do programa de Pós Graduação em Biologia Molecular, Ana, pelos créditos e simpatia.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3.....	1
1.1.1 Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 na saúde humana.....	1
1.1.2 Bioquímica dos poliinsaturados ômega-3.....	3
1.2 Fontes de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3.....	6
1.3 Rotas metabólicas para síntese de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3.....	7
1.4 Enzimas envolvidas na via aeróbica de biossíntese de PUFAs.....	9
1.4.1 Dessaturases.....	9
1.4.1.1 Δ 6-dessaturase.....	10
1.4.1.2 Δ 5-dessaturase.....	11
1.4.1.3 Δ 5/ Δ 6 dessaturase.....	12
1.4.1.4 Δ 8-dessaturase.....	12
1.4.1.5 Δ 4-dessaturase.....	12
1.4.1.6 Ω 3-dessaturase.....	13
1.4.2 Elongases.....	14
1.5 Produção transgênica de ácidos graxos ômega-3.....	16
1.6 Diatomáceas.....	17
2. JUSTIFICATIVA CIÊNTÍFICA	20
3. OJETIVO GERAL.....	22
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4. FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES.....	23
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
5.1 Material biológico.....	24
5.2 Minimização das atividades ribonucleásicas.....	24
5.3 Construção das bibliotecas de cDNA.....	24
5.3.1 Confirmação da presença e tamanho do inserto.....	26
5.4 Seqüenciamento em larga escala da biblioteca de cDNA de <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	27
5.4.1 Extração do DNA plasmidial.....	27
5.4.2 Reação de seqüenciamento.....	27
5.4.3 Avaliação da qualidade e limpeza das seqüências.....	27

5.4.4 Agrupamento das seqüências.....	28
5.4.5 Identificação dos genes.....	28
5.5 Isolamento do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de <i>Thalassiosira fluviatilis</i> (amplificação por PCR).....	28
5.5.1 Purificação e clonagem dos fragmentos selecionados.....	29
5.5.2 Extração do DNA plasmidial.....	30
5.5.3 Seqüenciamento e análise dos clones obtidos por PCR.....	30
5.5.4 Análise da seqüência do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	30
5.5.5 Hibridização de colônias.....	31
5.5.5.1 Transferência das colônias e fixação do DNA.....	31
5.5.5.2 Preparação da sonda.....	31
5.5.5.3 Hibridização e autorradiografia das membranas.....	32
5.5.6 Construção de árvore filogenética para $\Delta 6$ -dessaturase de <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	32
6. RESULTADOS.....	33
6.1 Construção de bibliotecas de cDNA.....	33
6.2 Análise da Biblioteca de cDNA de <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	34
6.2.1 Análise das seqüências.....	36
6.2.1.1 Proteínas envolvidas em síntese de lipídeos.....	37
6.3 Caracterização do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	39
6.3.1 Clonagem e sequenciamento do gene da $\Delta 6$ -dessaturase.....	39
6.3.2 Análise da seqüência do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	43
7. DISCUSSÃO.....	49
8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	53
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LCPUFAs – ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa ou long chain
polyunsaturated fatty acids

ALA – ácido linolênico ou ácido α -linolênico ou *alpha-linolenic acid*

EPA – ácido eicosapentaenóico ou *eicosapentaenoic acid*

DHA – ácido docosahexaenóico ou *docosahexaenoic acid*

LA – ácido linoléico ou *linoleic acid*

AA – ácido araquidônico ou *araquidonic acid*

LCPUFAs – ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa ou long chain
polyunsaturated fatty acids

LA – ácido linoléico ou *linoleic acid*

ORF – fase aberta de leitura ou *open reading frame*

cdNA – ácido desoxirribonucléico complementar ou *complementary desoxyribonucleic acid*

RNA – ácido ribonucléico ou *ribonucleic acid*

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro ou “mesenger ribonucleic acid”

coA – coenzima A

NADH – *nicotinamide adenine dinucleotide*

NADPH - *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

aa - aminoácido

H – histidina

X – qualquer aminoácido

Q – glutamina

S – serina

K- lisina

E - glutamato

D - aspartato

T - treonina

F - fenilalanina

Y - tirosina

N - asparagina

M – metionina

P – prolina

G - glicina

pb – pares de bases

Mb – megabases

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

PCR – reação em cadeia da polimerase ou *polymerase chain reaction*

SMART – mecanismo de mudança na extremidade 5' de RNA transcrito ou *Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript*

dCTP – 2'- desoxicitidina 5'- trifosfato ou *2'-deoxycytidine 5'-triphosphate*

RACE – amplificação rápida de extremidades de cDNAs ou *Rapid Amplified cDNA Ends*

BLAST – ferramenta básica de busca e alinhamento local ou *Basic Local Alignment Search Tool*

UTR – região não traduzida ou *untranslated region*

ESTs – marcas de seqüências expressas ou *expressed sequence tags*

TfAES – Seqüências expressas reunidas de *Thalassiosira fluviatilis* ou *Thalassiosira fluviatilis Assembled Expressed Sequence*

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Esquema da estrutura dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, EPA e DHA..	04
Figura 2. Esquemas das rotas metabólicas para biossíntese de EPA e DHA por meio da via aeróbica.....	08
Figura 3. Fotomicrografia das diatomáceas <i>T. fluviatilis</i> e <i>C. muelleri</i> em microscópio eletrônico.....	18
Figura 4. Gráficos do Percentual individual relativo do total de ácidos graxos poliinsaturados de <i>Chaetoceros muelleri</i> e <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	20
Figura 5. Fluxograma da metodologia utilizada neste trabalho.....	23
Figura 6. Esquema da seqüência do protocolo de clonagem utilizado na confecção das bibliotecas de cDNA.....	26
Figura 7. Fracionamento de RNAs totais das Diatomáceas <i>Thalassiosira fluviatilis</i> e <i>Chaetoceros muelleri</i> em gel de agarose desnaturante contendo formaldeído.....	33
Figura 8. População dos cDNAs obtido das algas <i>Thalassiosira fluviatilis</i> e <i>Chaetoceros muelleri</i> , em gel de agarose 1,2%.....	33
Figura 9. Fragmentos amplificados dos clones das bibliotecas de cDNA por PCR em gel de agarose 1,2%.....	34
Figura 10. Total de clones X total de <i>clusters</i> encontrados nas ESTs da biblioteca de cDNA da diatomácea <i>T. fluviatilis</i>	36
Figura 11. Porcentagem de <i>TfAES</i> que tiveram similaridade com enzimas envolvidas na biossíntese de lipídeos.....	37
Figura 12. Fragmento de 670 pb compreendendo a seqüência interna do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de <i>Thalassiosira fluviatilis</i> em gel de agarose 1,2%.....	39
Figura 13. Esquema da estratégia usada para amplificação das extremidades 5' e 3' do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de ácido graxo de <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	41
Figura 14. Seqüência de nucleotídeos e resíduos de aminoácidos deduzidos do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de <i>T. fluviatilis</i>	43
Figura 15. Análise de identidade da região seqüenciada de 1455 pb <i>T. fluviatilis</i> contra o banco de dados do GenBank.....	44
Figura 16. Alinhamento da seqüência de aminoácidos de quatro delta-6-dessaturases de ácido graxos de microalgas.....	46
Figura 17. Arvore filogenética para proteína predita da $\Delta 6$ -dessaturase de <i>Thalassiosira</i>	

<i>fluviatilis</i>	46
Figura 18. Arvore filogenética para proteína predita da $\Delta 6$ -dessaturase de <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	48
Tabela 1. Lista de <i>primers</i> utilizados para isolar o gene da $\Delta 6$ -dessaturase de ácido graxo da diatomácea <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	21
Tabela 2. Sumário do seqüenciamento de ESTs da diatomácea <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	35
Tabela 3. Resultado da busca de similaridade dos <i>clusters</i> da biblioteca da microalga <i>Thalassiosira fluviatilis</i> contra bancos de seqüências do GenBank utilizando os algoritmos BLASTx e BLASTn.....	37
Tabela 4. Enzimas envolvidas da biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados que apresentaram similaridade com 4 <i>clusters</i> da biblioteca de cDNA da diatomácea <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	38
Tabela 5. Proteínas que apresentaram maiores valores de similaridade (menor <i>e-value</i>), em ordem decrescente, com as ESTs da biblioteca de cDNA da diatomácea <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	38
Tabela 6. Identidade de resíduos de aminoácidos da seqüência da $\Delta 6$ -dessaturase de <i>Thalassiosira fluviatilis</i> comparada com as seqüências de $\Delta 6$ -dessaturases de outros organismos (análise por BLAST).....	43

RESUMO

Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 são moléculas presentes em óleos que têm fundamental importância na manutenção da saúde humana, e precisam ser ingeridos na alimentação. Atenção especial é dada aos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFAs) ômega-3 como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) devido à sua influência na prevenção e modulação de certas condições patológicas como a obesidade e doenças cardiovasculares e pela sua essencialidade no desenvolvimento do cérebro e retina. A principal fonte desses LCPUFAs são peixes, em especial os de águas marinhas frias e profundas. Estudos têm mostrado que esses óleos presentes nos peixes provêm da ingestão de organismos que constituem o zooplâncton, os quais têm as microalgas produtoras de LCPUFAs como seu principal alimento. Dentre as microalgas produtoras de altos perfis de EPA e DHA estão as diatomáceas, que, por esse motivo, se destacam para o estudo da rota biossintética de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 como uma fonte de genes. Com o objetivo de contribuir com o avanço do conhecimento de rotas de biossíntese de LCPUFAs, reportamos a análise parcial do genoma funcional da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis*. Para tanto, foram confeccionadas duas bibliotecas de cDNA das diatomáceas produtoras de altos perfis de LCPUFAs, *Thalassiosira fluviatilis* e *Chaetoceros muelleri* e temos como meta futura realizar análise comparativa do genoma funcional das duas microalgas junto a outras informações de genoma funcional de algas já reportadas. Adicionalmente, buscando gerar ferramentas moleculares que possam ser utilizadas na produção de plantas oleaginosas capazes de produzir LCPUFAs por meio de transgenia, reportamos a clonagem e caracterização do gene codificador da enzima $\Delta 6$ -dessaturase, a primeira enzima envolvida na biossíntese de EPA e DHA, responsável pela produção de ácido estearidônico, intermediário ao EPA produzido a partir do ácido α -linolênico. O cDNA usado para confeccionar a biblioteca de *T. fluviatilis* foi usado como *template* para amplificar e isolar o gene da $\Delta 6$ -dessaturase por meio das técnicas de PCR e RACE. O gene obtido contém uma ORF de 1455 nucleotídeos, que codifica uma proteína putativa de 484 resíduos de aminoácidos. A seqüência total inclui uma região 3' UTR de

120 nucleotídeos. A proteína predita apresenta um domínio citocromo b_5 fusionado à extremidade N-terminal e três motivos histidina-box conservados como em outras dessaturases descritas, apresentando também alta identidade com a $\Delta 6$ -dessaturase de *Thalassiosira pseudonana*. Ao todo foram seqüenciadas 1920 ESTs da biblioteca de cDNA de *T. fluviatilis* na extremidade 5' e em seguida validadas e analisadas no programa Sistema Genoma. Dessas, 1090 foram validadas gerando 775 clusters, compreendendo 628 singletons e 147 contigs. Dentre os clusters, 165 apresentaram identidade com proteínas depositadas no *GenBank*, 109 apresentaram identidade com seqüências nucleotídicas de *T. pseudonana* e 36 clusters tiveram identidade com seqüências ESTs do *GenBank*. Um total de 579 clusters não apresentou identidade com nenhuma seqüência dentre os bancos e algoritmos analisados, sendo exclusivas de *T. fluviatilis*. Na mesma análise foram encontrados 7 genes de enzimas envolvidas com metabolismo de ácidos graxos sendo que 4 deles compreendem enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, mostrando que é possível encontrar genes desta rota por meio do seqüenciamento massivo e gerando informações para entendimento da via de síntese de ácidos graxos ômega-3 dessa microalga.

ABSTRACT

Omega 3 polyunsaturated fatty acids are molecules found in oils that are of fundamental importance in the maintenance of human health, that need to be consumed by the humans. Special attention is given to the omega 3 long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), like eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) due to their influence in the prevention and modulation of certain pathological conditions like obesity and cardiovascular diseases and by their essentiality to brain and retina development. The main sources of LCPUFAs are fishes, specially those of deep and cold marine waters. Several studies have demonstrated that these oils found in the fishes come from their zooplankton ingestion of organisms, which contain microalgae that produce large amounts of LCPUFAs. Among these microalgae are those of the diatomacea family, and due to these are good candidates for the study of the omega 3 biosynthetic pathway and corresponding genes. Here we report a partial functional genome analysis of the diatomacea *Thalassiosira fluviatilis*, with the objective of contributing to the further understanding of the biosynthetic pathway of LCPUFAs. To accomplish that, two cDNA libraries of two omega 3 diatomacea producers were constructed, *Thalassiosira fluviatilis* e *Chaetoceros muelleri*. It is our goal in the future to do a comparative functional genome analysis of the two microalgae with others reported in the literature. With the objective of generating molecular tools for molecular engineering of LCPUFAs in plants, we report the cloning and characterization of the gene encoding $\Delta 6$ -desaturase, the first enzyme involved in the synthesis of EPA and DHA, responsible for the production of the intermediate stearidonic acid from α -linolenic acid. *T. fluviatilis* cDNA, originally used to make the cDNA library, was used as a template to isolate and clone the gene encoding $\Delta 6$ -desaturase using PCR and RACE approaches. The gene cloned has an ORF of 1455 nucleotides, encoding a putative protein of 484 aminoacid residues. The total sequence includes a 3'UTR of 120 nucleotides. The predicted protein has a cytochrome b5 domain fused at the N-terminal and three histidine-box conserved motifs as described in other desaturases; the predicted protein has also high identity with the $\Delta 6$ -desaturase from *Thalassiosira pseudonana*. Regarding the analysis of the cDNA library of *T. fluviatilis*, 1920 ESTs were

sequenced starting from the 5' end and the sequences validated and analyzed using the Program "Sistema Genoma" (www.genoma.embrapa.br). Those, 1090 sequences were validated generating 775 clusters, comprehending 628 singletons and 147 contigs. Within the clusters, 165 presented identity with proteins deposited in the GenBank, 109 presented identity with nucleotide sequences of *T. pseudonana* and 36 clusters had identity with EST sequences from GenBank. A totality of 579 clusters did not have identity with any sequence within the bank and algorithms analyzed, being exclusives to *T. fluviatilis*. In the analysis were identified 07 genes involved in the fatty acid metabolism, 04 of them been comprehending genes encoding enzymes involved in the biosynthesis of omega 3 polyunsaturated fatty acids, indicating that it massive sequencing of EST is a good approach to cloning genes involved in the omega 3 pathway in microalgae.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3

1.1.1 Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 na saúde humana

Os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 são moléculas lipídicas presentes em óleos que têm fundamental importância na dieta humana exercendo grande papel na manutenção da saúde. Dentre esses ácidos graxos, destacam-se o ácido eicosapentaenóico (EPA – *eicosapentaenoic acid*) e o ácido docosahexaenóico (DHA – *docosahexaenoic acid*), também denominados ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFAs – *long chain polyunsaturated fatty acid*).

A valorização da importância dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (em especial os de cadeia longa como EPA e DHA) na saúde humana tem crescido nos últimos 20 anos, inúmeros trabalhos científicos têm constatado sua influência na prevenção e modulação de certas condições patológicas como a obesidade e doenças cardiovasculares e sua essencialidade no desenvolvimento do cérebro e retina (Sayanova & Napier, 2004).

A principal fonte desses LCPUFAs são peixes, em especial os de águas frias e profundas. Vários estudos prospectivos encontraram que o homem que come peixe pelo menos uma vez por semana tem menor taxa de mortalidade de doenças da artéria coronária (DAC) comparado com homens que não comem peixe (Kromhout *et al.*, 1995). Por esse motivo, a Associação Americana do Coração (AHA - *American Heart Association*) recomenda que todos os adultos comam uma variedade de peixe, particularmente óleo de peixe, pelo menos duas vezes por semana, além do consumo de óleos vegetais ricos em ácido α -linolênico (ALA), que é precursor de EPA e DHA (Kris-Etherton *et al.*, 2003).

O cérebro acumula grandes quantidades de DHA durante os primeiros dois anos de vida. Os bebês prematuros são particularmente vulneráveis aos efeitos adversos de insuficiência de DHA no desenvolvimento visual e neural, já que o último trimestre da gravidez é um período crítico para o acúmulo de DHA no cérebro e retina (Uauy *et al.*, 2001). Por esse motivo, foi proposto que as fórmulas para os bebês prematuros fossem suplementadas com DHA para trazer os níveis de DHA plasmático e celular ao nível dos alimentados pelas mães (Larque *et al.*, 2002).

Um crescente número de trabalhos mais recentes tem relacionado consumo de DHA com a saúde do cérebro. Estudos epidemiológicos indicam uma associação entre depressão e o menor índice de ácidos graxos ômega-3 na dieta, e estudos bioquímicos revelam reduzidos níveis dessas substâncias nas células sanguíneas de pacientes com depressão e esquizofrenia (Peet & Stocks, 2005).

O DHA é encontrado em altas proporções na membrana neuronal e segmentos externos de fotorreceptores na retina, e sua deficiência tem sido associada com declínio cognitivo e desenvolvimento de doença de Alzheimer em adultos (Pereira *et al.*, 2004b).

Estudos com células nervosas (neurônios) cultivadas fora do corpo afirmam que o DHA pode protegê-las de apoptose (morte celular programada), o que leva à hipótese de que altos níveis de DHA no cérebro podem servir para aumentar a sobrevivência dos neurônios (Salem *et al.*, 2001).

O efeito da deficiência de ácidos graxos ômega-3 foi comprovado estar relacionado com outras doenças como: diabetes *mellitus* (Friday *et al.*, 1989), artrite reumatóide (Kremer, 2000), colite ulcerativa e doença de Crohn (Lorenz-Meyer *et al.*, 1996), asma em adultos e crianças (Woods *et al.*, 2002), neuropatia da imunoglobulina A (Pettersson *et al.*, 1994) desordem bipolar (Zanarini *et al.*, 2003) e esquizofrenia (Joy *et al.*, 2000).

1.1.2 Bioquímica dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3

Ácidos graxos poliinsaturados são ácidos carboxílicos, formados por uma cadeia de hidrocarbonos de número par, com 18 ou mais carbonos e com duas ou mais ligações duplas na configuração *cis* intercaladas por um grupo metileno (Figura 1). A denominação “ômega” é dada com base na posição da primeira ligação dupla contada a partir do carbono metil final, denominado também de carbono ômega. Os ácidos graxos ômega-3 (Ω -3) têm sua primeira ligação dupla no terceiro carbono a partir do grupo metil (Huang *et al.*, 2004).

A nomenclatura simplificada para ácidos graxos especifica o comprimento da cadeia e o número de duplas ligações separadas por “dois pontos” e no caso dos ácidos graxos poliinsaturados, a posição da dupla ligação é especificada em sobrescrito após a letra grega delta. Por exemplo, para EPA que tem 20 carbonos e 5 duplas ligações entre as posições 5-6, 8-9, 11-12, 14-15 e 17-18, fica designado C20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$ e por ser um ômega-3 é comumente chamado C20:5, n-3 (Nelson & Cox, 2000).

O grupo de ácidos graxos ômega-3 inclui também o ácido linolênico (ALA – *alfa linolenic acid*), o ácido estearidônico (STA – *stearidonic acid*), o ácido eicosatetraenóico (ETA – *eicosatetraenoic acid*) e o ácido docosapentaenóico (DPA – *docosapentaenoic acid*), que incluem os precursores na síntese do EPA e do DHA (Pereira *et al.*, 2003).

O EPA e o DHA são componentes essenciais dos fosfolipídios de membrana e servem também como precursores de moléculas reguladoras semelhantes a hormônios, como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, comumente chamadas eicosanóides (Pereira *et al.*, 2004a).

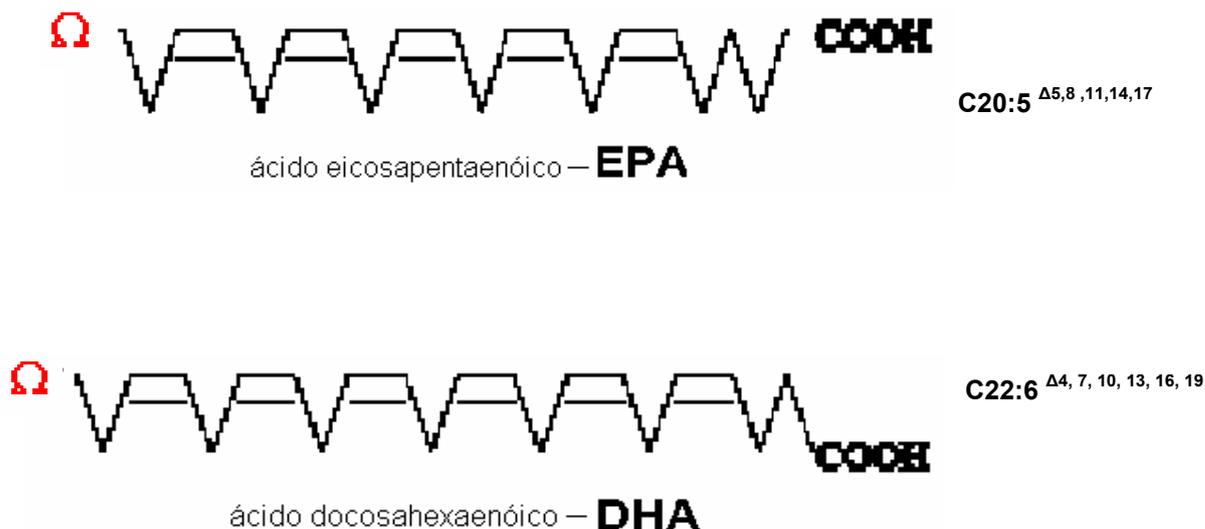


Figura 1. Esquema da estrutura dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, EPA e DHA. Em vermelho, a letra grega ômega, representando o último átomo de carbono no terminal metil da cadeia.

Estes compostos eicosanóides desempenham variadas funções fisiológicas, incluindo regulação do sistema imune, pressão, coagulação, neurotransmissão e metabolismo do colesterol, tendo também importantes implicações na integridade celular e no crescimento humano (Sayanova & Napier, 2004).

A composição de ácidos graxos dos fosfolípidios determina as propriedades físicas e funcionais de membranas celulares. Alterações nas propriedades físicas das membranas neuronais podem afetar os processos de transmissão nervosa através de alteração da disponibilidade de neurotransmissores ou alterando as funções das proteínas receptoras da membrana neuronal (Colin *et al.*, 2003; Sayanova & Napier, 2004).

Humanos podem sintetizar tanto o ácido EPA quanto o DHA a partir de ALA, através de uma série de dessaturações (adição de uma ligação dupla) e alongações (adição de dois átomos de carbono), entretanto o ALA não pode ser sintetizado pelo organismo humano, por este motivo é considerado essencial e deve ser suprido na alimentação (Sayanova & Napier, 2004).

Dentre fatores que limitam a síntese de EPA e DHA em humanos está a proporção de LA (ácido linoléico) e ALA na dieta, devido ao fato de que as mesmas

enzimas podem atuar sobre os dois tipos de substratos na produção de seus derivados (Schmidt, 2000). O ácido linoléico é um ácido graxo do tipo ômega-6 e também é importante para o organismo, no entanto, na dieta ocidental, devido ao elevado uso de óleos vegetais ricos em LA e redução no consumo de peixes, tem-se observado um aumento na proporção de ômega-6:ômega-3 a patamares que chegam a 16:1, sendo que o ideal estimado para a manutenção da saúde do organismo é no máximo 6:1 (Eckert *et al.*, 2006).

Outro fator que contribui para a ineficiência da conversão dos fatores ômega-3 é que a maioria do ALA da dieta, é β -oxidado para prover energia ao organismo e somente uma pequena porcentagem dele (3%) é convertido em LC-PUFAs. Além disso, esse processo é resultado de componentes da dieta, balanço hormonal e a presença de doenças crônicas como câncer e diabetes (Burdge & Wootton, 2002).

Estudos do metabolismo de ALA indicam que aproximadamente 8% do ALA da dieta é convertido para EPA e 0-4% é convertido para DHA em homens jovens e saudáveis. Em mulheres jovens e saudáveis, aproximadamente 21% do ALA da dieta é convertido para EPA e 9% é convertido para DHA (Burdge e Wootton, 2002).

1.2 Fontes de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3

O ácido linolênico é encontrado em grande concentração em alguns óleos vegetais como o de linhaça e o de canola, em sementes de moranga e em vegetais de folhas verdes como brócolis e espinafre e pode ser encontrado também em menores concentrações em óleo de soja (Schmidt, 2000).

As fontes mais conhecidas e tradicionais de EPA e DHA pré-formados, presentes na alimentação são peixes de águas frias marinhas, como exemplos comuns temos o salmão, cavala, arenque, anchovas, atum e sardinhas. No entanto, estudos têm mostrado que esses óleos presentes nos peixes provêm da ingestão de organismos que constituem o zooplâncton, os quais têm as microalgas como seu principal alimento (Schmidt, 2000).

As microalgas têm sido consideradas umas das mais promissoras fontes dos compostos EPA e DHA, embora não presente tradicionalmente na alimentação, a biomassa microalgal obtida em cultivos é caracterizada por ser livre de contaminação. Elas têm sido comercializadas com alimento natural (*health food*), ou suplemento alimentar e são encontradas em pó (*sun dried* ou *spray dried*), na forma de tabletes, cápsulas ou extratos. Podem ser também adicionadas a massas, petiscos, doces, bebidas etc (Derner, 2005).

Dentre as microalgas produtoras de altas quantidades de EPA e DHA estão diatomáceas, dinoflagelados, clorofíceas, crisofíceas, eustigmatofíceas e prasiofíceas (Wen & Chen, 2003).

As microalgas marinhas produtoras de ômega-3 se destacam para o estudo da rota biossintética de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 como uma fonte de genes para melhoramento de alimentos tradicionais por meio da engenharia molecular, pois, sendo produtores de EPA e DHA podem conter a via de síntese completa dessas moléculas o que já foi evidenciado por alguns trabalhos (Qiu *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2004).

1.3 Rotas metabólicas para síntese de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3

Algumas rotas biossintéticas de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 tem sido identificadas. Em muitos organismos eucariotos há uma via convencional aeróbica que se dá por processos de dessaturações e elongações e as enzimas envolvidas nesses processos são chamadas dessaturases e elongases.

A via convencional (Figura 2) inicia com a $\Delta 6$ -dessaturação do ácido linoléico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) resultando na síntese do ácido estearidônico (C18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$). Este primeiro passo é seguido por uma elongação específica gerando ácido eicosatetraenóico (20:4 $\Delta^{8,11,14,17}$) seguida de uma $\Delta 5$ -dessaturação para gerar EPA (C20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$). Neste ponto, para sintetizar o DHA há duas vias conhecidas, uma via linear e a via denominada “*Sprecher*”.

A via linear segue com a elongação do EPA para ácido docosapentaenóico (C22:5 $\Delta^{7,10,13,16,19}$) o qual é dessaturado na posição $\Delta 4$, produzindo DHA (C22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$) (Figura 2), essa via tem sido observada em microalgas (Tonon *et al.*, 2003, 2005).

A Via *Sprecher* caracteriza-se por dois ciclos consecutivos de elongação do EPA, produzindo ácido docosapentaenóico (C22:5 $\Delta^{7,10,13,16,19}$), e deste o ácido tetracosapentaenóico (C24:5 $\Delta^{9,12,15,18,21}$) o qual é desaturado na posição $\Delta 6$, sofrendo finalmente um ciclo de encurtamento da cadeia via β -oxidação no peroxissomo gerando DHA (Figura 2). Esta via tem sido observada em mamíferos (Pereira *et al.*, 2003).

Uma via alternativa para a biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa tem sido demonstrada nos protistas *Tetrahymena pyroformis*, *Acanthamoeba spp.* e *Euglena gracilis*, os quais não possuem atividade $\Delta 6$ -dessaturase. O primeiro passo nessa rota alternativa é a elongação de ALA formando o ácido eicosatrienóico (C20:3 $\Delta^{11,14,17}$), em seguida o produto é desaturado por uma $\Delta 8$ -dessaturase produzindo ácido eicosatetraenóico e este

segue então a via linear, como descrito anteriormente (Figura 2) (Pereira *et al.*, 2003).

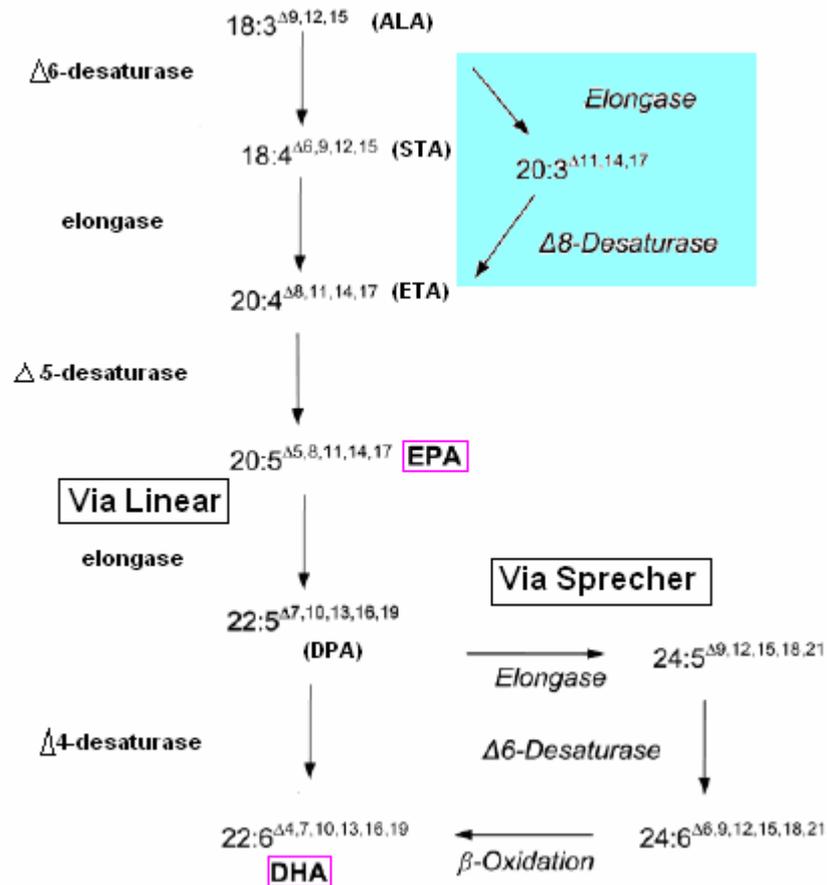


Figura 2. Esquemas das rotas metabólicas para biossíntese de EPA e DHA por meio da via aeróbica (Convencional, Linear e Sprecher).

Outra rota bem diferente da via das dessaturases e elongases, para a síntese de PUFAs encontrada na natureza, é a chamada poliquetídeo sintase (PKS). Essa rota tem sido observada em bactérias marinhas, como *Shewanella* sp., *Vibrio* sp. (Yazawa *et al.*, 1996), *Photobacterium profundum* e na microalga *Schizochytrium* sp. (Metz *et al.*, 2001).

Esta via difere dos processos de elongação/dessaturação descritos anteriormente porque não requer dessaturação aeróbica para introdução das duplas ligações entre a cadeia acil existente. Em vez disso a dupla ligação é introduzida durante o processo de síntese do ácido graxo.

Esta via é similar ao sistema de síntese de ácidos graxos, nela a biossíntese de PUFAs é iniciada pela condensação entre uma cadeia curta acil e uma unidade

de malonil, seguida por sucessivos ciclos de redução, desidratação, redução e condensação com a cadeia acil crescendo 2 carbonos em cada ciclo (Huang *et al.*, 2004; Qiu, 2003).

Uma possível desidratase/isomerase existente nesta via PKS pode ser responsável por catalisar a conversão *trans* para *cis* das duplas ligações formando EPA e DHA. Sabe-se que os genes que codificam estas enzimas apresentam-se sequencialmente ao longo de uma seqüência de DNA de 20 a 30 Kb, porém a identidade de muitas regiões entre estas ORFs não são conhecidas (Huang *et al.*, 2004).

1.4 Enzimas envolvidas na via aeróbica de biossíntese de PUFA's

1.4.1 Dessaturases

Enzimas que catalisam a adição de uma dupla ligação (insaturação) na cadeia do ácido graxo são chamadas de dessaturases de ácido graxo. A dessaturação é um processo aeróbico que utiliza oxigênio molecular e elétrons obtidos através de uma cadeia transportadora de elétrons.

As dessaturases encontradas na via de síntese de EPA e DHA são também denominadas *front-end*, porque inserem a dupla ligação entre o grupo carboxila e a insaturação pré-existente do ácido graxo e incluem a $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 8$ e $\Delta 8$ -esfingolípido dessaturases. A denominação delta é dada pela posição onde é inserida a dupla ligação contada a partir do carbono da carboxila (Pereira *et al.*, 2003).

Três tipos de dessaturases de ácido graxo podem ser encontradas: acil-CoA, acil-lípido e acil-ACP dessaturases. As acil-CoA dessaturases são enzimas ligadas a membrana do retículo endoplasmático que dessaturam ácidos graxos esterificados a coenzima A (CoA). As acil-ACP dessaturases são encontradas em plastídios de plantas na forma solúvel e dessaturam ácidos graxos ligados a proteína carreadora de Acil (ACP – *acyl carrier protein*). As acil-lípido dessaturases introduzem ligações insaturadas nos ácidos graxos em lipídeos e estão ligadas a membrana nas membranas de tilacóides de cianobactérias, retículo endoplasmático e plastídeos.

As dessaturases podem ser categorizadas com base no doador de elétrons utilizado que podem ser o citocromo b_5 ou a ferredoxina e NADH ou NADPH. As acil-CoA dessaturases de animais, e as acil-lipídeo dessaturases geralmente usam o citocromo b_5 como doador de elétrons. O citocromo b_5 encontra-se como um domínio conservado na região N-terminal de muitas dessaturases, incluindo de microalgas e plantas superiores (Pereira et al., 2003).

Outra característica comum a todas as dessaturases são seqüências ricas em histidina (*Histidina-box*) compreendendo em geral: H-X_[3-4]H, H-X_[2-3]H-H e H/Q-X_[2-3]H-H (Pereira et al., 2003).

1.4.1.1 $\Delta 6$ -dessaturase

A $\Delta 6$ -dessaturase é uma enzima que dessatura a ligação entre o sexto e o sétimo carbono do ácido graxo. A maioria das dessaturases descritas catalisa a conversão do ácido linoléico (n-6) e ácido linolênico nos seus respectivos ácido γ -linolênico (n-6) e ácido estearidônico. No entanto, existem dessaturases descritas para mamíferos que dessaturam substratos de 24 carbonos (Sprecher et al., 1995).

Como outras dessaturases de ácidos graxos, as $\Delta 6$ -dessaturases contêm um domínio citocromo b_5 fundido ao seu N-terminal. Esse domínio contém uma região com os aminoácidos HPGG, considerado o domínio de ligação de heme, que depende estritamente da histidina para sua atividade catalítica. Essa enzima possui também os três motivos histidinas conservados, porém com uma substituição do primeiro motivo de histidina por uma glutamina que é essencial para a atividade desta enzima. (Pereira et al., 2003).

$\Delta 6$ -dessaturases têm sido identificadas em vários mamíferos, incluindo humanos, ratos, camundongos e também nematóides como *Caenorhabditis elegans*. Entre três dessaturases de mamíferos, todas têm igual tamanho, 444 aminoácidos, sendo que a seqüência de ratos e humanos tem 87% de identidade. Não há muito progresso em termos de caracterização bioquímica desta enzima.

A atividade de $\Delta 6$ -dessaturase é regulada *in vivo* por componentes da dieta, idade e hormônios, doenças crônicas como diabetes e câncer alteram os níveis de expressão dessa enzima (Pereira et al., 2003).

Em eucariotos inferiores, a $\Delta 6$ -dessaturase foi identificada em fungos como *Mortierella alpina* (Huang *et al.*, 1999) e *Mucor rouxii* (Passorn *et al.*, 1999). A de *M. rouxii* difere da de *M. alpina* no tamanho (523 e 457 aminoácidos respectivamente) e é mais similar na seqüência com a $\Delta 6$ -dessaturase de plantas do que de fungos ou animais. Esta dessaturase contém um motivo rico em histidina não usual (HKHHSH) à jusante do citocromo b_5 .

Atividade $\Delta 6$ -dessaturase também foi encontrada em extratos microssomais da levedura como *Candida lipolytica* (Pugh *et al.*, 1979).

Em microalgas, $\Delta 6$ -dessaturase foi identificada em *Ostreococcus tauri* (456 aa), *Glossomastix chrisoplasta* (465 aa) e nas diatomáceas *Thalassiosira pseudonana* (484 aa) e *Phaeodactylum tricornutum* (477). No que diz respeito à seqüência de aminoácidos, a $\Delta 6$ -dessaturase de *T. pseudonana* partilha 70% de identidade com a de *P. tricornutum* e a $\Delta 6$ -dessaturase de *O. tauri* é a que tem menor similaridade.

Entre plantas, a $\Delta 6$ -dessaturase foi caracterizada em borragem (*Borago officinales*), que é uma das raras plantas juntamente com a primula (*Oenothera biennis*) a possuir atividade $\Delta 6$ -dessaturase, ou seja, *front-end* dessaturase, ausente em outras plantas. Essas duas plantas são produtoras de altos perfis de ácido γ -linolênico (n-6) em suas sementes.

1.4.1.2 $\Delta 5$ -dessaturase

A $\Delta 5$ -dessaturase partilha todas as características estruturais conservadas de outras *front-end* dessaturases como a $\Delta 6$, inclusive a substituição histidina por glutamina. Genes desta enzima têm sido identificados em alguns animais, incluindo humanos, ratos e *C. elegans*. O gene da $\Delta 5$ -dessaturase dos fungos *M. alpina* e *Dictyostelium discoideum* também foi caracterizado (Michaelson, *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 1999).

Em humanos a $\Delta 5$ -dessaturase carrega 62% de identidade com a $\Delta 6$ -dessaturase e possui 444 aminoácidos. Análises de *northern blot* revelaram maior expressão da $\Delta 5$ em fígado, cérebro e glândula adrenal.

A atividade de $\Delta 5$ -dessaturase é regulada pela dieta, sendo que alterados níveis de expressão desta enzima têm sido associados com várias doenças como diabetes, *Alzheimer* e desordens na visão (Pereira *et al.*, 2003).

1.4.1.3 $\Delta 5/\Delta 6$ dessaturase

Atividade $\Delta 5/\Delta 6$ dessaturase foi encontrada mais recentemente no peixe zebra (*Danio rerio*) (Hastings *et al.*, 2001). A enzima, denominada $\Delta 5/\Delta 6$ -dessaturase contém 444 aminoácidos e tem 64% de identidade com a $\Delta 6$ e 58% de identidade com a $\Delta 5$ -dessaturase humana.

A $\Delta 5/\Delta 6$ -dessaturase contém todas as características de dessaturases, incluindo a presença do motivo histidina-*box* conservado, dois longos domínios hidrofóbicos transmembrana e uma região N-terminal fundida a um citocromo b_5 . Ela é mais ativa em substratos $\Delta 6$ do que em $\Delta 5$ e mostra preferência para ômega-3 do que ômega-6 (Pereira *et al.*, 2003).

1.4.1.4 $\Delta 8$ -dessaturase

Em alguns eucariotos como a microalga *E. gracilis*, foi identificada uma $\Delta 8$ -dessaturase (Wallis e Browse, 1999). Sua atividade tem sido demonstrada em protozoários ciliados como *T. pyriformis* e *Acanthamoeba spp.*

Esta dessaturase partilha muitas similaridades com *front-end* dessaturases como o citocromo b_5 na região N-terminal e três motivos histidina-*box* conservados, sendo o terceiro motivo QXXHH. Esta enzima tem somente 33% de identidade com as dessaturases de *C. elegans* e 28% de identidade com $\Delta 6$ -dessaturase de Borragem.

Na microalga *Isochrysis galbana*, embora a $\Delta 8$ -dessaturase não tenha sido identificada, existe uma $\Delta 9$ -elongase que especificamente converte ALA para 20:3, indicando a presença da via na qual $\Delta 8$ -dessaturase está presente (Figura 2) (Qi *et al.*, 2002).

1.4.1.5 $\Delta 4$ -dessaturase

A existência de uma dessaturação na posição $\Delta 4$ de ácidos graxos para a biossíntese do ácido docosahexaenóico foi questionada por muitos anos até que Qiu e colaboradores (2001) clonaram o gene codificador para enzima $\Delta 4$ -dessaturase da microalga marinha *Thraustochytrium sp.* e provaram sua atividade através da expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* e *Brassica juncea*.

A $\Delta 4$ -dessaturase partilha 28-30% de identidade na seqüência de aminoácido com outras *front-end* dessaturases, com regiões de homologia localizadas comumente entre o domínio citocromo b_5 e os motivos histidina-*box*, porém é maior que as outras possuindo 519 resíduos de aminoácidos, sendo 80 adicionais entre o segundo e terceiro motivo histidina conservado.

Meyer e colaboradores (2003) estudaram a biossíntese de DHA em várias microalgas, *E. gracilis*, *Thraustochytrium sp.*, *Schizochytrium sp.*, e *Crypthecodinium cohnii*. Um cDNA completo para $\Delta 4$ -dessaturase foi clonado a partir do seqüenciamento massivo de uma biblioteca de cDNA de *E. gracilis* e sua função foi confirmada a partir de expressão heteróloga em levedura.

Mais recentemente, em 2004, Pereira e colaboradores clonaram $\Delta 4$ -dessaturase de *I. galbana*. Este gene, com 1302 bp de comprimento codifica uma enzima de 433 aminoácidos.

Análise comparativa das seqüências protéicas revelou que a mesma partilhava aproximadamente 30% de identidade com outras $\Delta 4$ -dessaturases conhecidas. O segundo motivo histidina-*box* do polipeptídeo deduzido continha HXXHH em vez de HXXXHH como as outras e mais ainda, não possuía um domínio estendido que existe entre o segundo e o terceiro motivo histidina-*box* das $\Delta 4$ -dessaturase de *E. gracilis* e *Thraustochytrium sp.*

1.4.1.6 $\Omega 3$ -dessaturase

Ω 3-dessaturases são enzimas capazes de converter substratos ômega-6 em ômega-3. Algumas dessas enzimas foram isoladas de diferentes organismos.

Elas possuem os motivos histidina-box conservados como em outras dessaturases e foram identificadas em plantas, fungos, cianobactérias e também em *C. elegans*.

A grande maioria dessas dessaturases tem preferência por substratos de 18 carbonos, e são também denominadas Δ 15-dessaturases, e são as enzimas que convertem o LA em ALA e estão presentes em algumas plantas. No entanto, existem Ω 3-dessaturases identificadas que agem tanto em substratos de 18 como de 20 carbonos, por exemplo, a de *C. elegans* (Spychalla *et al.*, 1997).

Recentemente foi identificada uma Ω 3-dessaturase do fungo *Saprolegia diclina* que tem especificidade para substratos de 20 carbonos com preferência para ácido araquidônico (AA, n-6) (Pereira *et al.*, 2004).

1.4.2 Elongases

Em geral, a alongação de ácidos graxos é catalisada por um complexo enzimático. Complexos elongase compreendem quatro atividades: a β -cetoacil-CoA-sintase, a cetoacil-CoA redutase, a hidroxiaçil-CoA desidratase e a enoil-CoA redutase (Meyer *et al.*, 2004).

Destas, a primeira enzima, a de condensação, é a mais significativa porque catalisa a reação limitante do passo de condensação nos quatro passos da reação e determina a especificidade do substrato do complexo inteiro (Pereira *et al.*, 2004b).

Estudos prévios têm revelado que a expressão da elongase (enzima de condensação) é suficiente para acarretar a alongação de PUFAs de cadeia longa em levedura, indicando que muitas elongases podem interagir e funcionar com as redutases e desidratases endógenas do complexo de alongação de ácidos graxos de levedura (Pereira *et al.*, 2004).

Nas seqüências de aminoácidos têm sido observado que elongases caracterizam-se por:

- 1) Um simples motivo histidina-*box* (HxxHH) como centro redox;
- 2) Um sinal de retenção (resíduos lisina próximos ao C-terminal) no retículo endoplasmático;
- 3) 7-9 hélices transmembrana;
- 4) Motivos altamente conservados (KXXEXXDT, QXXFLHXYHH, NXXXHXXMYXYY e TXXQXXQ);
- 5) Suas seqüências variam entre 288 a 358 aa. (Meyer *et al.*, 2004; Agaba *et al.*, 2005).

Meyer e colaboradores (2004) clonaram 7 elongases de PUFA dos organismos: *Oncorhynchus mykiss*, *Xenopus laevis*, *Ciona intestinales*, *O. tauri* e de *T. pseudonana*. Em cada microalga *O. tauri* e *T. pseudonana*, a análise funcional encontrou duas elongases sendo uma delas com especificidade para substratos $\Delta 6$ -C18-PUFA e outra para $\Delta 5$ -C18-PUFA, porém, não foi encontrada característica específica que determine a especificidade do substrato.

Pereira e colaboradores (2004b) clonaram um gene de elongase da microalga *Pavlova sp*, o qual tinha 834 bp e codificava uma proteína de 277 aminoácidos, a análise desta seqüência de aminoácidos mostrou que esta tinha maior identidade com elongases de mamíferos do que com *M. alpina*.

1.5 Produção transgênica de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3

Com a conscientização da importância dos ácidos graxos ômega-3 para a saúde humana, devido ao aumento quase exponencial de estudos clínicos e bioquímicos em humanos e com animais, alguns trabalhos envolvendo engenharia genética para produção de PUFAs em plantas têm surgido.

Hamada e colaboradores (1998) desenvolveram um fumo (*Nicotiana tabacum*) transgênico com níveis aumentados de ALA pela super-expressão de sua própria Ω 3-dessaturase microssomal, sob o controle de um promotor eficiente (CaMV 35S). Em 2004, foi divulgada a acumulação de altíssimos níveis de ácidos graxos de 18 carbonos Δ 6 desaturados e mais de 5% de 20 carbonos como EPA em fumo e linhaça (*Linum usitatissimum*), utilizando cDNAs de elongases e dessaturases (Abadi *et al.*, 2004).

Anai e colaboradores (2003) relataram a expressão heteróloga de um gene codificador de uma dessaturase microssomal de soja da rota ômega 3 em arroz. Em dez transformantes analisados, os níveis do ácido alfa linolênico aumentaram drasticamente em até 10 vezes e o fenótipo foi estável até as progênies T3. Estes resultados mostraram que o conteúdo do óleo de arroz pode ser facilmente alterado para conter mais ALA.

Robert e colaboradores (2005), expressaram por transgenia uma via metabólica alternativa para produção de LC-PUFA em *Arabidopsis thaliana* utilizando uma Δ 5/ Δ 6 dessaturase que age em substratos acil-CoA com maior eficiência do que as enzimas individuais específicas e obteve maiores níveis de síntese do que previamente reportado.

Também em 2005, foi descrita a produção transgênica de EPA em sementes de *B. juncea*, pela introdução de enzimas Δ 6-dessaturase de *Pythium irregulare*, Δ 6-elongase de *Psycomitrella patens* e Δ 5 dessaturase de *Thraustochytrium sp.* Como

B. juncea é uma alta fonte de ácido linoléico (ômega 6), para produzir ômega 3, foi utilizada a estratégia de clonagem de uma Ω 3-dessaturase de *Phytophthora infestans*, que foi capaz de converter AA em EPA, chegando a 15% do total de ácidos graxos e inclusive alguns níveis de DHA (Wu *et al.*, 2005).

Estes trabalhos abriram as portas para uma nova concepção de suplementação alimentar de ômega 3 através de alimentos tradicionais, tais como o arroz, que é a base da alimentação de populações carentes.

Para o agronegócio, a identificação e o desenvolvimento de sementes cujos óleos sejam ricos em fatores Ω 6 e 3 agrega valor aos alimentos, gerando novas oportunidades e maior competitividade para este setor.

1.6 Diatomáceas

As diatomáceas são organismos unicelulares, com uma teca: uma carapaça ou parede silicatada disposta em vesículas abaixo da membrana plasmática, e que pode facilmente fossilizar. Podem apresentar também, em algumas espécies, formação de cadeias ou colônias simples. As diatomáceas constituem um importante grupo de protistas fitoplanctônicos pertencentes à classe de microalgas de cor marrom designada como Bacillariophyceae (bacilariofíceos) (Raven *et al.*, 1996).

Atualmente existem mais de 200 gêneros não extintos, estimando-se que as espécies atuais perfaçam cerca de 100.000 (Round & Crawford, [1990](#)). As diatomáceas se encontram entre os grupos mais diversos e de sucesso entre os eucariotos fotossintéticos, ocupando desde o ambiente aquático ao úmido, dos pólos ao equador. A sua contribuição na fotossíntese é estimada em 30 a 40% da produtividade marinha primária e contribuem para grande parte do oxigênio que respiramos (Montsant *et al.*, 2005).

As diatomáceas podem ser autótrofas, heterótrofas e mixótrofas. Os autótrofos possuem clorofila a e c e têm como material de reserva amido e gotas de lipídio, que auxiliam na flutuação. Os seus cloroplastos tem quatro membranas contendo pigmentos como a fucoxantina. São simbiontes e de extrema importância nos recifes

de [corais](#). Algumas espécies podem apresentar [bioluminescência](#) e produzir [toxinas](#). Podem reproduzir-se [sexuada](#) ou [assexuadamente](#) (Raven *et al.*, 1996).

Duas ordens estão presente dentro da Classe Bacillariophyceae, a Ordem Centrales e Ordem Pennales. As microalgas da ordem Centrales caracterizam-se por ter simetria radial e incluem gêneros como *Thalassiosira*, *Chaetoceros* (Figura 3) e *Pseudosolenia*. Já a ordem Pennales caracteriza-se pela simetria bilateral e inclui gêneros como *Phaeodactylum* e *Cylindrotheca* (Raven *et al.*, 1996).

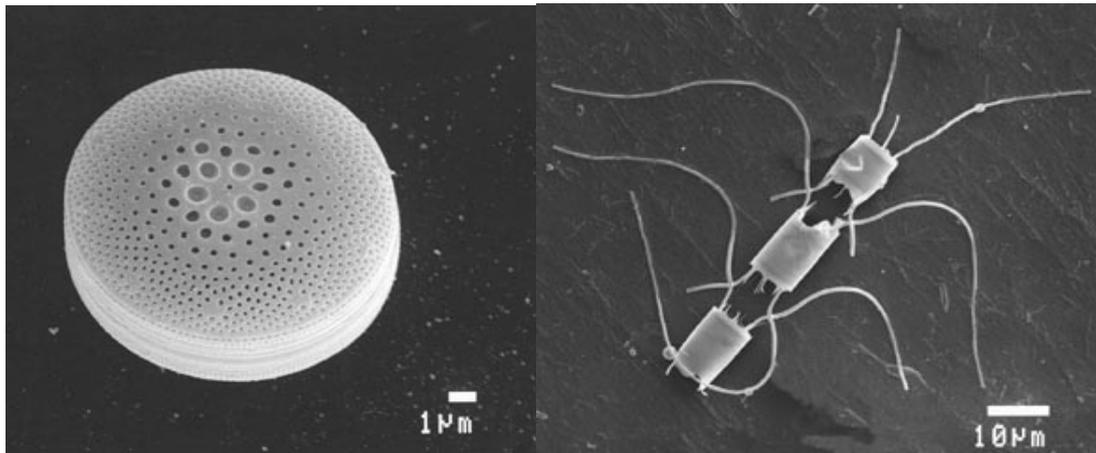


Figura 3. Diatomáceas da ordem centrais visualizadas em microscópio eletrônico. A esquerda *Thalassiosira fluviatilis* e a direita *Chaetoceros muelleri*.

As diatomáceas são responsáveis pela alta produtividade de águas ricas em nutrientes e representam a base de importantes pescarias no mundo, servindo de alimento para protozooplâncton, metazooplâncton, bentos, peixes filtradores e inclusive mamíferos como baleias filtradoras (Raymont, 1980).

Como desempenham importante papel no ecossistema global, sua ecologia e fisiologia tem sido foco de trabalhos por décadas. Mais, recentemente, a intrincada bioarquitetura da parede celular das diatomáceas tem atraído o interesse de nanotecnologistas. O entendimento do genoma de diatomáceas pode levar a dissecção dos mecanismos moleculares controlando seu modelo de formação bioinorgênico o que é a base para compreender o seu sucesso ecológico (Maheswari *et al.*, 2005).

Dentre inúmeros potencialidades, algumas diatomáceas, como por exemplo as espécies *Thalassiosira fluviatilis* e *Chaetoceros muelleri* (figura 3), destacam-se

por produzirem altos teores de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3. Os ácidos graxos estão geralmente presentes em microorganismos formando triacilgliceróis estocados em gotículas de óleo dentro da célula (Derner, 2005).

Recentemente foi seqüenciado o genoma completo nuclear, mitocondrial e plastidial da diatomácea *T. pseudonana* (Armbrust *et al.*, 2004). Essa microalga tem um genoma pequeno (34 Mb) e o gênero *Thalassiosira* é de importância ecológica significativa, com algumas espécies sendo os maiores componentes da biomassa total do fitoplâncton em seus ecossistemas (Montsant *et al.*, 2005). Genes da rota metabólica de ácidos graxos poliinsaturados foram clonados e caracterizados funcionalmente a partir de *T. Pseudonana*, e incluem a $\Delta 6$, $\Delta 5$ e $\Delta 4$ -dessaturases (Tonon *et al.*, 2005) e elongases (Meyer *et al.*, 2004).

Outros genes da rota metabólica de ácidos graxos poliinsaturados de diatomáceas caracterizados até o momento incluem $\Delta 6$ -dessaturase e $\Delta 5$ -dessaturase de *P. tricornutum* (Domergue *et al.*, 2002). Essa diatomácea também teve seu genoma funcional caracterizado (Maheswari *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICATIVA CIÊNÉTICA

A manipulação de genes isolados para a expressão de produtos desejados e melhoramento de plantas de uso na agricultura é de amplo potencial.

Por outro lado, como ferramentas em biologia molecular para a dissecção de rotas metabólicas, estudos de genoma funcional podem ser aplicados nos quais populações inteiras de cDNAs são seqüenciados e analisados. A vantagem desses estudos é a seleção do que é funcional no organismo na condição de estudo, descartando as seqüências não relevantes.

No Brasil, não há trabalhos relatados de clonagem de genes da rota metabólica dos fatores ômega-3 e dada à importância dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 na saúde humana, considerando se tratar de moléculas com poucas fontes na natureza, é de fundamental importância a geração de ferramentas biotecnológicas tanto para melhoramento assistido como para produção de alimentos contendo altas concentrações desses ácidos graxos, através de engenharia genética.

Derner (2005), caracterizou o perfil de ácidos graxos poliinsaturados das diatomáceas *T. fluviatilis* e *C. muelleri*, cultivadas em diferentes condições laboratoriais, as quais apresentaram altos teores de EPA e DHA chegando a 50% e 46% de EPA em cada alga respectivamente, além de 14% e 7% de DHA respectivamente (Figura 4).

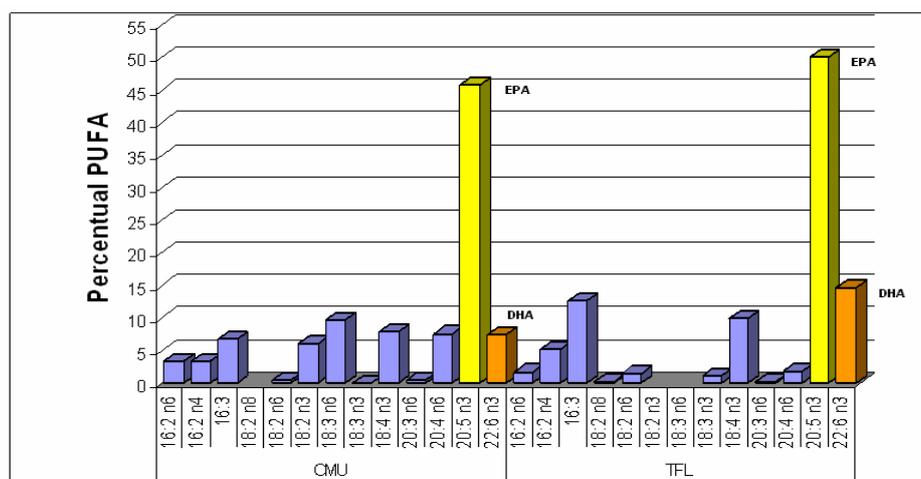


Figura 4 - Percentual individual relativo do total de ácidos graxos poliinsaturados obtidos na biomassa de *C. muelleri* (CMU) e *T. fluviatilis* (TFL) (Derner, 2005).

Neste contexto, assume particular importância a prospecção de genes da rota metabólica de ômega-3, especialmente de diatomáceas que, como produtoras de altos perfis desses óleos, espera-se que possuam todas as enzimas necessárias para a produção do DHA, visando a posterior biofortificação de alimentos tradicionais.

3. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo a confecção de duas bibliotecas de cDNA das diatomáceas produtoras de altos perfis de LCPUFAs, *Thalassiosira fluviatilis* e *Chaetoceros muelleri*, o seqüenciamento e análise de parte do genoma funcional de *T. fluviatilis* e a clonagem e caracterização da seqüência codificadora do gene da enzima Δ 6-dessaturase da microalga *T. fluviatilis*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver bibliotecas de cDNA das duas diatomáceas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*;
- Isolar e clonar o gene da Δ 6-dessaturase da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis*;
- Sequenciar e caracterizar o gene da Δ 6-dessaturase da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis*;
- Seqüenciar 1920 ESTs da biblioteca de cDNA da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis*;
- Analisar e caracterizar as ESTs geradas da biblioteca de cDNA da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis* utilizando ferramentas de bioinformática.

4. FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES

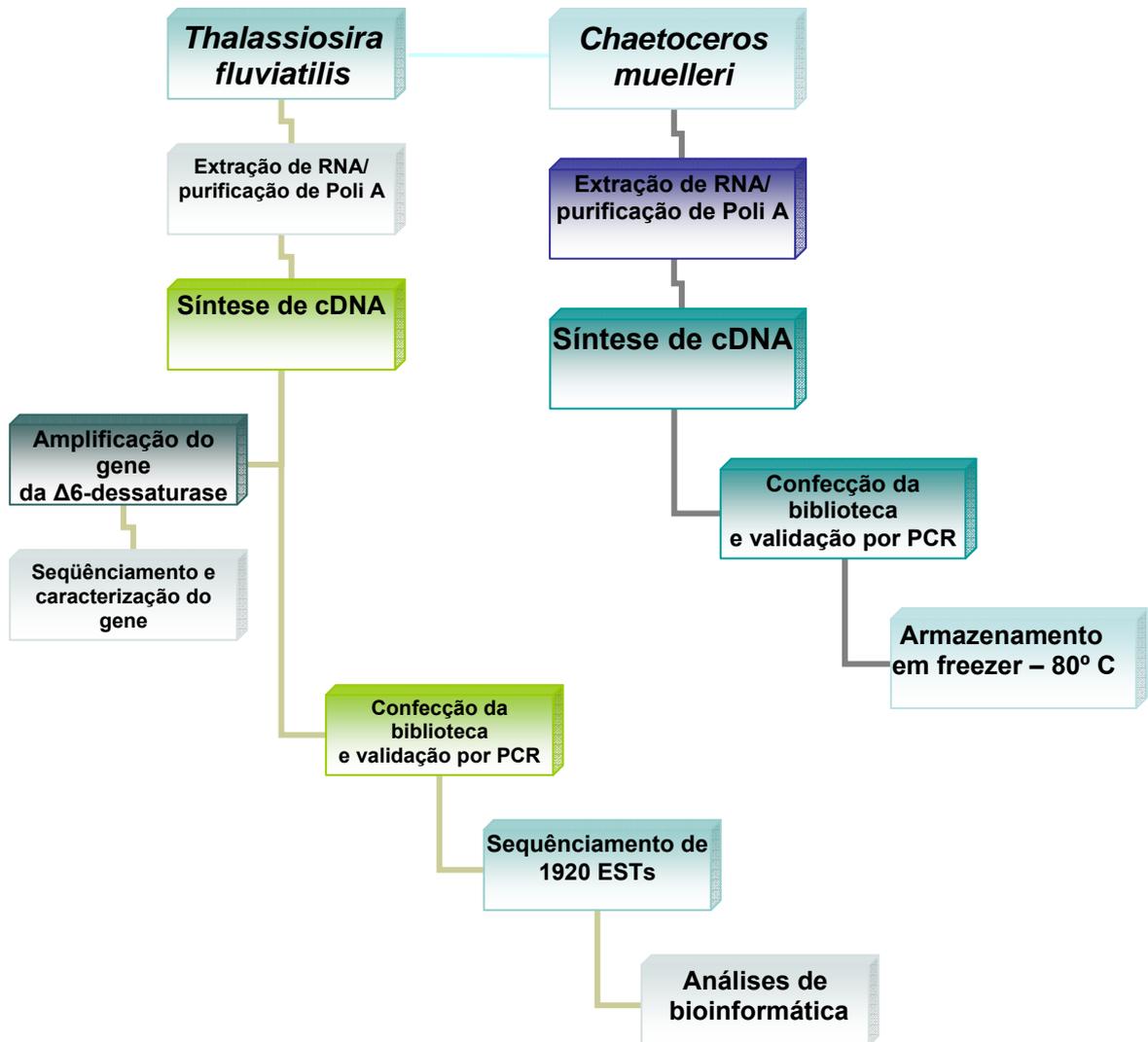


Figura 5. Fluxograma da metodologia utilizada neste trabalho

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Material biológico

Cepas de diatomáceas das espécies *Thalassiosira fluviatilis* e *Chaetoceros muelleri* foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Roberto Bianchini Derner do laboratório de Camarões Marinhos – UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina). As amostras foram concentradas sob centrifugação, congeladas e mantidas em gelo seco para serem transportadas para a Embrapa - Cenargen onde foram armazenadas em freezer a -80° C até o momento da extração do RNA.

5.2 Minimização das atividades ribonucleásicas

Toda a vidraria foi aquecida a 180° C durante um período mínimo de duas horas. O material plástico foi lavado com água MilliQ contendo DEPC a concentração de 0,1 % (v/v). A água e soluções estoques foram mantidos durante 15 minutos com DEPC á concentração final de 0,1% (v/v), após o que foram fervidas por 30 minutos para garantir a liberação do DEPC.

Os tampões e soluções tratados como descrito acima foram ainda autoclavados e estocados entre 0 e 4° C. A ação dessas RNAses foi controlada pela temperatura, sendo que todos os experimentos eram executados entre 0 e 4° C.

5.3 Construção das bibliotecas de cDNA

Para confecção das bibliotecas de cDNA, RNA total e poliadenilado foram purificados.

O RNA total de cada cepa foi extraído utilizando-se o *Concert Plant RNA Reagent* (Invitrogen) de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante.

A avaliação da qualidade e quantificação do RNA total foi feita em gel desnaturante contendo formaldeído corado com brometo de etídeo para visualização sob luz ultra-violeta.

Os RNAs mensageiros (mRNAs) poliadenilados foram isolados utilizando-se o Kit *micro-FastTrack mRNA isolation* (Invitrogen).

O mRNA poliadenilado de cada amostra foi usado na produção de bibliotecas de cDNAs segundo o protocolo descrito no Kit *Creator SMART cDNA library* (Clontech).

Este Kit provê um método no qual é possível gerar bibliotecas de cDNA direcionalmente clonados e de comprimento total. Um primer oligo(dT) modificado (CDS III/3' PCR Primer) inicia a reação de síntese da primeira fita, e um oligonucleotídeo (SMART IV) serve como uma curta extensão no final do *template* de mRNA (Figura 6).

Quando a enzima transcriptase reversa (RT) alcança a extremidade 5', a atividade terminal transferase da enzima adiciona uns poucos nucleotídeos, primariamente deoxicitidina, a extremidade 3' do cDNA. O oligonucleotídeo SMART IV, o qual tem uma sequência oligo(G), pareia com o trecho de desoxicitidina, criando um *template* estendido. A RT então passa a usar como *template* esse oligonucleotídeo completando a fita de cDNA (Figura 6). A simples fita resultante contém a extremidade 5' completa do mRNA, bem como a sequência complementar ao oligonucleotídeo SMART IV, o qual então serve como sítio iniciador universal (SMART- ancorador) na subsequente amplificação por PCR .

Somente os cDNAs tendo uma sequência SMART-ancorada na extremidade 5' podem servir como *template* e amplificar exponencialmente. Então, contaminação por DNA genômico e RNA sem poly-A é eliminada (manual Creator™ SMART™ cDNA Library).

Após a digestão e fracionamento a população de cDNAs foi inserida no plasmídeo pDNR-LIB e em seguida os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar células de *Escherichia coli* (One Shot TOP10 Competent Cells) através de eletroporação. As células transformadas foram crescidas em meio LB líquido e após 1 hora plaqueadas em meio LB sólido + antibiótico (cloranfenicol 25µg/mL).

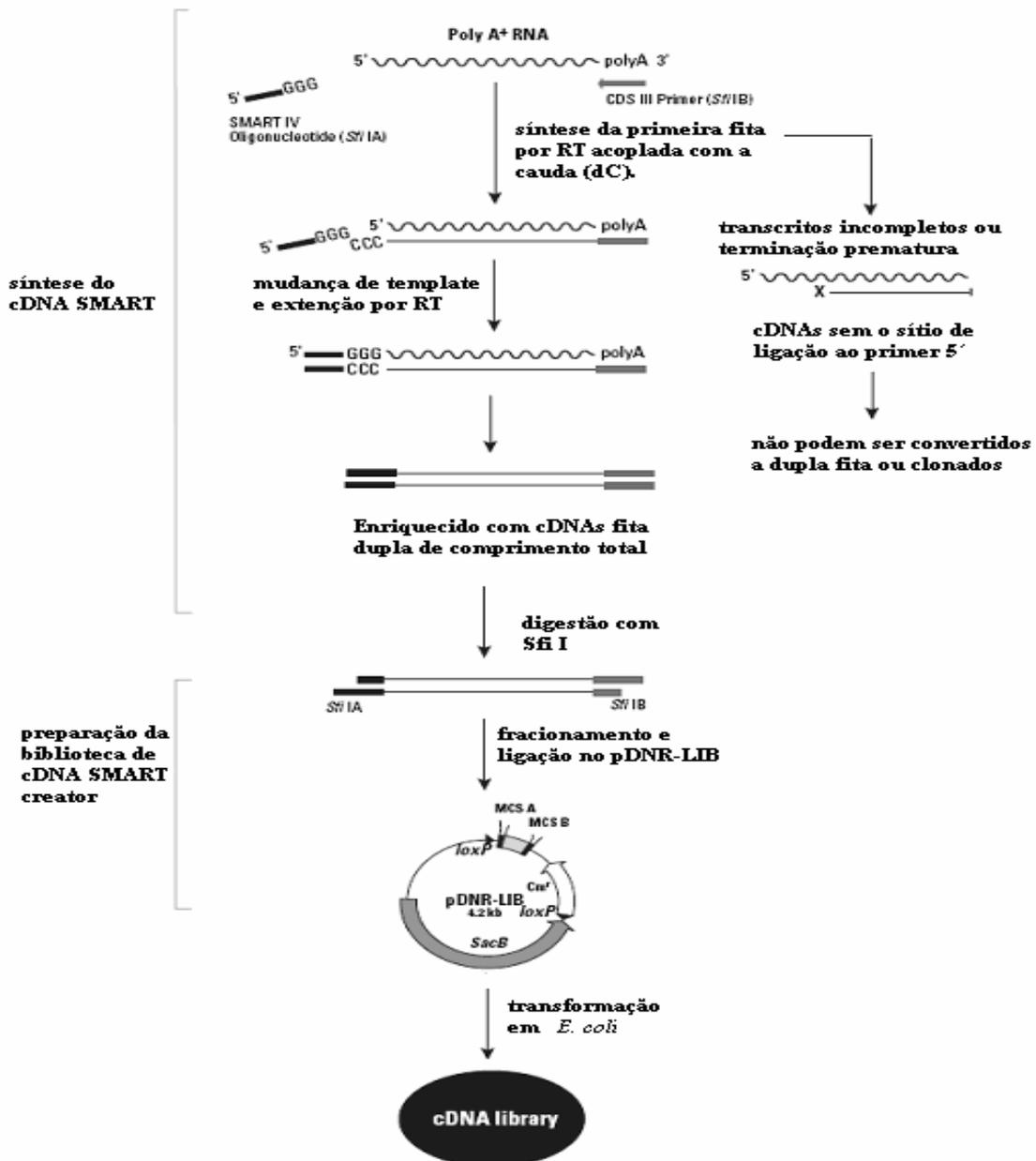


Figura 6. Seqüência simplificada do protocolo do Kit de clonagem Creator SMART cDNA Library. Fonte: Manual SMART cDNA Library Creator (Clontech).

5.3.1 Confirmação da presença e tamanho do inserto

Para confirmação da presença de insertos e pré-validação da biblioteca, foi utilizada a técnica de PCR. Os *primers* utilizados foram M13 *forward* e *reverse* sob as condições:

- 5 minutos de desnaturação inicial a 94° C; 30 ciclos de 94° C por 1 minuto, 45° C por 1 minuto e 72° C por 2 minutos; elongação final de 5 minutos a 72° C.

De cada biblioteca foram selecionadas 15 colônias, as quais foram fervidas em 50 µL de água durante 5 minutos e utilizados 5 µL de cada amostra nas reações de amplificação.

5.4 Seqüenciamento em larga escala da biblioteca de cDNA de *Thalassiosira fluviatilis*

Dos clones da biblioteca de cDNA de *T. fluviatilis* foram selecionados 1920 clones para serem seqüenciados. Os clones foram repicados em 20 placas de 96 poços em cultura permanente 40% glicerol.

5.4.1 Extração do DNA plasmidial

Para extração do DNA plasmidial seguiu-se o protocolo para miniprep disponível na página da plataforma de sequenciamento da Embrapa-Cenargen (http://www.cenargen.embrapa.br/laboratorios/psd/protocolos/protocol_1.htm).

5.4.2 Reação de seqüenciamento

As extremidades 5' dos clones de cDNA foram seqüenciadas na plataforma de seqüenciamento de DNA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (<http://www/laboratorios/psd/psd.html>), utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador "M13 forward" (5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3'), DNA molde, BigDye e água, baseando-se na amplificação por ciclagem de temperatura e incorporação de dideoxynucleotídeos e uso de equipamento seqüenciador automático ABI3700. Os fragmentos foram lidos a partir de microplacas de 96 poços durante uma corrida de 10 horas, onde foram lidas cerca de 700 pb.

Os eletroferogramas foram então submetidos ao Sistema GENOMA do Laboratório de Bioinformática da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (<http://genoma.cenargen.embrapa.br/genoma/>) até processamento e análise de seqüências.

5.4.3 Avaliação da qualidade e limpeza das seqüências

Os eletroferogramas gerados no sequenciamento dos clones de cDNA foram inicialmente analisados pelo programa Phred (Ewing *et al.*, 1998), que avaliou a qualidade dos picos correspondentes a cada base seqüenciada, conferindo um valor de qualidade a cada uma. Para esta análise foram estabelecidos os parâmetros de

aceitação das seqüências conforme Telles & da Silva (2001) com Phred superior a 20 correspondendo a um erro a cada 1000 bases. As pontuações inseridas nos arquivos de saída do Phred representam a probabilidade logarítmica negativa em escala de erro de uma base; portanto, quanto maior o valor de qualidade do Phred, menor a probabilidade de ter ocorrido um erro.

Para remoção de seqüências do vetor e de adaptadores, foi utilizado o programa CROSSMATCH.

5.4.4 Agrupamento das seqüências

As seqüências de alta qualidade foram então submetidas à montagem utilizando o programa TGICL (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/software/>), que gera os agrupamentos por similaridade e por qualidade. O resultado dessa fase é a construção dos grupos de *contigs* (agrupamento de seqüências formados por dois ou mais clones que representam o mesmo gene devido a similaridade) e *singletons* (seqüências representadas por um único clone).

5.4.5 Identificação dos genes

O conjunto total de seqüências agrupadas foi então comparado com diferentes bancos de dados disponíveis no *GenBank* com o programa de alinhamento BLASTn e BLASTx (Altschul et al., 1997). Os resultados das buscas foram analisados quanto a similaridade usando como parâmetros os índice estatístico, e-value $\leq 10^{-9}$.

5.5 Isolamento do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *Thalassiosira fluviatilis* (amplificação por PCR)

Para isolamento do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. fluviatilis* foi utilizada a técnica de PCR e RACE (*rapid amplified cDNA ends*) utilizando como molde o cDNA confeccionado na construção da biblioteca de cDNA desta diatomácea (figura 5). A relação dos *primers* utilizados e sua respectiva seqüência está listada na tabela 1.

Para a reação foram utilizados aproximadamente 100ng do cDNA molde (*T. fluviatilis*) 0,5 μ L de dNTPs 20mM, 05 μ L de cada primer a 20 μ M, 2,5 Unidades de *Taq* polimerase (Phoneutria) e seu respectivo tampão e água MilliQ autoclavada

completando-se o sistema para um volume final de 25 μ L. A reação procedeu-se em termociclador (Bio Rad) segundo o seguinte programa:

Ciclo 1- desnaturação inicial: 94°C - 5 minutos	} 30 X
Ciclo 2: 94°C- 1 minuto para desnaturação	
Ciclo 3: X°C- 1 minuto para anelamento	
Ciclo 4: 72 °C- 1 minuto para alongação	
Ciclo 5- alongação final: 72 °C - 5 minutos	

O fragmento amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo.

Tabela 1. Lista de *primers*, tamanho e sua respectiva seqüência utilizados para isolar o gene da $\Delta 6$ -dessaturase da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis*

Primer	Tamanho	Seqüência
D6desTpE	26	5'-ATGGGAAAAGGAGGAGACGCAGCCGC-3'
D6desTpMF	24	5'-CGGGCCAAGCTTGTCATGATGGGG-3'
D6desTpMR	22	5'-CCGGAAGAGAGGACGAACATCC-3'
Tfdes3RACE	26	5'-TGGAATCTTCTGGGGAGACCTTATGC-3'
Tfdes5RACE	26	5'-CCTGAAACTTTGTGCCTGCTTCAGAC-3'
SMART IV™ Oligonucleotide	39	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGATGGCCATTACGGCCGGG- 3'
CDS III/3' PCR Primer	59	5'-ATTCTAGAGCCGAGGCCGCCGACATG-d(T) ₃₀ N ₋₁ N-3' *

*(N = A, G, C ou T; N₋₁ = A, G ou C)

5.5.1 Purificação e clonagem dos fragmentos selecionados

Os fragmentos amplificados por PCR e apresentando o tamanho esperado foram cortados do gel e extraídos utilizando-se o *Kit PCR Clean-Up System – Wizard 5V Gel* (Promega), adicionou-se ao protocolo uma fase de precipitação com 2,5 volumes de etanol e 10% de Acetato de Sódio 3M durante a noite seguida de 15 minutos sob centrifugação a 15.700 g para concentrar o DNA.

Os DNAs purificados foram inseridos no vetor TOPO TA 2.1 (Invitrogen), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram usados para transformar células competentes de *Escherichia coli* XL-1 *blue* por meio de eletroporação, plaqueados em meio de cultura LB sólido contendo antibiótico (ampicilina 100 µg/mL) e incubadas 16 horas a 37°C. Os clones positivos foram selecionados por PCR como descrito no item 4.4.

5.5.2 Extração do DNA plasmidial

Os clones positivos (contendo o fragmento no tamanho esperado) foram crescidos em 5mL de meio de cultura LB líquido com ampicilina (50µg/mL) e mantidos sob agitação a 37° C *overnight*. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o *kit FlexiPrep* (Amersham Pharmacia Biosciences) segundo protocolo para Miniprep sugerido pelo fabricante.

5.5.3 Seqüenciamento e análise dos clones obtidos por PCR

Para as reações de sequenciamento foi utilizado o *Kit BigDye Terminator* versão 3.1 (*Applied Biosystem*) e *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*, procedendo-se em equipamento automático ABI 377 (*Applied Biosystems*). O sequenciamento foi realizado na Universidade Católica de Brasília.

As seqüências obtidas foram comparadas ao banco de dados do *GenBank*, utilizando o algoritmo tBLASTx, e programa disponível na página do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul *et al.*, 1997). Com este algoritmo o programa realiza a tradução da seqüência buscada e verifica similaridade com seqüências gênicas traduzidas, depositadas nesse banco de dados.

5.5.4 Análise da seqüência do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *Thalassiosira fluviatilis*

A partir dos cromatogramas resultantes, as seqüências obtidas foram alinhadas para gerar uma única seqüência (*contig*) com o auxílio do programa BioEdit. A seqüência consenso foi usada na busca de homólogos utilizando-se o BLASTX (Altschul *et al.*, 1997), no banco de seqüências protéicas do GenBank (Benson *et al.*, 2000).

Para identificação dos motivos e domínios conservados, a seqüência de resíduos de aminoácidos da $\Delta 6$ -dessaturase foi alinhada com outras três $\Delta 6$ -dessaturases de microalgas utilizando o programa ClustalW 1.81 e BioEdit (Thompson *et al.*, 1997).

5.5.5 Hibridização de colônias

Na tentativa de identificar o gene completo da $\Delta 6$ -dessaturase, foi realizado um *screening* em 2500 clones da biblioteca de cDNA de *T. fluviatilis* utilizando como sonda o fragmento obtido com os *primers* D6desTpMF e D6desTpMR.

5.5.5.1 Transferência das colônias e fixação do DNA

Os clones (2500) foram repicados em placas de petri contendo meio LB sólido e cloranfenicol e mantidos por 16 horas a 37° C. Em seguida as placas foram transferidas para a geladeira e mantidas por meia hora, passando então para a fases que seguem no protocolo:

- 1) Umedecer as membranas (Hybond-N+ da Amersham pharmacia biotech) em TE e colocar sobre as colônias na placa;
- 2) Retirar a membrana e inverter colocando sobre papel de filtro encharcado com SDS 10%, para lisar as colônias. Deixar 3 minutos;
- 3) Transferir a membrana para papel de filtro encharcado com tampão desnaturante. Deixar 5 minutos;
- 4) Transferir a membrana para papel de filtro encharcado com tampão neutralizante. Deixar 3 minutos;
- 5) Tirar o excesso de tampão e limpar os restos celulares em SSC 2x com auxílio de uma gaze;
- 6) Secar as membranas e fixar o DNA utilizando o aparelho *CrossLinker*.

5.5.5.2 Preparação da sonda

A sonda foi marcada pela incorporação de radioisótopos marcados (α [³²P] dCTP) em DNAs recém sintetizados pelo sistema *Ready-To-Go* (-dCTP) da *Amershampharmacia Biotech* que tem como iniciador de síntese hexâmeros randômicos que se anelam ao DNA molde.

5.5.5.3 Hibridização e autorradiografia das membranas

A Hibridização foi realizada segundo protocolo do fabricante (Amersham pharmacia biotech), sendo que as membranas foram pré-hibridizadas por 1 hora a 68° C (solução de pré-hibridização) em agitação e hibridizadas *overnight* a 68° C e sob agitação com solução de hibridização contendo a sonda a 10⁶ counts por mL de solução. Em seguida as membranas foram lavadas por incubação a 68° C e agitação leve em:

- 1) Solução de baixa estringência por 5 minutos;
- 2) Solução de média estringência por 15 minutos;
- 3) Solução de alta estringência por 10 minutos, 2x.

Após secas, as membranas foram autorradiografadas por 1 semana a -80° C. Os clones que apresentaram sinal autorradiográfico positivo foram selecionados e o tamanho do inserto avaliado por PCR utilizando-se os *primers* M13 *forward* e *reverse*.

5.5.6 Construção de árvore filogenética para $\Delta 6$ -dessaturase de *Thalassiosira fluviatilis*

O alinhamento das proteínas para análises de filogenia foi feito utilizando o programa Bioedit e clustalW e a árvore filogenética foi calculada segundo o algoritmo de *Neighbor joining* (N.J.) com teste de *bootstrap* de 10.000 repetições realizado no programa MEGA versão 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

Os organismos escolhidos para o estudo de filogenia foram as microalgas diatomáceas *T. pseudonana* e *P. tricornutum*, as microalgas *G. chryso-plasta* e *O. tauri*, as leveduras *P. irregularae*, *M. alpina* e *Mortierella isabelina*, os musgos *Marchantia polymorpha* e *Ceratodon purpureus* e a planta herbácea *B. officinalis*. Esta última foi utilizada como *outgroup* por tratar-se de uma planta superior.

6. RESULTADOS

6.1 Construção de bibliotecas de cDNA:

Bibliotecas de cDNA para isolamento de genes e/ou estudos de genoma funcional de *T. fluviatilis* e *C. muelleri* foram confeccionadas.

Os RNAs totais isolados eram translúcidos e quando visualizados em gel de agarose contendo formaldeído observou-se as bandas do RNAs ribossômicos intactas e claramente visíveis, indicando que o RNA não estava degradado (Figura 7). O cDNA obtido apresentou alta concentração de seqüências entre 800 a 2000 pares de bases (Figura 8).

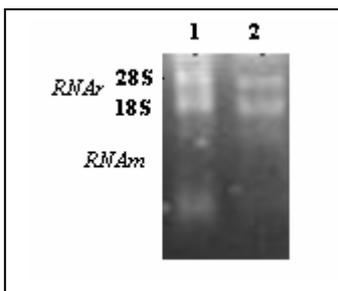


Figura 7. Fracionamento de RNAs totais das Diatomáceas *T. fluviatilis* e *C. muelleri* em gel de agarose desnaturante contendo formaldeído. 1= *T. fluviatilis*; 2= *C. muelleri*.

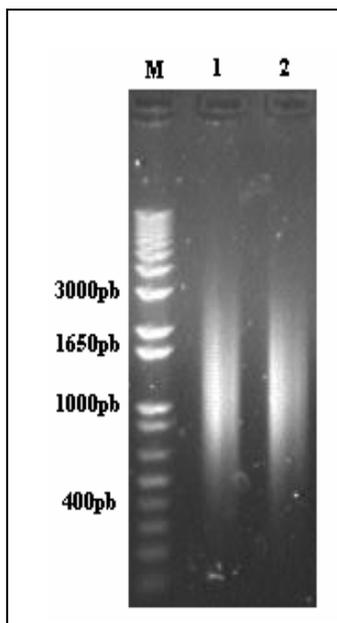


Figura 8. População dos cDNAs obtidos das diatomáceas *T. fluviatilis* e *C. muelleri*, em gel de agarose corado com brometo de etídeo em eletroforese. M= marcador; 1= *T. fluviatilis*; 2= *C. muelleri*.

A biblioteca de cDNA das duas algas teve alta eficiência, como observado pela quantidade de colônias obtidas quando plaqueadas em meio sólido (não mostrado).

Na confirmação da presença do inserto nas colônias da biblioteca de cDNA de cada 15 colônias avaliadas, 14 apresentaram inserto como confirmado por PCR (Figura 9). Pode-se observar grande quantidade de amplicons de tamanhos variados na faixa de 1000 a 2000 bp.

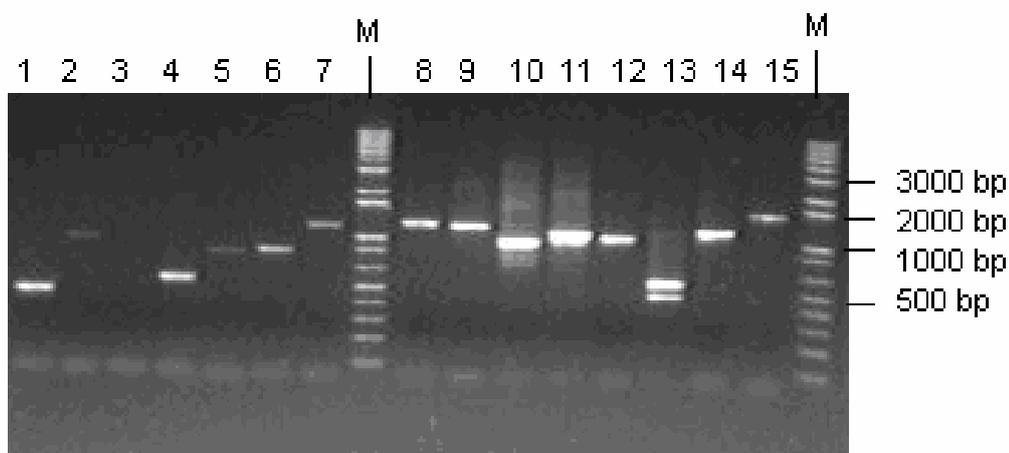


Figura 9. Fragmentos amplificados dos clones das bibliotecas de cDNA por PCR em gel de agarose corado com brometo de etídeo. M = marcador (1Kb *ladder plus*); 1 a 15= amplicons.

6.2 Análise da Biblioteca de cDNA de *Thalassiosira fluviatilis*

Devido a disponibilidade de recursos nas circunstâncias em que se desenvolveu o presente trabalho, somente uma das bibliotecas de cDNA confeccionadas pôde ser seqüenciada e foi escolhida a de *T. fluviatilis* por apresentar maior perfil de EPA e DHA entres os ácidos graxos poliinsaturados do que *C. muelleri* e dela foram seqüenciados 1920 ESTs.

Dos 1920 ESTs obtidos, 56,77% foram aceitas sendo consideradas válidas por ter boa qualidade (Phred >20) e baixo percentual de vetor (apêndice 1). O número médio de bases com Phred acima de 20 foi de 240,92 excluindo-se as bases pertencentes ao vetor (Tabela 2).

A partir das 1090 ESTs de *T. fluviatilis* validadas no programa Sistema Genoma, 775 *clusters* foram gerados, distribuindo-se em 628 *singletons* e 147

contigs. Os *clusters* obtidos foram denominados *TfAES* (*T. fluviatilis Assembled Expressed Sequence*), e serão doravante referidos como tal.

Tabela 2. Sumário do seqüenciamento de ESTs da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis*.

Biblioteca de ESTs	
No. de ESTs sequenciados	1920
No. de sequencias válidas	1090
No. de ESTs identificados*	1082
Redundância (%)**	41,96
Novidade (%)***	81,03
Agrupamento das ESTs (<i>clusters</i>)	
No. de <i>singletons</i>	628
No. de <i>contigs</i>	147
No. de <i>reads</i> em <i>contigs</i>	454
No. de <i>clusters</i>	775
Distribuição dos <i>reads</i> nos <i>contigs</i>	
2 - 4 <i>reads</i> (%)	89,12
5 - 10 <i>reads</i> (%)	8,16
> 10 <i>reads</i> (%)	2,72

*total de *reads* em *contigs* + *singletons*

**Redundância = numero de ESTs em *contigs* x 100/numero total de ESTs

***Percentual de *clusters*

Baseado nas categorias descritas por Lee et al. (2005), observou-se que: cerca de 89,12% dos ESTs que formaram *contigs* apresentaram baixa redundância (2-4 *reads* por *contigs*), dos quais 92 *contig* apresentaram 2 *reads*, 31 *contigs* apresentaram 3 *reads* e 8 *contig* apresentaram 4 *reads* (Figura 10 e Tabela 2); 8,16% apresentaram média redundância (5-10 *reads* por *contig*); e apenas 2,72 % dos ESTs apresentaram alta redundância (>10 *reads* por *contigs*), sendo eles: um *contig* com 22 *reads*, um *contig* com 17 *reads*, um *contig* com 12 *reads* e um *contig* com 11 *reads*.

Um total de 454 sequencias ESTs foram agrupadas formando os *contigs*, que unidos aos *singletons* somam 1082 ESTs. A análise da clusterização da

biblioteca revelou um índice de 81,03% de novidade e 41,96% de redundância (Tabela 2).

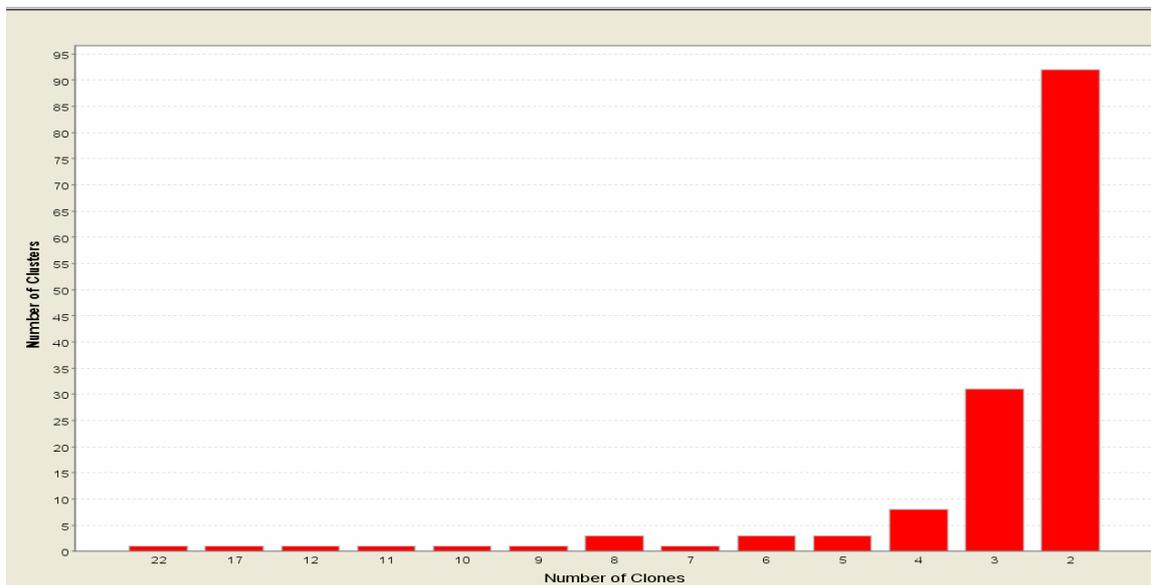


Figura 10. Número de clones por *clusters* encontrados nas ESTs da biblioteca de cDNA diatomácea *T. fluviatilis*. O eixo x indica o número de clones ou “reads” e o eixo y indica o número de *clusters*.

6.2.1 Análise das seqüências

Dos 775 *TfAES* submetidos ao BLASTx contra seqüências não redundantes (nr) do GenBank, 165 *clusters* tiveram similaridade com proteínas identificadas, totalizando 21,29% dos *clusters*. Dentre esses *clusters* 10 tiveram similaridade com seqüências de microalgas, sendo 7 da microalga *Ostreococcus tauri* (Apêndice 2).

As seqüências foram também submetidas ao BLASTn contra o banco de ESTs do GenBank e contra um banco de seqüências de uma biblioteca genômica da microalga *T. pseudonana*. Para o banco de ESTs, 36 seqüências (4,6%) tiveram similaridade com algum organismo sendo 29 delas, a microalga diatomácea *P. tricornutum*. Para o banco com seqüências genômicas da microalga diatomácea *T. pseudonana*, 109 das *TfAES* (14,06%) apresentaram similaridade.

Dentre os dois tipos de análise (BLASTx e BLASTn) houveram 196 seqüências (25,29%) com alguma similaridade com diferentes organismos, restando 579 *clusters* (74,71%) que não apresentaram similaridade com nenhuma seqüência desses bancos, sendo exclusivos da biblioteca de cDNA de *T. fluviatilis* (Tabela 3).

Dentre essas análises 122 clusters (15,74%) apresentaram similaridade com seqüências e/ou genes de microalgas.

Tabela 3. Total de *clusters* identificados da biblioteca da microalga *Thalassiosira fluviatilis* contra bancos de seqüências do GenBank utilizando os algoritmos BLASTx e BLASTn.

Análise		Total de <i>clusters</i>	% dos <i>clusters</i>
BLASTx	nr*	165	21,29
BLASTn	ESTs	36	4,6
	<i>T. pseudonana</i>	109	14,06
	Sem similaridade	542	74,71

* seqüências protéicas não redundantes do *GenBank*

6.2.1.1 Proteínas envolvidas em síntese de lipídeos

Das 165 *TfAES* analisadas pela similaridade com proteínas do *GenBank-nr*, 7 *clusters* apresentaram similaridade com proteínas envolvidas com a síntese de lipídeos (Figura 11) e 4 deles correspondem a enzimas envolvidas com a via biossintética de ácidos graxos poliinsaturados (apêndice 2).

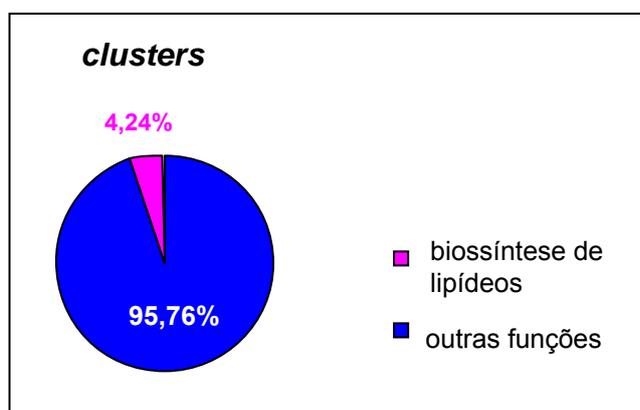


Figura 11. Gráfico de distribuição de *TfAES* relacionadas a biossíntese de lipídeos.

Dentre as 4 enzimas encontradas com similaridade aos *TfAES* envolvidas na biossíntese de LCPUFAs (tabela 4) destaca-se a $\Delta 6$ -dessaturase de ácido graxo de *T. pseudonana* com um “*e-value*” de $3,53 \times 10^{-44}$, sendo o sétimo menor “*e-value*” encontrado para similaridade com as *TfAES* entre as proteínas identificadas (Tabela 5).

Tabela 4. Lista das enzimas envolvidas da biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados que apresentaram similaridade com 4 clusters da biblioteca de cDNA da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis*.

DEFINIÇÃO	ORGANISMO	e-value
Δ 6-dessaturase de ácido graxo	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	3,53E-44
Δ 6- dessaturase de ácido graxo / Δ 8-dessaturase de esfingolípido	<i>Ostreococcus tauri</i>	1,59E-14
Provável ligase de ácidos graxos de cadeia longa a CoA	<i>Robiginitalea biformata</i>	1,43E-11
Provável ligase de ácidos graxos de cadeia longa a CoA	<i>Gamma proteobacterium</i>	2,98E-13

Tabela 5. Proteínas que apresentaram maiores valores de similaridade (menor e-value), em ordem decrescente, com as ESTs da biblioteca de cDNA da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis*.

DEFINIÇÃO	ORGANISMO	e-value
proteína semelhante ao fator de alongação da tradução	<i>Guillarida theta</i>	1,25E-103
ubiquitina (UbiA)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3,00E-60
transposase	<i>Escherichia coli</i>	1,74E-59
piruvato desidrogenase	<i>Aedes aegyptii</i>	5,68E-57
redutase peptídico metionina sulfoxido	<i>Synechococcus elongatus</i>	7,45E-52
ATPase de transporte de H(+)-	<i>uncultured archaeon</i>	3,33E-51
Δ 6-dessaturase de ácido graxo	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	3,53E-44

6.3 Caracterização do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *Thalassiosira fluviatilis*

O gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *Thalassiosira fluviatilis* foi amplificado por PCR usando como molde o cDNA sintetizado durante a confecção da biblioteca para esta diatomácea, em seguida clonado, seqüenciado, caracterizado na sua sequência protéica predita.

6.3.1 Clonagem e sequenciamento do gene da $\Delta 6$ -dessaturase

Para isolamento do gene $\Delta 6$ -dessaturase de ácido graxo de *T. fluviatilis*, inicialmente foram desenhados *primers* (D6desTpMF e D6desTpMR, tabela 1 de materiais e métodos) com base na seqüência do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. pseudonana* (disponível na página do NCBI), baseado na hipótese de que por serem diatomáceas do mesmo gênero, sua seqüência nucleotídica tem alta identidade. Os *primers* desenhados correspondem respectivamente as regiões +352 a + 376 e +998 a +1020 do gene com relação ao códon de iniciação da tradução, região esta escolhida por ser rica CG e garantir maior temperatura de anelamento.

Os *primers* D6desTpMF e D6desTpMR combinados resultaram na amplificação por PCR (temperatura de anelamento: 60° C) de um fragmento de aproximadamente 750 pb (Figura 12), a partir do cDNA de *T. fluviatilis*, e como o esperado era de 668 pb, relativamente próximo, o mesmo foi clonado e seqüenciado.

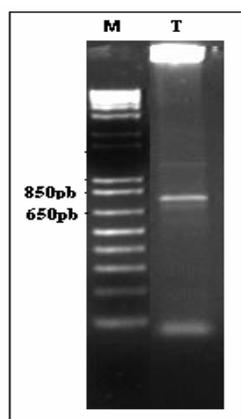


Figura 12. Amplicon obtido por meio de PCR usando como molde o cDNA de *Thalassiosira fluviatilis* e *primers* desenhados com base no gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *Thalassiosira pseudonana* visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Após o seqüenciamento, utilizando os *primers* M13 *forward* e em seguida M13 *reverse*, ficou demonstrado que o tamanho exato é de 670 pb. O alinhamento da

seqüência gerada com outras seqüências disponíveis no *GenBank*, utilizando o programa BLAST e algoritmo tBLASTx confirmou tratar-se de uma $\Delta 6$ -dessaturase.

Na tentativa de isolar o gene completo da $\Delta 6$ -dessaturase foram utilizadas três estratégias: hibridização de colônias da biblioteca de cDNA de *T. fluviatilis*, 3'/5' RACE e amplificação da região 5' com *primer* desenhado com base na seqüência da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. pseudonana*. A hibridização de colônias não obteve sucesso e por esse motivo optou-se pela técnica de RACE para obtenção da seqüência completa do gene.

Para a técnica de RACE, contou-se com o cDNA de *T. fluviatilis* com regiões conhecidas nas extremidades 3' e 5' devido ao protocolo e ferramentas utilizados para sua confecção fornecidos pelo *Kit creator*, incluindo *primers* SMART IVTM Oligonucleotide e CDS III/3' PCR (materiais e métodos tabela 1 e item 5.3).

Primers Tfdes3RACE e Tfdes5RACE (tabela 1 de materiais e métodos) correspondendo respectivamente a região +223 a +248 e +378 a +404 do fragmento de 690pb amplificado da $\Delta 6$ -dessaturase *T. fluviatilis* foram desenhados no programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Figura 13, a) para as amplificações das extremidades 3' e 5' do gene. Os primers foram desenhados nessa região baseado na temperatura de anelamento de 68° C necessária para combinação com os primers do *Kit creator*.

Para a amplificação da extremidade 3' foram combinados os *primers* Tfdes3RACE e CDS III/3' PCR (Figura 13, b). A PCR gerou um fragmento de 1000 pb (não mostrado), e como era esperado uma seqüência de mais de 870 pb baseado na seqüência do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. pseudonana* somado a poliA e uma possível região 3' UTR o mesmo foi clonado e sequenciado. Este fragmento quando sequenciado revelou uma região gênica de 870 pb e uma região 3' UTR (*untranslated terminal region*) de 122 pb mais 30 adeninas correspondendo a cauda poliA.

As tentativas de clonagem da região 5' do gene pela técnica de RACE, com o *primer* SMART IVTM Oligonucleotide, não obtiveram sucesso por razões ainda desconhecidas, um fragmento era amplificado, mas não clonado.

Para contornar a situação e amplificar o fragmento da região 5' do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. fluviatilis*, foi desenhado um primer correspondendo a região

+1 a +26 do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. pseudonana*, iniciando no ATG (figura 13, c). Esse *primer*, denominado D6desTpE (tabela 1 de materiais e métodos) foi combinado com o *primer* Tfdes5RACE numa PCR e resultou na amplificação um fragmento de 763 pb (não mostrado), tamanho este compatível com o fragmento esperado baseado na seqüência da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. pseudonana* (Figura 13, c).

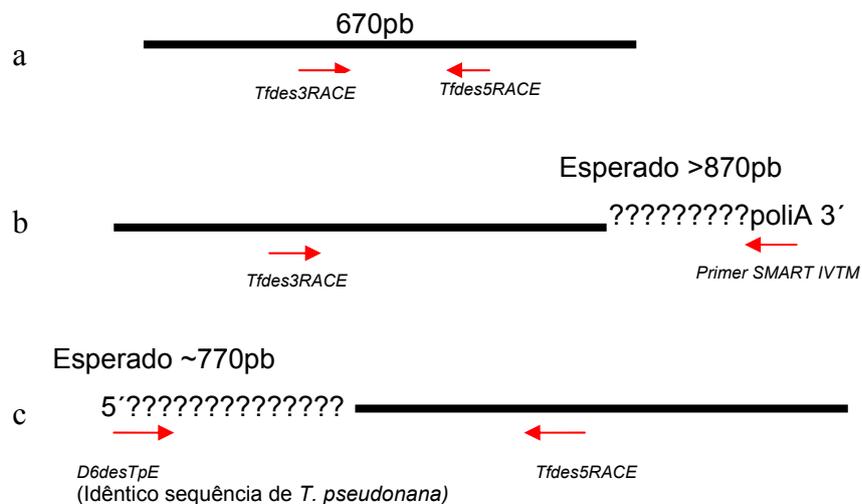


Figura 13. Esquema da estratégia usada para amplificação das extremidades 5' e 3' do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de ácido graxo de *Thalassiosira fluviatilis*. A) fragmento obtido na primeira amplificação com os *primers* D6desTpMF e D6desTpMR, as flechas vermelhas representam a região de onde foram desenhados os *primers* Tfdes3RACE e Tfdes5RACE.

Utilizando as seqüências obtidas e com auxílio do programa BioEdit foi possível montar um *contig* exibindo a seqüência completa do gene da $\Delta 6$ -dessaturase. A análise da seqüência nucleotídica do gene indicou a presença de uma ORF de 1455 nucleotídeos que codifica uma proteína predita de 484 aminoácidos (Figura 14). O Seqüenciamento total incluindo a região 3' UTR, incluindo a Poli A totaliza 1610 nucleotídeos.

1 atgggaaaaggaggagacgcagccgaggtcaatcgctttgaag
 M G K G G D A A A R S I A L K
 46 tctaacgacaaaagccgagaagtagcacttggggcggaggtgaagaag
 S N D K A E K Y T W A E V K K
 91 cacattacccccgacgacgcttggatcgctccatgctaacaaggctc
 H I T P D D A W I V H A N K V
 136 tatgatgtttcaaactggcagcaccatcctggaggcgcagtcac
 Y D V S N W H D H P G G A V I
 181 ttcactcagcctggagacgatatgacggatattctttgctgccttc
 F T H A G D D M T D I F A A F
 226 cagcacagggctctcaagccatgatgaagaaattctacatcggc
 H A Q G S Q A M M K K F Y I G
 271 gaccttatccccgagagcgtggagcataaggaccagagtcagctg
 D L I P E S V E H K D Q S Q L
 316 gattttgagaaggggtaccggtgatttaagggcgaagttggctcatg
 D F E K G Y R D L R A K L V M
 361 atgggaatgttcaagagttctaagggttactacgcctacaaatgc
 M G M F K S S K G Y Y A Y K C
 406 accttcaacatgtgcatgtggctcactgcggtagccatggtgtac
 T F N M C M W L T A V A M V Y
 451 tattcggatagttttgccgtgcacattgggtcggcccttttctc
 Y S D S F A V H I G S A L L L
 496 ggactcttctggcagcaatgcccgtggcttggccatgattttttg
 G L F W Q Q C G W L A H D F L
 541 catcatcaggtgttcaagcaccgcaagtagcgggacttggctgga
 H H Q V F K H R K Y G D L A G
 586 atcttctggggagaccttatgcaaggattttcaatgcaatggtgg
 I F W G D L M Q G F S M Q W W
 631 aaaaataagcacaacggacaccacgccgtgccaacttgcacaat
 K N K H N G H H A V P N L H N
 676 tcttcgggttgacagtcaggatggagatcctgacatcgacaccatg
 S S V D S Q D G D P D I D T M
 721 cccctcttagcatggagtctgaagcaggcacaagtttcagggaa
 P L L A W S L K Q A Q S F R E
 766 ttaaagcccgatggaaaggatagcaccttagtaagtagcgcgatc
 L N A D G K D S T L V K Y A I
 811 aagtttcaggcatttacctacttccccattcttttctgctggcaaga
 K F Q A F T Y F P I L L L A R
 856 atttcttgggttgagagagcttttcaaactgccttcgggtctcgggt
 I S W L R E S F K T A F G L G
 901 gctgcttctgaaaatgctaagcttgaacttgagaggcggggggttg
 A A S E N A K L E L E R R G L
 946 caataccccactcttgagcgttccgggaattgctgcttattacgca
 Q Y P T L E R S G I A L H Y A
 991 tggatgttcgctcctctcttctggcttcgggaaggtctttattcgca
 W M F V L S S G F G R S L F A
 1036 aaattcccatcaatggaattcatggtcgcaacttgctcatctgga
 K F P S M E F M V A T C S S G
 1351 cagcagactgacatgatcactggaacttgggaagttttaagcac
 H E T D M I T G T W E V L K H
 1396 cttcaaaatgtttccgacgaattcttggtagaaatggtgaaagat
 L Q N V S D E F L V E M V K D
 1441 ttcccagccatgtaa 1455
 F P A M *
 1456 GGTCTTACCTTTGAACATACTTTCTAAATTACCGCACCCGTAGT
 1502 CTGTTCTTTAATAAAGTAACTGTTAAAGCTCTTTGTTTCATGCC

```

1546 GCGAAGGTACTTTTCTGGCAACTGCTTTCCACCGTAAAAAAAAA
1591 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3' 1610

```

Figura 14. Seqüência de nucleotídeos e resíduos de aminoácidos deduzidos do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. fluviatilis*. A localização do códon de iniciação da tradução está indicado em vermelho (ATG), e o códon de terminação da tradução é indicado pela seqüência TAA (em rosa). Os aminoácidos deduzidos são designados por uma letra, abaixo do seu respectivo códon. A sequencia a partir de 1456 até 1610 nucleotídeos compreende a região 3'UTR e Poli A.

6.3.2 Análise da seqüência do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *Thalassiosira fluviatilis*

A análise por BLAST da seqüência da proteína da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. fluviatilis* revelou uma elevada identidade com proteínas $\Delta 6$ -dessaturases de outros organismos (Figura 15). Os maiores valores de identidade foram verificados entre as diatomáceas *T. fluviatilis* e *T. pseudonana* (89%), seguida da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* (81%), microalga *Glossomastix chrysoplata* (66%) e da levedura *Pythium irregulare* (61%) (Tabela 6).

Tabela 6. Identidade da seqüência de aminoácidos da $\Delta 6$ -dessaturase de *Thalassiosira fluviatilis* comparada com as seqüências de $\Delta 6$ -dessaturases de outros organismos (análise por BLAST).

Organismo	Identidade (%)	Score (bits)	Valor E	Tamanho da Seqüência (aa)
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	89	865	0.0	484
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	81	709	0.0	477
<i>Glossomastix chrysoplata</i>	66	494	5e-138	465
<i>Pythium irregulare</i>	61	386	2e-105	459

BLASTX 2.2.15 Results

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF

4,457,254 sequences; 1,532,736,548 total letters

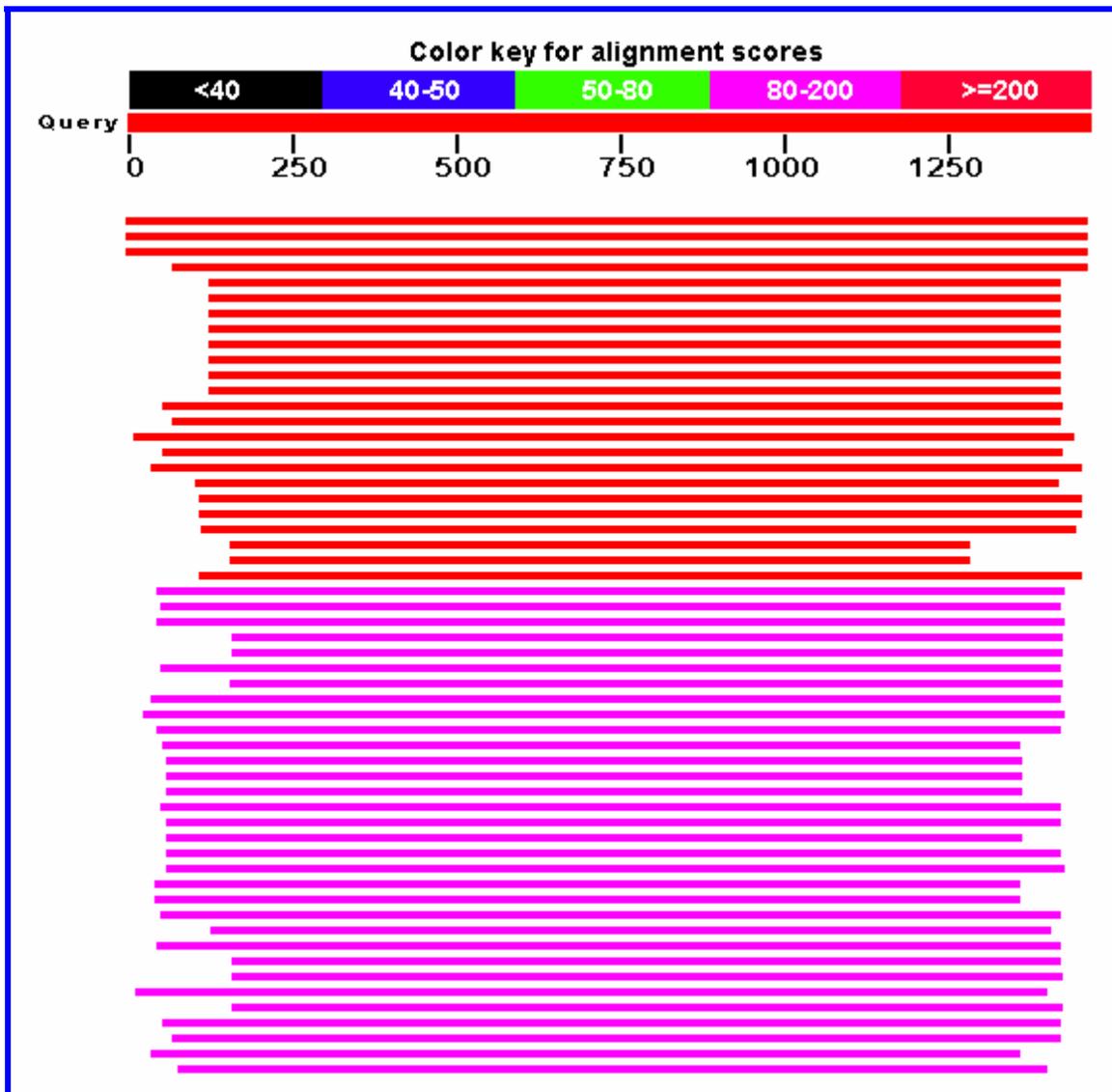


Figura 15. Análise de identidade da região seqüenciada de 1455 pb *T. fluviatilis* contra o banco de dados do GenBank.

Com base no alinhamento da seqüência de aminoácidos da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. fluviatilis* com outras microalgas (Figura 16) pode-se destacar:

- Uma região próxima ao N-terminal contendo os aminoácidos conservados HPGG (58 a 61 aa), característico do domínio citocromo b5 fusionado a “*front end*” dessaturases;

- Três motivos histidina-box conservados (184 a 188; 218 a 224; 423 a 428) característicos de dessaturases;

- O terceiro motivo histidina-box contém a substituição de uma histidina por uma glutamina (Q), no primeiro aminoácido do motivo conservado, característico de delta-6 dessaturases.

A região de leitura predita da proteína apresentou 2 domínios conservados putativos, o citocromo b5 e delta-6-dessaturase de ácidos graxos, que são característicos de front-end dessaturases (Figura 17). Além disso, na busca por domínios conservados, foi encontrado o domínio de dessaturase de ácido graxo comum as dessaturases.

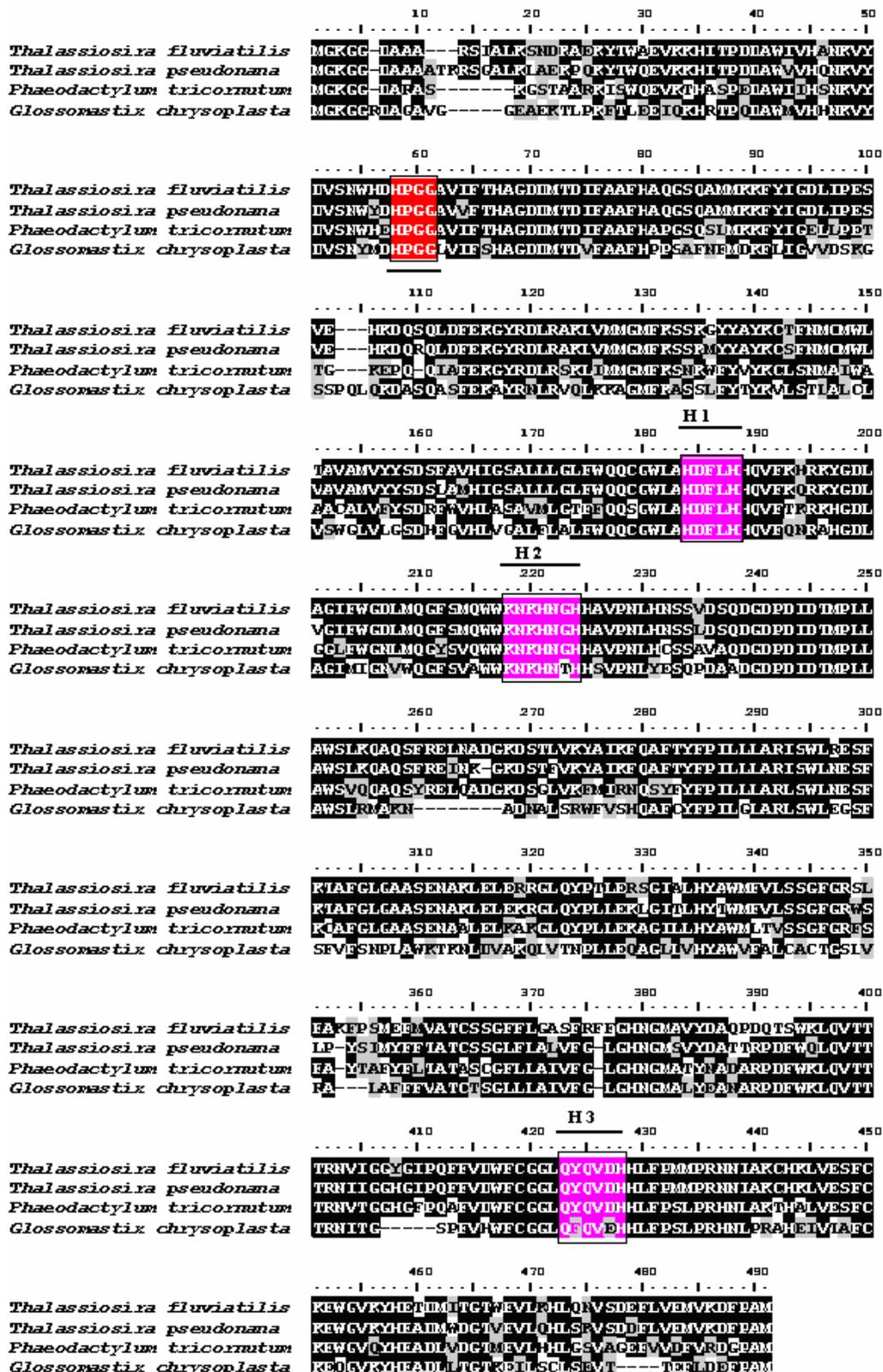


Figura 16. Alinhamento da sequência de aminoácidos de quatro delta-6-dessaturases de ácido graxos de microalgas. A sequência HPGG, do citocromo b5 está selecionada com um retângulo em vermelho. Os motivos histidina-box, característicos de dessaturases estão selecionados com um retângulo em rosa e nomeados acima com H1, H2 e H3.

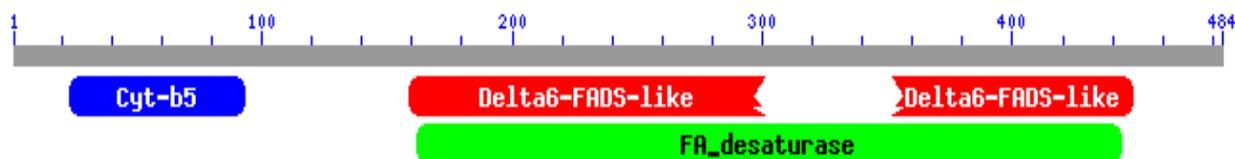


Figura 17. Domínios conservados na seqüência da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. fluviatilis* obtidos quando alinhada a seqüência contra o banco de dados do NCBI.

6.3.3 Análise filogenética da seqüência protéica predita da $\Delta 6$ -dessaturase de *Thalassiosira fluviatilis*

A árvore filogenética construída para o gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *Thalassiosira fluviatilis* (Figura 18) apresentou dois grupos principais separados, I e II, com um mesmo ancestral, *Borago officinalis*.

O grupo I caracteriza-se por tratar-se de microorganismos e inclui *T. fluviatilis*, *T. pseudonana*, *P. tricornutum*, *G. chrysoplata*, *P. irregulare*, *M. alpina* e *M. isabelina*. O grupo II formado por *M. polymorpha* e *C. purpureus* caracteriza-se por organismos macroscópicos, neste caso, musgos.

Dentro do grupo I, de microorganismos, *T. fluviatilis* e *T. pseudonana*, formaram uma clade enquanto *P. tricornutum* localiza-se como ramo ancestral destas duas. *G. chrysoplata* aparece como ramo ancestral de *P. tricornutum* e *P. irregulare*, como ancestral de *G. chrysoplata*. *M. alpina* e *M. isabelina*, aparecem como ancestral de *P. irregulare*.

A microalga *Ostreococcus tauri*, diferente do esperado, ramificou com o grupo separado, que pode ser caracterizado como um taxon basal.

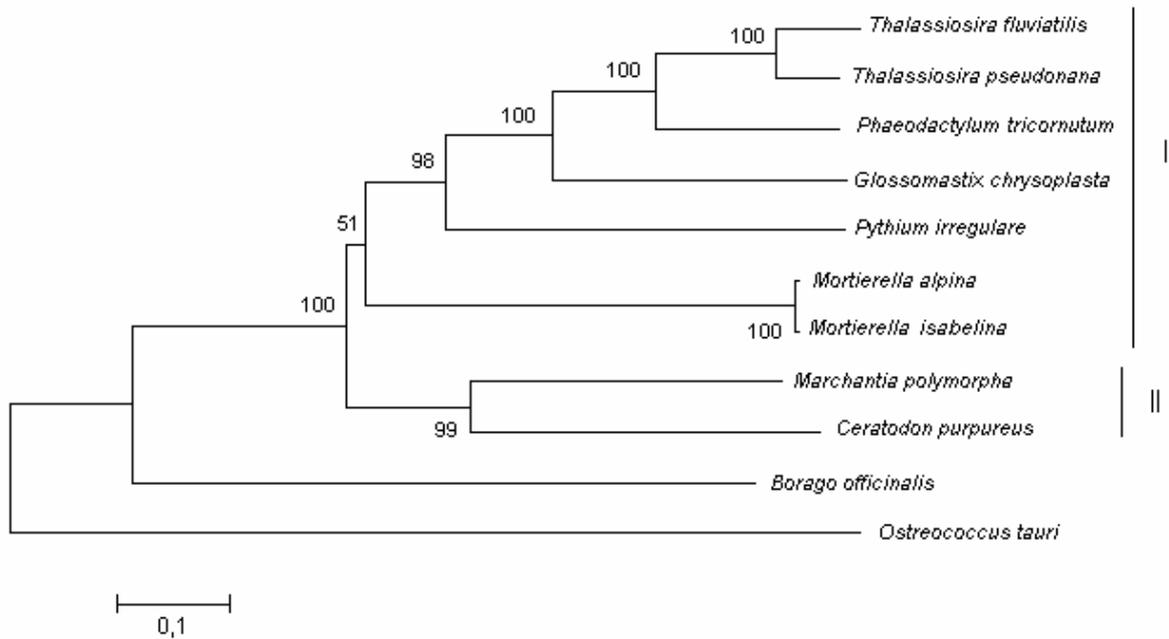


Figura 18. Arvore filogenética para proteína predita da $\Delta 6$ -dessaturase de *Thalassiosira fluvialilis*. Os números indicam os valores de “bootstrap” de cada ramo.

7. DISCUSSÃO

Com o objetivo de isolar genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos essenciais a saúde humana, bem como iniciar estudos de genoma funcional de microalgas produtoras de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, duas bibliotecas de cDNA das diatomáceas *T. fluviatilis* e *C. muelleri* foram confeccionadas, sendo as respectivas diatomáceas selecionadas por produzirem altos perfis de LCPUFAs ômega-3. A partir do cDNA de *T. fluviatilis* um gene de $\Delta 6$ -dessaturase foi clonado e seqüenciado e 1920 ESTs analisadas aplicando técnicas de bioinformática.

Quando analisados em gel (figura 8) os cDNAs de ambas diatomáceas sintetizados durante a confecção das bibliotecas mostraram alta concentração de seqüências entre 1.000 e 2.000 pares de bases (item 6.1) o que aumenta as chances de clonar genes completos das enzimas envolvidas na síntese de LCPUFAs, como esperado pelo tamanho de enzimas descritas até o momento para microalgas. Além disso, o kit utilizado na confecção da biblioteca aumenta as possibilidades de clonar genes completos (materiais e métodos 5.3).

A análise da clusterização da biblioteca de cDNA de *T. fluviatilis* revelou um índice de 81,03% de novidade, o que mostra que a biblioteca ainda pode ser explorada para a obtenção e identificação de novos genes. A distribuição das “reads” entre os “contigs” confirma a baixa redundância da biblioteca, baseado nas categorias descritas por Lee et al. (2005)

Alta quantidade de *clusters* (74,71%) não apresentaram similaridade com seqüências depositadas nos bancos de dados utilizados na caracterização, uma exclusividade da biblioteca de cDNA de *T. fluviatilis* (Tabela 3) e isso muito provavelmente se dá pelo fato de haver de pouca informação genômica sobre diatomáceas. Até o momento foram seqüenciados uma biblioteca genômica de *T. pseudonana*, uma biblioteca de cDNA de *P. tricornutum* e o genoma nuclear, mitocondrial e de cloroplasto de *Ostreococcus tauri*.

Dentre os 775 *TfAES* encontrados na biblioteca, somente 10 clusters tiveram similaridade com seqüências protéicas de microalgas sendo 7 da microalga *O. tauri*, o que é pouco para *O. tauri* que tem todo seu genoma seqüenciado, no entanto, esse resultado é compatível com o resultado da árvore filogenética

construída para $\Delta 6$ -dessaturase onde *O. tauri*, mesmo sendo uma microalga clusterizou como um grupo externo, fortalecendo a hipótese de uma distância evolutiva entre *O. tauri* e *T. fluviatilis* (Apêndice 2).

A observação do resultado obtido para as *TfAES* que foram submetidas ao BLASTn contra o banco de ESTs do *GenBank* onde foram obtidas 36 seqüências (4,6%) que tiveram similaridade com algum organismo e 29 clusters com similaridade com a diatomácea *P. tricornutum* evidencia a importância de realizar análises com diferentes algoritmos (Blastx e BLASTn), pois, embora não se possa inferir atividade, maiores informações podem ser geradas futuramente relacionando os organismos.

Para o banco com seqüências genômicas da microalga diatomácea *T. pseudonana*, 109 (14,06%) das *TfAES* apresentaram similaridade, o que é um resultado relativamente baixo pois se tratando de diatomáceas do mesmo gênero, esperava-se maior quantidade de seqüências similares. Esse resultado evidencia mais uma vez a importância dos diferentes algoritmos na análise, incluindo a importância de uma segunda análise para *O. tauri* utilizando BLASTn, já que sua maior informação está em bibliotecas genômicas.

Quando observados juntamente os resultados para os dois tipos de análises (BLASTx e BLASTn) 196 seqüências (25,29%) tiveram alguma similaridade com diferentes organismos e 122 clusters (15,74%) apresentaram similaridade com seqüências e/ou genes de microalgas, suportando mais uma vez os resultados diferenciais para as análises e reafirmando a importância delas.

O resultado obtido para o objetivo de encontrar genes envolvidos na rota biossintética de ácidos graxos ômega-3 é animador, 4 *TfAES* apresentaram similaridade com proteínas envolvidas nesta rota e 7 clusters com a síntese de lipídeos (apêndice 2). Este resultado revela que com o seqüenciamento de mais clones desta biblioteca, há grandes chances de se obter os outros genes envolvidos na rota de síntese de ômega-3 assim como uma análise mais detalhada dos clones obtidos poderá revelar informações sobre o metabolismo de ácidos graxos desta microalga que até o momento não apresentava nenhuma informação genômica disponível.

Partindo dos cDNAs sintetizados, foram aplicados esforços na clonagem de um gene completo da $\Delta 6$ -dessaturase da rota de ácidos graxos de *T. fluviatilis*. A

clonagem foi realizada por regiões (5', interna e 3') e em diferentes etapas. Na 1ª etapa foi amplificada a fração interna do gene (Figura 12). A análise em gel revelou correspondência em tamanho (668pb) quando comparado com a seqüência da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. pseudonana*. Esta região foi seqüenciada e ao ser analisada em banco de dados mostrou-se tratar realmente da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. fluviatilis*

Na 2ª etapa, a região 3' da seqüência codificadora da $\Delta 6$ -dessaturase foi clonada e seqüenciada. Dentro da região 3' do gene foi identificada uma região UTR (Figura 14) que pôde ser amplificada devido a estratégia de confecção de cDNAs fornecida pelo *kit creator* (materiais e métodos 5.3). Por fim, na 3ª etapa foi clonada e sequenciada a região 5' do gene, revelando um tamanho de 763 pb e alta similaridade a com a região 5' de outras $\Delta 6$ -dessaturases confirmado pelo alinhamento no programa BLASTx (não mostrado).

Para predição da seqüência completa do gene, as seqüências que compreendiam partes do gene da $\Delta 6$ -dessaturase foram alinhadas e um *contig* foi gerado. A proteína predita mostrou tratar-se de uma $\Delta 6$ -dessaturase, com 89% de identidade com a $\Delta 6$ -dessaturase de *T. pseudonana* (Tonon *et al.*, 2005). Além disso, a proteína apresentou todos os motivos conservados (figura 16 e 17) presentes em “*front-end*” *dessaturases*: um domínio citocromo b₅ fundido a região N-terminal da proteína predita e três motivos Histidina-*box* conservados, característicos de *dessaturases*, sendo que o primeiro aminoácidos do terceiro motivo histina conservado possui a substituição de uma histidina por uma glutamina como em *dessaturases* que *dessaturam* nas posições $\Delta 5$, $\Delta 6$ e $\Delta 8$ do ácidos graxo.

Considerando a alta produção de LCPUFAs da microalga *T. fluviatilis* e a alta identidade do gene identificado com o gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. pseudonana*, espera-se que o mesmo gene seja funcional. A presença dos motivos H-box conservados e do domínio citocromo b₅ salienta essa afirmação essenciais a função da proteína, agindo cataliticamente e doando elétrons na reação de *dessaturação* respectivamente.

A reconstrução filogenética para o gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. fluviatilis* com a $\Delta 6$ -dessaturase de outros eucariotos no geral apresentou resultados coerentes com o esperado pela ordem taxonômica dos organismos analisados com exceção da ramificação da microalga *O. tauri*. Dois grupos foram separados e caracterizaram-se pela separação em microorganismos e musgos.

Dentro do grupo I, de microorganismos, observou-se a proximidade de *T. fluviatilis* e *T. pseudonana*, ambas diatomáceas de simetria radial (Centrales), pertencentes ao mesmo gênero, formando um clado. *P. tricornutum*, uma diatomácea de simetria bilateral (Pennales) clusterizou como ramo ancestral de *T. pseudonana* e *T. fluviatilis*, enquanto *G. chrysoflava*, uma microalga não diatomácea aparece como ramo ancestral de *P. tricornutum* e *P. irregulare*, uma levedura, como ancestral de *G. chrysoflava*. A $\Delta 6$ -dessaturase de *M. alpina* e *M. isabelina*, leveduras do mesmo gênero possuem seqüência de aminoácidos idêntica e por isso, não podem ser separadas em ramos, mas aparecem como ancestral de *P. irregulare*.

A planta *B. officinalis* utilizada como grupo externo aparece como ancestral dos dois principais grupos encontrados (I e II), como esperado, mas, por outro lado, a microalga *O. tauri* formou um ramo ancestral de *Borago officinalis*, clusterizando separadamente das outras microalgas.

A seqüência da $\Delta 6$ -dessaturase de *O. tauri* não se relaciona com outras $\Delta 6$ -dessaturases identificadas até o momento e não é possível inferir tratar-se de uma questão filogenética particular do gene que codifica para esta enzima ou tratar-se de um gene parálogo com função bioquímica similar.

8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

- Duas bibliotecas de cDNA das diatomáceas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis* foram confeccionadas e validadas por PCR mostrando alta porcentagem de clones contendo fragmentos. Essas bibliotecas poderão ser utilizadas como ferramentas na busca de genes completos através de seqüenciamento em larga escala, hibridização com sonda ou mesmo por PCR;
- 1920 clones da biblioteca de cDNA da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis* foram seqüenciados gerando 775 *clusters* dos quais 579 não apresentaram identidade com nenhuma seqüência dentre os bancos e algoritmos analisados, sendo exclusivas de *T. fluviatilis*, agregando informações sobre genoma funcional de microalgas;
- Dentre as *TfAES* foram encontradas 4 *clusters* com identidade à enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos poliinsaturados mostrando que é possível encontrar genes desta rota através do seqüenciamento massivo e gerando informações para entendimento da via de síntese de ácidos graxos ômega-3 desta microalga.
- A biblioteca de cDNA de *Chaetoceros muelleri* encontra-se armazenada em freezer a -80° C e pode ser utilizada a qualquer momento para busca de genes e estudo de genoma funcional por meio de seqüenciamento em larga escala que agregará informação sobre diatomáceas pouco exploradas genomicamente.
- Um gene da $\Delta 6$ -dessaturase de ácidos graxo foi clonado e caracterizado da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis* gerando uma ferramenta molecular de grande importância para tentativas de modificar as concentrações de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 em sementes de plantas oleaginosas, aumentando as fontes na alimentação dessas gorduras importantes para a saúde humana;

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADI A, DOMERGUE F, BAUER J, NAPIER JA, WELTI R, ZHRINGER U, CIRPUS P, HEINZ E. (2004) **Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: constraints on their accumulation.** Plant Cell. 16(10):2734-48

ANAI T, KOGA M, TANAKA H, KINOSHITA T, RAHMAN SM, TAKAGI Y. (2003) **Improvement of rice (*Oryza sativa* L.) seed oil quality through introduction of a soybean microsomal omega-3 fatty acid desaturase gene.** Plant Cell Report 10:988-92.

ARMBRUST EV, GERGES JB, BOWLER CG, MARTINEZ D, PUTNAM NII, ZHOU S, ALLEN AE, APT KE BECHNER M *et al.* (2004) **The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism.** Science. 306: 79-86.

BURDGE GC, JONES AE, WOOTTON SA. (2002) **Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men.** Br J Nutr 88(4):355-364.

COLIN A, REGGERS J, CASTRONOVO V, ANSSEAU M. (2003) **Lipids, depression and suicide.** Encephale 29(1):49-58.

CLONTECH (2006) **Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit User Manual.**

DERNER RB. **Efeito de distintas fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Thalassiosira fluviatilis* e *Chaetoceros muelleri* (classe *Bacillariophyceae*), com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados.** Florianópolis, UFSC, 138 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

DOMERGUE F, LERCHL J, ZAEHRINGER U, HEINZ E. (2002) **Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis.** Eur J Biochem 269 (16), 4105-4113.

ECKERT H, LA VALLEE B, SCHWEIGER BJ, KINNEY AJ, CAHOON EB, CLEMENTE T. (2006) **Co-expression of the borage Delta 6 desaturase and the Arabidopsis Delta 15 desaturase results in high accumulation of stearidonic acid in the seeds of transgenic soybean.** Planta 224(5):1050-1057

FRIDAY KE, CHILDS MT, TSUNEHARA CH, FUJIMOTO WY, BIERMAN EL, ENSINCK JW. (1989) **Elevated plasma glucose and lowered triglyceride levels from omega-3 fatty acid supplementation in type II diabetes.** Diabetes Care 12(4):276-281.

HAMADA T, KODAMA H, TAKESHITA K, UTSUMI H, IBA K. (1998) **Characterization of Transgenic Tobacco with an Increased α -Linolenic Acid Level.** *Plant Physiol* 118: 591-598.

HASTINGS N, ABABA M, TOCHER DR. (2001) **A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ e $\Delta 6$ activities.** *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14304-14309.

HUANG YS, CHAUDHARY S, THURMOND JM, BOBIK EGJR, YUAN L, CHAN GM, KIRCHNER SJ, MUKERJI P, KNUTZON DS. (1999) **Cloning of delta12- and delta6-desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of gamma-linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Lipids* 34(7):649-59.

HUANG Y, PEREIRA SL, AMANDA EL. (2004) **Enzymes for transgenic biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids.** *Biochimie* 86: 793-798.

JOY CB, MUMBY-CROFT R, JOY LA. (2000) **Polyunsaturated fatty acid (fish or evening primrose oil) for schizophrenia.** *Cochrane Database Syst Rev* (2):CD001257

KREMER JM. (2000) **n-3 fatty acid supplements in rheumatoid arthritis.** *Am J Clin Nutr* 71(1 Suppl):349S-351S.

KRIS-ETHERTON PM, HARRIS WS, APPEL LJ. (2003) **Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new recommendations from the American Heart Association.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(2):151-152.

KROMHOUT D, FESKENS EJ, BOWLES CH. (1995) **The protective effect of a small amount of fish on coronary heart disease mortality in an elderly population.** *Int J Epidemiol* 24(2):340-345.

KUMAR S, TAMURA K, NEI M (2004) **MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment.** *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.

LARQUE E, DEMMELMAIR H, KOLETZKO B. (2002) **Perinatal supply and metabolism of long-chain polyunsaturated fatty acids: importance for the early development of the nervous system.** *Ann N Y Acad Sci.* 967:299-310.

LEE H, LEE, J-S, NOH E-W, BAE E-K, CHOI Y-I, HAN M-S. (2005) **Generation and analysis of expressed sequence tags from poplar (*Populus alba* x *P. tremula* var. *galindulosa*) suspension cells.** *Plant Science*, 169 (6):1118-1123.

NELSON DL, COX MM. **Lehninger Principles of Biochemistry.** New York, Worth Publishers, 2000.

LORENZ-MEYER H, BAUER P, NICOLAY C, *et al.* (1996) **Omega-3 fatty acids and low carbohydrate diet for maintenance of remission in Crohn's disease. A randomized controlled multicenter trial.** Study Group Members (German Crohn's Disease Study Group). *Scand J Gastroenterol* 31(8):778-785.

MAHESWARI U, MONTSANT A, GOLI J, KRISHNASAMY S, RAJYASHIRI KR, PATELL VM, BOWLER C. (2005). **The Diatom EST Database**. Nucleic Acid Research. 33:344-347.

METZ JG, ROESSLER P, FACCIOTTI D & 10 OTHER AUTHORS (2001). **Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes**. Science 293, 290-293.

MEYER A, KIRSCH H, DOMERGUE F, ABBADI A, SPERLING P, BAUER J, CIRPUS P, ZANK TK, MOREAU H, ROSCOE TJ, ZÄHRINGER U, HEINZ E. (2004) **Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis**. Journal of Lipid Research 45: 1899-1909.

MEYER A, CIRPUS P, OTT C, SCHLECKER R, ZÄHRINGER U, HEINZ E. (2003) **Biosynthesis of docosahexaenoic acid in *Euglena gracilis*: biochemical and molecular evidence for the involvement of a delta4-fatty acyl group desaturase**. Biochemistry 42(32):9779-9788.

MICHAELSON LV, LAZARUS CM, GRIFFITHS G, NAPIER JA, STOBART KA. (1998) **Isolation of a Δ^5 -Fatty Acid Desaturase Gene from *Mortierella alpine*** J. Biol Chem 30, 19055-19059.

MONTSANT A, JABBARI K, MAHESWARI U, BOWLER C. (2005) **Comparative Genomics of the Pennate Diatom *Phaeodactylum tricornutum***. Plant Physiology. 137: 500-513.

PASSORN S, LAOTENG K, RACHADAWONG S, TANTICHAROEN M, CHEEVADHANARAK S. (1999) **Heterologous expression of *Mucor rouxii* delta(12)-desaturase gene in *Saccharomyces cerevisiae***. Biochem Biophys Res Commun 16: 263(1):47-51

PEREIRA SL, HUANG YS, BOBIK E G, KINNEY A J, STECCA KL, PACKER JCL, MUKERJI P. (2004a) **A novel w3-fatty acid desaturase involved in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid**. Biochem J. 378: 665-671.

PEREIRA SL, LEONARD AE, HUANG YS, CHUANG L, MUKERJI P. (2004b) **Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the omega -3 fatty acid, eicosapentaenoic acid (EPA), to Docosahexaenoic acid (DHA)**. Biochem J 384: 357-366

PEREIRA SL, LEONARD AE, MUKERJI P. (2003) **Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes**. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty acids 68: 97-106.

PETTERSSON EE, REKOLA S, BERGLUND L, ET AL. (1994) **Treatment of IgA nephropathy with omega-3-polyunsaturated fatty acids: a prospective, double-blind, randomized study**. Clin Nephrol 41(4):183-190.

PEET M & STOKES C. (2005) **Omega-3 fatty acids in the treatment of psychiatric disorders**. Drugs 65(8):1051-9.

PUGH ELK, KATES M. (1979) **Membrane-bound phospholipids desaturases.** *Lipids* 14: 159-165.

QI B, BEAUDOIN F, FRASER T, STOBART AK, NAPIER JA, LAZARUS CM. (2002) **Identification of a cDNA encoding a novel C18- Δ 9 polyunsaturated fatty acid-specific elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana*.** *FEBS Lett* 510: 159-165.

QIU, X. (2003) **Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4,7,10,13,16,19): two distinct pathways.** *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 68: 181-186.

QIU X, HONG H, MACKENZIE SL. (2001) **Identification of a Δ 4 fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. Involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*.** *The Journal of Biological Chemistry* 276(34):31561-31566.

RAVEN PH, EVERT RF, EICHHORN SE. (1996) **Biologia Vegetal.** 5^a Ed. Guanabara Koogan. 728 p.

RAYMONT JEG. (1980) **Plankton and productivity of the oceans.** Pergamon Press. 489p.

ROBERT SS, SINGH SP, ZHOU XR, PETRIE JR, BLACKBURN SI, MANSOUR PM, NICHOLS PD, LIU Q, GREEN AG. (2005) **Metabolic engineering of *Arabidopsis* to produce nutritionally important DHA in seed oil.** *Functional Plant Biology* 32: 473-479.

ROUND FE, CRAWFORD RM, MANN DG (1990) **The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera.** Cambridge University Press, London.

SAITO T, OCHIAI H. (1999) **Identification of Δ 5-fatty acid desaturase from the cellular slime mold *Dictyostellium discoideum*,** *Eur. J Biochem* 265: 809-814.

SALEM N J, LITMAN B, KIM H Y, GAWRISCH K. (2001) **Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system.** *Lipids* 36(9):945-59.

SAYANOVA OV, NAPIER JA. (2004) **Eicosapentaenoic acid: Biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants.** *Phytochemistry* 147-158;

SCHMIDT MA. (2000) **Gorduras Inteligentes: como as gorduras e os óleos da dieta afetam as inteligências mental, física e emocional.** Ed. Roca, São Paulo, SP.

SHI J, PAN K, YU W, GONGQ. (2004) **Isolation of a delta-5 fatty acid desaturase gene from *Nitzschia closterium* f. minutissima.** Unpublished.

SPRECHER H, LUTHRIA DL, MOHAMMED BS, BAYKOUSHEVA SP. (1995) **Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids.** *Journal of Lipid Research* 36: 2471- 2476.

SPYCHALLA JP, KINNEY AJ, BROWSE J. **Identification of an animal ν -3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*.** Biochem 94: 1142–1147.

TONON T, HARVEY D, LARSON TR, GRAHAM IA. (2003) **Identification of a very long chain polyunsaturated fatty acid Δ 4-desaturase from the microalga *Pavlova lutheri*.** FEBS Letters 553: 440-444

TONON T, SAYANOVA O, MICHAELSON L, QING R, HARVEY D, LARSON TR, LI Y, NAPIER J, GRAHAM IA. (2005) **Fatty acid desaturases from the microalga *Thalassiosira pseudonana*.** FEBS Journal 272: 3401-3412

UAUY R, HOFFMAN DR, PEIRANO P, BIRCH DG, BIRCH EE. (2001) **Essential fatty acids in visual and brain development.** Lipids 36(9):885-895.

WALLIS JG, BROWSE J. (1999) **The Δ 8 desaturase of *Euglena gracilis*: an alternative pathway for the synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids.** Arch. Biochem Biophys 365: 307-316

WEN Z-Y, CHEN F. (2003) **Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae.** Biotechnology Advances 21: 273-294.

WOODS RK, THIEN FC, ABRAMSON MJ. (2002) **Dietary marine fatty acids (fish oil) for asthma in adults and children.** Cochrane Database Syst Rev. (3):CD001283.

WU G, TRUKSA M, DATLA M, VRINTEN P, BAUER J, ZANK T, CIRPUS P, HEINZ E, QIU X. **Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants.** Nature Biotechnology (2005) Vol 23 Number 8.

YAZAWA K. (1996). **Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria.** Lipids (Supplement) 31: S297-S300.

ZANARINI MC, FRANKENBURG FR. (2003) **Omega-3 Fatty acid treatment of women with borderline personality disorder: a double-blind, placebo-controlled pilot study.** Am J Psychiatry 160(1):167-169.

APÊNDICE 1



Projeto: microalga **Líder:** damares

- Relatório das Placas da Biblioteca: Chaetoceros muelleri

Código Placa	Responsável	Última Atualização	Total Clones	Clones Aceitos	Extensão Original	Extensão Aceita	Extensão Vetores
Cm_Alga01	damares	Nov 8, 2006	96	76	63979	21308	14948
Cm_Alga02	damares	Nov 8, 2006	96	42	33097	9647	5104
Cm_Alga03	damares	Nov 9, 2006	96	59	40133	12378	10727
Cm_Alga04	damares	Nov 9, 2006	96	42	27228	7823	8159
Cm_Alga05	damares	Nov 10, 2006	96	30	18760	5763	5182
Cm_Alga06	damares	Nov 10, 2006	96	27	16698	4890	4262
Cm_Alga07	damares	Dec 4, 2006	96	68	38447	14358	11502
Cm_Alga08	damares	Dec 4, 2006	96	59	37510	11851	8992
Cm_Alga09	damares	Dec 4, 2006	96	62	40729	12871	10552
Cm_Alga10	damares	Nov 13, 2006	96	37	20834	6568	6253
Cm_Alga11	damares	Jan 16, 2007	96	61	42783	15804	10398
Cm_Alga12	damares	Dec 4, 2006	96	56	37039	12150	10222
Cm_Alga13	damares	Dec 22, 2006	96	78	50598	18927	16347
Cm_Alga14	damares	Nov 13, 2006	96	22	13444	3900	3537
Cm_Alga15	damares	Jan 31, 2007	96	62	41805	18537	11486
Cm_Alga16	damares	Jan 16, 2007	96	72	54957	24001	16435
Cm_Alga17	damares	Dec 4, 2006	96	44	30683	11119	8020
Cm_Alga18	damares	Dec 4, 2006	96	72	45566	20126	12811
Cm_Alga19	damares	Jan 16, 2007	96	59	42336	15882	8774
Cm_Alga20	damares	Dec 13, 2006	96	62	44965	14705	10608

Código Barras	Responsável	Última Atualização	Total Clones	Clones Aceitos	Extensão Original	Extensão Aceita	Extensão Veteres
Total							
20			1920	1090	741591	262608	194319
				56,77%		35,41%	26,20%

Relatório de submissão dos eletroferogramas gerados da biblioteca de cDNA de *Thalassiosira fluviatilis* ao Sistema GENOMA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

APENDICE 2

CÓDIGO	No. ESTs	DEFINIÇÃO	ORGANISMO	ID	e-value
CL113contig 1	2	<i>elongation factor 1alpha long form</i>	<i>Monosiga brevicolis</i>	16554296	1,59E-23
CL2contig 1	22	<i>translational elongation factor-like protein</i>	<i>Guillarida theta</i>	106073629	1,25E-103
CL36contig1	3	<i>ubiquitina UbiA</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	70990606	3,00E-60
Cm03_F05	1	<i>putative ubiquitina</i>	<i>Oryza sativa</i>	54290883	2,52E-16
CL117contig 1	2	<i>putative AML1</i>	<i>Oryza sativa</i>	52076187	4,12E-29
CL129contig 1	2	<i>beta-ketoacyl-ACP reductase</i>	<i>Kaenia brevis</i>	104641041	8,36E-33
CL51contig 1	3	<i>CG6418-PB</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	24662330	4,84E-09
CL9contig 1	8	<i>putative dioxygenase</i>	<i>Oryza sativa</i>	115455509	1,39E-14
CL7contig 1	9	<i>H(+)-transporting ATPase</i>	<i>uncultured archaeon</i>	52550121	3,33E-51
CL6contig 1	11	<i>hypothetical protein</i>	<i>Nostoc sp.</i>	17229699	1,19E-36
CL15contig1	5	<i>hypothetical protein</i>	<i>Lawsonia intracellularis</i>	94987588	1,79E-10
CL3contig1	17	<i>hypothetical protein</i>	<i>Vibrio sp.</i>	116186199	6,45E-18
Cm02_C03	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Danio rerio</i>	41056251	8,99E-41
Cm04_A07	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	62320516	8,71E-13
CL118contig1	2	<i>hypothetical protein</i>	<i>Mariprofundus ferrooxidans</i>	114775644	2,57E-36
CL118Contig2	2	<i>solute carrier family 25 , member 4</i>	<i>Gallus gallus</i>	57530120	5,09E-19
Cm07_E01	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	39583291	7,65E-22
Cm07_E09	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Medicago truncatula</i>	92884105	3,74E-10
Cm08_A01	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Ustilago maydis</i>	71019841	1,10E-25
Cm11_E06	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Photobacterium profundum</i>	90410217	1,32E-16
Cm12_H01	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>S. degradom</i>	90022913	1,31E-13
Cm13_A05	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	72110093	5,94E-13
Cm13_B10	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Coccidioides immitis</i>	119189527	8,64E-18
Cm13_H09	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Gibberella zeae</i>	46108780	2,10E-21
Cm14_G08	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Mariprofundus ferrooxidans</i>	114775644	1,20E-19
Cm14_G10	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>	39978083	3,23E-20
Cm14_H08	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Blastopirellula marina</i>	87309015	1,49E-12
Cm16_B03	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>P. nodorum</i>	111064001	8,88E-16
Cm16_G01	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Neurospora crassa</i>	85092105	7,81E-23
Cm18_A05	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Leishmania major</i>	68124783	2,10E-10
Cm18_B06	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Blastopirellula marina</i>	87309015	6,59E-28
Cm19_E08	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	50551963	1,84E-10
CL31contig1	3	<i>pyruvato carboxilase</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	115398039	8,23E-26

Cm02_E06	1	pyruvato carboxilase family member	<i>Caenorhabditis elegans</i>	17562816	4,79E-21
CL52contig1	3	thioredoxin reductase 1	<i>Danio rerio</i>	29165344	9,50E-17
CL10contig1	7	peptide methionine sulfoxide reductase	<i>Synechococcus elongatus</i>	56752166	7,45E-52
Cm02_A03	1	serine protease	<i>Cullicoides somorensis</i>	56199562	2,32E-12
Cm02_A07	1	putative 4-methyl-5(B-hydroxyethyl)-thiazol monophosphate biosynthesis enzyme	<i>Oryza sativa</i>	56201615	5,48E-21
Cm02_F03	1	Proteinase inhibitor I1, Kazal:Protease inhibitor, Kazal-type	<i>Caulobacter sp.</i>	113934916	1,73E-12
CL11contig1	7	hypothetical protein Acid	<i>Acidobacteria bacterium</i>	94968095	4,61E-30
CL122contig1	2	ATP-binding cassette subfamily B member 4	<i>Gallus gallus</i>	45382457	1,20E-12
Cm19_C02	1	ATP-binding/tRNA ligase/threonine-tRNA ligase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	22325483	1,78E-38
Cm19_D07	1	ATP binding / ATP-dependent helicase/ helicase/ nucleic acid binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	18424667	9,20E-37
CL56contig1	2	similar to60S acidic ribosomal protein	<i>Schistosoma japonicum</i>	29841185	1,05E-17
Cm03_B09	1	ribosomal protein S19	<i>Phytophthora infestans</i>	66270181	1,01E-18
Cm06_D08	1	30S ribosomal protein S1	<i>Synechococcus elongatus</i>	56750845	2,20E-21
Cm07_A06	1	ribosomal protein S18	<i>Cherax destructor</i>	12232348	7,66E-17
Cm08_C06	1	60S ribosomal protein L8	<i>Nicotiana tabacum</i>	132849	2,24E-20
Cm16_H10	1	ribosomal protein S4	<i>Argopecten inadans</i>	22758868	2,09E-18
CL73contig1	2	unnamed protein product	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	47229753	1,41E-19
CL65contig1	2	protein kinase 6	<i>Toxoplasma gondii</i>	4325074	3,15E-22
CL24contig1	4	calcium-dependent protein kinase	<i>Plasmodium chabaudi</i>	70946212	7,77E-21
CL24Contig2	4	unknown protein	<i>Xenopus laevis</i>	117558808	5,27E-09
Cm06_E08	1	aspartato kinase	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i>	113941570	2,75E-11
Cm19_A11	1	calcium-dependent protein kinase	<i>Plasmodium falciparum</i>	23619315	4,09E-17
Cm03_D04	1	BON2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	18415456	6,09E-13
Cm12_C05	1	glycyl-tRNA synthase	<i>Corynebacterium efficiens</i>	25028734	8,08E-16
Cm12_C08	1	silicon transporter	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	82527161	9,58E-27
Cm12_E10	1	Domain containing protein, expressed	<i>Oryza sativa</i>	115482622	4,51E-13
Cm12_F08	1	acetolactate synthase	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	21615550	1,18E-11
Cm12_G03	1	unnamed protein product	<i>Ostreococcus tauri</i>	116056746	5,98E-16
Cm12_G11	1	glutamic pyruvic transaminase 1, soluble	<i>Rattus norvegicus</i>	13591961	1,19E-09
Cm12_H05	1	MUM4(mucilage-modified 4) catalytic	<i>Arabidopsis thaliana</i>	42562732	4,94E-16
Cm13_E05	1	transcriptional activator, TenA family	<i>Metallosphaera sedula</i>	118751964	9,44E-09
Cm13_E08	1	unnamed protein product	<i>Kluyveromyces lactis</i>	50307719	4,79E-12
Cm13_E11	1	solute carrier family 25	<i>Galus Galus</i>	57530120	5,44E-19
CL107contig 1	2	predicted protein	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	111056838	6,34E-13
CL17contig 1	4	delta-6 fatty acid desaturase	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	60172984	3,53E-44

CL55contig 1	2	PREDICTED: similar to ATP-binding cassette, sub-family G, member 2	Macaca mulata	109148639	8,40E-13
Cm16_B10	1	PREDICTED: similar to Zinc finger, CCHC domain containing 7	Galus Galus	118104651	5,28E-10
Cm16_F04	1	D-lactate dehydrogenase	Agrobacterium tumefaciens	15891092	9,45E-31
Cm16_G03	1	probable Ni-binding urease accessory protein	Neurospora crassa	85082664	3,56E-12
Cm16_H12	1	MGC69029 protein	Xenopus laevis	37590720	2,76E-21
Cm17_C09	1	pyruvate carboxylase	Symbiobacterium thermophilus	51893320	2,23E-09
Cm17_E03	1	transposase	Escherichia coli	9507723	1,74E-59
Cm17_F11	1	putative cyclophilin-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Synechococcus sp.	87301579	2,21E-09
Cm18_A02	1	plastidial 30S ribosomal protein S15	Guillardia theta	13812239	5,03E-19
Cm18_E09	1	CoA-binding domain protein	Solibacter usitatus	116619310	9,04E-22
Cm18_G07	1	probable long chain fatty acid CoA ligase	Robiginitalea biformata	88804998	1,43E-11
Cm18_H08	1	Threonine synthase	Desulfuromonas acetoxidans	95929640	2,08E-20
Cm19_B10	1	methylmalonyl-CoA mutase	Gamma proteobacterium	119476777	1,69E-25
Cm19_D10	1	similar to dihydrolipoamid S-succinyltransferase	Sus scrofa	47523848	7,41E-54
Cm19_F10	1	pyruvate dehydrogenase	Aedes aegyptii	108880044	5,68E-57
Cm20_A06	1	transcription factor BTF3	Bigelowiella natans	47028289	8,51E-22
Cm20_A11	1	enolase	Glycine max	42521309	5,33E-12
Cm20_B11	1	unnamed protein product	Mus musculus	74222220	1,19E-21
Cm20_F06	1	Histone H2B	Ostreococcus tauri	116059220	3,69E-09
CL64contig 1	2	unnamed protein product	Kluyveromyces lactis	50307715	1,99E-09
CL79contig 1	2	Ras-like GTP-binding protein YPT1		2500076	1,01E-61
Cm01_A01	1	p27BBP/eIF6-like	Spodoptera frugiperda	82880642	8,40E-32
Cm01_C01	1	Delta 6-fatty acid desaturase/delta-8 sphingolipid desaturase	Ostreococcus tauri	116056666	1,59E-14
Cm01_C03	1	hypothetical protein	Mariprofundus ferrooxydans	114775644	4,42E-31
Cm01_C11	1	ENSANGP	Anopheles gambiae	58383587	3,26E-16
Cm01_C12	1	Animal-type fatty acid synthase and related proteins	Ostreococcus tauri	116058029	5,68E-27
Cm01_H01	1	hypothetical protein Sde_3273	Saccharophagus degradans	90022913	3,14E-16
Cm02_D10	1	peptide methionine sulfoxide reductase	Synechococcus sp.	88808420	6,69E-09
Cm09_C07	1	Os01g0315700	Oryza sativa	115436234	7,18E-09
Cm19_C09	1	ornithine/acetylornithine aminotransferase	Flavobacteria bacterium	89890518	4,54E-09
Cm13_F05	1	putative adenylysuccinate synthetase	Oryza sativa	115454773	2,60E-39
CL101contig 1	2	putative transport protein	Sulfitobacter sp.	83854728	5,42E-21
CL143contig1	2	putative amonium transporter	Thalassiosira weissflogii	19347648	1,72E-32
CL94contig 1	2	ly 200 protein	Capsicum annum	40287540	5,26E-25
Cm04_C12	1	heat shock protein	Anabaena variabilis	75906604	6,98E-18
Cm04_G02	1	NADH dehydrogenase	Aeromonas hydrophila	117618080	2,26E-15

Cm04_H10	1	mitochondrial phosphate carrier protein	<i>Aspergillus terreus</i>	115492591	4,79E-16
CL40contig 1	3	mercuric reductase	<i>Geobacter uraniumreducens</i>	88936998	1,42E-17
Cm05_H12	1	mKIAA4096 protein	<i>Mus musculus</i>	60360134	1,10E-23
CL116contig 1	2	cystathionine gamma-lyase	<i>Dictyostelium discoideum</i>	66825335	8,34E-22
Cm06_C06	1	histone H2a	<i>Plasmodium yoelii</i>	82594560	1,54E-25
Cm06_H10	1	GDP-mannose-3",5"-epimerase	<i>Oryza sativa</i>	75991690	1,86E-11
Cm06_G06	1	putative threonyl-tRNA synthetase	<i>Oryza sativa</i>	115475758	6,26E-34
CL19contig 1	4	unnamed protein product	<i>Kluyveromyces lactis</i>	50312711	1,58E-11
CL82contig 1	2	predicted protein	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	111069184	2,63E-13
Cm07_A01	1	alanine transaminase	<i>Dictyostelium discoideum</i>	66808541	4,07E-15
Cm07_B09	1	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	<i>Cryptosporidium hominis</i>	67610850	1,79E-17
Cm07_D09	1	PREDICTED: similar to Henna CG7399-PB, isoform B isoform 1	<i>Apis mellifera</i>	66501325	3,95E-12
Cm07_D12	1	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase, USG-1 related	<i>Deinococcus geothermalis</i>	94985882	1,00E-11
Cm07_F01	1	fucoxanthin chlorophyll a/c binding protein	<i>Cyclotella cryptica</i>	2996371	7,21E-22
Cm07_F05	1	fizzy related protein	<i>Paramecium tetraurelia</i>	31873191	2,19E-31
Cm07_H09	1	cyclopropane fatty acid synthase	<i>Gossypium hirsutum</i>	50313464	2,35E-10
Cm08_B09	1	similar to MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	<i>Mus musculus</i>	82986764	2,54E-09
Cm08_D05	1	similar to CG3661-PA	<i>Tribolium castaneum</i>	91085777	5,46E-15
Cm08_E10	1	PREDICTED: phosphodiesterase 11A isoform 2	<i>Mus musculus</i>	94367047	3,12E-12
Cm08_F07	1	arginyl-tRNA synthetase	<i>Synechococcus sp</i>	78185701	1,19E-24
Cm08_F08	1	2-nitropropane dioxygenase, NPd	<i>Acidobacteria bacterium</i>	94971324	3,15E-10
Cm08_G05	1	aconitate hydratase	<i>Alteromonas macleodii</i>	88795050	2,29E-30
CL39contig 1	3	isovaleryl-CoA dehydrogenase	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	42522736	9,52E-22
CL95contig 1	2	alanine aminotransferase	<i>Capsicum annuum</i>	37953301	9,88E-30
Cm09_B01	1	Succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	<i>Ostreococcus tauri</i>	116054681	3,78E-18
Cm09_C01	1	PC-MYB2; DNA binding / transcription factor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	18411365	1,56E-16
Cm09_D07	1	secreted protein containing DUF1501	<i>gamma proteobacterium</i>	88705762	3,24E-09
Cm09_E12	1	argininosuccinate lyase	<i>Phytophthora infestans</i>	23394365	5,72E-22
Cm09_F05	1	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	<i>Thermus thermophilus</i>	46198485	5,39E-25
Cm09_H07	1	Queuine-tRNA ribosyltransferase	<i>Ostreococcus tauri</i>	116059209	1,99E-09
CL87contig 1	2	HLA-B associated transcript 1	<i>Homo sapiens</i>	55961531	2,90E-45
Cm10_D10	1	MORN repeat protein	<i>Cryptosporidium hominis</i>	67604650	2,53E-09
Cm10_E02	1	alpha 2 subunit of 20S proteasome	<i>Oryza sativa</i>	49387541	3,61E-24
Cm10_F11	1	unnamed protein product	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	47228841	1,96E-17
CL101contig 1	2	putative transport protein	<i>Sulfitobacter sp.</i>	83854728	5,42E-21
Cm11_A05	1	Autophagy-related protein 8 precursor	<i>Phytophthora infestans</i>	62899789	1,78E-11

Cm11_A11	1	<i>Peptidyl-prolyl isomerase FKBP12</i>	<i>Vicia faba</i>	73919361	8,46E-20
Cm11_B03	1	<i>conserved hypothetical protein</i>	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	78033430	8,45E-12
Cm11_B06	1	<i>PREDICTED: similar to CG3329-PA</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	91094821	2,74E-21
Cm11_B11	1	<i>VAM3; t-SNARE</i> <i>PREDICTED: similar to Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	18422725	3,39E-10
Cm11_C03	1	<i>type 1D</i>	<i>Danio rerio</i>	68358596	1,13E-19
Cm11_E05	1	<i>NifU-like domain-containing proteins</i>	<i>Ostreococcus tauri</i>	116056795	1,89E-27
Cm11_G03	1	<i>LD16326p</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	27819985	1,28E-33
Cm11_G10	1	probable long chain fatty acid CoA ligase	<i>Gamma proteobacterium</i>	119504909	2,98E-13
Cm11_H02	1	<i>tyrosine transaminase</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>	66806875	5,43E-13
Cm11_H07	1	<i>hydroxylamine reductase</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	59714046	4,36E-19
Cm11_H11	1	<i>phosphoribosylpyrophosphate synthetase</i>	<i>Plasmodium yoelii</i>	82753618	2,56E-24
Cm12_A06	1	<i>Skp1-like protein</i>	<i>unidentified</i>	22094874	1,84E-15
Cm12_C02	1	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>Hypocrea jecorina</i>	117371498	5,17E-18
CL137Contig1	2	<i>Aspartate-semialdehyde dehydrogenase, USG-1 related</i>	<i>Deinococcus geothermalis</i>	94985882	2,37E-30
CL58Contig1	3	<i>unnamed protein product</i>	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	47229753	1,41E-19
CL75Contig1	2	<i>hypothetical protein</i>	<i>Mariprofundus ferrooxydans</i>	114775644	9,64E-34
CL8Contig1	8	<i>peptide methionine sulfoxide reductase</i>	<i>Synechococcus elongatus</i>	56752166	6,31E-51
Cm15_A01	1	<i>Hybrid cluster protein</i>	<i>Geobacter sp.</i>	110600215	1,15E-28
Cm15_A04	1	<i>putative ubiquitin-specific protease</i>	<i>Candida albicans</i>	68474276	3,99E-11
Cm15_C06	1	<i>unnamed protein product</i>	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	47217700	8,14E-36
Cm15_D09	1	<i>peptidase M14, carboxypeptidase A</i>	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i>	113940652	6,72E-10
Cm15_E05	1	<i>ENSANG</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	118776939	9,07E-19
Cm15_F04	1	<i>prohibitin complex subunit Phb1, putative</i>	<i>Neosartorya fischeri</i>	119495244	6,85E-09
Cm15_G01	1	<i>unnamed protein product</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	83765607	1,82E-34
Cm15_H08	1	<i>hypothetical protein</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15891051	5,36E-39

Relação dos genes clusters encontrados com similaridade seqüências não redundantes de proteínas disponíveis no **GenBank**

APÊNDICE 3

Reagentes e Soluções

Extração de RNA

Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen)

Cloreto de Sódio 5 M

Clorofórmio

Álcool Isopropílico

Álcool etílico 75%

Soluções para hibridização de colônias

Tampão Tris-EDTA (TE):

Tris 0,01M, pH 7,8; EDTA 0,001M.

Solução de lise:

SDS 10%

Tampão de desnaturação:

NaCl 0,5M; NaOH 0,5N.

Solução de neutralização:

Tris 1M, pH 7,4; NaCl 1,5M.

Solução de pré-hibridização:

SSC 5x; Denhardt's 5x; SDS 0,5%; esperma de salmão 1ng/mL.

Solução de hibridização:

SSC 5x; Denhardt's 5x; SDS 0,5%

Solução SSC 20x:

NaCl 3M; Citrato de sódio 0,3M, pH 7,0

Soluções para lavagem das membranas:

2X SSC; 0,1% SDS (baixa estringência);
1X SSC; 0,1% SDS (média estringência);
0,1X SSC; 0,1% SDS (alta estringência).

Solução de Denhardt's 100X:

2g de soro albumina bovina

2g de Ficoll™ 400

2g de Polyvinylpyrrolidona

Adicionar aproximadamente 50mL de água destilada. Mixar até dissolver e completar para 100mL. Estocar a -20° C por 3 meses.

Outras soluções

EDTA 0,5M:

EDTA - 186,1g, dissolver em 700mL de água destilada. Ajustar o pH para 8,0 com NaOH 10M e completar com água destilada para 1L.

Tris pH 7,8:

Tris - 60,5g, dissolver em de água destilada. Ajustar o pH para 7,8 com HCl e completar com água destilada para um volume final de 500mL.

Acetato de Sódio 3M, pH 5,2

Acetato de sódio - 20,4g, dissolver em de água destilada. Ajustar o pH para 5,2 com ácido acético glacial e completar com água destilada para 50mL.

Tampão TAE 50X:

Tris base - 242g; ácido acético glacial - 57,1mL; EDTA 0,5 M pH 8,0 - 100mL.
Completar com água destilada para 1L.

Tampão de amostra 5x (*loading buffer*)

Azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; ficoll 15%

Kits

Kit Micro-FastTrack™ 2.0 (Invitrogen)

Kit Creator™ SMART™ cDNA Library (Clontech)

Kit FlexiPrep (Amersham Biosciences)

Kit PCR Clean-Up System – Wizard 5V Gel (Promega)

Kit Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP) (Amersham pharmacia biotech)

Kit TOPO TA 2.1 (Invitrogen)

Enzimas e marcador de peso molecular

Enzimas: *Taq* polimerase (Invitrogen); *Taq* polimerase (Phonetría)

Marcador de peso molecular: DNA λ *Pst*I - DNA do bacteriófago lambda digerido com a enzima *Pst*I, Ladder 1Kb Plus (Invitrogen).

Meios de cultura

LB líquido:

Bacto triptona - 2g

Extrato de levedura - 1g

NaCl - 2g

Dissolver e completar para 200mL com água destilada.

LB sólido:

Bacto triptona - 2g

Extrato de levedura - 1g

NaCl - 2g

Ágar - 2,8g

Dissolver e completar para 200mL com água destilada.

Antibióticos

Ampicilina 100mg/mL

Cloranfenicol 25 mg/mL