

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

THOMAZ STUMPF TRENZ

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE NOVAS ENZIMAS RELACIONADAS À
PRODUÇÃO DE ÓLEO EM OLEAGINOSAS

Porto Alegre

2018

THOMAZ STUMPF TRENZ

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE NOVAS ENZIMAS RELACIONADAS À
PRODUÇÃO DE ÓLEO EM OLEAGINOSAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Maria Auxiliadora Naschenveng Pinheiro Margis

Co-orientador: Felipe dos Santos Maraschin

Porto Alegre 2018

AGRADECIMENTOS

À professora Márcia Pinheiro Margis, pela orientação e por ter permitido o desenvolvimento desta pesquisa em seu laboratório;

Ao professor Felipe dos Santos Maraschin, pela paciência, credibilidade e orientação que vem desde os tempos da graduação;

Aos meus colegas de laboratório, em especial ao Ronei, Fernanda, Paloma, Kaira e Letícia Gal, que sempre cederam um pouco de seu tempo para me ajudar quando eu precisava;

Aos colaboradores deste projeto, professor Rogério Margis, professora Andréia Turchetto e Dra. Ana Korbes;

Ao Carlos e à Tania, que auxiliaram nas análises de identificação de ácidos graxos;

À minha família, por todo o apoio e por sempre acreditarem em mim;

Aos meus amigos e colegas, em especial ao Daniel, Raíssa e Carolina, que compartilharam dúvidas, momentos e perspectivas comigo;

Ao CNPq, FAPERGS e CAPES, pelos recursos disponibilizados para o desenvolvimento deste projeto.

Muito obrigado!

Resumo

Novas fontes de combustíveis e produtos não baseados no óleo de petróleo são necessárias na sociedade moderna. Uma das alternativas é o óleo derivado de plantas. Os triglicerídeos (TAGs), componentes dos óleos vegetais, são os principais lipídeos de estoque em plantas. O entendimento de como os triglicerídeos são formados é importante para o desenvolvimento de estratégias visando melhorar o conteúdo e a composição de óleos nutricionais e industriais. As diacilglicerol aciltransferases (DGATs) são as enzimas chave para biossíntese de TAGs e catalisam a condensação do diacilglicerol (DAG) e dos ácidos graxos à formação de triglicerídeos. Diversos tipos de genes DGAT já foram identificados em plantas. DGAT1 e DGAT2 são enzimas ligadas a membranas já bem caracterizadas, mas pouco é sabido sobre a isoforma DGAT3 solúvel na maioria de espécies de plantas. O objetivo deste estudo foi caracterizar as duas isoformas de DGAT3 (GmDGAT3A e GmDGAT3B) de soja (*Glycine max*), a principal fonte de óleo vegetal do Brasil, e de mamona (*Ricinus communis*, RcDGAT3), oleaginosa que possui altos níveis de ácido ricinoleico em sua semente. Plantas de *Arabidopsis thaliana* expressando de forma heteróloga a RcDGAT3 de mamona não apresentaram diferença no perfil de ácidos graxos em suas sementes. Leveduras mutantes para a biossíntese de TAGs foram incapazes de recuperar o fenótipo mutante quando expressam GmDGAT3A, GmDGAT3B, ou RcDGAT3. A suplementação dessas leveduras com ácido linoleico, ou ácido linolênico não resultou na síntese de triglicerídeos, indicando que GmDGAT3A e GmDGAT3B necessitam de um conjunto diferente de substratos não encontrados nas células de leveduras. Folhas de *Nicotiana benthamiana* expressando fusões traducionais de GmDGAT3A, GmDGAT3B, ou RcDGAT3 com proteínas fluorescentes, mostraram que GmDGAT3B é parcialmente co-localizada com o retículo endoplasmático, enquanto GmDGAT3A é concentrada em pequenos pontos citosólicos, e simultaneamente espalhada pela célula. A expressão heteróloga de RcDGAT3-CFP tanto em folhas de *N. benthamiana*, quanto em folhas de *Arabidopsis* mostrou uma localização similar a GmDGAT3A-GFP, ou seja, as proteínas estavam localizadas em pontos no citosol das células vegetais. O principal papel da DGAT3 nessas oleaginosas ainda não é claro, mas é provável que estas enzimas tenham propriedades bioquímicas diferentes dos ortólogos já descritos.

Palavras chave: óleos vegetais; biocombustíveis; complementação de mutantes; genômica funcional.

Abstract

New fuel sources and non-petroleum oil based products are needed in modern society. One of the alternatives is the oil derived from plants. Triacylglycerides (TAGs) are main components of vegetal oil and constitute the major stock of lipids in plants. The understanding of how triacylglycerides are produced is important for the development of strategies aiming to improve the content and composition of nutritional and industrial oils. Diacylglycerol Acyltransferases (DGATs) are the key enzymes for TAG biosynthesis as they catalyze the condensation of diacylglycerol (DAG) to fatty acids for triacylglycerides formation. Several types of DGAT have been identified in plants. DGAT1 and DGAT2 are well characterized membrane-bound enzymes, but little is known about the soluble DGAT3 isoform in most plant species. The aim of this study was to characterize the two DGAT3 isoforms (GmDGAT3A and GmDGAT3B) of soybean (*Glycine max*), the main plant oil source in Brazil, and the castor bean DGAT3 isoform (*Ricinus communis*, RcDGAT3), oleaginous plant that contains high levels of ricinoleic acid in its seeds. *Arabidopsis thaliana* plants heterologously expressing RcDGAT3 from castor bean did not display differences in their seed fatty acid profiles. Mutant yeast for TAG biosynthesis was unable to recover the mutant phenotype when GmDGAT3A, GmDGAT3B, or RcDGAT3 are expressed. Even with supplementation of linoleic acid, or linolenic acid, triacylglyceride synthesis did not take place, indicating that GmDGAT3A and GmDGAT3B need different substrates not found in yeast cells. *Nicotiana benthamiana* leaves expressing translational fusions of GmDGAT3A, GmDGAT3B, or RcDGAT3 with fluorescent proteins, showed that GmDGAT3B is partially co-localized with the endoplasmic reticulum, whereas GmDGAT3A is either concentrated in small cytosolic spots or widespread in the cell. The heterologous expression of RcDGAT3-CFP either in *N. benthamiana* leaves or in *Arabidopsis* leaves showed similar localization to GmDGAT3A-GFP, in which the proteins are localized in cytosolic spots in plant cells. The DGAT3 main role in these oleaginous plants is still unclear, but it is likely that these enzymes display different biochemical properties from the previously described orthologues.

Keywords: plant oils; biofuels; mutant rescue; functional genomics.

Lista de Figuras

Figura 1 Diferentes tipos de Ácidos graxos.....	13
Figura 2 Biossíntese de ácidos graxos e triglicerídeos (TAGs).....	16
Figura 3 Mapa do plamídeo pVT-U.....	21
Figura 4 Mapa do plasmídeo pEARLYGATE-104.....	22
Figura 5 Caracterização das plantas de Arabidopsis expressando RcDGAT3-CFP em relação às plantas do tipo selvagem.....	28
Figura 6 Composição de ácidos graxos nas sementes de Arabidopsis expressando RcDGAT3-CFP e as plantas do tipo selvagem.....	29
Figura 7 Complementação leveduras mutantes para síntese de TAGs com RcDGAT3.....	31
Figura 8 Ensaio de complementação usando leveduras mutantes incapazes de produzir óleo.....	32
Figura 9 Ensaio de complementação em leveduras H1246 com suplementação de ácidos graxos.....	33
Figura 10 Crescimento de leveduras em meio seletivo.....	35
Figura 11 Resgate do fenótipo de lipotoxicidade em células H1246.....	36
Figura 12 RcDGAT3-CFP está localizada em estruturas dot-like em células de folhas vegetais.....	38
Figura 13 Localização subcelular das DGAT3s de soja.....	39
Figura 14 Alinhamento das DGATs solúveis.....	40

Lista de Tabelas

Tabela 1 Primers utilizados para RT-qPCR	23
--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

TAG	Triglicerídeo
FA	Ácido graxo (do inglês, <i>Fatty Acid</i>)
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferase
LPAT	Ácido lisofosfatídico aciltransferase (do inglês, <i>Lysophosphatidic Acid Acyltransferase</i>)
FAD2	Ácido graxo desaturase 2 (do inglês, <i>Fatty Acid Desaturase 2</i>)
PAP	Ácido fosfatídico fosfatase (do inglês, <i>Phosphatidic Acid Phosphatase</i>)
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
DAcT	Diacilglicerol acetiltransferase
WS/DGAT	Cera éster sintase/acil-CoA:diacilglicerol (do inglês, <i>Wax Ester Synthase/Acyl coenzyme A:Diacylglycerol Acyltransferase</i>)
PDAT	Fosfolipídeo:diacilglicerol aciltransferase (do inglês, <i>Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase</i>)
AA	Aminoácidos
DAG	1,2-diacilglicerol
acTAG	Triglicerídeos acetilados (do inglês, <i>acetylated Triacylglycerols</i>)
FAME	Éster metílico de ácido graxo (do inglês, <i>Fatty acid methyl ester</i>)
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
GFP	Proteína fluorescente verde (do inglês, <i>Green Fluorescent Protein</i>)
RFP	Proteína fluorescente vermelha (do inglês, <i>Red Fluorescent Protein</i>)
YFP	Proteína fluorescente amarela (do inglês, <i>Yellow Fluorescent Protein</i>)
CFP	Proteína fluorescente ciana (do inglês, <i>Cyan Fluorescent Protein</i>)
WT	Tipo selvagem (do inglês, <i>Wild Type</i>)
ACP	Proteína carreadora de acila (do inglês, <i>Acyl carrier protein</i>)
LPA	Ácido lisofosfatídico (do inglês, <i>Lysophosphatidic Acid</i>)
PA	Ácido fosfatídico (do inglês, <i>Phosphatidic Acid</i>)
PC	Fosfatidilcolina (do inglês, <i>Phosphatidylcholine</i>)
CDS	Sequência codificante (do inglês, <i>Coding Sequence</i>)
Pb	Pares de base

CoA	Coenzima A
RE	Retículo endoplasmático
RTNLB13	<i>Reticulon-like protein B13</i>

Sumário

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Óleo vegetal.....	12
1.1.2 Óleo de mamona	14
1.2 Biossíntese de ácidos graxos e triglicerídeos em plantas.....	15
1.2.1 Enzimas do tipo Diacilglicerol Aciltransferase (DGAT).....	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Material vegetal, extração de RNA e síntese de cDNA	20
3.2 Clonagem dos genes	20
3.4 Teste de complementação em leveduras.....	22
3.5 Teste <i>in vivo</i> usando <i>Nile red</i>	24
3.6 Análise de lipídeos totais de <i>A. thaliana</i> expressando RcDGAT3-CFP	24
3.7 Expressão transiente em folhas de <i>N. benthamiana</i> e localização subcelular	24
3.8 Análise do óleo de sementes de <i>A. thaliana</i> expressando DGAT3-CFP.....	25
3.8 Alinhamento das sequências proteicas	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Análise fenotípica de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> expressando de forma heteróloga RcDGAT3 de mamona.....	27
4.2 Leveduras mutantes H1246 expressando de forma heteróloga RcDGAT3 de mamona são incapazes de recuperar a síntese de triglicerídeos.....	30
4.3 GmDGAT3A e GmDGAT3B de soja expressas de forma heteróloga em leveduras mutantes H1246 são incapazes de recuperar síntese de triglicerídeos	31
4.4 Ensaio de complementação do fenótipo mutante de leveduras H1246 com DGATs solúveis de soja na presença de ácidos graxos poliinsaturados	33
4.5 Lipotoxicidade em leveduras mutantes via suplementação de ácidos graxos livres e recuperação do efeito inibitório via produção de triglicerídeos.....	34
4.6 RcDGAT3-CFP localiza-se em estruturas <i>dot-like</i> no citoplasma de células de folhas vegetais	37
4.7 DGATs solúveis de soja têm diferentes localizações subcelulares	38
4.8 DGAT3s de soja são mais similares a DGAT3s de amendoim	40

5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS	42
6 REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia tem dado suporte importante neste momento de transição de nossa sociedade, e através dela diversos processos e tecnologias têm sido desenvolvidos para substituir aqueles já estabelecidos na segunda revolução industrial. Além de revoluções nas áreas da saúde, conservação, alimentação e energia, a biotecnologia tem ajudado na área industrial, viabilizando diversos processos e substituindo outros (Chen e Jiang, 2017; Harnisch e Holtmann, 2017; Imran *et al.*, 2017). Um dos desafios desta área é tornar mais sustentável a produção de combustíveis, estes que têm como principal representante o óleo derivado de petróleo. Embora haja novos métodos para a produção de energia que não dependem de carbono, a substituição efetiva é um processo lento e, portanto, a produção de combustíveis a partir de óleos vegetais se tornou uma alternativa atrativa (Dyer e Mullen, 2008).

O óleo bruto, derivado de petróleo, tem sido muito utilizado pelo seu preço, que é relativamente baixo, e pela sua rica composição química. Ele é composto por uma mistura de hidrocarbonetos e outros químicos, dos quais são fracionados e recuperados produtos como gasolina, diesel, querosene, gás de petróleo liquefeito e outros hidrocarbonetos de cadeia longa. A maior parte deste óleo é utilizada para combustível (90%), sendo que o restante é utilizado para a fabricação de lubrificantes, plásticos, e outros produtos da indústria petroquímica. A principal diferença entre os dois tipos mais conhecidos de combustíveis derivados do petróleo, gasolina e diesel, é o número de carbonos que cada molécula possui. O diesel apresenta uma média de 10 a 15 carbonos por molécula, enquanto a gasolina tem uma média menor, variando de 5 a 12 carbonos. Essa diferença confere à gasolina uma maior volatilidade, necessitando de apenas ar e uma faísca para começar a combustão, ao passo que o diesel precisa de maior compressão e de calor para iniciar a sua queima (Durrett *et al.*, 2008; Dyer e Mullen, 2008). Embora o emprego do petróleo como principal fonte de combustíveis tenha sido favorável, ele impacta negativamente o meio ambiente, devido aos compostos tóxicos que são extraídos junto ao combustível e pela sua contribuição ao efeito estufa. Por isso, fontes menos nocivas e renováveis de óleo têm sido almejadas.

Uma das alternativas é um derivado do óleo de plantas, conhecido como biodiesel. Este, após o processo de transesterificação e separação da glicerina, pode ser utilizado como combustível e é menos nocivo ao meio ambiente, já que contém poucos compostos com enxofre

ou aromáticos, reduzindo assim a formação de óxido sulfúrico, ácido sulfúrico e outros compostos que possam ser considerados carcinogênicos, além de possuir a capacidade de aumentar a lubricidade do combustível (Durrett *et al.*, 2008). Além disso, o biodiesel tem baixa emissão de monóxido de carbono (CO), e apresenta certa neutralidade em relação à produção de CO₂, já que o gás não vem de fontes soterradas e é reabsorvido pelas plantas na fase química da fotossíntese, formando um ciclo que pode resultar em uma diminuição de até 41% na emissão de gases do efeito estufa (Hill *et al.*, 2006).

1.1 Óleo vegetal

O óleo proveniente das plantas é quimicamente parecido com aquele que é encontrado em frações do petróleo e, por esta razão, pode ser utilizado na produção de biodiesel. Ele apresenta maior conteúdo energético que o etanol e tem uma relação energética favorável em relação à taxa de energia de *input/output* de até 1:4 em plantações irrigáveis (Dyer e Mullen, 2008). O óleo vegetal, resumidamente, é um conjunto de triglicerídeos (TAGs), que são formados por uma molécula de glicerol ligada a três ácidos graxos (FAs), saturados ou insaturados. Da grande diversidade de ácidos graxos que existe na natureza, cinco deles são abundantemente encontrados nos óleos vegetais, são eles o ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1 Δ^9), ácido linoleico (C18:2 $\Delta^{9,12}$) e o ácido linolênico (C18:3 $\Delta^{9,12,15}$) (Jaworski e Cahoon, 2003). Estes FAs são conhecidos como ácidos graxos “usuais”, pois estão presentes no óleo de diversas oleaginosas (Figura 1, A). A composição de ácidos graxos confere aos óleos as suas diferentes propriedades, e, conseqüentemente, define suas aplicações industriais. Além da produção de biodiesel, os triglicerídeos têm grande importância na alimentação, na preparação de tintas, lubrificantes, detergentes, cosméticos, entre outros produtos (Dyer e Mullen, 2008; Orsavova *et al.*, 2015).

Algumas espécies de vegetais têm a capacidade de acumular um tipo específico de ácido graxo em seus óleos, geralmente apresentando características diferentes dos convencionais. Esses FAs diferentes, conhecidos como “não usuais”, possuem grupamentos funcionais (hidroxi, epóxi), cadeia carbônica com tamanho variado e até uma grande quantidade de insaturações (Figura 1, B); entretanto, esses ácidos graxos são encontrados em espécies não amplamente cultivadas, o que dificulta sua exploração em larga escala (Jaworski e Cahoon, 2003).

Para que o óleo vegetal possa ser utilizado como combustível, ele precisa ser transesterificado para que haja a formação de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES). Este processo não só quebra os TAGs em FAs e glicerol, mas também diminui a viscosidade dessas moléculas. Essa redução da viscosidade acarreta um menor acúmulo de carbono nos bicos de injetores e anéis de pistões em motores. Além disso, a viscosidade é uma propriedade físico-química importante que também está relacionada com a qualidade da combustão (Beltrão e Oliveira, 2008). Como o tamanho de cadeia carbônica e a quantidade de insaturações nos FAs afetam tanto positivamente quanto negativamente as qualidades do biodiesel, não há um perfil ótimo. As propriedades mais atrativas são adquiridas via ácidos graxos monoinsaturados (oleico e palmitoleico, por exemplo), pois apresentam maior qualidade de ignição, uma maior estabilidade de combustível e nas suas propriedades de fluxo frio (ponto de entupimento de filtro a frio, por exemplo). Entretanto, nenhuma cultivar produz tais ácidos graxos em grande quantidade/pureza (Rogalski e Carrer, 2011).

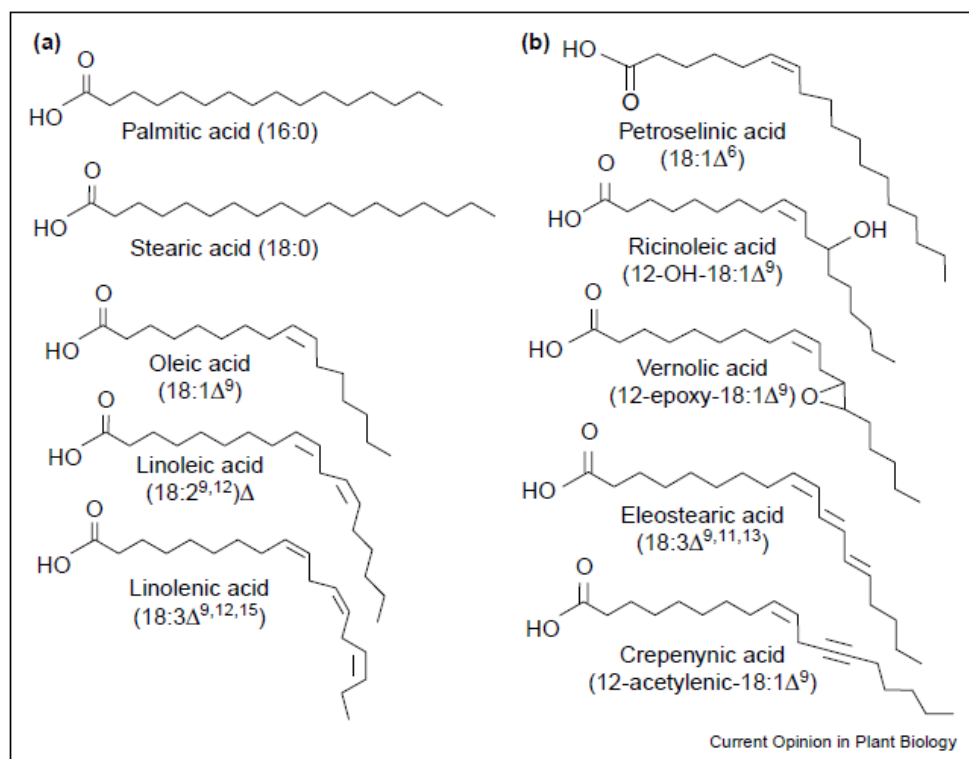


Figura 1 Diferentes tipos de Ácidos graxos. (A) Ácidos graxos usuais são encontrados na maioria das espécies oleaginosas e são abundantes em soja. (B) Ácidos graxos ditos como “não usuais” são encontrados em sementes de poucas espécies na natureza. O ácido ricinoléico (*Ricinoleic acid*) é o principal ácido graxo encontrado nas sementes de mamona (Fonte: Jaworski and Cahoon, 2003).

A maior parte do óleo vegetal produzido/extraído mundialmente está concentrado em quatro espécies, sendo elas a soja (*Glycine max*), dendê (*Elaeis guineenses*), canola/colza (*Brassica napus*) e o girassol (*Helianthus annuus*), que juntos somam quase 80% da produção total de óleo mundial (Dyer e Mullen, 2008). Devido à falta de ácidos graxos “não usuais” com valor industrial nessas espécies, e pelo fato de que elas não acumulam altos níveis de um único ácido graxo em seu óleo (o que facilitaria os processos a jusante, como a sua purificação), modificações genéticas vêm sendo testadas com o intuito de desvendar os processos e os genes envolvidos na produção de triglicerídeos em diversas espécies (Burgal *et al.*, 2008; Troncoso-Ponce *et al.*, 2011; Sharma e Chauhan, 2012).

1.1.1 Óleo de Soja

A soja (*Glycine max*) é uma variedade que foi trazida da Ásia para o Brasil no início do século XX, e se tornou uma das oleaginosas mais exploradas pelo nosso país. Embora seu grão seja rico em proteínas e muito utilizado para alimentação, ela é considerada atualmente a única oleaginosa cultivada com escala suficiente para geração de biodiesel (Beltrão e Oliveira, 2008). O óleo de soja compõe até 25% do peso seco de suas sementes, e é composto por ácidos graxos usuais. Ele é rico em ácido linoleico (55%), oleico (23%), palmítico (13%), linolênico (4,5%) e ácido esteárico (4%), embora as concentrações possam variar bastante devido a mudanças no ambiente, especialmente de temperatura (Beltrão e Oliveira, 2008; Rogalski e Carrer, 2011). Essa grande variação de FAs no óleo de soja acaba sendo também uma desvantagem para sua utilização na indústria, já que muitas vezes é necessário apenas um tipo de ácido graxo, demandando métodos de separação e processamento antes de sua aplicação (Dyer *et al.*, 2008).

1.1.2 Óleo de mamona

A mamona (*Ricinus communis*) também é uma espécie originária do continente asiático e é cultivada em diversos estados do Brasil. A semente desta oleaginosa é rica em ácido ricinoleico (90%), um ácido graxo “não usual” que tem alto valor industrial, servindo como matéria prima para a produção de tintas, plásticos, cosméticos, entre outros. O que diferencia o ácido ricinoleico dos ácidos graxos ditos como usuais é seu radical hidroxila no carbono 12, que lhe proporciona propriedades físico-químicas únicas, como uma maior solubilidade em álcool e alta viscosidade

(Beltrão e Oliveira, 2008). Outra característica importante do óleo de mamona é seu conteúdo na semente, que pode chegar a 60% de seu peso seco; entretanto, a semente da mamona contém ricina, uma das proteínas mais tóxicas do reino vegetal, além da 2S albumina, uma proteína alergênica. A presença dessas proteínas na semente dificulta a produção do óleo de mamona (Jaworski e Cahoon, 2003; He *et al.*, 2004).

1.2 Biossíntese de ácidos graxos e triglicerídeos em plantas

Em plantas, a síntese de ácidos graxos se inicia no cloroplasto, onde o acetil-CoA (molécula de 2 carbonos) é ativado a malonil-CoA pela acetil-CoA carboxylase, e transferido para a proteína carreadora de acila (ACP), formando o complexo malonil-ACP, o primeiro substrato do complexo ácido graxo sintase (Cagliari *et al.*, 2011). Neste complexo, a síntese *de novo* de ácidos graxos ocorre por uma série de adições de moléculas de acetil até a formação de ácidos graxos de 16, ou 18 carbonos (Figura 2, A). A ação de enzimas do tipo desaturases pode ocorrer nesse processo, adicionando uma ligação dupla no nono carbono, formando o ácido oleico (18:1 Δ^9). Em plantas que possuem ácidos graxos de cadeia curta/média (8-14 carbonos), encontrados no óleo de coco e palma, há a ação de tioesterases, que acabam clivando os ácidos graxos crescentes na acil-ACP, e terminando, assim, precocemente o alongamento da cadeia carbônica dos FAs (Dyer *et al.*, 2008). Após a dissociação dos ácidos graxos com a ACP, eles são exportados do cloroplasto e esterificados a acil-CoAs.

As reações que levam a síntese de glicerolípídeos (via de Kennedy) majoritariamente ocorrem no retículo endoplasmático (RE), onde as moléculas de acil-CoA são transferidas para o glicerol-3-fosfato na posição *sn*-1 pela glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT), gerando o ácido lisofosfatídico (LPA) (Voelker e Kinney, 2001). A enzima responsável pela segunda adição do grupamento acila, do acil-CoA, na posição *sn*-2 do LPA é a ácido lisofosfatídico aciltransferase (LPAT), formando o ácido fosfatídico (PA) (Figura 2, B). O próximo passo da via de Kennedy é a retirada do grupamento fosfato na posição *sn*-3 do PA, realizada pela enzima ácido fosfatídico fosfatase (PAP), gerando a molécula 1,2-diacilglicerol (DAG). O diacilglicerol é uma molécula central no metabolismo lipídico, pois pode ser utilizada para a formação de lipídeos de membrana como a fosfatidilcolina (PC), ou formar lipídeos de reserva, como os triglicerídeos. A formação de PC é muito importante para a síntese de ácidos graxos insaturados, já que é nesta molécula que

diversas ácido graxo desaturases (FAD2) atuam, levando a formação do ácido linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$), ou do ácido linolênico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$), por exemplo (Jaworski e Cahoon, 2003).

Há duas principais enzimas responsáveis pela formação de TAGs em plantas: a fosfolípido:diacilglicerol aciltransferase (PDAT), que utiliza fosfolípidos como co-substrato além de DAG, sendo acil-CoA independente, e a diacilglicerol aciltransferase (DGAT). Essa última enzima transfere o grupamento acila do acil-CoA para o DAG na posição *sn*-3, formando os triglicerídeos, e é considerada como a principal enzima para a formação de óleo (Turchetto-Zolet *et al.*, 2011).

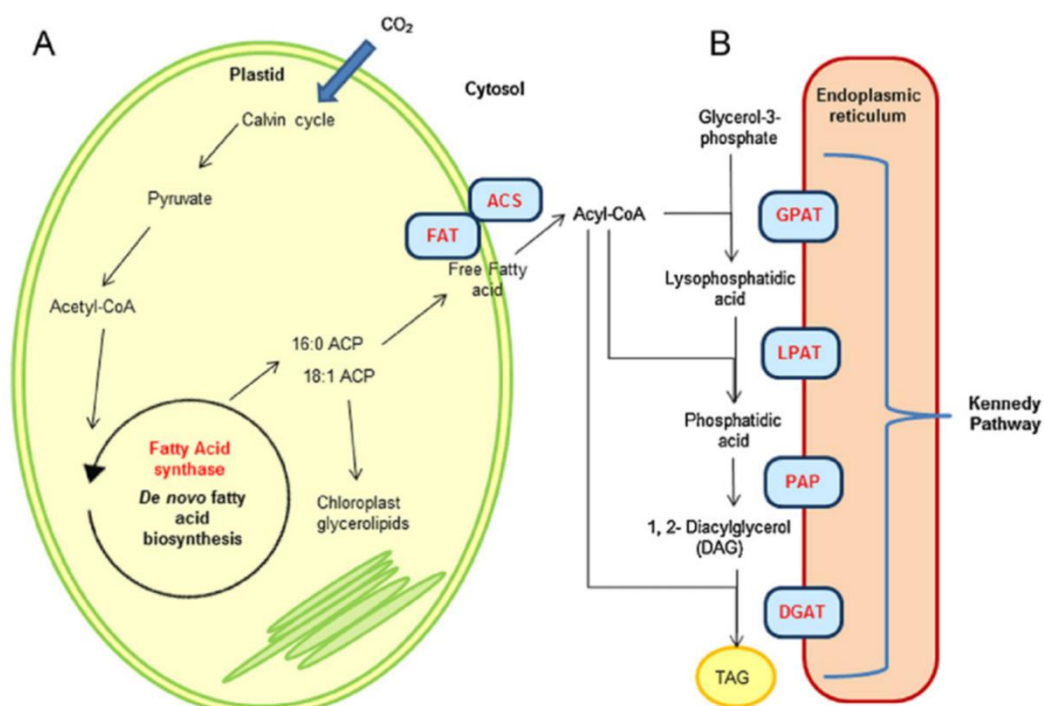


Figura 2 Biossíntese de ácidos graxos e triglicerídeos (TAGs). Ácidos graxos em plantas são formados *de novo* nos cloroplastos (A) e então exportados ao retículo endoplasmático (B), onde após uma série de esterificações, triglicerídeos são sintetizados. A diacilglicerol aciltransferase (DGAT) é considerada a enzima limitante para síntese de TAGs. FAT: Ácido graxo tioesterase; ACS: Acil-CoA sintetase; GPAT: Glicerol-3-fosfato aciltransferase; LPAT: Ácido lisofosfatídico aciltransferase; PAP: Ácido fosfatídico fosfatase. Adaptado de (Chen e Smith, 2012).

1.2.1 Enzimas do tipo Diacilglicerol Aciltransferase (DGAT)

Há pelo menos cinco tipos de DGATs (EC 2.3.1.20), nomeadas como DGAT1, DGAT2, DGAT3, DAcT e WS/DGAT. DGAT1 é a mais conhecida e bem caracterizada em animais e

plantas. Em mamíferos, essa enzima está ligada ao retículo endoplasmático e é sugerido que tenha várias atividades acil-transferase além da acilação de DAG, tais como acil-CoA:retinol aciltransferase, mono e diester cera sintase (Yen *et al.*, 2008). Além disso, essa proteína é o principal alvo para a busca de novos inibidores, já que a falta de sua função pode levar à redução de peso corpóreo (Yen *et al.*, 2008). Em plantas, DGAT1 também contém vários domínios transmembrana e parece ter um perfil de expressão mais amplo do que as outras isoenzimas DGAT, sendo expressa em vários tecidos vegetais, como flores, caules, folhas e sementes (Chen *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016). DGAT2 é outra enzima bem descrita, tendo homólogos também encontrados em fungos (Sandager *et al.*, 2002). Sua função parece ser essencial no metabolismo de lipídeos em camundongos e é expressa em vários tecidos, além do tecido adiposo marrom (Yen *et al.*, 2008). DGAT2 de plantas tem uma maior expressão durante o desenvolvimento de sementes em diversas espécies, especialmente em plantas contendo ácidos graxos “não usuais” (Kroon *et al.*, 2006; Burgal *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2013). DGAT2 é localizada em diferentes subdomínios do retículo endoplasmático quando comparada a DGAT1, indicando que suas funções não são redundantes (Shockey *et al.*, 2006).

Novas enzimas relacionadas à biossíntese de óleo e com atividade DGAT foram descritas nos anos recentes. A cera éster sintase/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase (WS/DGAT) é uma enzima bifuncional que exhibe tanto atividade acil-CoA:ácido graxo aciltransferase quanto atividade DGAT, e está presente em procariotos (Kalscheuer e Steinbüchel, 2003; Arabolaza *et al.*, 2008). Recentemente, uma WS/DGAT homóloga de *Arabidopsis thaliana* também foi caracterizada (Li *et al.*, 2008), e embora tenham sido identificados homólogos dessa proteína em outras espécies de plantas e algas, ainda se faz necessário a caracterização funcional dessas enzimas (Turchetto-Zolet *et al.*, 2016). Outra enzima que difere de DGAT1 e DGAT2 foi identificada por Durrett e colaboradores, em 2010, dos quais desvendaram qual era a enzima responsável pela produção do acetil-triglicerídeos (acTAGs) abundantes nas sementes de *Eonymus alatus* (Durrett *et al.*, 2010). Este tipo de triglicerídeo é interessante, pois possui baixa viscosidade e poderia ser aplicado diretamente na composição de biodiesel, evitando o processo de transesterificação. Essa enzima distinta identificada, nomeada como diacilglicerol acetiltransferase (DAcT), adiciona uma molécula de acetil na posição *sn*-3 do DAG. Além dessa atividade, a EuDAcT também acetila álcoois graxos *in vitro* (Bansal e Durrett, 2016). A expressão heteróloga dessa enzima levou a produção de 40% de acTAGs no óleo de *Arabidopsis*,

mostrando uma aplicação interessante dessa enzima na formação de óleos de baixa viscosidade para a produção de biocombustíveis (Durrett *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2017).

Estudando frações citosólicas de cotilédones em desenvolvimento de amendoim (*Arachis hypogaea*), Saha e colaboradores isolaram um novo tipo de diacilglicerol aciltransferase (Saha *et al.*, 2006). Essa enzima possui baixa identidade quando comparada a outras DGATs, e não apresenta domínios transmembranas, e por isso foi denominada como DGAT solúvel, ou apenas DGAT3. Hernández e colaboradores mostraram que a DGAT3 de *Arabidopsis* (AtDGAT3) está localizada no citoplasma, diferente da localização de AtDGAT1 (Hernández *et al.*, 2012). Desde então, homólogos de AtDGAT3 e AhDGAT3 têm sido estudadas em plantas a fim de entender a provável via alternativa de síntese de triglicerídeos, mas nenhum estudo apresentou caracterização profunda desta enzima em cultivares destinadas principalmente à produção de óleo (Cao *et al.*, 2013; Chi *et al.*, 2014). Nosso grupo demonstrou que os dois genes codificantes para GmDGAT3 (GmDGAT3A e GmDGAT3B) têm maior expressão comparado com as outras DGATs durante o desenvolvimento da semente de soja (Turchetto-Zolet *et al.*, 2016). Além disso, a DGAT3 de mamona (RcDGAT3) também é expressa em sementes e em outros tecidos (Brown *et al.*, 2012; Trenz, 2015). Porém, essas enzimas ainda não foram caracterizadas em detalhe visando entender os papéis funcionais desempenhados por elas no metabolismo de lipídeos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar funcionalmente as DGATs solúveis de soja e mamona via complementação de leveduras mutantes para síntese de TAGs, localização subcelular em folhas de *Nicotiana benthamiana* e expressão heteróloga em *Arabidopsis thaliana*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Analisar o padrão de localização subcelular dessas enzimas em células de *N. benthamiana*;
- b) Testar a funcionalidade dos genes DGAT através da expressão heteróloga em leveduras mutantes incapazes de sintetizar triglicerídeos;
- c) Testar a atividade metabólica destas enzimas através de ensaios de detoxificação de ácidos graxos livres em leveduras;
- d) Avaliar o perfil de ácidos graxos de sementes de *Arabidopsis thaliana* expressando RcDGAT3-CFP;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal, extração de RNA e síntese de cDNA

Arabidopsis thaliana Columbia-0 (*Wild Type*) e linhagens expressando RcDGAT3 (Trenz, 2015) foram crescidas por um período de 40 dias em sala de crescimento a 24°C com fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa. As partes aéreas de cinco plantas de cada linhagem foram coletadas, secadas por 72h em estufa a 70°C e pesadas para obter-se o peso seco.

Plantas de soja (*Glycine max*) foram crescidas a uma temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ em sala de crescimento pelo período de um mês, com fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro. As folhas foram coletadas e estocadas imediatamente em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído usando Trizol (Invitrogen). A síntese de cDNA foi realizada usando 1 μg de RNA livre de DNA, 200 unidades de Transcriptase reversa M-MLV (Promega) e oligo(dT), seguindo as recomendações do fabricante.

Plantas de *Nicotiana benthamiana* foram crescidas em sala de crescimento a 24°C com ciclos de 16/8h de luz/escuro e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa, por um período de 45 dias, quando as folhas estão bem expandidas e prontas para a Agroinfiltração.

3.2 Clonagem dos genes

Sequências codificantes dos genes GmDGAT3A (Glyma13g17860) e GmDGAT3B (Glyma17g04650) foram amplificados a partir de cDNA de folhas de soja, utilizando oligonucleotídeos (*primers*) específicos (Tabela 1) que continham o *stop* códon ou não. Os fragmentos amplificados foram clonados em vetores pENTR/D-TOPO com a finalidade de gerar clones de entrada para o sistema *Gateway* (Invitrogen). As sequências correspondentes aos genes foram confirmadas via sequenciamento. Para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* os CDS dos genes codificadores de GmDGAT3A e GmDGAT3B contendo o *stop-codon* foram subclonados a partir de pENTR para o plasmídeo pVT-U103 (Vernet et al, 1987; Figura 3) utilizando-se os sítios de restrição XbaI e XhoI para GmDGAT3A e XbaI e SalI para GmDGAT3B, que foram inseridos nos *primers* utilizados para o isolamento dos genes. Por expressar o gene URA3, o plasmídeo permite o crescimento em meio sem uracila em leveduras auxotróficas para este nutriente. Vetores de expressão em levedura contendo as CDS de

RcDGAT1, RcDGAT2 e RcDGAT3 foram previamente descritas em (Turchetto-Zolet *et al.*, 2011; Trenz, 2015).

Tabela 1 Primers utilizados para as clonagens

Nome	Sequência
GmDGAT3a_F_Xbal	5'-CACCTCTAGAATGGAGATCTCCGGCAGC-3'
GmDGAT3a_R_Sall_AA_STOP	5'-AAAAGTTCGACTCAAGTAGCTGTAGCTGCACCTATC-3'
GmDGAT3a_R_NO_STOP	5'-AGTAGCTGTAGCTGCACCTATCATA-3'
GmDGAT3b_F_Xbal	5'-CACCTCTAGAATGGAGATCTCCGGCACC-3'
GmDGAT3b_R_No_stop	5'-AGTAGCTGTAGCTGCACCTGCACC-3'

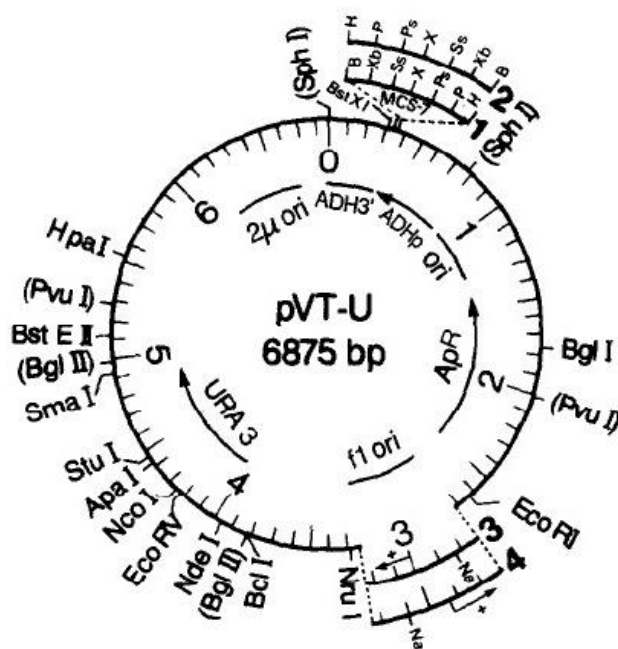


Figura 3 Mapa do Plasmídeo pVT-U. URA3: gene relacionado a síntese de uracila (codifica a orotidina 5'-fosfato descarboxilase); 2μ ori: origem de replicação em levedura; ADH3' e ADHp Ori: Promotor e região 3' da álcool desidrogenase; Ori: origem de replicação em bactéria; f1 ori: origem de replicação em fago; ApR: gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina. (Adaptado de Vernet et al., 1987).

Para expressão transiente em folhas de *N. benthamiana*, pENTR_GmDGAT3 com e sem stop códon foram clonados por recombinação em pEARLYGATE-104 e pEARLYGATE-

103(Earley *et al.*, 2006), respectivamente. pENTR_GmDGAT3B com *stop* códon foi também recombinado com pEARLYGATE-104 (Figura 4). Estes plasmídeos expressam GmDGAT3A, ou GmDGAT3B com fusões traducionais com GFP na C-terminal e YFP na N-terminal, respectivamente.

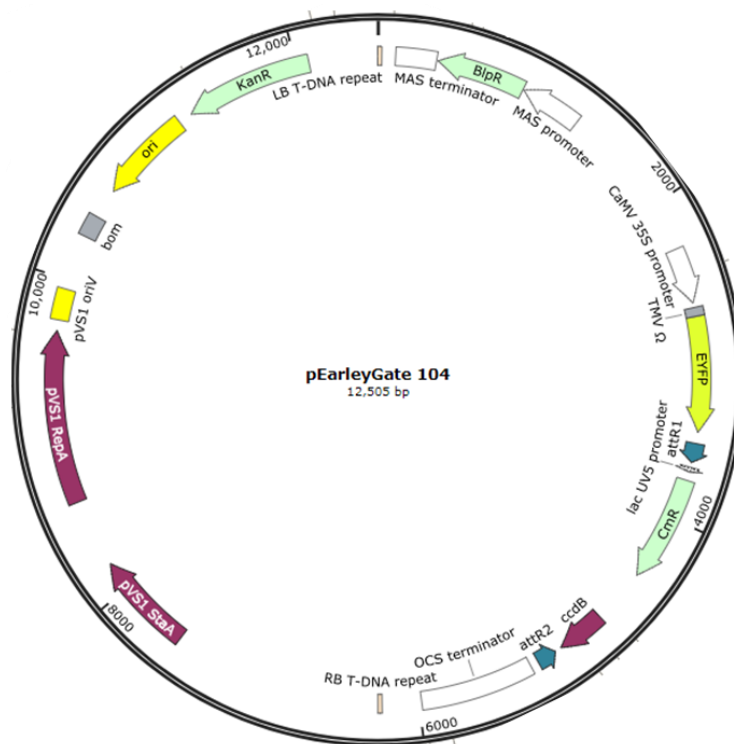


Figura 4 Mapa do plasmídeo pEARLYGATE-104. *attR1* e *attR2*: seqüências que permitem a recombinação específica do gene de interesse com o plasmídeo de entrada; *CmR*: gene de resistência ao antibiótico canamicina; *CaMV p35*: promotor 35S; *OCS terminator*: terminador do gene da octopina-sintase; *pVSI oriV*: origem de replicação em *Agrobacterium*; *ccdB*: gene que codifica a proteína *control of cell death B* ; *EYFP*: seqüência codificadora para YFP (Adaptado de: http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/plant_vectors/pEarleyGate_104/)

3.4 Teste de complementação em leveduras

Leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) mutantes da linhagem H1246, incapazes de sintetizar triglicerídeos devido a mutações nos genes *ARE1/ARE2/LRO1/DGA1* (genes que codificam enzimas que catalisam a síntese de triglicerídeos nesta espécie)(Sandager *et al.*, 2002), e transformadas como descrito por Turchetto-Zolet *et al.* (2011) com o vetor pVT-U103 (Vernet *et al.*, 1987) (Figura 3) contendo as seqüências codificadoras para GmDGAT3A e GmDGAT3B de soja, RcDGAT3 e RcDGAT1 (controle positivo) de mamona, foram utilizadas para testar a complementação de fenótipo. As leveduras foram cultivadas até a fase logarítmica (24 horas), ou

até a fase estacionária (72 horas) a 30°C em meio de cultura mínimo contendo 0,67% de *Yeast Nitrogen Base* (Merck), 2% de glicose, e drop out de aminoácidos sem uracila. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas e ressuspensas em 1 mL de 0.9% (m/v) de cloreto de sódio (NaCl). As células foram homogeneizadas com um volume igual de *beads* de vidro (0,5 mm), em vortex intenso por 5 min. Os lipídeos foram extraídos com uma mistura de clorofórmio/metanol/0,9% NaCl em água (2: 1: 1 v/v/v). A fase orgânica foi coletada, seca e ressuspensa em 20 µL de clorofórmio. Os lipídeos extraídos foram aplicados em placas de sílica gel para cromatografia de camada delgada (Merck) utilizando como fase móvel uma solução de hexano/éter dietílico/ácido acético (80:20:1 v/v/v) (Pan *et al.*, 2013). As placas foram visualizadas utilizando vapor de iodo. Óleo de soja foi utilizado como padrão para identificar TAGs.

Para teste de complementação utilizando ácidos graxos, ácido linoleico e ácido linolênico (Sigma), os mesmos foram primeiramente dissolvidos em etanol para uma concentração de 0,5 M. As soluções de ácidos graxos então eram dissolvidas primeiramente em uma solução de etanol contendo 0,05% Triton X-100 e então misturados ao meio de cultura, como descrito acima. O Triton X-100 é um surfactante não iônico que foi utilizado para dispersar os ácidos graxos no meio de cultura. As suspensões de leveduras foram diluídas para uma OD₆₀₀ inicial de 0.1, suplementadas com 0,2 mM de ácido linoleico ou ácido linolênico, crescidas por 72h a 30°C, e seus lipídeos extraídos e analisados como descrito acima.

Para o teste de lipotoxicidade, os diferentes fenótipos de levedura foram analisados. Primeiramente, as leveduras foram cultivadas em meio sem suplementação de ácidos graxos até uma OD₆₀₀ de 2.2 ± 0.2 . Após, 10 µL das diferentes culturas foi adicionado nas placas contendo ácido linoleico, ou ácido linolênico, com diferentes concentrações dos ácidos graxos (0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM). Diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram feitas com essas culturas e uma alíquota de 10 µL de cada diluição foi aplicada nas placas contendo ou não os ácidos graxos. Leveduras H1246 transformadas com vetor vazio (pVT-U103) e expressando RcDGAT1 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. As leveduras foram cultivadas a 28°C por 7 dias.

3.5 Teste *in vivo* usando *Nile red*

Leveduras foram crescidas até a fase estacionária (72 horas) e o ensaio de fluorescência de *Nile red* foi realizado como descrito em Siloto (Siloto *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2013). Após as medições de fluorescência, células foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Imager 2) no filtro *Spectrum Orange*.

3.6 Análise de lipídeos totais de *A. thaliana* expressando RcDGAT3-CFP

Folhas de *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (*Wild Type*) e linhagens expressando RcDGAT3 (Trenz, 2015) foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas. Para extração de lipídeos totais, 35 mg (peso seco) de folhas maceradas foram utilizados (Li-Beisson *et al.*, 2010). Alíquotas de 1 mL da fase orgânica foram utilizadas para realização da TLC, como descrito acima. Outras alíquotas de 1 mL foram utilizadas para fazer a estimativa de lipídeos totais. Este experimento foi feito via pesagem por diferença, com tempo de secagem da fase orgânica de 24 h a 37°C. Após a pesagem, amostras eram normalizadas pelo volume inicial e os valores foram convertidos para 100 mg de peso seco. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas.

3.7 Expressão transiente em folhas de *N. benthamiana* e localização subcelular

A expressão transiente em folhas de *N. benthamiana* foi realizada como descrito em (Sparkes *et al.*, 2006). *Agrobacterium tumefaciens* (linhagem EHA105) contendo os vetores binários pEARLYGATE-103_GmDGAT3A, pEARLYGATE-104_GmDGAT3B, ou pH7CWG2_RcDGAT3 (Trenz, 2015) foram co-infiltrados com *A. tumefaciens* (linhagem LBA4404) contendo o vetor binário pB7WGR2-RNTLB (Sparkes *et al.*, 2010), com uma razão na densidade óptica (OD₆₀₀) de 2:1. Este último plasmídeo contém a sequência codificadora para *Reticulon-Like Protein B13* (RNTLB13), uma proteína de retículo endoplasmático, tradicionalmente fusionada com a proteína fluorescente vermelha (RFP). A expressão transiente da fluorescência foi visualizada por microscopia de fluorescência confocal, no Centro de Microscopia da UFRGS (<http://www.cme.ufrgs.br/>) no equipamento Olympus FV1000, utilizando os filtros para GFP, YFP, CFP e RFP para a detecção das proteínas tradicionalmente fusionadas com as diferentes proteínas fluorescentes.

Plantas de *A. thaliana* expressando RcDGAT3-CFP foram visualizadas por microscopia de fluorescência confocal (Olympus FV1000), utilizando o filtro específico para CFP.

3.8 Análise do óleo de sementes de *A. thaliana* expressando DGAT3-CFP

Sementes (aproximadamente 50 mg) de linhagens 35S:DGAT3-CFP de *A. thaliana* foram adicionadas a uma solução contendo 1 mL 5% de ácido sulfúrico (H₂SO₄) em metanol (v/v), 50 µg de hidroxitolueno butilado (BHT) e 300 µL de tolueno. As amostras foram agitadas intensamente, aquecidas a 85°C por 1,5 hrs e, em seguida, as fases foram separadas com o auxílio de um funil de decantação. A fase orgânica foi então transferida para um novo tubo, onde foi evaporada utilizando nitrogênio (Li-Beisson *et al.*, 2010). As amostras foram ressuspensas em 500 µL de hexano e 1 µL foi aplicado no cromatógrafo a gás (Modelo CG 2010, Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com injetor automatizado, detector de ionização em chama usando coluna capilar de sílica fundida (SBL 100, Shimadzu, 30 m x 0.25 mm, 0.25 mm de espessura). O solvente para lavagem utilizado foi o hexano e a temperatura de injeção foi de 240°C. O gás carreador foi o hidrogênio com injeção constante de 1 mL min⁻¹. A detecção foi realizada a partir do espectrofotômetro por ionização em chama (FID), em uma temperatura de 260°C com taxa de injeção de gás de hidrogênio de 40 mL min⁻¹ e ar de 400 mL min⁻¹. A temperatura inicial do forno foi ajustada para 50°C por 1 min e aquecida até os 250°C em um gradiente de 10°C min⁻¹. Cromatogramas foram analisados com base em suas áreas e tempos de retenção. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas biológicas.

Alternativamente, o perfil de ácidos graxos das sementes de *Arabidopsis* expressando RcDGAT3-CFP foi analisado por cromatografia líquida de alta performance com fluorescência induzida por laser (HPLC-LIF) (Rodrigues, 2018). Resumidamente, as sementes foram moídas, pesadas (10 mg) e extraídas com 2 mL de hexano a 60°C. Após extração, ocorre uma etapa de hidrolisação com Lypozyme TL (Novozymes Latin America) e os ácidos graxos são submetidos à derivatização com a molécula fluorescente MPAC-Br. MPAC-ésteres são separados em uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4.6 mm) a 30°C por eluição em gradiente. As fases móveis são compostas por metanol:tris/acetado (90:10, v/v, fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B), e o gradiente é programado para alternar entre as duas fases móveis por uma hora, em um fluxo de 1.5 mL/min. A análise dos MPAC-ésteres foi feita a 405 nm. Este método foi desenvolvido por (Rodrigues, 2018).

3.8 Alinhamento das sequências proteicas

As sequências proteicas de AhDGAT3-2 (AAX62735.1), AhDGAT3-3 (KC736067) de amendoim, AtDGAT3 (AAP21223.1) de *Arabidopsis* e RcDGAT3 (EEF43203.1) de mamona foram obtidas no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). As sequências foram alinhadas usando o software Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e transferidas para o software GeneDoc para melhor visualização. Os domínios conservados, como descritos por Chi *et al.* (2014), foram utilizados no alinhamento.

4 RESULTADOS

4.1 Análise fenotípica de plantas de *Arabidopsis thaliana* expressando de forma heteróloga RcDGAT3 de mamona

Transformantes de *Arabidopsis thaliana* expressando de forma heteróloga RcDGAT3-CFP de mamona foram obtidas usando o plasmídeo pH7CWG2. Foram obtidos inicialmente 10 eventos de transformação independentes, nos quais as plântulas expressavam o transgene tanto em nível de mRNA quanto de proteína, dos quais foram detectados na terceira geração (T3)(Trenz, 2015). Para verificar se a expressão do transgene afetaria o fluxo de carbono dessas plantas, retardando seu crescimento em prol da síntese de triglicerídeos, análises fenotípicas foram realizadas. Como visto na Figura 5, plantas que expressam a DGAT solúvel de mamona não tiveram diferença em seu peso seco ou na quantidade de lipídeos totais em suas folhas em relação às plantas do tipo selvagem (Figura 5, A e B). Além disso, experimentos de coloração com Sudan III e Steinmetz não revelaram nenhuma diferença entre as linhagens, assim como número de folhas e estrutura das rosetas (dados não mostrados).

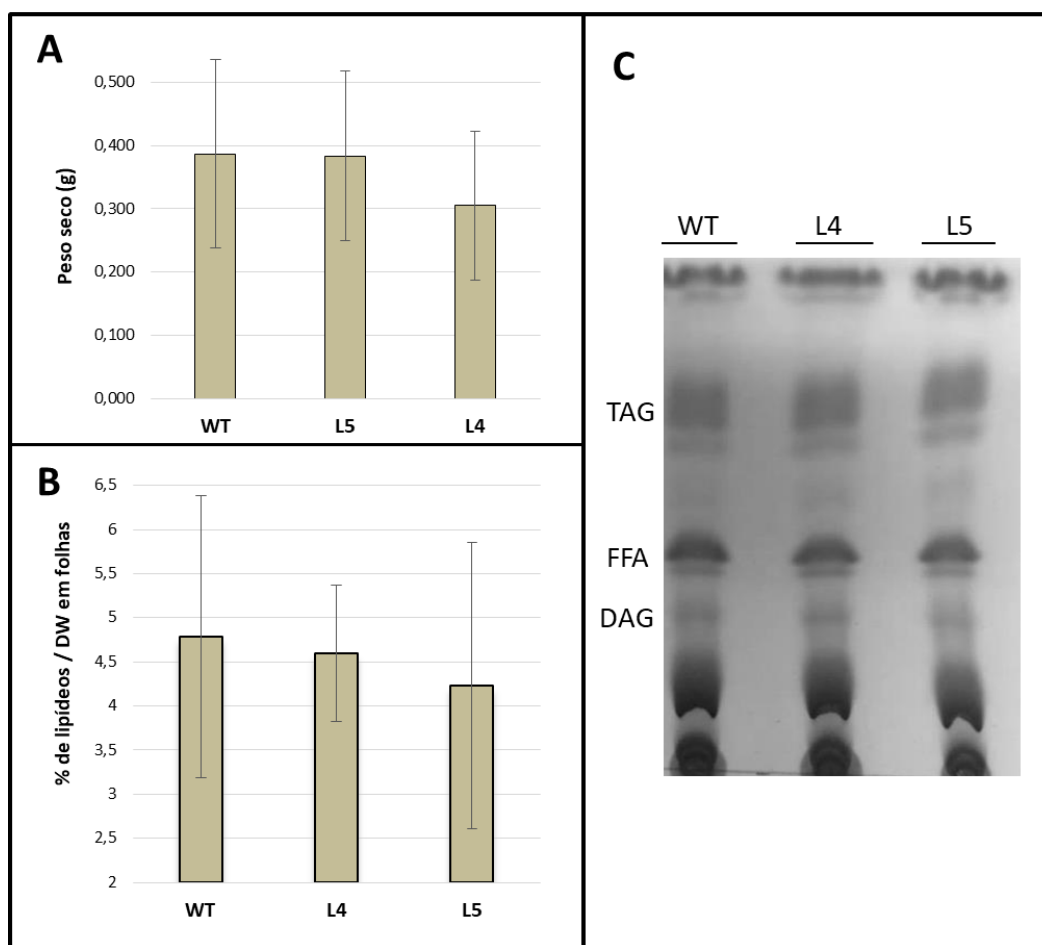


Figura 5: Caracterização das plantas de *Arabidopsis* expressando RcDGAT3-CFP em relação as WT. A) Peso seco de plantas de *Arabidopsis* expressando RcDGAT3-CFP (L5 e L4) e do tipo selvagem (WT). **B)** Porcentagem de lipídeos totais pelo peso seco de folhas de *Arabidopsis* expressando, ou não, RcDGAT3-CFP. **C)** TLC dos lipídeos totais de folhas das plantas em descritas em (B).

Para uma análise de quais espécies de lipídeos poderiam estar sendo formadas nas folhas dessas plantas, uma cromatografia de camada delgada foi realizada (Figura 5, C). Nenhuma diferença foi observada entre as plantas que expressam RcDGAT3-CFP e as do tipo selvagem.

Como as sementes são os tecidos que mais acumulam triglicerídeos em plantas (Chen *et al.*, 2007), foi realizada a análise do perfil de ácidos graxos das sementes de plantas expressando RcDGAT3-CFP. Os resultados mostram que não há diferença no perfil de ácidos graxos entre as plantas transgênicas e as plantas do tipo selvagem (Figura 6, A). Para uma maior confiabilidade neste resultado, outras linhagens homozigotas de plantas expressando RcDGAT3-CFP foram selecionadas por sua resistência à higromicina em meio seletivo, e utilizando um método

analítico diferente (HPLC-LIF), o perfil de ácidos graxos dessas linhagens foi caracterizado (Figura 6, B). Novamente, não foi observada nenhuma diferença entre as plantas transgênicas e as selvagens na composição de seus ácidos graxos.

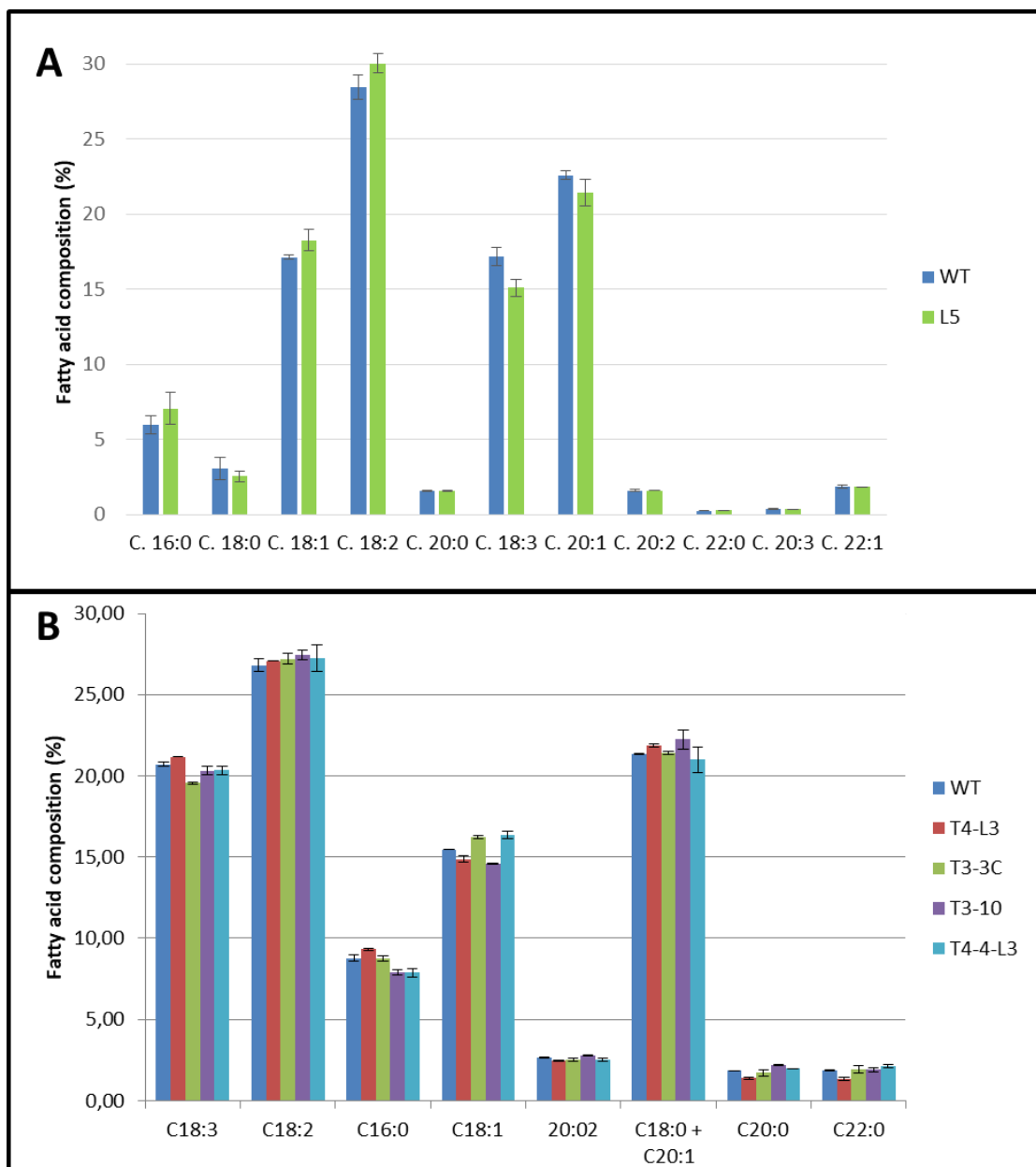


Figura 6: Composição de ácidos graxos nas sementes de *Arabidopsis* expressando RcDGAT3-CFP e nas plantas do tipo selvagem. A) Análise de plantas expressando RcDGAT3-CFP na geração T3 via GC-FID. B) Análise do perfil de ácidos graxos de diferentes linhagens expressando RcDGAT3-CFP de mamona via HPLC-LIF. Eixo vertical indica o percentual de cada ácido graxo, e o eixo horizontal indica os diferentes ácidos graxos. WT: sementes do tipo selvagem; T3: sementes transgênicas na geração T3; T4: sementes transgênicas na geração T4.

4.2 Leveduras mutantes H1246 expressando de forma heteróloga RcDGAT3 de mamona são incapazes de recuperar a síntese de triglicerídeos

O ensaio de fluorescência com *Nile red* em leveduras mutantes para a síntese de triglicerídeos (H1246) mostrou que as leveduras complementadas tanto RcDGAT3, quanto com RcDAcTA não possuíam fluorescência significativamente diferente em relação a transformada com o vetor vazio (Trenz, 2015). Leveduras da linhagem H1246 são capazes de produzir ácidos graxos e DAGs, mas não triglicerídeos (Sandager *et al.*, 2002), o que as torna uma interessante ferramenta para estudo de complementação de fenótipo. O fluoróforo *Nile red* é capaz de se ligar em lipídeos, e também se mostrou uma ferramenta útil para estudos com o objetivo de se identificar lipídeos neutros, e sua fluorescência está correlacionada com a atividade DGAT (Siloto *et al.*, 2009). Embora houvesse bandas correspondentes à formação de triglicerídeos na cromatografia de camada delgada com as leveduras H1246 expressando RcDGAT3 e RcDAcTA (Trenz, 2015), novas bateladas foram realizadas para confirmar o experimento; porém, utilizou-se dessa vez uma nova proporção na solução da fase móvel, para que houvesse uma melhor separação entre as espécies de lipídeos. Como visto na Figura 7-A, tanto RcDGAT3 e RcDAcTA são incapazes de recuperar o fenótipo de biossíntese de triglicerídeos nestas leveduras. Quando *Nile red* é adicionado no meio de cultura contendo estes micro-organismos, e uma alíquota dos mesmos é levada ao microscópio de fluorescência, é possível identificar a formação de corpos lipídicos (*oil bodies*) nas leveduras *wild type* (G175). Entretanto, não há formação de *oil bodies* nas leveduras mutantes que expressam RcDGAT3 (Figura 7, B).

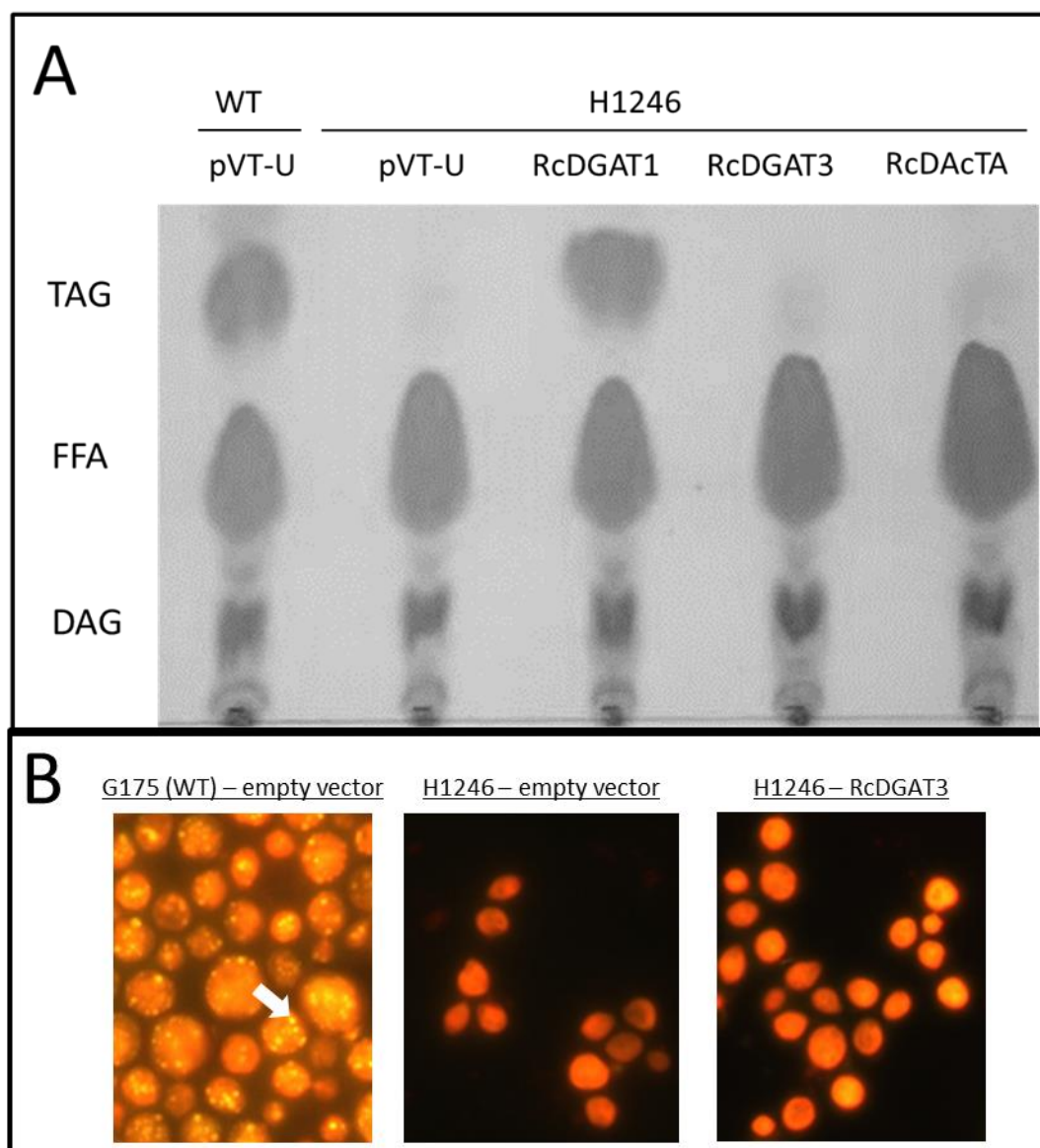


Figura 7 Complementação leveduras mutantes para síntese de TAGs com RcDGAT3. A) Cromatografia de camada delgada (TLC) do extrato lipídico de leveduras WT (tipo selvagem), ou leveduras mutantes para a síntese de triglicerídeos (H1246). As células foram transformadas com o vetor vazio (pVT-U), ou com plasmídeos de expressão contendo a sequência codificadora para RcDGAT1, RcDGAT3, ou RcDAcTA. B) As leveduras foram levadas ao microscópio de fluorescência após a adição de *Nile red*. A seta branca indica a presença de corpos lipídicos nas células do tipo selvagem. TAG: Triglicerídeos; FFA: Ácidos graxos livres; DAG: Diacilglicerol.

4.3 GmDGAT3A e GmDGAT3B de soja expressas de forma heteróloga em leveduras mutantes H1246 são incapazes de recuperar síntese de triglicerídeos

A soja é outra oleaginosa de alto valor agrônômico, e as DGAT solúveis dessa espécie também são expressas durante o desenvolvimento da semente. Para compreender melhor a função dos genes putativos das DGAT solúveis de soja, as CDS de GmDGAT3A e GmDGAT3B foram

amplificadas a partir do cDNA de folhas de soja e clonadas com o auxílio de enzimas de restrição em plasmídeos de expressão para um teste de complementação de fenótipo, utilizando leveduras da linhagem H1246. A expressão heteróloga dos genes de soja nessas leveduras por 72h (fase estacionária) não resultou em síntese de triglicerídeos (Figura 8, A). O ensaio para verificar o acúmulo de lipídeos neutros *in vivo*, utilizando o fluoróforo *Nile red*, também não demonstrou diferença significativa entre o vetor vazio (pVT-U103) e as leveduras carregando GmDGAT3A, ou GmDGAT3B (Figura 8, B e C), indicando que esses genes são incapazes em complementar o fenótipo das leveduras mutantes.

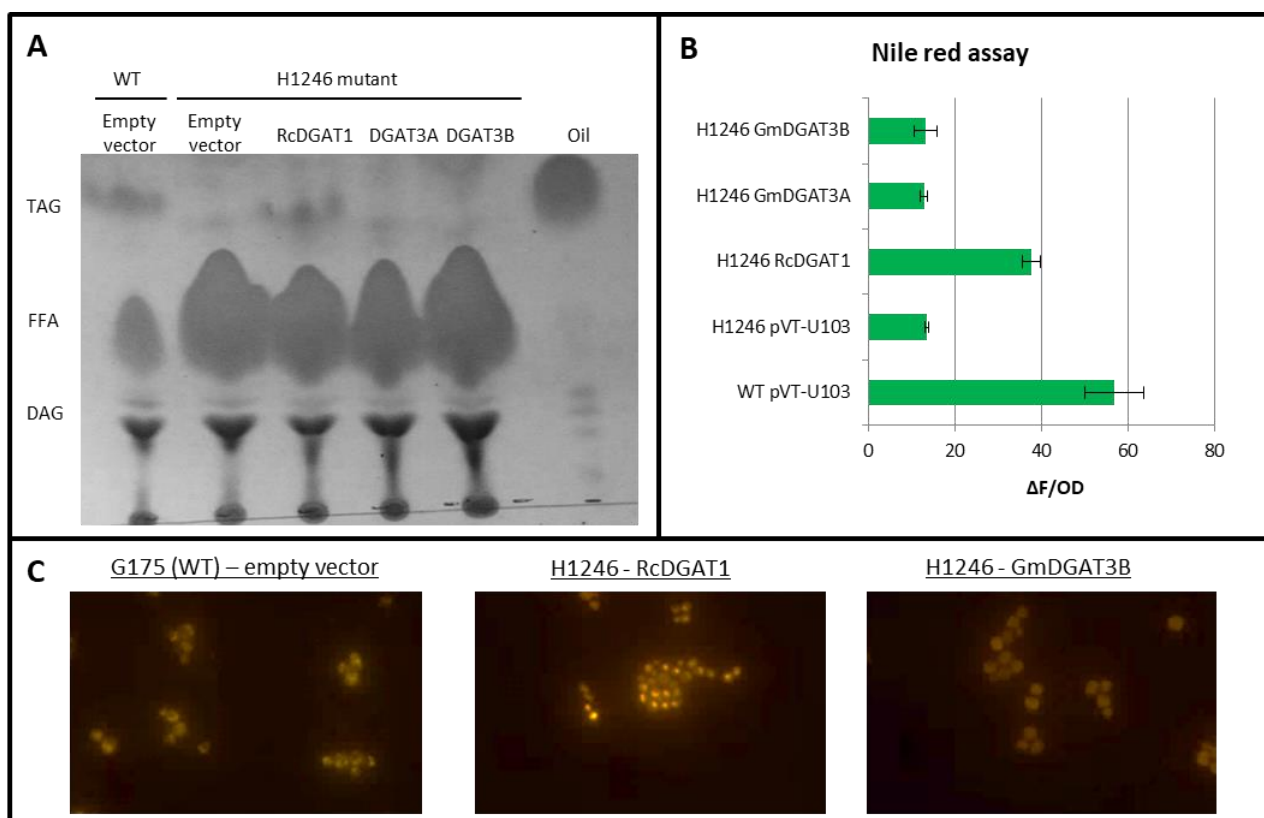


Figura 8 Ensaio de complementação usando leveduras mutantes incapazes de produzir óleo. A) Cromatografia de camada delgada (TLC) do extrato lipídico de leveduras WT (tipo selvagem), ou leveduras mutantes para a síntese de triglicerídeos (H1246). As células foram transformadas com o vetor vazio (pVT-U), ou com plasmídeos de expressão contendo a sequência codificadora para RcDGAT1 (controle positivo), GmDGAT3A, ou GmDGAT3B. B) Atividade de DGAT *in vivo* utilizando o ensaio de fluorescência de *Nile red* em leveduras mutantes H1246. Eixo horizontal representa a diferença de fluorescência pré e pós adição do *Nile red*, dividido pela OD₆₀₀. C) Células de (B) foram visualizadas no microscópio de fluorescência. TAG: Triglicerídeos; FFA: Ácidos graxos livres ; DAG: Diacilglicerol; Oil: óleo de soja.

4.4 Ensaio de complementação do fenótipo mutante de leveduras H1246 com DGATs solúveis de soja na presença de ácidos graxos poliinsaturados

Uma das grandes características dos triglicerídeos de diversas espécies oleaginosas é a presença de ácidos graxos insaturados em sementes (Tvrzicka *et al.*, 2011). No entanto, as leveduras produzem apenas traços de tais ácidos graxos (Daum *et al.*, 1998; Sandager *et al.*, 2002). Como GmDGAT3A e GmDGAT3B são expressas em sementes de soja (Turchetto-Zolet *et al.*, 2016), hipotetizou-se que os substratos dessas enzimas não estejam presentes nas leveduras H1246, e por este motivo não produzissem TAGs apesar da expressão dos genes de soja, GmDGAT3A e GmDGAT3B. Para reverter tal efeito, ácido linoleico (18:2) e ácido linolênico (18:3) (ácidos graxos encontrados em sementes de soja) foram adicionados no meio de cultura das leveduras durante os ensaios de complementação. Mesmo com a adição de tais FA, ambas DGATs solúveis de soja (GmDGAT3A e GmDGAT3B) foram incapazes de complementar o fenótipo mutante das leveduras (Figura 9). Como mostrado por (Turchetto-Zolet *et al.*, 2011), RcDGAT2 é uma enzima incapaz de recuperar tal fenótipo em meio de cultura mínimo; entretanto, quando suplementadas com ácido linoleico ou ácido linolênico, leveduras expressando RcDGAT2 foram capazes de produzir triglicerídeos (Figura 9).

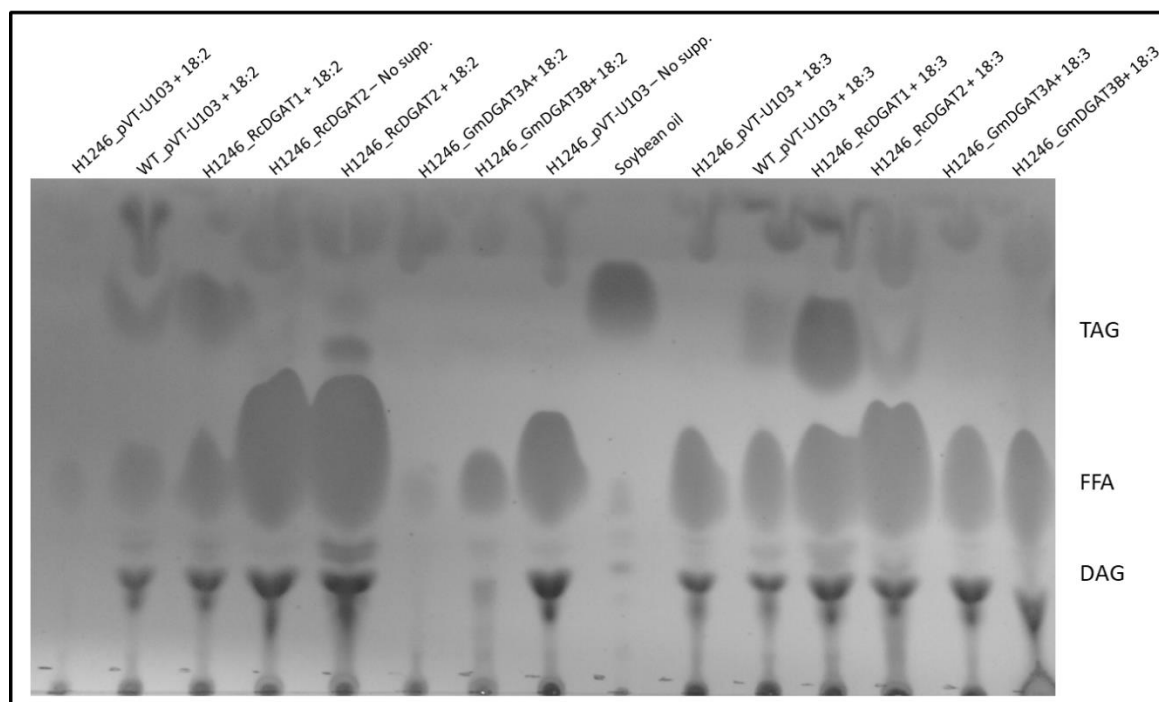


Figura 9 Ensaio de complementação em leveduras H1246 com suplementação de ácidos graxos. Cromatografia de camada delgada (TLC) do extrato lipídico de leveduras WT (tipo selvagem), ou leveduras mutantes para a síntese de triglicerídeos (H1246), expressando diferentes DGATs (RcDGAT1, RcDGAT2, GmDGAT3A, ou GmDGAT3B). Leveduras foram crescidas na presença de 0,2 mM de ácido linoleico (18:2), ou ácido linolênico (18:3).

4.5 Lipotoxicidade em leveduras mutantes via suplementação de ácidos graxos livres e recuperação do efeito inibitório via produção de triglicerídeos

A adição de ácidos graxos livres no meio de cultura em leveduras H1246 pode retardar a taxa de crescimento das células, via efeitos de toxicidade como permeabilização das membranas, produção de espécies reativas de oxigênio e estresse no retículo endoplasmático (Weinberg, 2006; Siloto *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2013). Uma das maneiras das leveduras contornarem esse efeito é convertendo os ácidos graxos em triglicerídeos. Inicialmente, foram plaqueados os diferentes genótipos de leveduras em diluições seriadas em meio seletivo para avaliar o crescimento padrão das células, onde não havia adição de ácidos graxos (Figura 10). Para avaliar os efeitos causados pelo ácido linoleico e o ácido linolênico, estes foram adicionados no meio de cultura em três diferentes concentrações (0,1, 0,5 e 1 mM) e as leveduras foram crescidas por sete dias. De modo geral, o ácido linoleico parece ter um efeito inibitório maior do que o ácido linolênico, independente do genótipo/concentração utilizado (Figura 11). Leveduras do tipo selvagem, contendo o vetor vazio, conseguem tolerar concentrações baixas de ambos ácidos graxos, mostrando crescimento levemente retardado; porém, em concentrações maiores, as leveduras não se desenvolveram nos pontos com maior diluição de células, indicando um efeito de lipotoxicidade causada pela suplementação de ácidos graxos (Figura 11).

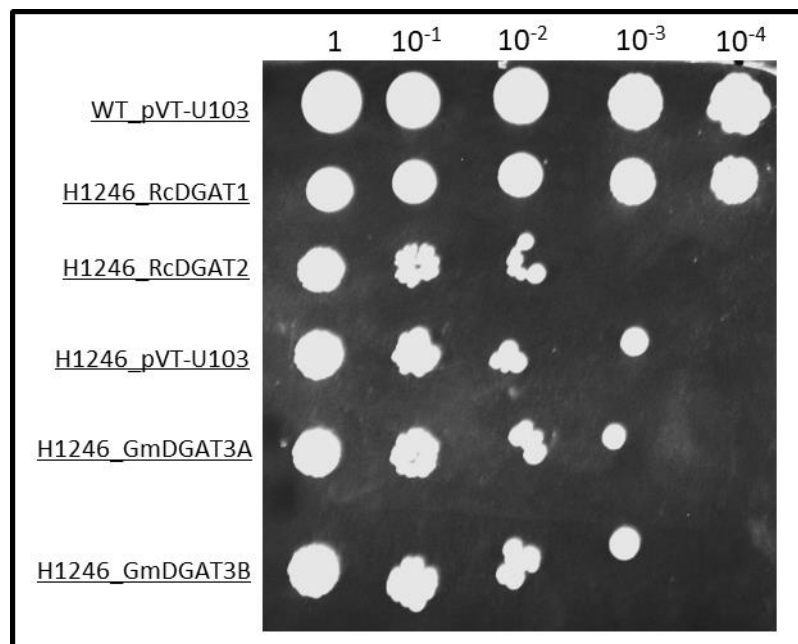


Figura 10 Crescimento de leveduras em meio seletivo. Leveduras expressando genes de DGAT foram crescidas por 7 dias em meio seletivo (sem uracila), na ausência de ácidos graxos. O crescimento das leveduras é demonstrado pela aplicação de 10 μ L de cada diluição (1 a 10⁻⁴, da esquerda para direita) das leveduras recombinantes (H1246), ou do tipo selvagem (WT). pVT-U103: vetor vazio.

As leveduras mutantes expressando RcDGAT1 desenvolveram-se em qualquer concentração de ácidos graxos, apresentando retardamento em seu crescimento apenas quando submetidas a 1mM de ácido linoleico (Figura 11), indicando que esta enzima consegue reverter o fenótipo de lipotoxicidade causada pela adição de ácidos graxos. Curiosamente, as leveduras H1246 expressando RcDGAT2 também conseguiram se desenvolver na presença dos ácidos linoleico e linolênico. Além disso, o crescimento das leveduras expressando RcDGAT2 foi igual ou superior na presença do ácido linolênico, dependendo da concentração no meio; entretanto, seu crescimento foi altamente inibido na presença de 1mM de ácido linoleico no meio de cultura (Figura 11). As leveduras mutantes contendo as construções para GmDGAT3A, ou GmDGAT3B (DGAT solúveis de soja) tiveram seu crescimento inibido na presença dos ácidos graxos, principalmente na presença do ácido linoleico (Figura 11).

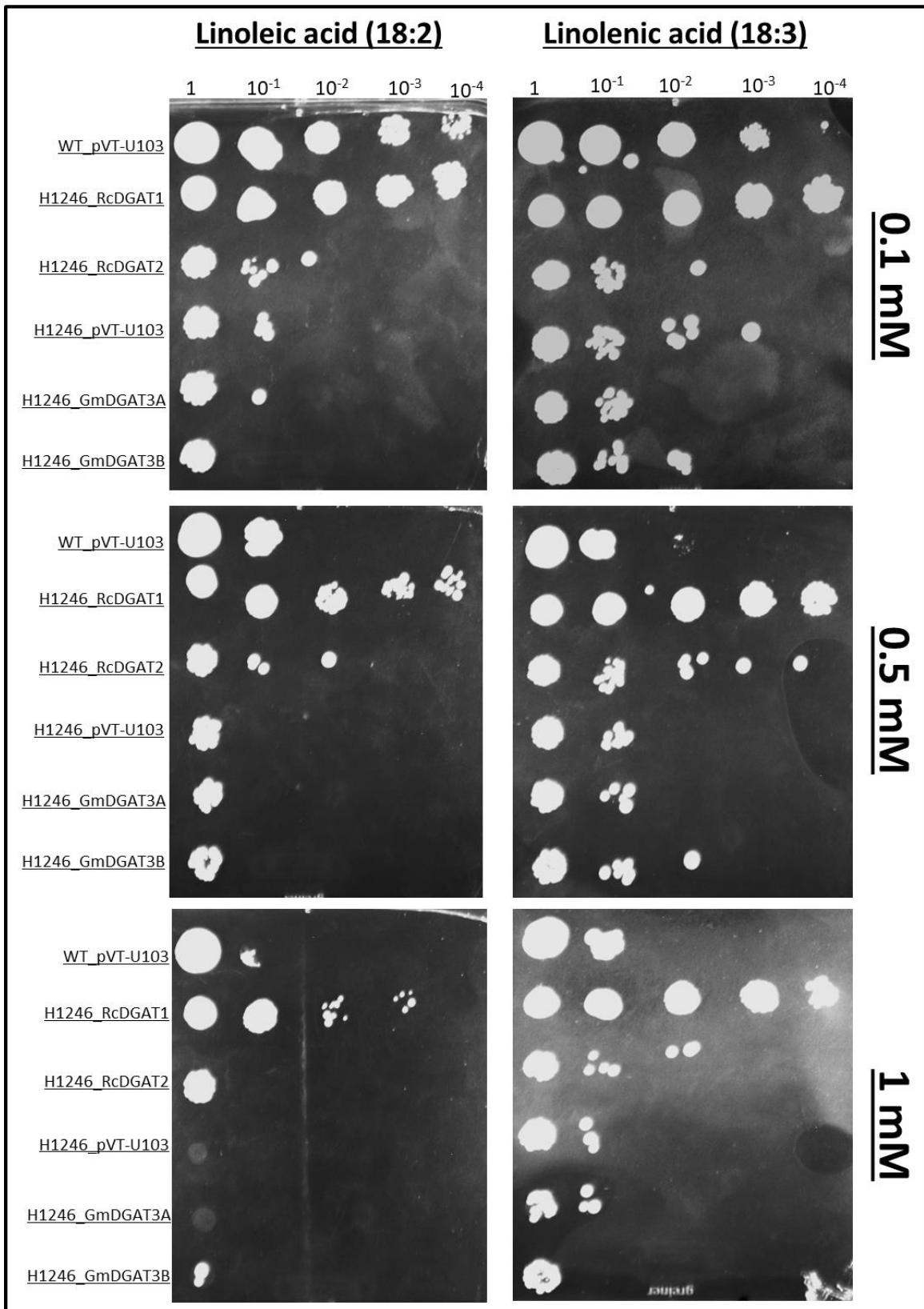


Figura 11 Resgate do fenótipo de lipotoxicidade em células H1246. Leveduras expressando diferentes genes de DGAT foram crescidas por sete dias em meio seletivo (sem uracila), na presença de ácido linoleico (18:2), ou ácido linolênico (18:3), em diferentes concentrações (0,1, 0,5 e 1mM). O crescimento das leveduras é demonstrado pela aplicação de 10µL de cada diluição (1 a 10⁻⁴, da esquerda para direita) das leveduras recombinantes (H1246), ou do tipo selvagem (WT). pVT-U103: vetor vazio.

4.6 RcDGAT3-CFP localiza-se em estruturas *dot-like* no citoplasma de células de folhas.

Para confirmar a localização subcelular da DGAT solúvel de mamona, já descrita como citoplasmática (Trenz, 2015), folhas de *Arabidopsis* expressando RcDGAT3-CFP foram levadas ao microscópio confocal e sua localização avaliada. A maior intensidade de fluorescência da CFP estava concentrada em pontos fora do cloroplasto (Figura 12, A e B). Quando folhas de *N. benthamiana*, expressando transientemente a mesma construção, foram visualizadas no microscópio confocal, um padrão muito similar foi observado (Figura 12, C). O padrão de localização em estruturas *dot-like* de RcDGAT3-CFP parece ser citosólica, sem estar embebida no retículo endoplasmático como as outras DGATs (Figura 12, C).

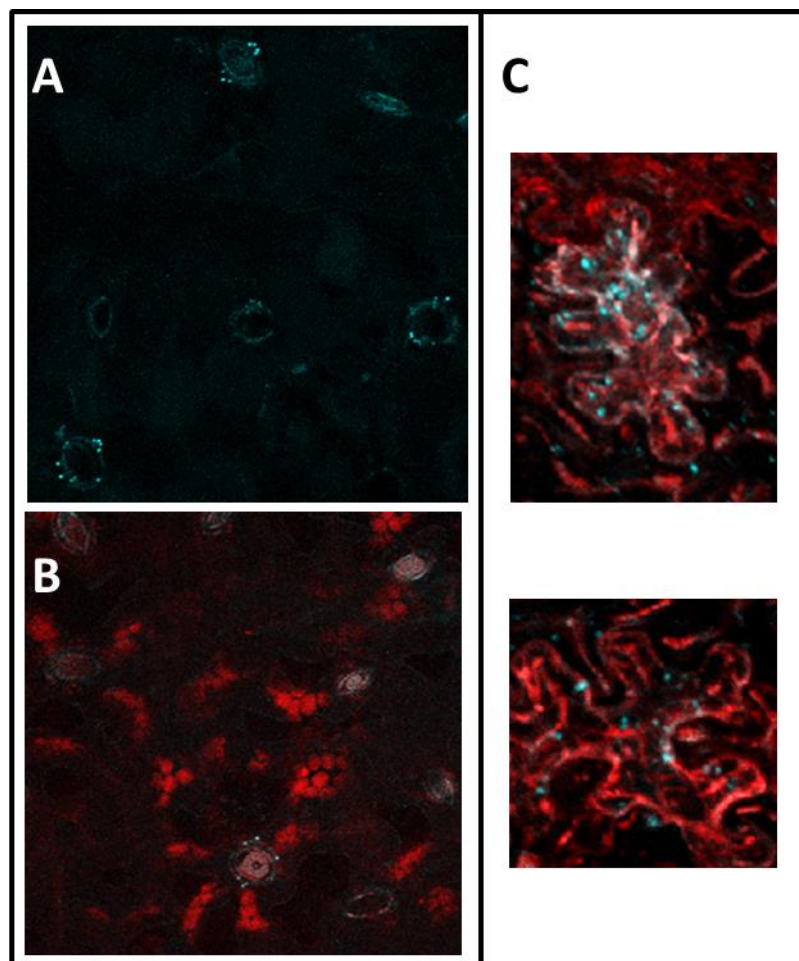


Figura 12 RcDGAT3-CFP está localizada em estruturas *dot-like* em células de folhas. A) Imagem de folha de *Arabidopsis thaliana* expressando RcDGAT3-CFP, utilizando-se apenas o filtro para CFP. B) Imagem de folha de *Arabidopsis thaliana* expressando RcDGAT3-CFP, utilizando o filtro para CFP e a autofluorescência dos cloroplastos (vermelho). C) Overlay de imagens de folhas de *N. benthamiana* expressando transientemente RcDGAT3-CFP e RNTLB13-RFP (proteína de retículo endoplasmático, em vermelho).

4.7 DGATs solúveis de soja têm diferentes localizações subcelulares

Os glicerolípídeos são principalmente sintetizados no retículo endoplasmático e as enzimas GmDGAT1 e GmDGAT2 de soja também são localizadas nessa organela (Chen *et al.*, 2016). Uma das características das proteínas DGAT3 é a falta de domínios transmembrana, o que indica uma localização diferente das outras DGATs. Por isso, a localização subcelular de ambas GmDGAT3A e GmDGAT3B foi examinada por expressão transiente em folhas de *N. benthamiana*, contendo construções traducionalmente fusionadas com proteínas fluorescentes. YFP-GmDGAT3B parece estar localizada por toda a célula e tem co-localização parcial com as membranas do RE assim como RTNLB13-RFP (Figura 13, A). Por outro lado, GmDGAT3A tem

uma distribuição diferente dentro das células de *N. benthamiana*, dependendo de qual orientação a proteína fluorescente foi fusionada. Quando GmDGAT3A é traducionalmente fusionada com GFP na porção C-terminal, sua localização estava concentrada em pontos concentrados em volta do retículo endoplasmático (Figura 13, B); entretanto, quando YFP foi fusionada na porção N-terminal da GmDGAT3A, sua localização foi dependente de quão distante do ponto de agroinfiltração a fluorescência foi observada no microscópio, apresentando co-localização com RE quando estava afastada do ponto de agroinfiltração (Figura 13, C e D).

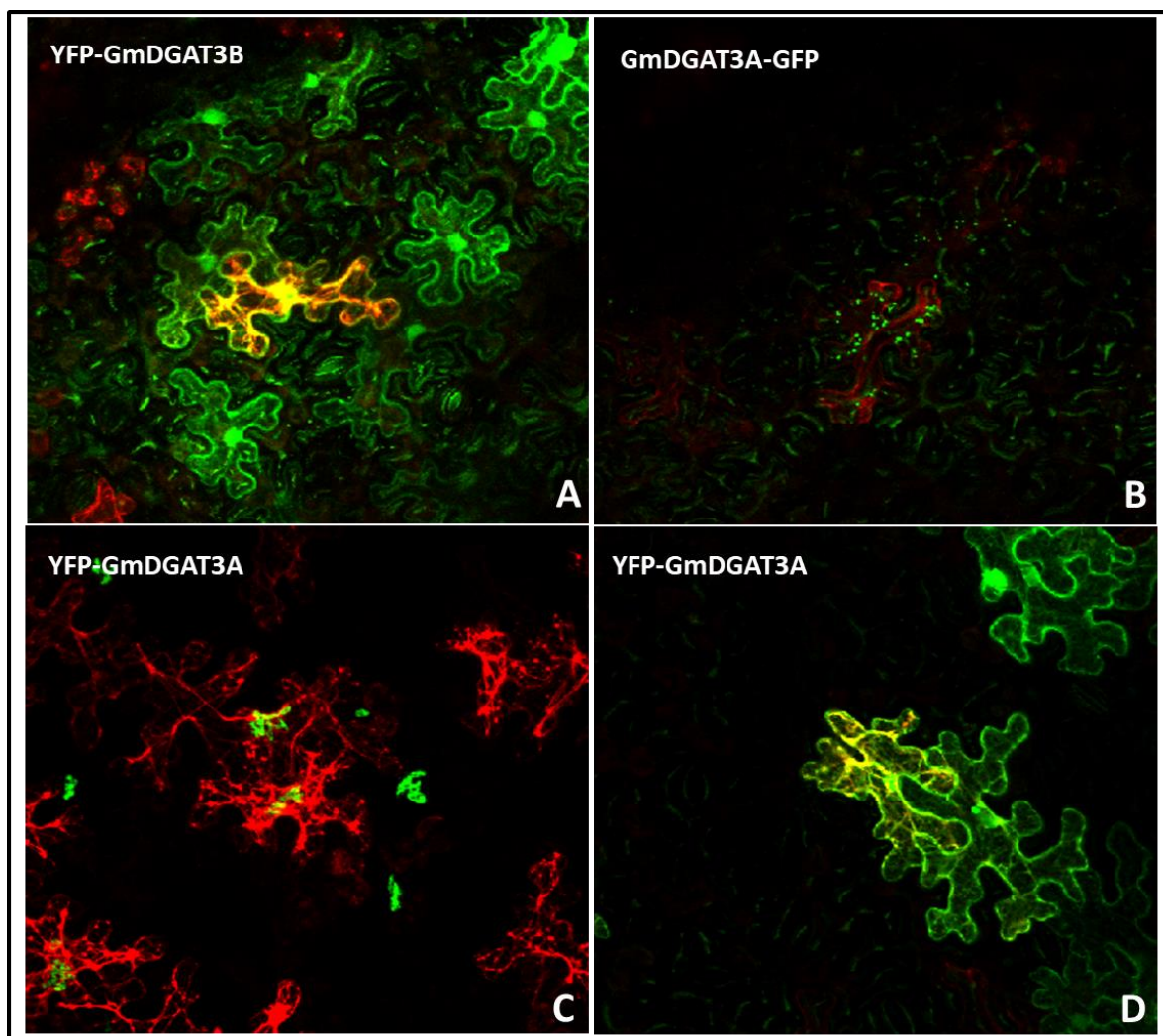


Figura 13 Localização subcelular das DGAT3s de soja. Folhas de *N. benthamiana* foram co-infiltradas com *Agrobacterium tumefaciens* contendo GmDGAT3 fusionada com a proteína fluorescente verde, ou amarela e também *Agrobacterium tumefaciens* contendo RTNLB13 (proteína marcadora de RE) traducionalmente fusionada a RFP. A) GmDGAT3B traducionalmente fusionada com YFP na porção N-terminal. B) GmDGAT3A traducionalmente fusionada com GFP na porção C-terminal. C) Imagem de GmDGAT3A traducionalmente fusionada com YFP perto do ponto de agroinfiltração. D) Imagem de GmDGAT3A traducionalmente fusionada com

YFP na N-terminal distante do ponto de infiltração. Imagens foram tiradas quatro dias depois da infiltração no microscópio confocal, e uma sobreposição das imagens dos filtros de GFP/YFP e RFP é representada.

4.8 DGAT3s de soja são mais similares a DGAT3s de amendoim

As isoenzimas de diacilglicerol aciltransferase são diferentes uma das outras, e embora as localizações subcelulares de DGAT1 e DGAT2 estejam bem estabelecidas (Shockey *et al.*, 2006), apenas uma DGAT3 foi estudada em relação a sua localização dentro da célula (Hernández *et al.*, 2012). Uma vez que GmDGAT3A e RcDGAT3 apresentam localização subcelular distinta da AtDGAT3, foi feita uma comparação das sequências de aminoácidos dessas proteínas com as outras DGATs solúveis que já foram caracterizadas. Ambas as DGATs de soja têm uma maior similaridade com as AhDGATs de amendoim (Figure 14). Interessantemente, elas também compartilham o domínio N-terminal presente nas enzimas de amendoim, mas que não é encontrado na AtDGAT3 de *Arabidopsis* (Figura 14).

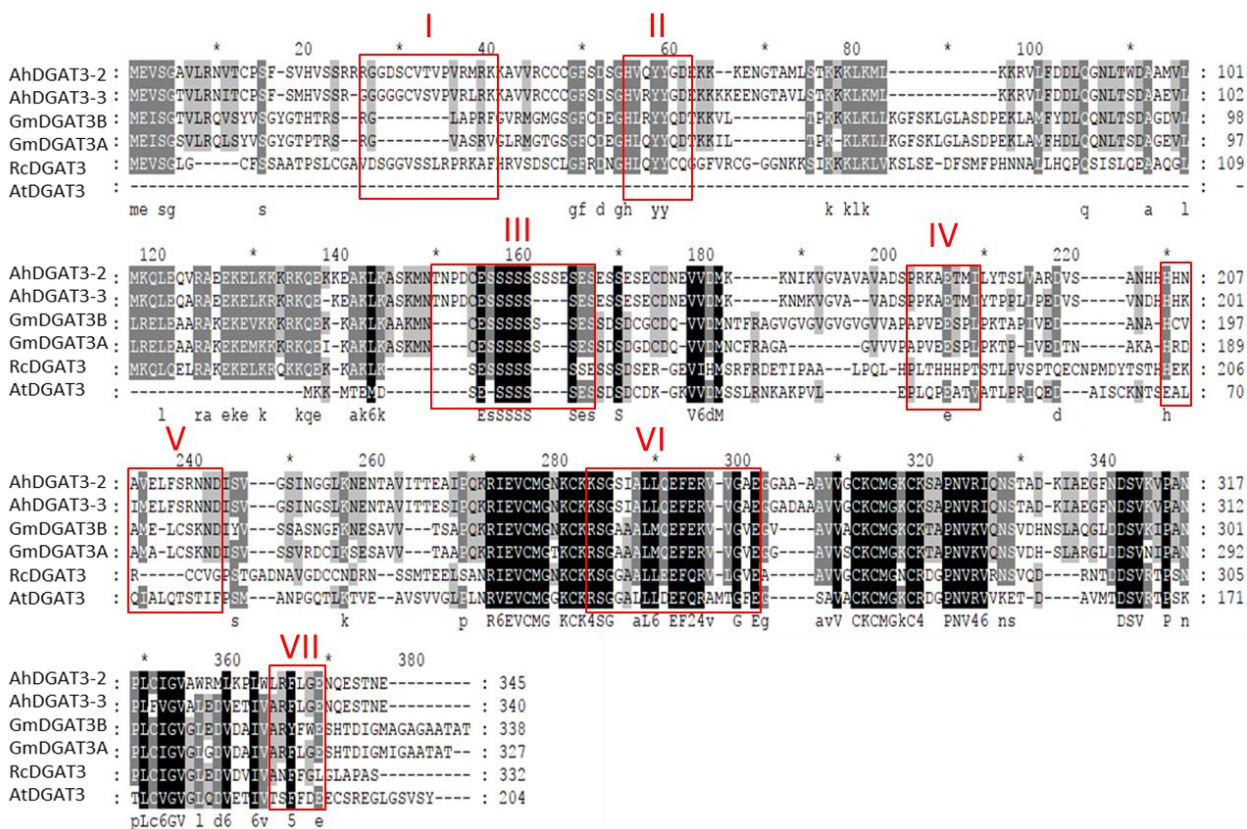


Figura 14 Alinhamento das DGATs solúveis. Comparação das sequencias das enzimas caracterizadas de amendoim AhDGAT3-2 e AhDGAT3-3, AtDGAT3 de *Arabidopsis*, RcDGAT3 de mamona e GmDGAT3A e

GmDGAT3B de soja. Domínios conservados estão em vermelho. I: Sítio de ligação à fosfopanteteína; II e V: Potenciais motivos DGAT; III: Assinatura putativa de um tiolase acil-enzima intermediário; IV: Sítio putativo de fosforilação tirosina quinase; VI: Assinatura da proteína ligadora de ácido graxo; VII: Sítio ativo catalítico putativo.

5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

O entendimento de como os genes funcionam, interagem, e como eles são regulados é muito importante para o estabelecimento de novas estratégias no campo da biotecnologia (Bunnik e Le Roch, 2013; Thao e Tran, 2016). Uma vez que o petróleo é um combustível finito, e pode apresentar compostos perigosos para o meio ambiente, novas tecnologias têm sido buscadas para substituir essa fonte de energia tradicional. Óleos de plantas, algas e de microrganismos vêm sendo propostos como uma alternativa ecológica, pois eles podem gerar compostos de carbono semelhantes àqueles encontrados no diesel (Vanhercke *et al.*, 2013; Bhujade *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2017). Por isso, a prospecção de novos genes e o entendimento dos mecanismos pelos quais os organismos vivos produzem tais moléculas podem contribuir para o desenvolvimento de alternativas para uma melhor acumulação/produção de óleo e sua futura otimização.

A diacilglicerol aciltransferase é a principal enzima para a biossíntese de triglicerídeos na maioria dos organismos e tem sido explorada no campo da biotecnologia para o acúmulo de óleo (Reynolds *et al.*, 2017). Embora a expressão heteróloga de DGAT1 e DGAT2 já tenha mostrado a habilidade de desviar o metabolismo de lipídeos para o anabolismo de TAG, vários mecanismos ainda não estão claros em como aumentar a quantidade específica de ácidos graxos “não usuais” em oleaginosas cultivadas. A co-expressão de DGAT e de ácido graxo desaturases/hidrolases específicas ainda leva a uma baixa produção de TAGs contendo ácidos graxos modificados (Burgal *et al.*, 2008; Yurchenko *et al.*, 2017).

A DGAT solúvel, ou DGAT3, foi originalmente descrita em amendoim em frações citosólicas de cotilédones em desenvolvimento (Saha *et al.*, 2006), e mostrou atividade DGAT *in vitro* usando 1,2-DAG e oleil-CoA, com menor atividade usando pamitoil- e estearoil-CoA como doadores de acila, respectivamente (Saha *et al.*, 2006). Um dos inconvenientes de expressar estas enzimas envolvidas na produção de TAGs utilizando promotores fortes é o possível deslocamento do metabolismo de carbono, que poderia retardar ou limitar o crescimento das plantas em prol da produção de lipídeos (Yurchenko *et al.*, 2017). *Arabidopsis thaliana* expressando de forma heteróloga a construção 35S::RcDGAT3-CFP não demonstrou diferença no seu crescimento, número de folhas e quantidade de lipídeos totais (Figura 5, A e B). Como o acúmulo de TAGs em folhas é baixo (1%) (Murphy e Parker, 1984), quando comparado com as

sementes (20 - 60% do peso seco) , uma simples separação de lipídeos dessas plantas, via TLC, poderia apresentar alguma diferença na quantidade ou nas espécies de lipídeos presentes nessas amostras; entretanto, nenhuma diferença foi observada em relação às plantas selvagens (Figura 5, C). Embora o tempo de retenção de triglicerídeos tenha sido o mesmo das plantas do tipo selvagem e das plantas expressando RcDGAT3-GFP na cromatografia de camada delgada, alterações na composição de ácidos graxos ainda podem estar presentes, sendo necessário um método analítico como GC-FID ou HPLC-MS, para análises mais robustas (Li *et al.*, 2014). Além disso, a quantidade de amostra do extrato lipídico aplicado na TLC pode ter sido excessivo, já que as bandas de TAGs em todas as amostras estavam quase saturadas (Figura 5, C) (Yurchenko *et al.*, 2017).

Em mamona, o gene RcDGAT3 é expresso durante todo o desenvolvimento da semente, com maior expressão no estágio S2, indicando que este gene possa estar relacionado com a síntese de triglicerídeos (Trenz, 2015). Além disso, o gene também é expresso em diversos outros tecidos, com alta expressão em folhas (Brown *et al.*, 2012). Sementes de *Arabidopsis* expressando RcDGAT3-CFP foram analisadas, por dois métodos, para avaliar se haveria diferença no perfil de seus ácidos graxos com relação as plantas selvagens (Figura 6). Tanto a análise via GC-FID, quanto por HPLC-LIF não identificou diferença significativa no perfil de ácidos graxos nas sementes de *Arabidopsis* expressando RcDGAT3-CFP, em diversas linhagens, em relação as plantas do tipo selvagem (Figura 6, A e B). A alta competição pelo substrato entre as enzimas endógenas pode explicar os perfis de ácidos graxos idênticos entre as linhagens transgênicas e selvagens. (Van Erp *et al.*, 2015). Para reduzir o efeito destas isoenzimas já presentes nas sementes, a utilização de mutantes, ou técnicas de silenciamento gênico podem ser utilizadas (Van Erp *et al.*, 2015). Outros fatores que podem estar relacionados à falta de diferença do perfil de ácidos graxos entre as plantas expressando RcDGAT3-CFP e do tipo selvagem são a falta de substratos específicos para a enzima, ou a baixa expressão do transgene nas sementes, já que a presença do mRNA de RcDGAT3 neste tecido não foi analisada (Trenz, 2015).

A função putativa de DGAT das DGAT3 ainda precisa ser confirmada. Uma das metodologias bem estabelecidas para testar esta atividade, é a complementação de fenótipo em leveduras da linhagem H1246. Estas leveduras mutantes são incapazes de produzir triglicerídeos, o que simplifica muito a análise para a detecção de atividade de síntese de TAGs (Sandager *et al.*,

2002). Como demonstrado na Figura 7-A, a expressão de RcDGAT3 é incapaz de recuperar a biossíntese de triglicerídeos nas leveduras H1246 (Figura 7, A e B). Este experimento confirma o que já tinha sido observado previamente (Trenz, 2015), uma vez que as mesmas leveduras transformadas com o gene não demonstraram fluorescência relativa significativamente diferente das que possuíam apenas o vetor vazio no experimento da fluorescência de *Nile red* (Trenz, 2015). Quando Chi *et al.* expressou de forma heteróloga a AhDGAT3-3 de amendoim em leveduras mutantes H1246, o fenótipo mutante foi complementado, e o perfil total de ácidos graxos das leveduras mudou, apresentando maiores níveis de ácido mistérico, palmítico, oleico e linoleico, e menores níveis de ácido palmitoleico e esteárico (Chi *et al.*, 2014). Possivelmente, a falta de atividade DGAT da DGAT solúvel de mamona esteja relacionada com a falta de substratos, encontrados no óleo desta oleaginosa, mas ausentes nas leveduras. Além disso, não foi medida a expressão das DGATs de mamona nas leveduras, e isso pode estar diretamente relacionado com a falta de atividade DGAT, já que foi mostrado que leveduras H1246 apenas expressavam a proteína AtDGAT2 de *A. thaliana* quando os códons da sua sequência codificadora eram otimizados, e com isso, conseguiam complementar o fenótipo mutante produzindo *oil bodies* e triglicerídeos (Aymé *et al.*, 2014). Alternativamente, não podem ser descartadas as possibilidades desta enzima precisar de alguma interação com outras moléculas para ter atividade DGAT, de possuir alguma regulação pós-transcricional, pós-traducional (Zhou *et al.*, 2013), ou até mesmo de não realizar tal atividade catalítica.

A expressão de DGAT3 foi estudada previamente em outras espécies além de amendoim e mamona. Em tungue (*Vernicia fordii*), a expressão do gene é maior em folhas e tecidos reprodutivos, do que durante o desenvolvimento da semente (Cao *et al.*, 2013). Em *Arabidopsis*, a expressão de AtDGAT3 também é maior durante a germinação da semente e durante o estabelecimento da plântula do que durante o desenvolvimento da semente (Hernández *et al.*, 2012). Em soja (*Glycine max*), a expressão das duas DGAT3 (GmDGAT3A e GmDGAT3B) é maior durante o desenvolvimento da semente do que a maioria das DGAT1 e DGAT2 desta espécie (Turchetto-Zolet *et al.*, 2016). Além disso, GmDGAT3A apresenta os maiores níveis de expressão do seu mRNA entre as DGATs em folhas e sementes desta oleaginosa. Para avaliar a capacidade das duas DGAT solúveis de soja em sintetizar triglicerídeos *in vivo*, os genes correspondentes foram clonados e expressos em leveduras mutantes da linhagem H1246. Tanto a cromatografia de camada delgada, quanto o ensaio da fluorescência por *Nile red* mostraram que a

expressão de GmDGAT3A e GmDGAT3B não levaram à produção de triglicerídeos nessas leveduras (Figura 8, A-C).

Devido à diferente composição de ácidos graxos entre leveduras e plantas, e a fim de fornecer novos substratos para as enzimas testadas, o meio de cultura das leveduras foi suplementado com FA poli-insaturados. Hernandez *et al.* (2012) demonstraram que AtDGAT3 de *Arabidopsis* possui maior preferência pelo ácido linoleico e ácido linolênico (Hernández *et al.*, 2012). Além disso, Pan *et al.* demonstraram que leveduras H1246 expressando o gene LuPDAT1 de linho (*Linum usitatissimum* L.) precisavam da suplementação de ácido linolênico para produzir TAGs (Pan *et al.*, 2013). Porém, leveduras mutantes que expressavam GmDGAT3A, ou GmDGAT3B, não conseguiram complementar o fenótipo mutante na presença de ácido linoleico, ou do ácido linolênico (Figura 9). Além das hipóteses já levantadas anteriormente sobre RcDGAT3, a falta de DAGs específicos, que não são encontrados endogenamente em leveduras, também pode estar relacionada à falta de atividade DGAT nas leveduras H1246 que expressam GmDGAT3A, ou GmDGAT3B (Burgal *et al.*, 2008; Bansal e Durrett, 2016). Curiosamente, leveduras H1246 expressando RcDGAT2 conseguiram complementar o fenótipo mutante quando ácido linoleico, ou ácido linolênico, foram adicionados ao meio de cultura das células (Figura 9), indicando que esses ácidos graxos podem ser utilizados como substratos por esta enzima *in vivo*. A RcDGAT2 de mamona, junto com a RcPDAT1-2, são consideradas as enzimas principais para a formação do óleo de mamona, rico em ácido ricinoleico, e já foram expressas, de forma heteróloga, em *Arabidopsis* para o acúmulo deste FA (Kroon *et al.*, 2006; Burgal *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). Burgal *et al.* demonstraram que RcDGAT2 consegue utilizar oleil-CoA como substrato *in vitro*, especialmente com a adição de 1,2-diricinoleína (Burgal *et al.*, 2008); entretanto, é a primeira vez que é demonstrada a atividade de RcDGAT2 *in vivo* utilizando ácido linoleico, ou ácido linolênico como substratos, sem a adição de DAGs exógenos. Este dado indica que RcDGAT2 é capaz de produzir triglicerídeos na ausência de ácido ricinoleico, e pode usar os DAGs endógenos das leveduras como substrato.

Apesar da suplementação de ácidos graxos livres no meio de cultura das leveduras auxiliar na identificação de quais substratos as DGATs putativas podem utilizar, esses ácidos graxos podem ser tóxicos para as leveduras H1246, causando retardamento em seu crescimento (Siloto *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2013; Rani *et al.*, 2013). A presença do ácido linoleico em altas

concentrações afetou intensamente o crescimento de todos os genótipos de leveduras, com exceção de leveduras H1246 expressando RcDGAT1, que se desenvolveram em várias diluições (Figura 11). Este fenômeno também foi observado na presença de ácido linolênico, onde a expressão de RcDGAT1 permitiu o crescimento das leveduras mutantes independente de sua diluição e da concentração do FA (Figura 11). Embora RcDGAT1 tenha uma expressão relativa menor que RcDGAT2 ao longo do desenvolvimento da semente de mamona (Cagliari *et al.*, 2010), sua expressão é relativamente maior em folhas (Brown *et al.*, 2012) e sua preferência por substratos é diferente de RcDGAT2, já que consegue restaurar a biossíntese de TAGs em leveduras mutantes sem suplementação exógena de ácidos graxos (Figura 7 e 8). As leveduras que expressam RcDGAT2 também conseguiram se desenvolver na presença de ácido linoleico e, curiosamente, desenvolveram-se melhor na presença de ácido linolênico do que em sua ausência (Figura 10 e 11). Apesar deste resultado indicar algum benefício para as leveduras que expressam RcDGAT2, este experimento precisa ser repetido, já que nunca foi detectada alguma deficiência no crescimento dessas células na presença dessa enzima, o que poderia indicar um falso positivo neste experimento. Por fim, as leveduras mutantes que expressavam as DGATs solúveis de soja (GmDGAT3A ou GmDGAT3B) não tiveram desenvolvimento diferente das leveduras que apenas possuíam o vetor vazio (Figura 11). Este resultado corrobora o que foi detectado na análise de TLC (Figura 9), em que a expressão de ambas as enzimas não resultou na formação de triglicerídeos nas leveduras, e assim não conseguem detoxificar o dano causado pelo acúmulo de ácidos graxos adicionados ao meio de cultura.

A localização subcelular das enzimas envolvidas na síntese de glicerolípídeos é comumente observada no retículo endoplasmático. Experimentos em que GmDGAT1A e GmDGAT2D de soja eram expressas de forma transiente em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) mostraram que ambas as enzimas estão localizados nesta organela (Chen *et al.*, 2016). Protoplastos de *Arabidopsis thaliana* expressando também de forma transiente RcDGAT1, ou RcDGAT2 de mamona mostraram que estas enzimas também se localizam no RE (Maraschin *et al.*, dados não publicados). Uma das características das enzimas do tipo DGAT3 é a falta de domínios transmembrana, sugerindo que sua localização esteja na parte solúvel da célula (Turchetto-Zolet *et al.*, 2016). RcDGAT3-CFP expressa de forma heteróloga em *Arabidopsis thaliana* tem localização citoplasmática em diversos tecidos (Trenz, 2015). Porém, quando as folhas dessas plantas foram observadas no microscópio, houve um intenso sinal fluorescente em

forma de pontos (*dot-like*) em células guarda (Figura 12, A e B). Quando a mesma construção foi utilizada para expressar RcDGAT3, de forma transiente em folhas de *N. benthamiana*, o mesmo padrão foi observado (Figura 12, C). Esta localização subcelular também foi visualizada quando GmDGAT3A-GFP foi expressa de forma heteróloga em folhas de *N. benthamiana*, mostrando-se citosólica e não tendo co-localização no retículo endoplasmático (Figura 13, B). Para um melhor entendimento de onde essas enzimas estão atuando dentro das células, marcadores da via trans-Golgi podem ser utilizados para indicar uma possível localização na via de secreção celular. Além disso, a utilização do fluoróforo *Nile red* possibilitaria a identificação de corpos lipídicos nas folhas, que poderia indicar alguma relação entre a localização das enzimas e suas funções na reciclagem de ácidos graxos (De Domenico *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2012). É sabido que triglicerídeos são utilizados como fonte energética para a abertura estomática (McLachlan *et al.*, 2016), e como DGAT3 de diversas espécies são expressas em folhas. Portanto, é possível que esta enzima esteja envolvida com o processo de homeostase dos corpos lipídicos.

A expressão de GmDGAT3A fusionada com YFP na porção N-terminal levou a resultado curioso (Figura 13, C e D). Dois padrões foram observados para essa construção, um que demonstrou um aglomerado concentrado dentro da célula (Figura 13, C), e outro em que estava espalhado por toda a célula (Figura 13, D). Este último é muito similar à localização de YFP-GmDGAT3B, em que as proteínas estavam dispersas pela célula e possuíam co-localização parcial com o retículo endoplasmático (Figura 13, A). Embora não tenha sido detectado nenhum peptídeo sinal nas sequências N-terminal das DGAT3s de soja (dado não mostrado), a fusão da YFP poderia estar interferindo na localização destas enzimas, necessitando de uma análise mais detalhada utilizando mais controles. Curiosamente, a expressão de AtDGAT3 de *Arabidopsis* fusionada com GFP na C-terminal (Hernández *et al.*, 2012) apresentou localização diferente de RcDGAT3-CFP e GmDGAT3A-GFP, lembrando bastante o padrão de YFP-GmDGAT3B (Figura 12, A e Figura 13, A e B). Para identificar alguma possível diferença entre os domínios das proteínas, um alinhamento múltiplo foi realizado. Como visto na figura 14, AtDGAT3 de *Arabidopsis* não possui a porção N-terminal que está presente na sequência de aminoácidos das outras enzimas, podendo explicar a localização subcelular diferente de RcDGAT3-CFP e GmDGAT3A-GFP (Figura 14). Além disso, comparando o alinhamento de proteínas DGAT3 de (Chi *et al.*, 2014) com o realizado neste estudo, tanto GmDGAT3A, quanto GmDGAT3B não

possuem o domínio de ligamento a fosfopanteteína (Chi *et al.*, 2014), que pode influenciar em sua função (Kosa *et al.*, 2014).

Diferente das outras DGATs, ainda pouco é sabido sobre as DGAT solúveis. Seu padrão de expressão diferente, sua incomum localização subcelular e sua função enzimática nas plantas ainda precisa ser melhor estudada para se entender qual o papel dessas enzimas no metabolismo lipídico. Estudos de interação proteína-proteína podem revelar possíveis parceiros para tais proteínas, assim como a análise do perfil de ácidos graxos em tecidos vegetativos de plantas que superexpressam essas enzimas podem identificar os substratos elas utilizam.

6 REFERÊNCIAS

ARABOLAZA, A. et al. Multiple pathways for triacylglycerol biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 9, p. 2573-82, May 2008. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18310412> >.

AYMÉ, L. et al. Function and localization of the *Arabidopsis thaliana* diacylglycerol acyltransferase DGAT2 expressed in yeast. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92237, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24663078> >.

BANSAL, S.; DURRETT, T. P. Defining the extreme substrate specificity of *Euonymus alatus* diacylglycerol acetyltransferase, an unusual membrane bound O-acyltransferase. **Biosci Rep**, Sep 2016. ISSN 1573-4935. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27688773> >.

BELTRÃO, N. E. D. M.; OLIVEIRA, M. I. P. D. Oleaginosas e seus Óleos: Vantagens e Desvantagens para Produção de Biodiesel **EMBRAPA**, v. 1, p. 30, 2008.

BHUJADE, R. et al. Algae to Economically Viable Low-Carbon-Footprint Oil. **Annu Rev Chem Biomol Eng**, v. 8, p. 335-357, Jun 2017. ISSN 1947-5446. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28592173> >.

BROWN, A. P. et al. Tissue-specific whole transcriptome sequencing in castor, directed at understanding triacylglycerol lipid biosynthetic pathways. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e30100, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22319559> >.

BUNNIK, E. M.; LE ROCH, K. G. An Introduction to Functional Genomics and Systems Biology. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 2, n. 9, p. 490-498, Nov 2013. ISSN 2162-1918. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24527360> >.

BURGAL, J. et al. Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: RcDGAT2 drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil. **Plant Biotechnol J**, v. 6, n. 8, p. 819-31, Oct 2008. ISSN 1467-7652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18643899> >.

CAGLIARI, A. et al. Biosynthesis of Triacylglycerols (TAGs) in plants and algae **International Journal of Plant Biology**, v. 2, n. 10, p. 13, 2011.

_____. Identification and expression analysis of castor bean (*Ricinus communis*) genes encoding enzymes from the triacylglycerol biosynthesis pathway. **Plant Sci**, v. 179, n. 5, p. 499-

509, Nov 2010. ISSN 1873-2259. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21802608> >.

CAO, H. et al. Developmental regulation of diacylglycerol acyltransferase family gene expression in tung tree tissues. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76946, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24146944> >.

CHEN, B. et al. Two types of soybean diacylglycerol acyltransferases are differentially involved in triacylglycerol biosynthesis and response to environmental stresses and hormones. **Sci Rep**, v. 6, p. 28541, Jun 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27345221> >.

CHEN, G. Q.; JIANG, X. R. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. **Curr Opin Biotechnol**, v. 50, p. 94-100, Dec 2017. ISSN 1879-0429. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29223022> >.

CHEN, G. Q. et al. Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in castor bean (*Ricinus communis* L.). **Lipids**, v. 42, n. 3, p. 263-74, Apr 2007. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17393231> >.

CHEN, J. E.; SMITH, A. G. A look at diacylglycerol acyltransferases (DGATs) in algae. **J Biotechnol**, v. 162, n. 1, p. 28-39, Nov 2012. ISSN 1873-4863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22750092> >.

CHI, X. et al. Cloning and functional analysis of three diacylglycerol acyltransferase genes from peanut (*Arachis hypogaea* L.). **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e105834, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25181516> >.

DAUM, G. et al. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, n. 16, p. 1471-510, Dec 1998. ISSN 0749-503X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9885152> >.

DE DOMENICO, S. et al. Subcellular localisation of *Medicago truncatula* 9/13-hydroperoxide lyase reveals a new localisation pattern and activation mechanism for CYP74C enzymes. **BMC Plant Biol**, v. 7, p. 58, Nov 2007. ISSN 1471-2229. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17983471> >.

DURRETT, T. P.; BENNING, C.; OHLROGGE, J. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. **Plant J**, v. 54, n. 4, p. 593-607, May 2008. ISSN 1365-313X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476866> >.

DURRETT, T. P. et al. A distinct DGAT with sn-3 acetyltransferase activity that synthesizes unusual, reduced-viscosity oils in *Euonymus* and transgenic seeds. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 20, p. 9464-9, May 2010. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20439724> >.

DYER, J. M.; MULLEN, R. T. Engineering plant oils as high-value industrial feedstocks for biorefining: the need for underpinning cell biology research. **Physiol Plant**, v. 132, n. 1, p. 11-22, Jan 2008. ISSN 1399-3054. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18251866> >.

DYER, J. M. et al. High-value oils from plants. **Plant J**, v. 54, n. 4, p. 640-55, May 2008. ISSN 1365-313X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476869> >.

EARLEY, K. W. et al. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. **Plant J**, v. 45, n. 4, p. 616-29, Feb 2006. ISSN 0960-7412. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16441352> >.

HARNISCH, F.; HOLTSMANN, D. Electrification of Biotechnology: Status quo. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, Dec 2017. ISSN 0724-6145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29209791> >.

HE, X. et al. Cloning and characterization of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from castor bean. **Lipids**, v. 39, n. 4, p. 311-8, Apr 2004. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15357018> >.

HERNÁNDEZ, M. L. et al. A cytosolic acyltransferase contributes to triacylglycerol synthesis in sucrose-rescued *Arabidopsis* seed oil catabolism mutants. **Plant Physiol**, v. 160, n. 1, p. 215-25, Sep 2012. ISSN 1532-2548. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22760209> >.

HILL, J. et al. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 30, p. 11206-10, Jul 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16837571> >.

IMRAN, M. et al. Modern biotechnology-based therapeutic approaches against HIV infection. **Biomed Rep**, v. 7, n. 6, p. 504-507, Dec 2017. ISSN 2049-9434. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29250325> >.

JAWORSKI, J.; CAHOON, E. B. Industrial oils from transgenic plants. **Curr Opin Plant Biol**, v. 6, n. 2, p. 178-84, Apr 2003. ISSN 1369-5266. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12667876> >.

KALSCHEUER, R.; STEINBÜCHEL, A. A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. **J Biol Chem**, v. 278, n. 10, p. 8075-82, Mar 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502715> >.

KIM, H. U. et al. Endoplasmic reticulum-located PDAT1-2 from castor bean enhances hydroxy fatty acid accumulation in transgenic plants. **Plant Cell Physiol**, v. 52, n. 6, p. 983-93, Jun 2011. ISSN 1471-9053. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21659329> >.

KOSA, N. M.; PHAM, K. M.; BURKART, M. D. Chemoenzymatic exchange of phosphopantetheine on protein and peptide. **Chem Sci**, v. 5, n. 3, p. 1179-1186, Mar 2014. ISSN 2041-6520. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26998215> >.

KROON, J. T. et al. Identification and functional expression of a type 2 acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) in developing castor bean seeds which has high homology to the major triglyceride biosynthetic enzyme of fungi and animals. **Phytochemistry**, v. 67, n. 23, p. 2541-9, Dec 2006. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17084870> >.

LI, F. et al. Identification of the wax ester synthase/acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase WSD1 required for stem wax ester biosynthesis in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, v. 148, n. 1, p. 97-107, Sep 2008. ISSN 0032-0889. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18621978> >.

LI, M. et al. Quantitative profiling and pattern analysis of triacylglycerol species in *Arabidopsis* seeds by electrospray ionization mass spectrometry. **Plant J**, v. 77, n. 1, p. 160-72, Jan 2014. ISSN 1365-313X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24164626> >.

LI-BEISSON, Y. et al. Acyl-lipid metabolism. **Arabidopsis Book**, v. 8, p. e0133, 2010. ISSN 1543-8120. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22303259> >.

LIU, J. et al. Metabolic engineering of oilseed crops to produce high levels of novel acetyl glyceride oils with reduced viscosity, freezing point and calorific value. **Plant Biotechnol J**, v. 13, n. 6, p. 858-65, Aug 2015. ISSN 1467-7652. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25756355> >.

MCLACHLAN, D. H. et al. The Breakdown of Stored Triacylglycerols Is Required during Light-Induced Stomatal Opening. **Curr Biol**, v. 26, n. 5, p. 707-12, Mar 2016. ISSN 1879-0445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26898465> >.

MURPHY, G., J., P.; PARKER, M., L. Lipid Composition and carbon turnover of wheat leaf oleosomes. **Journal of Experimental Botany**, v. 152, p. 348-355, 1984.

ORSAVOVA, J. et al. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 6, p. 12871-90, Jun 2015. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26057750> >.

PAN, X. et al. Identification of a pair of phospholipid:diacylglycerol acyltransferases from developing flax (*Linum usitatissimum* L.) seed catalyzing the selective production of trilinolenin. **J Biol Chem**, v. 288, n. 33, p. 24173-88, Aug 2013. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23824186> >.

QIN, L. et al. From low-cost substrates to Single Cell Oils synthesized by oleaginous yeasts. **Bioresour Technol**, v. 245, n. Pt B, p. 1507-1519, Dec 2017. ISSN 1873-2976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28642053> >.

RANI, S. H.; SAHA, S.; RAJASEKHARAN, R. A soluble diacylglycerol acyltransferase is involved in triacylglycerol biosynthesis in the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis*. **Microbiology**, v. 159, n. Pt 1, p. 155-66, Jan 2013. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103975> >.

REYNOLDS, K. B. et al. A reconfigured Kennedy pathway which promotes efficient accumulation of medium-chain fatty acids in leaf oils. **Plant Biotechnol J**, v. 15, n. 11, p. 1397-1408, Nov 2017. ISSN 1467-7652. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28301719> >.

RODRIGUES, C. E. Derivatização e análise de ácidos carboxílicos de cadeia longa por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência induzida por laser. **Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular**, 2018.

ROGALSKI, M.; CARRER, H. Engineering plastid fatty acid biosynthesis to improve food quality and biofuel production in higher plants. **Plant Biotechnol J**, v. 9, n. 5, p. 554-64, Jun 2011. ISSN 1467-7652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21535359> >.

SAHA, S. et al. Cytosolic triacylglycerol biosynthetic pathway in oilseeds. Molecular cloning and expression of peanut cytosolic diacylglycerol acyltransferase. **Plant Physiol**, v. 141, n. 4, p. 1533-43, Aug 2006. ISSN 0032-0889. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16798944> >.

SANDAGER, L. et al. Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. **J Biol Chem**, v. 277, n. 8, p. 6478-82, Feb 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11741946> >.

SHARMA, A.; CHAUHAN, R. S. In silico identification and comparative genomics of candidate genes involved in biosynthesis and accumulation of seed oil in plants. **Comp Funct Genomics**, v. 2012, p. 914843, 2012. ISSN 1532-6268. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22312320> >.

SHOCKEY, J. M. et al. Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. **Plant Cell**, v. 18, n. 9, p. 2294-313, Sep 2006. ISSN 1040-4651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920778> >.

SILOTO, R. M. et al. Simple methods to detect triacylglycerol biosynthesis in a yeast-based recombinant system. **Lipids**, v. 44, n. 10, p. 963-73, Oct 2009. ISSN 1558-9307. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19763656> >.

SPARKES, I. et al. Five Arabidopsis reticulon isoforms share endoplasmic reticulum location, topology, and membrane-shaping properties. **Plant Cell**, v. 22, n. 4, p. 1333-43, Apr 2010. ISSN 1532-298X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20424177> >.

SPARKES, I. A. et al. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. **Nat Protoc**, v. 1, n. 4, p. 2019-25, 2006. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17487191> >.

THAO, N. P.; TRAN, L. S. Enhancement of Plant Productivity in the Post-Genomics Era. **Curr Genomics**, v. 17, n. 4, p. 295-6, Aug 2016. ISSN 1389-2029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27499678> >.

TRAN, T. N. T. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to produce a reduced viscosity oil from lignocellulose. **Biotechnol Biofuels**, v. 10, p. 69, 2017. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28331545> >.

TRENZ, T. S. **Caracterização funcional das enzimas do tipo Diacilglicerol acetiltransferase (DacT) e Diacilglicerol aciltransferase solúvel (DGAT3) de mamona (*Ricinus communis*)** 2015. 49 (Trabalho de Conclusão de Curso em Biotecnologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

TRONCOSO-PONCE, M. A. et al. Comparative deep transcriptional profiling of four developing oilseeds. **Plant J**, v. 68, n. 6, p. 1014-27, Dec 2011. ISSN 1365-313X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21851431> >.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. Diversity and evolution of plant diacylglycerol acyltransferase (DGATs) unveiled by phylogenetic, gene structure and expression analyses. **Genet Mol Biol**, v. 39, n. 4, p. 524-538, 2016 Oct-Dec 2016. ISSN 1415-4757. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27706370> >.

_____. Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. **BMC Evol Biol**, v. 11, p. 263, 2011. ISSN 1471-2148. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21933415> >.

TVRZICKA, E. et al. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 155, n. 2, p. 117-30, Jun 2011. ISSN 1213-8118. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804620> >.

VAN ERP, H. et al. Reducing isozyme competition increases target fatty acid accumulation in seed triacylglycerols of transgenic Arabidopsis. **Plant Physiol**, v. 168, n. 1, p. 36-46, May 2015. ISSN 1532-2548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25739701> >.

VANHERCKE, T. et al. Metabolic engineering of plant oils and waxes for use as industrial feedstocks. **Plant Biotechnol J**, v. 11, n. 2, p. 197-210, Feb 2013. ISSN 1467-7652. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190163> >.

VERNET, T.; DIGNARD, D.; THOMAS, D. Y. A family of yeast expression vectors containing the phage f1 intergenic region. **Gene**, v. 52, n. 2-3, p. 225-33, 1987. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3038686> >.

VOELKER, T.; KINNEY, A. J. VARIATIONS IN THE BIOSYNTHESIS OF SEED-STORAGE LIPIDS. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 52, p. 335-361, Jun 2001. ISSN 1040-2519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11337402> >.

WEINBERG, J. M. Lipotoxicity. **Kidney Int**, v. 70, n. 9, p. 1560-6, Nov 2006. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16955100> >.

YEN, C. L. et al. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. **J Lipid Res**, v. 49, n. 11, p. 2283-301, Nov 2008. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18757836> >.

YURCHENKO, O. et al. Engineering the production of conjugated fatty acids in *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant Biotechnol J**, v. 15, n. 8, p. 1010-1023, Aug 2017. ISSN 1467-7652. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28083898> >.

ZHOU, X. R. et al. AtDGAT2 is a functional acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase and displays different acyl-CoA substrate preferences than AtDGAT1. **FEBS Lett**, v. 587, n. 15, p. 2371-6, Aug 2013. ISSN 1873-3468. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770095> >.