



**Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 –
clonagem e caracterização do primeiro
gene da via de síntese na microalga
marinha *Thalassiosira fluviatilis***

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 224

**Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 –
clonagem e caracterização do primeiro
gene da via de síntese na microalga
marinha *Thalassiosira fluviatilis***

Cristiane Teresinha Citadin
Elionor Rita Pereira de Almeida
Joseilde Silva-Werneck
Natalia Florêncio Martins
Roberto Bianchini Derner
Roberto Togawa
Damares de Castro Monte

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Miguel Borges*

Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*
Luiz Adriano Maia Cordeiro
José Roberto de Alencar Moreira
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Samuel Rezende Paiva

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*
Margot Alves Nunes Dode

Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Rosameres Rocha Galvão*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 181 Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 – clonagem e caracterização do primeiro gene da via de síntese na microalga marinha *Thalassiosira fluviatilis*. / Cristianhe Teresinha Citadin ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
20 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 224).

1. *Thalassiosira fluviatilis*. 2. Ácido Graxo. 3. Alga marinha. I. Citadin, Cristiane Teresinha. II. Série.

579.8 – CDD 21

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	13
Conclusão	19
AGRADECIMENTOS	19
Referências Bibliográficas	19

Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 – clonagem e caracterização do primeiro gene da via de síntese na microalga marinha *Thalassiosira fluviatilis*

Cristiane Teresinha Citadin¹
Elionor Rita Pereira de Almeida²
Joseilde Silva-Werneck³
Natalia Florêncio Martins⁴
Roberto Bianchini Derner⁵
Roberto Togawa⁶
Damare de Castro Monte³

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 gerar ferramentas moleculares para engenharia genética de LCPUFAs em plantas, reportamos a clonagem e caracterização do gene codificador da enzima $\Delta 6$ -dessaturase, a primeira enzima da rota metabólica de síntese de EPA e DHA, responsável pela produção do intermediário ácido estearidônico. O

¹ Bióloga – Doutoranda em Biologia Molecular – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Universidade de Brasília

² Bióloga – PhD em Biologia Molecular – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Engenheira Agrônoma – PhD em Biologia Molecular – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Bióloga – PhD em Bioquímica e Imunologia – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵ Biólogo – PhD em Ciência dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina

⁶ Bioinformática - Recursos Genéticos e Biotecnologia

gene da $\Delta 6$ -dessaturase foi amplificado e isolado por PCR e RACE usando como *template* o cDNA da microalga marinha *Thalassiosira fluviatilis*. O gene obtido contém uma ORF de 1458 nucleotídeos, que codifica uma proteína putativa de 485 resíduos de aminoácidos. A proteína predita apresenta um domínio citocromo b5 associado 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 *T. pseudonana*.

Abstract

Omega 3 polyunsaturated fatty acids are molecules found in oils that are of fundamental importance in the maintenance of human health, and 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 ingestion of zooplankton organisms, which contain microalgae that produce large amounts of LCPUFAs. Among these microalgae are those of the diatomacea family, which, due to this, are good candidates for the study of the omega 3 biosynthetic pathway and corresponding genes. With the objective of generating molecular tools for genetic 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. The gene of $\Delta 6$ -desaturase was amplified and isolated using PCR and RACE approaches with the microalga *Thalassiosira fluviatilis* cDNA as template. The gene cloned has an ORF of 1458 nucleotides, encoding a putative protein of 485 aminoacid residues. The predicted protein has a cytochrome b5 domain fused at the N-terminal and three histidine-box conserved motifs as described for other desaturases. The predicted protein has also high identity with the $\Delta 6$ -desaturase from *T. pseudonana*.

Introdução

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 na saúde humana, em especial EPA e DHA, tem crescido nos últimos 20 anos. Inúmeros trabalhos científicos têm constatado a influência destes óleos na prevenção e modulação de certas condições patológicas como a obesidade e doenças cardiovasculares e sua essencialidade no desenvolvimento do cérebro e retina (SAYANOVA e NAPIER, 2004).

Seres humanos podem sintetizar tanto o ácido EPA quanto o DHA a partir de ALA (ácido alfa-linolênico), através de uma série de dessaturações (adição de uma ligação dupla) e elongações (adição de dois átomos de carbono), como mostrado na Figura 1. Entretanto o ALA não pode ser sintetizado pelo organismo humano, por este motivo é considerado essencial e deve ser suprido na alimentação (SAYANOVA e NAPIER, 2004).

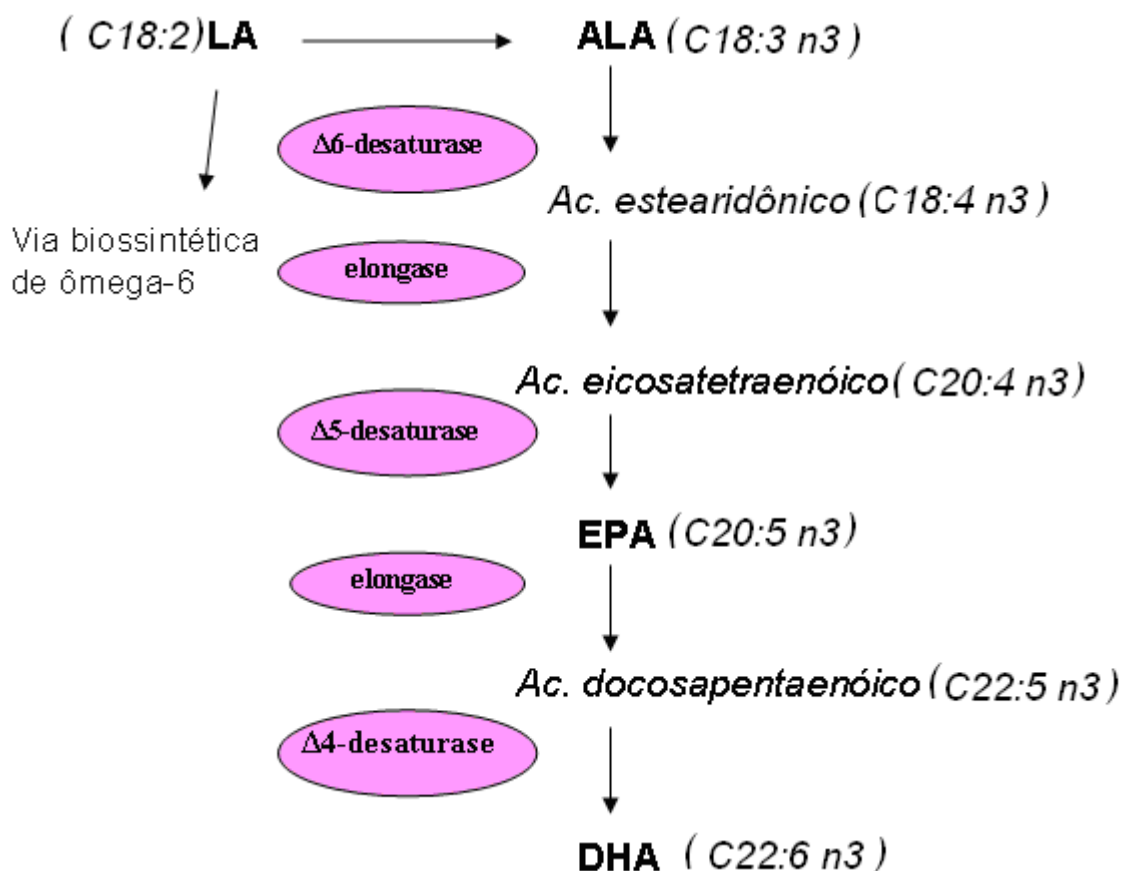


Figura 1. Esquema da rota metabólica para biossíntese de EPA e DHA .

A síntese de EPA e DHA em humanos, no entanto, é limitada. A proporção de ALA em relação ao ácido linoléico (LA) na dieta, um ácido graxo do tipo ômega-6, gera esta deficiência, pois as mesmas enzimas atuam sobre os dois tipos de substratos na produção de seus derivados (figura 1) (SCHMIDT, 2000).

A maior fonte de ácido alfa-linolênico, tipo ômega-3, é a semente de linhaça (19,81g/100g) e folhas de brócolis (0,10g/100g). Outras fontes são óleos vegetais como o de canola (6,78g/100g) e de soja (5,72g/100g), nozes (8,82g/100g) e vegetais de folhas verdes escuras como espinafre (0,38g/100g), entretanto estes últimos contêm maiores concentrações de ômega-6 do que ômega-3, de acordo com a Tabela brasileira de composição de alimentos (LIMA et al., 2006). Nessas plantas o LA é precursor de ALA.

Estima-se que a proporção de LA:ALA chega a patamares de 16:1, sendo que o ideal estimado para a manutenção da saúde do organismo é no máximo 6:1 (ECKERT et al., 2006).

Considerando essa competição LA *versus* ALA, o ideal para manter as quantidades ideais de EPA e DHA no organismo é ingeri-los pré-formados. Sua fonte presente na alimentação tradicional são peixes de águas frias marinhas, como por exemplo: salmão, cavala, arenque, anchovas, atum e sardinhas. Vários estudos prospectivos encontraram que o homem que come peixe pelo menos uma vez por semana tem menor taxa de mortalidade por doenças da artéria coronária (DAC) comparado com homens que não comem peixe (KROMHOUT et al., 1995).

Diante disto, a produção destes ácidos graxos em alimentos tradicionais é um objetivo a ser atingido e para isto a engenharia genética é uma ferramenta de grande auxílio, sendo portanto, essencial o estudo e clonagem de genes de enzimas envolvidas na biossíntese de EPA e DHA a partir de organismos produtores de altos teores desses compostos.

Estudos têm mostrado que os óleos ômega-3 presentes nos peixes provêm da ingestão de organismos que constituem o zooplâncton, os quais têm as microalgas como seu principal alimento (DERNER, 2005). Algumas microalgas, incluindo diatomáceas, acumulam grandes quantidades de EPA e DHA em gotículas lipídicas contidas em seu citoplasma, e por esse motivo destacam-se para o estudo genômico de rotas biossintéticas destes compostos.

O presente trabalho teve como objetivo a clonagem e caracterização do gene codificador da enzima $\Delta 6$ -dessaturase da microalga *Talassiosira fluviatilis*, a primeira enzima da rota metabólica para síntese de EPA e DHA a partir de ALA.

Material e Métodos

Material biológico

Uma cepa da diatomácea da espécie *T. fluviatilis* foi gentilmente cedida pelo Professor Dr. Roberto Bianchini Derner do laboratório de Camarões Marinhos – UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina).

Produção do cDNA

O RNA total de cada cepa de *T. fluviatilis* foi extraído utilizando-se o *Concert Plant RNA Reagent* (Invitrogen) de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante. Os RNAs mensageiros (mRNAs) poliadenilados foram isolados utilizando-se o Kit *micro-FastTrack mRNA isolation* (Invitrogen) e usados na produção de bibliotecas de cDNAs segundo o protocolo descrito no Kit *Creator SMART cDNA library* da Clontech. Parte do cDNA obtido durante a confecção foi separado para ser usado como *template* na busca do gene da delta-6-dessaturase por PCR.

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

Para isolamento de fragmento do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. fluviatilis* foi utilizada a técnica de PCR usando *primers* desenhados com base na seqüência do gene da enzima $\Delta 6$ -dessaturase de *T. pseudonana* (Tabela 1) e para isolamento das regiões 3' e 5' do gene a técnica de RACE (*rapid amplified cDNA ends*).

Tabela 1. Características dos *primers* utilizados para isolar o gene da $\Delta 6$ -dessaturase da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis*.

Primer	Tamanho	Seqüência
D6desTpMF	24	5'-CGGGCCAAGCTTGTTCATGATGGGG-3'
D6desTpMR	22	5'-CCGGAAGAGAGGACGAACATCC-3'
Tfdes3RACE	26	5'-TGGAATCTTCTGGGGAGACCTTATGC-3'
Tfdes5RACE	26	5'-CCTGAAACTTTGTGCCTGCTTCAGAC-3'
DES6-KPNSAL	24	5'-CAGGTACCGTCGACATGGGAAAAG-3'
DES6-BAM	26	5'-CTGGATCCTTACATGGCTGGGAAATC-3'

Para a reação de PCR foram utilizados aproximadamente 100 ng do cDNA molde (*T. fluviatilis*), 0,5 μ L de dNTPs 20mM, 0,5 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

Ciclo 2: 94 °C- 1 minuto para desnaturação

Ciclo 3: X °C- 1 minuto para anelamento

Ciclo 4: 72 °C- 1 minuto para elongação
Ciclo 5 - elongação final: 72 °C - 5 minutos
Repetição dos ciclos 2-4 por 30 vezes.

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

Para a técnica de 3' RACE, usou-se cDNA de *T. fluviatilis* (sintetizado durante confecção de uma biblioteca de cDNA) com regiões conhecidas nas extremidades 3' e 5' (graças ao protocolo usado) e reagentes fornecidos pelo *Kit Creator SMART cDNA library* (figura 2).

Para amplificar a região 5' do gene foi utilizada a técnica de RACE, usando o Kit *Marathon cDNA Amplification* da Clontech.

Primers Tfdes3RACE e Tfdes5RACE (Tabela 1) correspondendo respectivamente às regiões +223 a +248 e +378 a +404 do fragmento de 670 pb amplificado da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. fluviatilis* foram desenhados no programa Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000) (Fig. 2a) 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 SMART cDNA library*.

Para amplificação da extremidade 3' foram combinados os *primers* Tfdes3RACE e CDS III/3' PCR do *Kit Creator SMART cDNA library* (Fig. 2b).

Para amplificação da região 5' do gene, foi utilizado o *primer* 5' RACE (AP1) do Kit *Marathon cDNA Amplification* e o *primer* Tfdes5RACE (Fig. 2c).

Para a clonagem do gene completo, foram desenhados primers para as extremidades 5' e 3', com base nas seqüências obtidas, e contendo sítios de restrição para *Sal* I e *Kpn* I para facilitar a clonagem em vetores de expressão.

FIGURA 2: ESQUEMA DA POSIÇÃO DOS PRIMERS

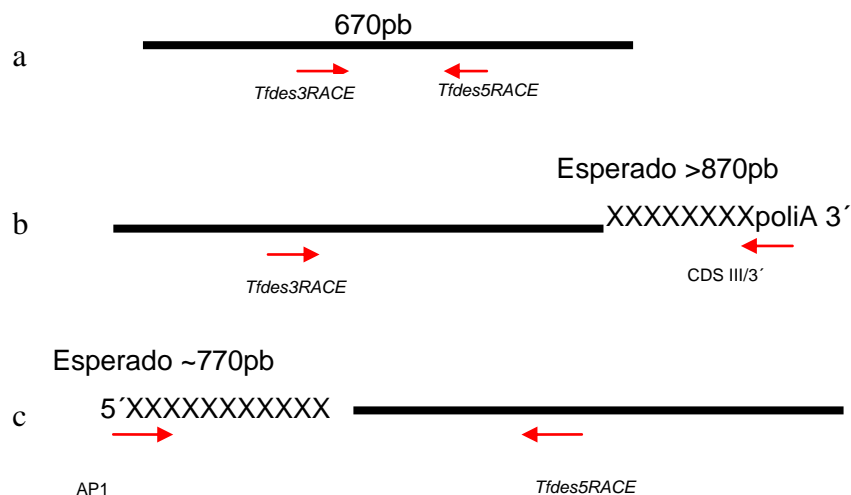


Figura 2. Esquema da estratégia usada para amplificação das extremidades 5' e 3' do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de ácido graxo de *Thalassiosira fluviatilis*. A) Fragmento obtido na primeira amplificação com os *primers* D6desTpMF e D6desTpMR, abaixo estão indicados os *primers* que foram desenhados com base nessa sequência gerada. B) Esquema para amplificação da região 3' do gene. C) Esquema para amplificação da região 5' do gene. As flechas vermelhas indicam a orientação dos *primers*.

Clonagem e sequenciamento

Os fragmentos amplificados por PCR e apresentando o tamanho esperado foram extraídos do gel utilizando-se o *Kit PCR Clean-Up System – Wizard 5V Gel* (Promega).

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, as quais foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/mL). Os clones positivos foram selecionados por PCR usando os primers Tfdes3RACE e Tfdes5RACE (Tabela 1). O DNA plasmidial foi extraído para seqüenciamento usando *primers* M13 *Forward* e *Reverse* que tem complementaridade com seqüências do vetor. Para as reações de sequenciamento foi utilizado o *Kit BigDye Terminator* versão 3.1 (*Applied Biosystem*) procedendo-se em equipamento automático ABI 377 (*Applied Biosystems*).

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

Análise da seqüência do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. fluviatilis*

As seqüências obtidas foram alinhadas para gerar uma única seqüência (*contig*) com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1997). 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., 2002).

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.

Resultados e Discussão

Clonagem e sequenciamento do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. fluviatilis*

A reação de PCR (temperatura de anelamento: 60° C) a partir do cDNA de *T. fluviatilis* com os *primers* D6desTpMF e D6desTpMR combinados resultou na amplificação de um fragmento de aproximadamente 700 pb (Figura 3), e como o esperado era de 668 pb, com base na seqüência do gene de *T. pseudonana*, ele foi clonado e seqüenciado.

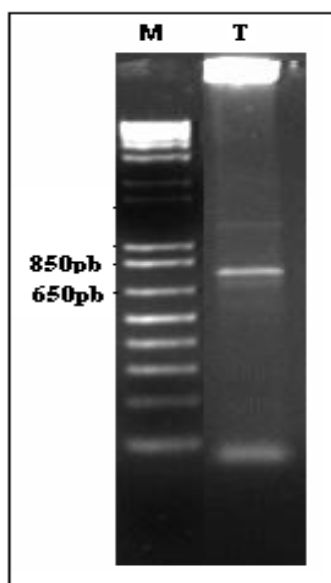


Figura 3. Amplicon obtido por meio de PCR usando como molde o cDNA de *T. fluviatilis* e *primers* desenhados com base no gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. pseudonana*, visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

O seqüenciamento mostrou tratar-se do fragmento de uma $\Delta 6$ -dessaturase, cujo tamanho exato é de 670 pb, conforme alinhamento com outras seqüências disponíveis no *GenBank*, utilizando o programa BLAST.

A PCR com os *primers* Tfdes3RACE e CDS III/3' PCR (Figura 2b) gerou um fragmento de 1000 pb (não mostrado) e, como era esperado, baseado na seqüência do gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. pseudonana*, uma seqüência de mais de 870 pb. O fragmento foi clonado e sequenciado. Análise da seqüência revelou uma região gênica de 870 pb e uma região 3' UTR (*untranslated terminal region*) de 122 pb mais 30 adeninas correspondendo à cauda poliA.

A amplificação do cDNA com os *primers* 5' RACE (AP1) do Kit *Marathon* e Tfdes5RACE para clonagem da região 5' do gene resultou em uma seqüência de 771 pb desde o ATG.

O gene completo foi amplificado utilizando-se os *primers* DES6-KPNSAL e DES6-BA. O mesmo foi clonado no vetor pGEM-T *easy* (Promega), nos sítios de *Kpn* I e *Sal* I.

Utilizando as seqüências obtidas e com auxílio do programa BioEdit obteve-se um *contig* exibindo a seqüência consenso completa do gene da $\Delta 6$ -dessaturase. A análise da seqüência nucleotídica do gene indicou a presença de uma ORF de 1458 nucleotídeos que codifica uma proteína predita de 485 aminoácidos (Figura 4).

```
1 atgggaaaaggaggagacgctagcatcccggccgaggtcaatc
M G K G G D A S I P A A R S I
46 gctttgaagtctaacgacaaagccgagaagtacacttgggcggag
A L K S N D K A E K Y T W A E
91 gtgaagaagcacattacccccgacgacgcttggatcgtccatgct
V K K H I T P D D A W I V H A
136 aacaagggtctatgatgtttcaaactggcagaccatcctggaggc
N K V Y D V S N W H D H P G G
181 gctgtcatcttcactcacgctggagacgatatgacggatatcttt
A V I F T H A G D D M T D I F
226 gctgccttccacgcacagggctctcaagccatgatgaagaaattc
A A F H A Q G S Q A M M K K F
271 tacatcggcgaccttatccccgagagcgtggagcataaggaccag
Y I G D L I P E S V E H K D Q
316 agtcagctggattttgagaagggttaccgtgatttaagggcgaag
S Q L D F E K G Y R D L R A K
361 ttggtcatgatgggaatgttcaagagtttcaagggttactacgcc
L V M M G M F K S S K G Y Y A
406 tacaaatgcaccttcaatatgtgcatgtggctcactgcggtagcc
Y K C T F N M C M W L T A V A
451 atgggtgtactattcggatagttttgccgtgcacattggttcggcc
M V Y Y S D S F A V H I G S A
496 cttttgctcggactcttctggcagcaatgcggatggccttgcccat
L L L G L F W Q Q C G W L A H
541 gatttttttgcgtcatcaggtgttcaagcaccgcaagtacggggac
D F L R H Q V F K H R K Y G D
586 ttggctggaatcttctgaggagaccttatgcaaggattttcaatg
L A G I F W G D L M Q G F S M
631 caatggttgaaaaataagcacacgacaccacgccgtgccaac
```

```

      Q W W K N K H N G H H A V P N
676 ttgcacaattcttcggttgacagtcaggatggagatcctgacatc
      L H N S S V D S Q D G D P D I
721 gacaccatgccccctcttagcatggtgtctgaagcaggcacaaagt
      D T M P L L A W C L K Q A Q S
766 ttcagggaattaaacgccgatggaaaggatagcaccttcgtaaag
      F R E L N A D G K D S T F V K
811 tacgcatcaagtttcaggcatttacctacttccccattcttttg
      Y A I K F Q A F T Y F P I L L
856 ctggcaagaatttcttggttgagagagtctttcaaaactgccttc
      L A R I S W L R E S F K T A F
901 ggtctcgggtgctgcttctgaaaatgccaaagcttgagcttgagagg
      G L G A A S E N A K L E L E R
946 cgggggttgcaataccccactcttgagcgttccggaattgcgctt
      R G L Q Y P T L E R S G I A L
991 cattacgcatggatgttcgtcctctcttctggcttcggaaggttc
      H Y A W M F V L S S G F G R F
1036 tctatcgcatattccatcatgtacttcatggctcgcaacttgctca
      S I A Y S I M Y F M V A T C S
1081 tctggactcttctcgtggttagtttctcgttcttgacacaacggt
      S G L F L A L V F G L G H N G
1126 atggcgggtgtatgatgcaacaacccgaccagacttctggaaactc
      M A V Y D A T T R P D F W K L
1171 caagtaaccacaactcgaaacggttattggtggttatggaattcct
      Q V T T T R N V I G G Y G I P
1216 cagttcttcgtcgatttggttctgtggtggcctgcaataccaagtg
      Q F F V D W F C G G L Q Y Q V
1261 gatcaccacctcttccccatgatgcctaggaacaatattgccaaa
      D H H L F P M M P R N N I A K
1306 tgccacaagctcgtcgagtcattctgcaaggagtggggagtcaag
      C H K L V E S F C K E W G V K
1351 tatcacgagactgacatgatcactggaacttggaagtgttttaaag
      Y H E T D M I T G T W E V L K
1396 caccttcaaaatgtttccgacgaattcttggtagaaatggtgaaa
      H L Q N V S D E F L V E M V K
1441 gatttcccagccatgtaa 1458
      D F P A M *

```

Figura 4. 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 indicada em verde (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.

Análise das seqüências

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. 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%).

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

- Uma região próxima ao N-terminal contendo os aminoácidos conservados HPGG (58 a 61 aa), característica do domínio citocromo b5 fusionado a “*front end*” dessaturases de ácidos graxos poliinsaturados. (Fig. 5)

- Três motivos histidina-box conservados (184 a 188; 218 a 224; 423 a 428) característicos de dessaturases (Fig. 5);

- O terceiro motivo histidina-box contém a substituição de uma histidina (H) por uma glutamina (Q), no primeiro aminoácido do motivo conservado (Fig. 5), característico de delta-6 dessaturases.

Alignment: Untitled1

	10 20 30 40 50
Thalassiosir	MGKGG-DASI PAARSIALKS NDKAEKYTWA EVKKHITPDD AWIVHANKVY
Phaeodactylu	MGKGG-DARA S-----KG STAARKISWQ EVKTHASPED AWIIHSNKVY
Thalassiosir	MGKGG-DAAA ATKRSGALKL AEKPQKYTWQ EVKKHITPDD AWVVHQNKVY
Glossomastix	MGKGGRDAGA VGG-----EA EKTLPKFTE EIQKHRTPOD AWMVHHNKVY

	60 70 80 90 100
Thalassiosir	DVSNWHDHPG GAVIFTHAGD DMTDIFAAFH AQGSQAMMKK FYIGDLIPES
Phaeodactylu	DVSNWHEHPG GAVIFTHAGD DMTDIFAAFH APGSQSLMKK FYIGELLPET
Thalassiosir	DVSNWYDHPG GAVVFTHAGD DMTDIFAAFH AQGSQAMMKK FYIGDLIPES
Glossomastix	DVSNYMDHPG GLVIFSHAGD DMTDVFAAFH PPSAFNFMDK FLIGVVDISK

	110 120 130 140 150
Thalassiosir	VE---HKDQS QLDFEKGYRD LRAKLVMGM FKSSKGYAY KCTFNMCMWL
Phaeodactylu	TG---KEPQ- QIAFEKGYRD LRSKLIMGM FKSNKWFYVY KCLSNMAIWA
Thalassiosir	VE---HKDQR QLDFEKGYRD LRAKLVMGM FKSSKMYAY KCSFNMCMWL
Glossomastix	SSPQLQKDAS QASFEKAYRN LRVQLKKAGM FKASSLFYTY KVLSTLALCL

	160 170 180 190 200
Thalassiosir	TAVAMVYYS SFAVHIGSAL LLGLFWQQCG WLAHDFLRHQ VFKHRKYGDL
Phaeodactylu	AACALVFYSD REFWHLASAV MLGTFFQQSG WLAHDFLHHQ VFTKRKHGDL
Thalassiosir	VAVAMVYYS SLAMHIGSAL LLGLFWQQCG WLAHDFLHHQ VFKQRKYGDL
Glossomastix	VSWGLVLGSD HFGVHLVGAL FLALFWQQCG WLAHDFLHHQ VFQNRAGDL

	210 220 230 240 250
Thalassiosir	AGIFWGDLMQ GFSMQWWKNK HNGHHAVPNL HNSSVDSQDG DPDIDTMPLL
Phaeodactylu	GGLFWGNLMQ GYSVQWWKNK HNGHHAVPNL HCSSAVAQDG DPDIDTMPLL
Thalassiosir	VGIFWGDLMQ GFSMQWWKNK HNGHHAVPNL HNSSLDSQDG DPDIDTMPLL
Glossomastix	AGIMIGNVWQ GFSVAWWKNK HNTTHSVPNL YESQPDAADG DPDIDTMPLL

	260 270 280 290 300
Thalassiosir	AWCLKQAQSF RELNADGKDS TFKYAIKFQ AFTYFPILL ARISWLRESF
Phaeodactylu	AWSVQQAQSY QELQADGKDS GLVKFMIRNQ SYFYFPILL ARLSWLNESF
Thalassiosir	AWSLKQAQSF REINK-GKDS TFKYAIKFQ AFTYFPILL ARISWLNESF

Glossomastix	AWSLRMAKN-	-----ADN	ALSRWFVSHQ	AFCYFPILGL	ARLSWLEGSF

	310	320	330	340	350
Thalassiosir	KTAFGLGAAS	ENAKLELERR	GLQYPTLERS	GIALHYAWMF	VLSSGFGRFS
Phaeodactylu	KCAFGLGAAS	ENAALELKAK	GLQYPLLEKA	GILLHYAWML	TVSSGFGRFS
Thalassiosir	KTAFGLGAAS	ENAKLELEKR	GLQYPLLEKL	GITLHYTWMF	VLSSGFGRWS
Glossomastix	SFVFSNPLAW	KTKNLDVAKQ	LVTNPLLEQA	GLLVHYAWVF	ALCACTG--S

	360	370	380	390	400
Thalassiosir	IAYSIMYFMV	ATCSSGLFLA	LVFGLGHNGM	AVYDATTRPD	FWKLQVTTTR
Phaeodactylu	FAYTAFYFLT	ATASCGFLA	IVFGLGHNGM	ATYNADARPD	FWKLQVTTTR
Thalassiosir	LPYSIMYFFT	ATCSSGLFLA	LVFGLGHNGM	SVYDATTRPD	FWQLQVTTTR
Glossomastix	LVRALAFFV	ATCTSGLLA	IVFGLGHNGM	ALYEANARPD	FWKLQVTTTR

	410	420	430	440	450
Thalassiosir	NVIGGYGIPQ	FFVDWFCGGL	QYQVDH HLFP	MMPRNNIAKC	HKLVESFCKE
Phaeodactylu	NVTGGHGFPQ	AFVDWFCGGL	QYQVDH HLFP	SLPRHNLAKT	HALVESFCKE
Thalassiosir	NIIGGHGIPQ	FFVDWFCGGL	QYQVDH HLFP	MMPRNNIAKC	HKLVESFCKE
Glossomastix	NITG-----S	PFVHWFCGGL	QFQVEH HLFP	SLPRHNLPR	HEIVTAFCKE

	460	470	480		
Thalassiosir	WGVKYHETDM	ITGTWEVLKH	LQNVSDFLV	EMVKDFPAM	
Phaeodactylu	WGVQYHEADL	VDGTMEVLHH	LGSVAGEFV	DFVRDGPAM	
Thalassiosir	WGVKYHEADM	WDGTVEVLQH	LSKVSDDFLV	EMVKDFPAM	
Glossomastix	QGVKYHEADL	LTGTKEILSC	LSEVT----T	EFLDEFPAM	

Figura 5. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de quatro delta-6-dessaturases de ácidos graxos de microalgas (*Thalassiosira fluviatilis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana* e *Glossomastix chrysoplata*). A seqüência HPGG, do citocromo b5 está destacada em negrito. Os motivos histidina-box, característicos de dessaturases estão destacados em vermelho.

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 6). Além disso, na busca por domínios conservados, foi encontrado o domínio de dessaturase de ácido graxo comum a outras dessaturases de ácidos graxos.

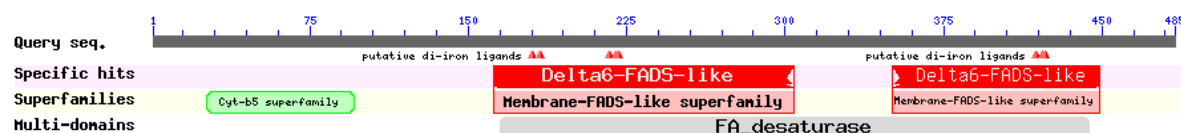


Figura 6. Domínios conservados na seqüência da Δ6-dessaturase de *T. fluviatilis* obtidos quando alinhada a seqüência contra o banco de dados do NCBI (NATIONAL..., 2008).

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 b_5 salienta a afirmação, pois estes motivos são essenciais à função da proteína, agindo cataliticamente e doando elétrons na reação de dessaturação respectivamente (NATIONAL..., 2008).

Análise filogenética da sequência protéica predita da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. fluviatilis*

A árvore filogenética construída para o gene da $\Delta 6$ -dessaturase de *T. fluviatilis* (Figura 7) apresentou dois grupos principais separados, I e II, com um mesmo ancestral, *Borago officinalis*.

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

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

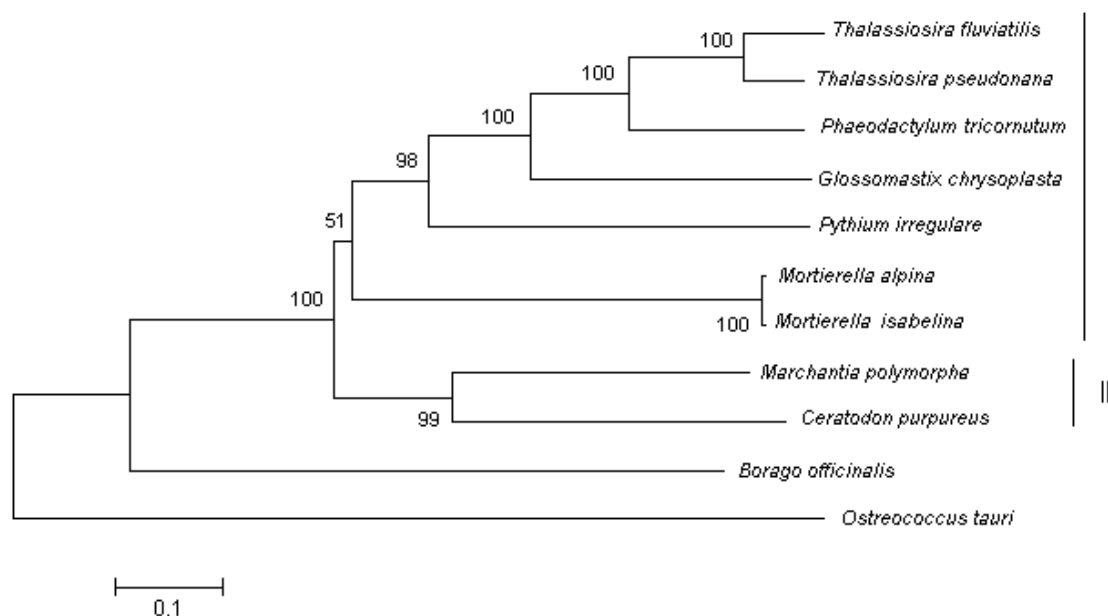


Figura 7. Árvore filogenética para a proteína predita da $\Delta 6$ -dessaturase de *Thalassiosira fluviatilis*. Os números indicam os valores de "bootstrap" de cada ramo.

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 microrganismos e musgos.

Conclusão

Um gene da $\Delta 6$ -dessaturase de ácidos graxo da diatomácea *T. fluviatilis* foi clonado e caracterizado 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 alimentares dessas gorduras importantes para a saúde humana.

AGRADECIMENTOS

Parte deste trabalho foi financiado pela Embrapa e pelo Programa PRONEX do MCT/CNPq/FAP-DF. Agradecimentos também à Universidade de Brasília (UnB) pela disponibilização dos recursos para o desenvolvimento do trabalho e à CAPES pela concessão de bolsa de Mestrado.

Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, GB, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; RAPP, B. A.; WHEELER, D. L. Genbank. **Nucleic Acids Research**, London, GB, v. 30, n. 1, p. 17-20, 2002.

DERNER, R. B. **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**. 2005. 138 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ECKERT, H. L. A.; VALLEE, B.; SCHWEIGER, B. J.; KINNEY, A. J.; CAHOON, E. B.; CLEMENTE, T. 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**, Berlin, DE, v. 224, n. 5, p.1050-1057, 2006.

HALL, T. **BioEdit version 5.0.6**. Raleigh: North Carolina State University, 1997.

KROMHOUT, D.; FESKENS, E. J.; BOWLES, C. H.; The protective effect of a small amount of fish on coronary heart disease mortality in an elderly population. **International Journal of Epidemiology**, Oxford, GB, v. 24, n. 2, p. 340-345, 1995.

LIMA, D. M.; COLUGNATI, F. A. B.; PADOVANI, R. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SALAY, E.; GALEAZZI, M. A. M. **Tabela brasileira de composição de alimentos – TACO**: versão 2. 2. ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2006. 113 p.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **A conserved domain database and search service, v2.16**. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>>. Acesso em: 06 de outubro de 2008.

ROZEN, S.; SKALETISKY, J. Pimer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, W.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics methods and protocols**: methods in molecular biology. Totowa, US, Humana Press, 2000. p. 265-386.

SAYANOVA, O. V.; NAPIER, J. A. Eicosapentaenoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants. **Phytochemistry**, New York, US, v. 65, n. 2, p. 147-158, 2004.

SCHMIDT, M. A. **Gorduras Inteligentes**: como as gorduras e os óleos da dieta afetam as inteligências mental, física e emocional. São Paulo, SP: Roca, 2000. 254 p.