

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 451**

51 Int. Cl.:
C12N 15/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02735183 .2**
96 Fecha de presentación: **26.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1373519**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **Nuevo gen de elongasa y producción de ácidos grasos Δ^{-9} -poliinsaturados**

30 Prioridad:
26.03.2001 GB 0107510

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.06.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITY OF BRISTOL
LONG ASHTON
BRISTOL BS41 9AF, GB**

72 Inventor/es:
**NAPIER, Johnathan A.;
LAZARUS, Colin M.;
QI, Baoxiu y
LERCHL, Jens**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 383 451 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevo Gen de Elongasa y Producción de Ácidos Grasos Δ- 9- Poliinsaturados

Campo de la Invención

5 Esta invención se relaciona con un nuevo gen de elongasa que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1 o derivados de la secuencia representada en SEQ ID NO: 1, la cual codifica polipéptidos que tienen al menos 50% de homología con la secuencia que codifica aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 secuencia que funciona como una elongasa, para un constructo de gen que comprende esta secuencia o dichos derivados antes mencionados y con su uso. La secuencia de ácidos nucleicos de la invención codifica un polipéptido que elonga un ácido α-linolénico (C_{18:3} Δ^{9, 12, 15}) en al menos dos átomos de carbono y donde el ácido γ-linolénico (C_{18:3} Δ^{6, 9, 12}) no está elongado. La invención se relaciona
10 adicionalmente con vectores u organismos que comprenden un gen de elongasa que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1 o dichos derivados antes mencionados.

La invención se relaciona adicionalmente con un proceso para la producción de ácidos grasos poliinsaturados (= PUFA) con un organismo no humano que comprende el gen elongasa y organismo que produce altas cantidades de aceites y especialmente aceites con un alto contenido de ácidos grasos insaturados.

15 Antecedentes de la invención

Ciertos productos y subproductos de procesos metabólicos de ocurrencia natural en células tienen utilidad en una amplia gama de industrias, incluyendo las industrias de alimentos, piensos, y farmacéutica. Estas moléculas, colectivamente denominadas "productos químicos finos" incluyen también lípidos y ácidos grasos donde una clase representativa de moléculas son ácidos grasos poliinsaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados (=PUFA) se
20 adicionan por ejemplo a formulas infantiles para crear un valor nutritivo más alto de tales formulas. Los PUFA tienen por ejemplo una influencia positiva en el nivel de colesterol de la sangre en humanos y por lo tanto son útiles en la protección contra enfermedades del corazón. Los productos químicos finos y los ácidos grasos poliinsaturados (=PUFA) pueden aislarse a partir de fuentes animales tales como por ejemplo pescado o ser producidos con microorganismos a través de cultivo de fermentación a larga escala de microorganismos desarrollados para producir y acumular o secretar grandes cantidades de una o más de las moléculas deseadas.

Microorganismos particularmente útiles para la producción de PUFAs son microorganismos tales como las algas Isochrysis galbana, Phaedactylum tricornutum o Crypthecodinium sp., ciliados tales como Stylonychia o Colpidium, hongos tales como Mortierella, Entomophthora, Mucor o Thrausto-/Schizochytrium sp. A través de la selección de cepas, se ha desarrollado un cierto número de cepas mutantes de los respectivos microorganismos que producen una
30 amplia gama de compuestos deseables incluyendo PUFA. Sin embargo, la selección de cepas mejoradas para la producción de una molécula particular consume tiempo y es un proceso difícil.

Alternativamente, la producción de los productos químicos finos puede ser llevada a cabo de la forma más conveniente a través de producción a gran escala de plantas desarrolladas para producir los PUFA antes mencionados. Plantas particularmente bien adecuadas para este propósito son plantas de semillas oleaginosas que contienen cantidades de compuestos lipídicos de colza, canola, linaza, soja, girasol, borraja y onagra. Pero también otros cultivos de plantas que
35 contienen aceites o lípidos y ácidos grasos son bien adecuados como se menciona en la descripción detallada de esta invención. A través de un cultivo convencional, se ha desarrollado un cierto número de plantas mutantes que producen una gama de lípidos y ácidos grasos, cofactores y enzimas deseables. Sin embargo, la selección de nuevos cultivares de plantas mejoradas para la producción de una molécula particular es un proceso que consume tiempo y complicado o aun imposible si el compuesto no se presenta de forma natural en el correspondiente cultivo de oleaginosa como en el
40 caso de los ácidos grasos de cadena poliinsaturada C₂₀ y superiores.

Resumen de la Invención

Esta invención proporciona una novedosa molécula de ácido nucleico tal como se describe en SEQ ID NO: 1 la cual puede utilizarse para modificar aceites, ácidos grasos, lípidos, compuestos derivados de los lípidos y la más preferida
45 para producir ácidos grasos poliinsaturados.

Los microorganismos tales como Mortierella, Entomophthora, Mucor, Crypthecodinium así como otras algas y hongos y plantas, especialmente plantas oleaginosas, se utilizan comúnmente en la industria para la producción a gran escala de una variedad de productos químicos finos.

50 Dada la disponibilidad de vectores de clonación y técnicas para la manipulación genética de los microorganismos antes mencionados y ciliados tales como los descritos en WO 98/01572 o algas y organismos relacionados tales como Phaedactylum tricornutum descrito en Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1 (3):239-251 así como en Dunahay

et al. 1995, Genetic transformation of diatoms, J. Phycol. 31:1004-1012 y referencias en los mismos, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden utilizarse en la ingeniería genética de estos organismos para hacerlos mejores productores o más eficientes de uno más productos químicos finos. Esta producción o eficiencia mejorada de la producción de un producto químico fino puede deberse a un efecto directo de la manipulación de un gen de la invención, o puede deberse a un efecto indirecto de tal manipulación.

Los musgos y las algas son los únicos sistemas vegetales conocidos que producen cantidades considerables de ácidos grasos poliinsaturados tales como el ácido araquidónico (ARA) y/o ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA). Por lo tanto, las moléculas de ácidos nucleicos que se originan de un alga tal como Isochrysis galbana son especialmente adecuados para modificar el lípido y el sistema de producción de PUFA en un huésped, especialmente en microorganismos tales como los microorganismos antes mencionados y plantas tales como las plantas oleaginosas, por ejemplo colza, canola, linaza, soja, girasol, borraja. Además los ácidos nucleicos del alga Isochrysis galbana pueden utilizarse para identificar aquellas secuencias de ADN y enzimas en otras especies que son útiles para modificar la biosíntesis de las moléculas precursoras de los PUFA en los organismos respectivos.

El alga Isochrysis galbana comparte un alto grado de homología en la secuencia de ADN y en los niveles de polipéptidos con otras algas permitiendo el uso de la selección heteróloga de moléculas de ADN con sondas que evolucionan de otras algas u organismos, permitiendo así la derivación de una secuencia de consenso adecuada para la selección heteróloga o la notación funcional y predicción de las funciones genéticas en terceras especies. La capacidad para identificar tales funciones puede por lo tanto tener una relevancia significativa, por ejemplo, la predicción de la especificidad de un sustrato de enzimas. Adicionalmente, estas moléculas de ácido nucleico pueden servir como secuencias de referencia para el mapeo de otras algas o para la derivación de cebadores de PCR.

Estas moléculas de ácidos nucleicos novedosas pueden codificar proteínas denominadas aquí como elongasas específicas para PUFA (PSEs o en singular PSE). Estos PSEs son capaces de, por ejemplo, llevar a cabo una función involucrada en el metabolismo (por ejemplo la biosíntesis o degradación) de compuestos necesarios para la biosíntesis de lípidos o ácidos grasos tales como los PUFA, o colaborando en el transporte transmembrana de uno o más compuestos lipídicos / ácidos grasos bien hacia dentro a hacia fuera de la célula.

En la presente solicitud mostramos la función de una de estas secuencias en más detalles. Hemos aislado por primera vez un gen activo de funcionalidad que codifica una actividad de elongasa altamente especificada adecuada para producir ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga a partir de ácido α -linolénico (C18:3 d9, 12, 15), mientras que el ácido γ -linolénico (C18:3 d6, 9, 12) no es elongado. Por lo tanto nos referiremos aquí a un gen o proteína ASE ("elongasa específica para ácido α -linolénico") que representa así una actividad enzimática que lleva a la elongación de ácidos grasos omega-3 o ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga Δ -9 desaturados al menos en dos átomos de carbono. Otras publicaciones y patentes no han sido capaces antes de mostrar un gen ASE funcionalmente activo que sea específico para ácido α -linolénico (ALA) y que no acepte ácido α -linolénico (GLA) como sustrato aunque hay diversas solicitudes de patente conocidas que muestran la elongación de ácidos grasos saturados de cadena corta o media (WO 98/46776 y US 5,475,099). La WO 00/12720 describe diversos PSE a partir de diversos organismos pero ninguno de los genes descritos mostró ser específico para ALA a la vez que discrimina el GLA. Los genes que muestran codificar los PSEs de WO 00/12720 aceptan todos el GLA como sustrato, por lo tanto estas enzimas llevan a la elongación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga desaturados Δ -6 pero no de ácidos grasos Δ -9 desaturados tales como los divulgados en la presente invención.

La característica única del ASE divulgado en la presente invención puesto que los productos resultantes se limitan a productos deseados a la vez que están libres de moléculas de PUFA no deseadas tales como las resultantes de la elongación de GLA.

Las WO 99/64616, WO 98/46763, WO 98/46764, WO 98/46765 describen la producción de PUFAs en plantas transgénicas que muestran la expresión clonada y funcional de las respectivas actividades Δ -12, Δ -5 o Δ -6 desaturasa a partir de diversas fuentes que carecen de la demostración de un gen codificador de ASE o de un gen Δ -6-desaturasa específico para el ácido α -linolénico y la actividad funcional necesaria para la producción del ácido eicosapentaenoico y precursores relacionados del ALA.

Para la producción de PUFA es necesario que las moléculas de ácidos grasos poliinsaturados tales como los ácidos grasos C₁₈ preferidos sean elongadas en al menos dos átomos de carbono mediante la actividad enzimática de una elongasa. La secuencia de ácidos nucleicos de la invención codifica la primera elongasa derivada de una planta que tiene la capacidad de elongar ácidos grasos C_{18:3} d_{6, 9, 12} con al menos dos dobles enlaces, preferiblemente tres dobles enlaces, en el ácido graso mediante dos átomos de carbono. Después de una ronda de elongación esta actividad enzimática lleva a ácidos grasos C₂₀ y después de 2, 3 o 4 rondas de elongación, a ácidos grasos C₂₂, C₂₄ o C₂₆. Con la elongasa de la invención también es posible sintetizar PUFAs más largos. La actividad de la elongasa de la invención lleva preferiblemente a ácidos grasos C₂₀ y/o C₂₂ con al menos dos dobles enlaces en la molécula de ácidos grasos preferiblemente con tres o cuatro dobles enlaces, particularmente de forma preferida tres dobles enlaces, en la molécula de ácidos grasos. Las moléculas de ácidos grasos preferidas de la elongación son moléculas de ácidos grasos con un doble enlace en la posición Δ -9. Después de que la elongación con la enzima de la invención ha tenido lugar

adicionalmente podría no ocurrir las etapas de desaturación. Por lo tanto, los productos de la actividad de la elongasa y la posible desaturación posterior lleva a PUFAs preferidos con un grado de desaturación más alto tales como ácido docosadienoico, ácido araquidónico, ω 6-eicosatrienoico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido eicosapentaenoico, ácido ω 3-eicosatrienoico, ω 3-eicosatetraenoico, ácido docosapentaenoico o docosahexaenoico. Un ácido graso particularmente preferido es el producto de elongación ácido estearidónico del ácido α -linolénico ($C_{18:3 \Delta 9, 12, 15}$). Los sustratos de la actividad enzimática de la invención son preferiblemente ácidos grasos Δ -9 desaturados que tiene el primer doble enlace en la posición Δ -9 tales como ácido axilarenico, ácido vernólico ($C_{18, \Delta 9_{cis}, 12-13_{epoxi}}$), ácido linolénico conjugado ($C_{18, \Delta 9_{cis}, 11_{trans}}$), ácido esterolico ($C_{18, \Delta 9}$ -acetilénico), ácido α -parinarico ($C_{18, \Delta 9_{cis}, 11_{trans}, 13_{trans}}$), ácido palmitoleico ($C_{18, \Delta 9_{cis}}$), ácido linoleico o ácido α -linolénico. Sustratos preferidos son ácido linoleico y/o ácido α -linolénico. Los ácidos grasos con al menos dos dobles enlaces en el ácido graso pueden elongarse mediante la actividad enzimática de la invención en la forma de ácidos grasos libres, los ácidos grasos acil-CoA, ésteres alquílicos de los ácidos grasos o en la forma de ésteres tales como fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos, fosfoglicéridos, monoacilglicéridos, diacilglicéridos o triacilglicéridos, preferiblemente la forma del ácido graso libre o los ácidos grasos acil-CoA.

Dada la disponibilidad de vectores de clonación para uso en plantas y en la transformación de plantas, tales como los publicados en y citados en: *Plant Molecular Biology and Biotechnology* (CRC Press, Boca Raton, Florida), chapter 6/7, S.p. 71-119 (1993); F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, *Engineering and Utilization*, eds.: Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenés et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, *Engineering and Utilization*, eds.: Kung and R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205-225), las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden utilizarse en la ingeniería genética de una amplia variedad de plantas para hacerlas productores mejores o más eficientes de uno o más productos derivados de lípidos tales como los PUFA. Esta producción o eficiencia mejorada de un producto derivado de un lípido tal como un PUFA puede deberse a una acción directa de la manipulación de un gen de la invención, o puede deberse a un efecto indirecto de tal manipulación.

Hay un número de mecanismos mediante los cuales la alteración de una proteína ASE de la invención puede afectar directamente el rendimiento, producción y/o eficiencia de producción de un producto químico a partir de una planta oleaginosa o de un microorganismo debido a tal proteína alterada. La proteína o gen ASE puede incrementarse en número o actividad de tal manera que produzcan cantidades mayores de estos compuestos o el compuesto pueda producirse de novo en cuanto los organismos carecieran de esta actividad y capacidad de biosíntesis antes de la introducción del gen respectivo.

La introducción de un gen ASE en un organismo o célula puede no solamente incrementar el flujo biosintético hacia un producto final, también incrementar o crear de novo la respectiva composición de triacilglicerol. De la misma forma, otros genes involucrados en la importación de nutrientes necesarios para la biosíntesis de uno o más productos químicos finos (por ejemplo, ácidos grasos, lípidos polares y neutros) puede incrementarse en número o actividad de tal forma que estos precursores, cofactores o compuestos intermedios se incrementan en concentración dentro de la célula o dentro del compartimiento de almacenamiento, incrementando así adicionalmente la capacidad de la célula para producir los PUFA tal como se describe más abajo. Los ácidos grasos y los lípidos en sí mismos son productos químicos finos deseables; optimizando la actividad o incrementando el número de uno o más ASE que participan en la biosíntesis de estos compuestos, o deshabilitando la actividad de uno o más ASE que están involucrados en la degradación de estos compuestos, puede ser posible incrementar el rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción de moléculas de ácidos grasos y lípidos a partir de plantas o microorganismos.

La mutagénesis del gen ASE de la invención también puede dar como resultado una proteína ASE que tiene actividades alteradas que directa o indirectamente impactan en la producción de uno o más productos químicos finos deseados. Por ejemplo el gen ASE de la invención puede incrementarse en número o actividad de tal forma que los residuos o subproductos metabólicos normales de la célula (posiblemente incrementados en cantidad debido a la sobreproducción del producto químico fino deseado) se exportan de forma eficiente antes de que sean capaces de destruir otras moléculas o procesos dentro de la célula (lo que disminuiría la viabilidad de la célula) o de interferir con rutas biosintéticas de productos químicos finos (lo que disminuirá el rendimiento, producción o eficiencia de la producción del producto químico fino deseado). Adicionalmente, las cantidades intracelulares relativamente grandes de los productos químicos finos deseados pueden por sí mismas ser tóxicas para la célula o puede interferir con los mecanismos de retroalimentación enzimática tales como la regulación alostérica, por ejemplo, incrementando la actividad o el número de otras enzimas corrientes abajo o enzimas detoxificantes de la ruta de los PUFA, podría incrementar la localización del PUFA en la fracción triacilglicerol, podría incrementar la viabilidad de células semilla, llevando a su vez a un mejor desarrollo de las células en el cultivo o una producción en semilla del producto químico fino deseado. El gen ASE de la invención también puede manipularse de tal manera que se produzcan cantidades relativas de moléculas de diferentes lípidos y ácidos grasos. Esto puede tener un efecto profundo en la composición lipídica de la membrana de la célula y crearían novedosos aceites además de la presencia de PUFA de síntesis reciente. Puesto que cada tipo de lípido tiene diferentes propiedades físicas, una alteración en la composición lipídica de una membrana puede alterar significativamente la fluidez de la membrana. Los cambios en la fluidez de la membrana pueden impactar el transporte de moléculas a través de la membrana, así como la integridad de la célula, teniendo ambos un efecto profundo sobre la producción de productos químicos finos. En las plantas estos cambios pueden adicionalmente influir sobre otras características como tolerancia hacia condiciones abióticas o de tensión biótica.

La tolerancia biótica y el estrés abiótico es una característica general que se desea se herede en una amplia variedad de plantas tales como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza y canola, manihot, pimienta, girasol y tagetes, plantas solanáceas tales como patata, tabaco, berenjena y tomate, especies de Vicia, guisantes, alfalfa, plantas tipo arbusto y también se prefieren plantas objetivo para una ingeniería genética tales como en una realización adicional de la presente invención. Plantas particularmente preferidas de la invención son plantas oleaginosas tales como soja, cacahuete, colza, canola, girasol, cártamo, árboles (palma de aceite, coco) o cultivos tales como maíz, trigo, centeno, avenas, triticale, arroz, cebada, alfalfa o plantas tipo arbusto (café, cacao, té).

La molécula de ácido nucleico aislada codifica una proteína o una porción de la misma donde la proteína o la porción de la misma incluye una secuencia de aminoácidos que es suficientemente homologa a una secuencia de aminoácidos de la secuencia SEQ ID NO: 2 de tal forma que la proteína o porción de la misma mantiene una actividad ASE. Preferiblemente, la proteína o porción de la misma codificada por la molécula de ácido nucleico retiene la habilidad de participar en el metabolismo de los compuestos necesarios para la construcción de PUFAs o membranas celulares de plantas o en el transporte de moléculas a través de estas membranas. En una realización, la proteína codificada por las moléculas de ácido nucleico es al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, y más preferiblemente al menos 70%, 80% o 90% y lo más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más homologa a una secuencia de aminoácidos de la secuencia SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida, la proteína es una proteína de *Isochrysis galbana* de longitud completa que es homologa a una secuencia completa de aminoácidos de SEQ ID NO:2 (derivada de un marco lectura abierta mostrado en SEQ ID NO:1).

De acuerdo con lo anterior, las moléculas de ácido nucleico aisladas (por ejemplo, ADNc) que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ASE o porciones activas biológicamente de la misma, así como fragmentos de ácidos nucleicos adecuados como cebadores o sondas de hibridización para la detección o amplificación de ácidos nucleicos que codifican ASE (por ejemplo, ADN o ARNm) se describen aquí. En realizaciones particularmente preferidas, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una de las secuencias de nucleótidos definidas en SEQ ID NO:1, derivados de dicha secuencia o la región codificadora o un complemento o una parte enzimáticamente activa de la misma. En otras realizaciones particularmente preferidas, la molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, 80% o 90%, y aun más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homologa a una secuencia de nucleótidos como en SEQ ID NO:1. En otras realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico aislada codifica una secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID NO:2. El gen ASE preferido de la presente invención también posee preferiblemente al menos una de las actividades ASE descritas aquí.

La molécula de ácido nucleico aislada es derivada de la *Isochrysis galbana* y codifica una proteína (por ejemplo, una proteína de función ASE) la cual incluye un dominio biológicamente activo que es al menos 50% o más homologa a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y es capaz de participar en el metabolismo de compuestos necesarios para la construcción de membranas celulares o en el transporte de moléculas a través de estas membranas, o tiene una o más de las actividades definidas en la tabla 2, y que también incluye secuencias de ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido heterólogo o regiones reguladoras.

La molécula de ácidos nucleicos aislada tiene al menos 15 nucleótidos de longitud e hibridiza bajo condiciones restrictivas con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico aislada corresponde a una molécula de ácido nucleico de origen natural. Más preferiblemente, el ácido nucleico aislado codifica una ASE de *Isochrysis galbana* de origen natural, o una porción biológicamente activa de la misma.

Otro aspecto de la invención es relativo a vectores como por ejemplo, vectores de expresión recombinantes, que contienen las moléculas de ácido nucleico de la invención, y a células huésped en las cuales tales vectores han sido introducidos, especialmente microorganismos, células vegetales, tejidos vegetales, órganos vegetales o plantas enteras. En una realización, tal célula huésped es un célula capaz de almacenar compuestos químicos finos, especialmente PUFAs, con el fin de aislar el compuesto desaseado del material recolectado. Los compuestos (aceites, lípidos, triacilglicéridos, ácidos grasos) o la ASE pueden aislarse del medio o de la célula huésped, la cual en plantas es una célula que contiene y almacena los compuestos químicos finos, lo más preferiblemente células de tejidos de almacenamiento tales como recubrimientos de semillas, tubérculos, células epidérmicas y de semillas.

Aun otro aspecto de la invención es relativo con un gen ASE aislado mostrado en la SEQ ID NO:1 o una porción del mismo, por ejemplo, una porción biológicamente activa del mismo. En una realización preferida, el ASE o la porción del mismo aislados pueden participar en el metabolismo de compuestos necesarios para la construcción de membranas celulares en un microorganismo o una célula vegetal, o en el transporte de moléculas a través de sus membranas. En otra realización preferida, el ASE o la porción aislada del mismo es suficientemente homologa a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, de tal forma que la proteína o porción de la misma mantiene la capacidad de participar en el metabolismo de compuestos necesarios para la construcción de las membranas celulares en microorganismos o células vegetales, o en el transporte de moléculas a través de estas membranas.

Por lo tanto en otra realización preferida, el alga *Isochrysis galbana* puede utilizarse para mostrar la función de un gen de musgo que utiliza recombinación homologa basada en los ácidos nucleicos descritos en esta invención.

5 También se describe un gen de ASE o una porción aislada, por ejemplo una porción biológicamente activa. El ASE o la porción aislada del mismo puede participar en el metabolismo de compuestos necesarios para la construcción de membranas celulares en un microorganismo o en una célula vegetal, o en el transporte de moléculas a través de sus membranas. Preferiblemente, la ASE o porción aislada de la misma es suficientemente homologa a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de tal forma que la proteína o porción de la misma mantiene la capacidad de participar en el metabolismo de compuestos necesarios para la construcción de membranas celulares en microorganismos o células vegetales, o en el transporte de moléculas a través de estas membranas.

10 La invención también proporciona una preparación aislada de una ASE. En realizaciones preferidas, el gen ASE comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. Se describe una proteína aislada de longitud completa que es sustancialmente homologa a una secuencia completa de aminoácidos de SEQ ID NO:2 (codificada por un marco de lectura abierta definido en SEQ ID NO:1). En otra realización, la proteína es al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, 80% o 90%, y lo más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más homologa a una secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID NO:2. En otras realizaciones, el ASE aislado comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% o más homologa a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:2 y es capaz de participar en el metabolismo de compuestos necesarios para la construcción de ácidos grasos en un microorganismo o una célula vegetal, o en el transporte de moléculas a través de estas membrana, o tiene una o más de las actividades de elongación de PUFA, significando así que la elongación de las cadenas de carbono 20 C18 que son desaturadas portan al menos dos posiciones de dobles enlaces.

Alternativamente, el ASE aislado puede comprender una secuencia de aminoácidos que se codifica mediante una secuencia de nucleótidos que hibridiza bajo condiciones restrictivas, o es al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, 80% o 90%, y aun más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más homologa a una secuencia de nucleótidos de secuencia ID NO: 1. También se prefiere que las formas preferidas de ASE tengan también una o más de las actividades de ASE descritas aquí. El polipéptido de ASE, o una porción activa biológicamente del mismo, puede estar enlazado operativamente a un polipéptido que no es ASE para formar una proteína de fusión. En realizaciones preferidas, esta proteína de fusión tiene una actividad que difiere de la del ASE solo. En otras realizaciones preferidas, esta proteína de fusión participa en el metabolismo de compuestos necesarios para la síntesis de lípidos y ácidos grasos, cofactores y enzimas en microorganismos o plantas, o en el transporte de moléculas a través de las membranas de las plantas. En realizaciones particularmente preferidas, la integración de esta proteína de fusión en una célula huésped modula la producción de un compuesto deseado de la célula. En una realización preferida a tales proteínas de fusión también contienen actividades Δ -4, Δ -5 o Δ -8 desaturasa solas o en combinación. Especialmente, una Δ -8 desaturasa de la *Euglena gracilis* descrita en WO 00/34439 y un gen de Δ -5 desaturasa descrito en US 6,051,754 (*M.alpina*), GB9814034.6 (*C. elegans*) o un gen de Δ -12 y Δ -15 desaturasa descrito en US5850026 son genes adecuados para la coexpresión con un gen ASE de la presente invención. Ninguna de las patentes citadas muestra coexpresión con un gen ASE descrito en la presente invención.

La invención describe un método para producir un producto químico fino. Este método involucra bien sea el cultivo de un microorganismo adecuado o el cultivo de células, tejidos, órganos, vegetales o plantas enteras que contienen un vector que dirige la expresión de la molécula de ácido nucleico de ASE de la invención, de tal forma que se producen el producto químico fino. En una realización preferida, este método incluye adicionalmente la etapa de obtener una célula que contiene tal vector, en el cual una célula se transforma con un vector que dirige la expresión del ácido nucleico de ASE. En otra realización preferida, este método incluye adicionalmente la etapa de recuperar el producto químico fino del cultivo. En una realización particularmente preferida, la célula es de un alga tal como *Phaeodactylum*, ciliados como *Colpidium* o *Stylonichia*, hongos tales como *Mortierella* o *Thraustochytrium* o *Schizochytrium* o de plantas oleaginosas tal como se menciono más arriba.

También se describen métodos para modular la producción de un molécula a partir de un microorganismo. Tales métodos incluyen poner en contacto la célula con un agente que modula la actividad de ASE o la expresión del ácido nucleico de ASE de tal forma que una actividad asociada a una célula se altera con respecto a la misma actividad en la ausencia del agente. Preferiblemente, la célula se modula para uno o más caminos metabólicos para lípidos y ácidos grasos, cofactores y enzimas, o se modula para el transporte de compuestos a través de tales membranas, de tal forma que se mejoran los rendimientos o ratas de producción por parte de este microorganismo de un producto químico fino deseado. El agente que modula la actividad ASE puede ser un agente que estimula la actividad de la ASE o la expresión del ácido nucleico de ASE. Ejemplos de agentes que estimulan la actividad de ASE o la expresión del ácido nucleico de ASE incluyen pequeñas moléculas, ASEs activos, y ácidos nucleicos que codifican los ASEs que han sido introducidos en la célula. Ejemplos de agentes que inhiben la actividad o la expresión de ASE incluyen pequeñas moléculas y moléculas de ácido nucleico de ASE antisentido.

Además, se describen métodos para modular rendimientos de un compuesto deseado a partir de una célula, involucrando la introducción de un gen ASE tipo silvestre o mutante en una célula, siendo el gen bien sea mantenido en un plásmido separado o integrado en el genoma de la célula huésped. Si se integra en el genoma, tal integración puede

5 ser aleatoria, o puede tener lugar por recombinación de tal forma que el gen nativo se reemplaza por la copia introducida, causando la producción del compuesto deseado a partir de la célula que va a ser modulada o utilizando un gen en trans de tal forma que el gen esta enlazado funcionalmente a unidad de expresión funcional que contiene al menos una secuencia que facilita la expresión de un gen y una secuencia que facilita la poliadenilación de un gen transcrito funcionalmente.

10 Se prevé que se modifican dichos rendimientos. Preferiblemente, dicho producto químico deseado se incrementa a la vez que se disminuyen los compuestos químicos perturbadores no deseados. más preferiblemente, dicho producto químico fino deseado es un lípido o un ácido graso, un cofactor o una enzima. A un más preferiblemente, dicho producto químico es un ácido graso poliinsaturado. más preferiblemente se escoge de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) o ácido docosahexaenoico (DHA).

Descripción Detallada de la Invención

15 La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico y proteína de ASE que están involucradas en el mecanismo de los lípidos y ácidos grasos, cofactores de PUFA y enzimas en el alga Isochrysis galbana o en el transporte de compuestos lipofílicos a través de la membranas. Las moléculas de la invención pueden utilizarse en la modulación de la producción de productos químicos finos a partir de microorganismos, tales como ciliados tales como Colpidium o Stytonichia, hongos tales como Mortierella o Thraus- tochytrium o Schizochytrium, algas tales como Phaeodactylum y/o plantas como maíz, trigo, centeno, avena, tritical, arroz, cebada, soja, cacahuete, almidón, especias de Brassica tales como colza, canola y tulipán, linaza, pimienta, girasol, borraja, veranera matinal y tagetes, plantas solanáceas tales como patata, tabaco, berenjena y tomate, especies de Vicia, guisantes, manihot, alfalfa, plantas tipo arbusto (café, cacao, té), especies de Salix, árboles (palma de aceite, coco), y pastos perennes y cultivos de forraje bien sea directamente (por ejemplo, cuando la expresión o la optimización de una proteína para la biosíntesis de ácidos grasos tiene un impacto directo en el rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción del ácido graso a partir de organismos modificados), o puede tener un impacto indirecto con resultados no despreciables en un incremento del rendimiento, producción, y/o eficiencia de la producción de un compuesto deseado o descenso de compuestos no deseados (por ejemplo, cuando la modulación del metabolismo de los lípidos y los ácidos grasos, cofactores y enzimas da como resultado alteraciones en el rendimiento, producción, y/o eficiencia en la producción o en la composición de compuestos deseados dentro de las células, lo cual a su vez puede impactar la producción de uno o más productos químicos finos). Aspectos de la invención se explican adicionalmente más abajo.

I. Productos Químicos Finos y PUFAs

30 El término "producto químico fino" está reconocido por la técnica e incluye moléculas producidas por un organismo que tiene aplicaciones en diversas industrias, tales como, pero no limitándose a, las industrias farmacéuticas, agrícola, de alimentos, de piensos y cosméticos.

35 Tales compuestos también incluyen lípidos, ácidos grasos, cofactores y enzimas etc. (tal como se describe en por ejemplo, in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, p. 561-612, in Biotechnology vol. 6, Rehm et al., eds. VCH: Weinheim, y referencias contenidas en la misma), lípidos, tanto ácidos grasos saturados como insaturados (por ejemplo, ácido araquidónico), vitaminas y cofactores (tal como se describe en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. A27, Vitamins, p. 443-613 (1996) VCH: Weinheim and references therein, and Ong, A.S., Niki, E. & Packer, L. (1995) Nutrition, Lipids, Health, and Disease Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia, and the Society for Free Radical Research, Asia, held Sept. 1-3, 1994 at Penang, Malaysia, AOCs Press, (1995)), enzimas y todos los demás productos químicos descritos por Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 y referencias en los mismos. El metabolismo y los usos de ciertos de estos productos químicos finos se explican adicionalmente más abajo.

45 La combinación de las diversas moléculas precursoras y enzimas biosintéticas da como resultado la producción de diferentes moléculas de ácidos de grasos, lo que tiene un efecto profundo sobre la composición de la membrana. También puede asumirse que los PUFA no solamente se incorporaran en el triacilglicerol sino también en los lípidos de la membrana.

Las síntesis de las membranas es un proceso bien caracterizado que involucra un cierto número de componentes que incluyen lípidos como parte de la membrana de dos capas. La producción de nuevos ácidos grasos tales como PUFA puede por lo tanto crear nuevas características de funciones de la membrana dentro de una célula u organismo.

50 Las membranas celulares cumplen una variedad de funciones en una célula. Primero y más importante, una membrana diferencia el contenido de una célula del ambiente circundante, dando así integridad a la célula. Las membranas también pueden servir como barreras para el influjo de compuestos nocivos o no deseados, y también frente al flujo de compuestos deseados.

Para descripciones más detalladas e implicaciones de las membranas y de los mecanismos involucrados véase: Bamberg, E. et al., (1993) Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes, *Q. Rev. Biophys.* 26: 1-25; Gennis, R.B. (1989) Pores, Channels and Transporters, in: *Biomembranes, Molecular Structure and Function*, Springer: Heidelberg, p. 270-322; and Nikaido, H. and Saier, H. (1992) Transport proteins in bacteria: common themes in their design, *Science* 258: 936-942, y referencias contenidas dentro de cada una de estas referencias.

La síntesis de lípidos puede dividirse en dos partes: la síntesis de ácidos grasos y su unión al sn-glicerol-3-fosfato, y la adición o modificación de un grupo de cabeza polar. Los lípidos típicos utilizados en las membranas incluyen fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos y fosfoglicéridos. La síntesis de los ácidos grasos comienza con la conversión del acetilCoA, bien sea a malonilCoA mediante la acetilCoA carboxilasa, o acetil-ACP mediante la acetil transacilasa. Después de una reacción de condensación estas dos moléculas producidas juntas forman intermedios adicionales, los cuales son convertidos mediante una serie de reacciones de condensación, reducción y deshidratación para producir una molécula de ácido graso saturado que tiene la longitud de cadena deseada. La producción de ácidos grasos insaturados a partir de tales moléculas se catalizan mediante desaturasas específicas bien sea aeróbicamente, con la ayuda de oxígeno molecular, o anaeróbicamente (para diferencias sobre síntesis de ácidos grasos en microorganismos, véase F.C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli and Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., p. 612-636 y referencias contenidas en la misma; Lengeler et al. (eds) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, y referencias contenidas en las mismas; y Magnuson, K. et al., (1993) *Microbiological Reviews* 57: 522-542, y referencias contenidas en la misma).

Precusores preferidos para el proceso de biosíntesis de PUFA de la invención son ácido linoleico y ácido linolénico. Estos ácidos grasos con C₁₈ carbonos tienen que ser elongados hasta C₂₀ y C₂₂ con el fin de obtener los ácidos grasos de tipo de cadena eicosa y docosa. Con la ayuda de diversas desaturasas tales como las enzimas con actividad Δ-6 o Δ-8 y Δ-5 y Δ-4 desaturasa pueden obtenerse ácido eicosapentaenoico y ácido dosahexaenoico así como diversos otros PUFA de cadena larga, se pueden extraer y usar para diversos propósitos, por ejemplo en aplicaciones de alimentación y piensos.

Para la producción de PUFA de cadena larga es necesario como se menciona más arriba que los ácidos grasos poliinsaturados C₁₈ sean elongados en al menos dos átomos de carbono mediante la actividad enzimática de la elongasa de la invención. La secuencia de ácidos nucleicos de la invención codifica la primera elongasa vegetal que tiene la capacidad de elongar ácido α-linolénico (C_{18:3Δ9,12,15}) en al menos dos átomos de carbono pero ácido γ-linolénico (C_{19:3Δ6,9,12}).

Adicionalmente los ácidos grasos tienen que ser transportados e incorporados en el lípido de almacenamiento triacilglicerol subsecuente a diversas modificaciones. Otra etapa esencial en la síntesis de los lípidos es la transferencia de los ácidos graso sobre los grupos de cabeza polares mediante, por ejemplo, el glicerol-fosfato-aciltransferasas (véase Frentzen, 1998, *Lipid*, 100(4-5):161-166).

Para publicaciones sobre la biosíntesis de ácidos grasos en vegetales, desaturación, metabolismo de lípidos y transporte de membrana de compuestos lipídicos, β-oxidación, modificación de ácidos grasos y cofactores, almacenamiento de triacilglicerol y ensamblaje incluyendo referencias contenidas en las mismas véanse los siguientes artículos: Kinney, 1997, *Genetic Engineering*, ed.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge and Browse, 1995, *Plant Cell* 7:957-970; Shanklin and Cahoon, 1998, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 611-641; Voelker, 1996, *Genetic Engineering*, ed.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, *Prog. Lipid R.* 31:397-417; Gühneemann-Schäfer & Kindl, 1995, *Biochim. Biophys Acta* 1256:181-186; Kunau et al., 1995, *Prog. Lipid Res.* 34: 267-342; Stymne et al 1993, in: *Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants*, Eds: Murata and Somerville, Rock-ville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, *Plant Journal*. 13(1):1-16.

Vitaminas, cofactores y nutraceuticos tales como PUFA comprenden un grupo de moléculas para cuya síntesis los animales superiores han perdido la habilidad, y así deben ingerirlas o para las cuales los animales no pueden producir suficientemente por si mismos y así deben ingerirlas adicionalmente, aunque son fácilmente sintetizadas por otros organismos tales como las bacterias. La biosíntesis de estas moléculas en los organismos capaces de producirlas, tales como las bacterias, ha sido ampliamente caracterizada (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vitamins vol. A27, p. 443-613, VCH: Weinheim, 1996; Michal, G. (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E. & Packer, L. (1995) *Nutrition, Lipids, Health, and Disease*" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia, and the Society for Free Radical Research Asia, held Sept. 1-3, 1994 at Penang, Malaysia, AOCs Press: Champaign, IL X, 374 S).

Estas dichas moléculas son bien sustancias bioactivas por si mismas, o son precursoras de sustancias biológicamente activas, que pueden servir como portadores de electrones o intermediarios en una variedad de rutas metabólicas. A parte de su valor nutritivo, estos compuestos también tienen un valor industrial significativo como agentes colorantes, antioxidantes y catalizadores u otros auxiliares en procesos. (para una revisión de la estructura, actividad y aplicaciones industriales de estos compuestos, véase, por ejemplo, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vitamins vol. A27, p. 443-613, VCH: Weinheim, 1996.). Los ácidos grasos poliinsaturados tienen diversas funciones y efectos beneficiosos para la salud tales como en enfermedades cardíacas coronarias, mecanismos inflamatorios, nutrición

infantil, etc. Para publicaciones y referencias véanse las referencias citadas aquí: Simopoulos 1999, Am. J. Clin. Nutr., 70 (3 Suppl):560-569, Takahata et al., Biosc. Biotechnol. Biochem, 1998, 62 (11): 2079-2085, Willich und Winther, 1995, Deutsche Medizinische Wochenschrift, 120 (7):229 ff.

II. Elementos y Métodos de la Invención

5 La presente invención se basa como al menos en parte, en el descubrimiento de moléculas novedosas, denominadas aquí como moléculas de ácido nucleico y proteína ASE, las cuales tienen un efecto sobre la producción de membranas celulares en *Isochrysis galbana* e influyen por ejemplo en el movimiento de moléculas a través de tales membranas. En una realización, las moléculas ASE participan en el metabolismo de compuestos necesarios para la construcción de membranas celulares en microorganismos y plantas, o indirectamente influyen en el transporte de moléculas a través de estas membranas. En una realización adicional, la actividad de las moléculas ASE de la presente invención para regular la producción de componentes de la membrana y el transporte a través de la membrana tiene un impacto sobre la producción de un producto químico deseado por este organismo. En una realización particularmente preferida, las moléculas ASE de la invención son moduladas en actividad, de tal forma que las rutas metabólicas en los microorganismos o plantas que son regulados por el ASE de la invención se modulan en rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción y el transporte de compuestos a través de las membranas se altera en eficiencia, lo cual bien sea directa o indirectamente modula el rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción de un producto químico fino deseado por parte de los microorganismos y plantas.

El lenguaje, ASE polipéptidos de ASE, incluyen proteínas que participan en el metabolismo de compuestos necesarios para la construcción de membranas celulares en microorganismos y plantas, o en el transporte de moléculas a través de estas membranas. Ejemplos de ASE son como se divulgan en SEQ ID NO:1 o sus derivados. Los términos gen de ASE o secuencia de ácidos nucleicos de ASE incluyen secuencias de ácidos nucleicos que codifican un ASE, que consisten de una región de codificación y también de regiones de secuencia correspondientes no traducidas 5' y 3'. Ejemplos de genes ASE incluyen aquellos definidos en SEQ ID NO:1 y sus derivados. Los términos producción o productividad son reconocidos en la técnica e incluyen la concentración del producto de fermentación (por ejemplo, el producto químico fino deseado) formado dentro de un tiempo dado y un volumen de fermentación dado (por ejemplo, kg de producto por hora por litro). El término eficiencia de la producción incluye el tiempo requerido para que se alcance un nivel particular de producción (por ejemplo, cuanto tiempo toma para que la célula alcance una rata particular de producción de un producto químico fino). El término rendimiento producto/carbono es reconocido por la técnica e incluye la eficiencia de la conversión de la fuente de carbono en el producto (esto es, producto químico fino). Esto se escribe en general como, por ejemplo, kg de producto por kg de fuente de carbono. Incrementando el rendimiento o producción del compuesto, la cantidad de moléculas recuperadas, o de moléculas útiles recuperadas, de ese compuesto en una cantidad dada de cultivo durante un cantidad dada de tiempo se incrementa. Los términos biosíntesis o una ruta biosintética son reconocidos por el arte e incluyen la síntesis de un compuesto, preferiblemente un compuesto orgánico, por parte de una célula a partir de compuestos intermedios en lo que puede ser un proceso de etapas múltiples y altamente regulado. Los términos degradación o una ruta de degradación son reconocidos por la técnica e incluyen la ruptura de un compuesto, preferiblemente un compuesto orgánico, mediante una célula a productos de degradación (hablando en general, moléculas más pequeñas o menos complejas), en lo que puede ser un proceso de etapas múltiples y altamente regulado. El término metabolismo esta reconocido por la técnica e incluye la totalidad de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en un organismo. El metabolismo de un compuesto en particular, entonces, (por ejemplo, el metabolismo de un ácido graso) comprende las rutas completas biosintéticas, de modificación y de degradación en una célula relacionadas con este compuesto.

En otra realización, las moléculas de ASE de la invención son capaces de modular la producción de un molécula deseada, tal como un producto químico fino, en un microorganismo o planta. Hay un cierto número de microorganismos mediante los cuales la alteración de un ASE de la invención puede afectar directamente el rendimiento, producción y/o eficiencia en la producción de un producto químico fino a partir de una cepa de microorganismos o plantas que incorporan tal proteína alterada. Estos ASE involucrados en el transporte de moléculas químicas finas dentro de o a partir de la célula puede incrementarse en número o actividad de tal forma que se transportan cantidades mayores de estos compuestos a través de las membranas, a partir de las cuales son más fácilmente recuperados e interconvertidos. Adicionalmente, los ácidos grasos y los lípidos son por si mismos productos químicos finos deseables; optimizando la actividad o incrementando el número de uno a más ASE de la invención que participan en la biosíntesis de estos compuestos, o impidiendo la actividad de uno o más ASE que están involucrados en la degradación de estos compuestos, puede ser posible incrementar el rendimiento, producción, y/o eficiencia de la producción de moléculas de ácidos grasos y lípidos a partir de microorganismos o plantas.

La mutagénesis del gen ASE de la invención también puede dar como resultado un ASE que tenga actividades alteradas que impacten indirectamente en la producción de uno o más de los productos químicos finos deseados a partir de los microorganismos o plantas. Por ejemplo, los ASE de la invención involucrados en la exportación de productos residuales pueden incrementarse en número o actividad de tal forma que los residuos metabólicos normales de la célula (posiblemente incrementados en cantidad debido a la sobreproducción del producto químico fino deseado) son exportados eficientemente antes de que sean capaces de dañar las moléculas dentro de la célula (lo que disminuiría la viabilidad de la célula) o de que interfieran con las rutas biosintéticas de los productos químicos finos (lo que disminuiría

el rendimiento, producción o eficiencia de producción de los productos químicos finos deseados). Adicionalmente, las cantidades intracelulares relativamente grandes del producto químico fino deseado pueden por si mismas ser tóxicas para la célula, incrementando así la actividad o número de transportes capaces de exportar este compuesto desde la célula, o puede incrementar la viabilidad de la célula en un cultivo, llevando a su vez a un número más grande de células en el cultivo que producen el producto quimo fino deseado. Los ASE de la invención también pueden ser manipulados de tal manera que se produzcan cantidades relativas de diferentes moléculas de lípidos y ácidos grasos. Esto puede tener un efecto profundo en la composición en lípidos de la membrana de la célula. Puesto que cada tipo de lípido tiene propiedades físicas diferentes, una alteración en la composición en lípidos de una membrana puede alterar significativamente la fluidez a través de la membrana. Los cambios en la fluidez a través de la membrana pueden impactar el transporte de moléculas a través de la membrana, así como la integridad de la célula, teniendo ambas cosas un efecto profundo sobre la producción de productos químicos finos a partir de microorganismos en plantas en cultivos de fermentación a gran escala. Las membranas de las plantas confieren características específicas tales como tolerancia hacia el calor, frío, sal, sequedad y tolerancia hacia patógenos tales como bacterias y hongos. Los compuestos que modulan las membranas por lo tanto tienen un efecto profundo en la capacidad de la planta para sobrevivir bajo parámetros de tención antes mencionados. Esto puede pasar bien sea a través del cambio en las cascadas de señalización o directamente a través de la composición alterada de la membrana (por ejemplo, véase: Chapman, 1998, Trends in Plant Science, 3 (11):419-426) e influir en las cascadas de señalización (véase Wang 1999, Plant Physiology, 120:645-651) o en la tolerancia del frío tal como se divulga en WO95/18222.

La secuencia de ácidos nucleicos aislada de la invención está contenida dentro del genoma de una cepa de *Isochrysis galbana* tal como se describe en los ejemplos. La secuencia de nucleótidos del ASE de ADNc de *Isochrysis galbana* aislada y la secuencia de aminoácidos predicha de los ASE de *Isochrysis galbana* se muestran en SEQ ID NO:1 y 2, respectivamente.

Un fragmento de la molécula de ácido nucleico en SEQ ID NO:1 fue aislada por reacción en cadena con polimerasa con la ayuda de oligonucleótidos degenerados derivados de otros genes de elongasa conocidos y un cebador vector. Un fragmento parcial fue amplificado adicionalmente y utilizado para el aislamiento de un ADNc de longitud completa que contenían suficiente información sobre la secuencia que representa un gen ASE funcionalmente activo. Un clon contenía un gen de ASE completo mostrando una homología débil con genes de elongasa conocidos. Esta expresión del marco de lectura abierta en levadura reveló inesperadamente un actividad específica del gen ASE. La enzima elonga los ácidos grasos Δ -9 como se muestra en los ejemplos.

Se describen adicionalmente proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homologa con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Tal como se usa aquí como una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que se sustancialmente homologa a una secuencia de aminoácidos seleccionada es la menos 50% homologa a la secuencia de aminoácidos seleccionada, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos seleccionada completa. Una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homologa a una secuencia de aminoácidos seleccionada puede ser de al menos 50-60%, preferiblemente al menos 60-70% y más preferiblemente al menos 70-80%, 80-90% o 90-95%, y lo más preferiblemente al menos 96%, 97%, 98%, 99% o más homologa a la secuencia de aminoácidos seleccionada.

El ASE o una porción activa biológicamente del fragmento de la misma descrito aquí puede participar en el metabolismo de los compuestos necesario para la construcción de las membranas celulares en microorganismos o plantas, o en el transporte de moléculas a través de estas membranas, o tener una o más de las actividades necesarias para elongar PUFA C18 para convertirlos en PUFA C22 o C24 así como en PUFAs relacionados.

En las siguientes subsecciones se describen en detalle adicional diversos aspectos de la invención:

A. Moléculas de Ácido Nucleico Aisladas

Un aspecto de la invención se relaciona con moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican polipéptidos ASE o porciones biológicamente activas de los mismos, así como fragmentos de ácidos nucleicos suficientes para su uso en sondas de hibridización o cebadores para la identificación o amplificación de ácidos nucleicos que codifican ASE (por ejemplo, ADN de ASE). Tal como se utiliza aquí, el término "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos de los análogos de nucleótidos que utilizan ADN o ARN generados. Ese término también abarca secuencias no traducidas localizadas tanto en los extremos 3' como 5' de la región de codificación del gen: al menos 500, preferiblemente al menos 400, más preferiblemente al menos 350, 300, 250, 200, 150 y aun más preferiblemente al menos 100 nucleótidos de secuencia corriente arriba del extremo 5' de la región de codificación y al menos 1000, preferiblemente al menos 500, más preferiblemente al menos 400, 300, 250, 200, 150 y aun más preferiblemente 100, 80, 60, 40 o 20 nucleótidos de secuencia corriente abajo desde el extremo 3' de la región de codificación del gen. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o cadena doble, pero preferiblemente es ADN de cadena doble. Una molécula de ácido nucleico "aislada" es aquella que es separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" esta libre de secuencias que flanquean de forma natural el ácido nucleico (esto es, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del

organismo del cual se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico ASE aislada puede contener menos de 5kb, 4kb, 3kb, 2kb, 1kb, 0.5kb o 0.1kb de secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en ADN genómico de la célula a partir de la cual se deriva el ácido nucleico (por ejemplo, un célula de *Isochrysis galbana*). Adicionalmente, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas de recombinación o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente; el término "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de moléculas de ácido nucleico que tienen menos de 30% (en peso seco) de otros materiales tales como proteínas, polisacáridos, etc. También denominados aquí como "material contaminante", más preferiblemente menos de 20% de material contaminantes, aun más preferiblemente menos de 10% de material contaminante, y lo más preferiblemente menos de 5% de material contaminante.

Una realización adicional de la invención es un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos derivada de una planta que codifica un polipéptido que elonga el ácido α -linolénico (C_{18:3 Δ 9,12,15}) en al menos dos átomos de carbono y donde el ácido γ -linolénico (C_{18:3 Δ 6,9,12}) no es elongado, ácido nucleico que es seleccionado del grupo consistente de

- a) es una secuencia de ácidos nucleicos representa en SEQ ID NO:1,
- b) es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido representado en SEQ ID NO:2,
- c) derivados de la secuencia representada en SEQ ID NO: 1 que codifican polipéptidos que tienen al menos 50% de homología con la secuencia que codifica secuencias de aminoácidos representados en SEQ ID NO: 2 y secuencias que funcionan como una elongasa.

El ácido nucleico aislado mencionado más arriba de la invención es derivado a partir de microorganismos tales como ciliados, o hongos, algas o dinoflagelados que son capaces de sintetizar PUFAs, preferiblemente derivados de plantas, particularmente del genero *Isochrysis* y lo más particularmente de forma preferible de la *Isochrysis galbana*.

Un aspecto de la invención se relaciona con moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos ASE o porciones biológicamente activas de los mismos, así como fragmentos de ácidos nucleicos suficientes para su uso como sondas de hibridización o cebadores para la identificación o amplificación de ácidos nucleicos codificadores de ASE (por ejemplo, ADN de ASE). Tal como se usa aquí, el término "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótidos. Este término también abarca las secuencias no traducidas localizadas tanto en el extremo 3' como en el 5' de la región codificadora del gen, al menos cien nucleótidos de secuencia corriente arriba desde el extremo 5' de la región codificadora y al menos aproximadamente veinte nucleótidos de secuencia corriente abajo del extremo 3' de la región codificadora del gen. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o cadena doble, pero preferiblemente es ADN de cadena doble. Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Preferiblemente, una molécula de ácido nucleico "aislada" está libre de secuencias que flanquean de forma natural el ácido nucleico (esto es, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo desde el cual se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico ASE puede tener menos de 5kb, 4kb, 3, kb, 2kb, 1kb, 0.5kb o 0.1kb de secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula desde la cual se deriva el ácido nucleico (por ejemplo, una célula de *Isochrysis galbana*). Además, una molécula de ácido nucleico "aislada" tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de material celular, o medio de cultivo cuando produce por técnicas de recombinación, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, o una porción de la misma, puede aislarse utilizando técnicas de biología molecular estándar y la información de la secuencia provista allí. Por ejemplo, un ADNc de ASE de *Isochrysis galbana* puede aislarse de una biblioteca de *Isochrysis galbana* utilizando todo o una porción de SEQ ID NO: 1 como una sonda de hibridización junto con técnicas de hibridización estándar (por ejemplo, tal como se describe en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Adicionalmente, una molécula de ácido nucleico que abarque todo o una porción de las secuencias de SEQ ID NO:1 puede aislarse mediante la reacción en cadena con polimerasa utilizando cebadores oligonucleótidos diseñados sobre la base de esta secuencia o partes de la misma, especialmente regiones de estas estructuras encajadas, véase Shanklin et al. (1994) *Biochemistry* 33, 12787-12794 (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que abarca todo una porción de una de las secuencias de SEQ ID NO:1 puede aislarse mediante la reacción en cadena con polimerasa utilizando cebadores oligonucleótidos diseñados sobre la base de esta misma secuencia SEQ ID NO: 1). Por ejemplo, el ARNm puede aislarse a partir de células vegetales (por ejemplo, mediante el procedimiento de extracción con diocianato de guanidinio de Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* 18: 5294-5299) y el ADNc puede prepararse utilizando la transcriptasa reversa (por ejemplo, transcriptasa reversa Moloney MLV, disponible de Gibco/BRL, Bethesda, MD; o transcriptasa reversa AMV, disponible de Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL).

- Los cebadores de oligonucleótidos sintéticos para la amplificación por reacción en cadena de polimerasa pueden diseñarse sobre la base de una de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO:1. Un ácido nucleico de la invención puede amplificarse ADNc, o, alternativamente, ADN genómico, como un molde y cebadores de oligonucleótidos apropiados de acuerdo con técnicas de amplificación por PCR estándar. El ácido nucleico así amplificado puede ser clonado en un vector apropiado y caracterizado por análisis de secuencia de ADN. Adicionalmente, los oligonucleótidos correspondientes a una secuencia de nucleótidos de ASE pueden prepararse por técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador automatizado de ADN.
- El ADNc mostrado en la secuencia ID NO:1 comprende secuencias que codifican ASEs (esto es, la "región de codificación"), así como la información de la secuencia 5' no traducida y de la secuencia 3' no traducida. Alternativamente, la molécula de ácido nucleico puede comprender solamente la región de codificación de cualquiera de las secuencias en SEQ ID NO:1 o puede contener fragmentos genómicos completos aislados a partir de ADN genómico.
- La secuencia ID NO:2 es una traducción de la región codificadora de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico Ig_uASE1 mostrado en SEQ ID NO: 1.
- En otra realización preferida, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de una de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO:1, o una porción de la misma. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO:1 es una que es suficientemente complementaria con una de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO:1 tal que pueda hibridizar con una de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO:1, formando por lo tanto un dúplex estable.
- Homólogos de la secuencia novedosa de ácido nucleico de elongasa que tiene la secuencia SEQ ID NO:1 significa, por ejemplo, variantes alélicas que tiene al menos 50-60%, preferiblemente al menos 60-70%, más preferiblemente al menos 70-80%, 80-90% o 90-95%, y aun más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de homología con una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1 o sus homólogos, derivados o análogos o porciones de la misma. Preferiblemente, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que hibridiza, por ejemplo, hibridiza bajo condiciones restrictivas, con una de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO: 1, o una porción de la misma.
- Variantes alélicas comprenden, en particular, variantes funcionales que se obtienen por eliminación, inserción, o sustitución de nucleótidos a partir de la secuencia representada en SEQ ID NO:1, siendo la intención, sin embargo, que la actividad enzimática de las proteínas sintetizadas derivadas pueda ser retenida ventajosamente para la inserción de uno o más genes. Las proteínas que tienen aun la actividad enzimática de la elongasa significan proteínas que tienen al menos 10% de la actividad enzimática original, preferiblemente 20%, particularmente de forma preferible 30%, lo más particularmente preferible 40%, en comparación con la proteína codificada por SEQ ID NO:2.
- Homólogos de SEQ ID NO:1 significa adicionalmente, por ejemplo, homólogos bacterianos, fúngicos o vegetales, secuencias truncadas, ADN o ARN de cadena sencilla de la secuencia de ADN codificadora y no codificadora.
- Homólogos de SEQ ID NO:1 también significan derivados tales como, por ejemplo, variantes de promotores. Los promotores corriente arriba de las secuencias de nucleótidos indicados pueden modificarse por uno o más intercambios de nucleótidos, por inserción(es) y/o eliminación(es) sin, sin embargo, impedir la funcionalidad o actividad de los promotores. Es posible adicionalmente para los promotores tener su actividad incrementada modificando su secuencia, o ser completamente reemplazados por promotores más activos aun a partir de organismos heterólogos.
- Adicionalmente, la molécula de ácido nucleico descrita aquí puede comprender solamente una porción de la región codificadora de una de las secuencias en SEQ ID NO:1, por ejemplo un fragmento que pueda ser utilizado como una sonda o cebador o un fragmento que codifica una porción biológicamente activa de un ASE. Las secuencias de nucleótidos determinadas a partir de la clonación del gen de ASE a partir de la *Isochrysis galbana* permite la generación de sondas y cebadores diseñados para su uso en la identificación y/o clonación de homólogos de ASE en otros tipos de células y organismos, así como de homólogos de ASE a partir de *Isochrysis galbana* o especies relacionadas. La sonda/cebador comprende típicamente oligonucleótidos sustancialmente purificados. El oligonucleótido típicamente comprende una región de secuencia de nucleótidos que hibridiza bajo condiciones restrictivas con al menos aproximadamente 12, preferiblemente de forma aproximada 16, más preferiblemente de forma aproximada 25, 40, 50 o 75 nucleótidos consecutivos de una cadena en sentido de una de las secuencias definidas en secuencia ID NO:1, una secuencia antisentido de una de las secuencias definida en secuencia ID NO:1, o de mutantes de presencia natural de las mismas. Los cebadores basados en una secuencia de nucleótidos de secuencia ID NO:1 pueden utilizarse en reacciones de PCR para clonar homólogos de ASE. Las sondas basadas en las secuencias de nucleótidos de ASE pueden utilizarse para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican transcritos o secuencias genómicas que codifican las mismas proteínas u homólogos. Se prevé que la sonda comprende adicionalmente un grupo marcado anexo a la misma, por ejemplo, el grupo marcado puede ser un radio isótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un factor de coenzima. Tales sondas pueden ser utilizadas como parte un kit de prueba de un marcador genómico para identificar células que expresen equivocadamente un ASE, tales como mediante la medición de un nivel de ácido

nucleico codificador de ASE en una muestra de células, por ejemplo, detectando los niveles de ARNm de ASE o determinando si un gen de ASE genómico ha sido mutado o eliminado.

5 En una realización, la molécula de ácido nucleico de la invención codifica una proteína o una porción de la misma que incluye una secuencia de aminoácidos que es suficientemente homóloga con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 de forma que la proteína o porción de la misma mantiene su función como una elongasa, la capacidad para participar en el metabolismo de los compuestos necesarios para la construcción de las membranas celulares en microorganismos o plantas o en el transporte de moléculas a través de estas membranas. Tal como se utiliza aquí, el término "suficientemente homólogo" se refiere a proteínas o porciones de las mismas que tienen secuencias de aminoácidos que incluyen un número mínimo de residuos de aminoácidos idénticos o equivalentes (por ejemplo, un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral igual que un residuo de aminoácidos en una de las secuencias de SEQ ID NO:2) frente a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 de tal forma que la proteína o porción de la misma es capaz de participar en el metabolismo de compuestos necesarios para la construcción de las membranas celulares en microorganismos o plantas, o en el transporte de moléculas a través de estas membranas. Los miembros proteínicos de tales rutas metabólicas de componente de la membrana o sistemas de transporte por membrana tal como se describen aquí, pueden jugar un papel en la producción y secreción de uno o más productos químicos finos. Ejemplos de tales actividades también se describen aquí. Así, la función de un ASE contribuye bien sea directa o indirectamente al rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción de uno o más productos químicos finos. Ejemplos de especificidades de sustratos de ASE de la actividad catalítica se establecen en la tabla 2.

20 En otra realización, derivados de la molécula de ácido nucleico de la invención codifican proteínas que son al menos 50-60%, preferiblemente al menos 60-70%, y más preferiblemente al menos 70-80%, 80-90%, 90-95% y los preferiblemente al menos 96%,97%,98%,99% o más homólogos a una secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID NO:2 de tal forma que estas proteínas mantienen su función como elongasa.

25 Porciones de proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico de ASE de la invención son preferiblemente porciones biológicamente activas de una de las ASE. Tal como se utiliza aquí el término "porción biológicamente activa de un ASE" pretende incluir una porción, por ejemplo, un dominio/estructura de un ASE que participa en el metabolismo de compuestos necesarios para la construcción de membranas celulares en microorganismos o plantas, o en el transporte de moléculas a través de estas membranas, o tiene una actividad como se define en la tabla 2. Para determinar si un ASE o una porción biológicamente activa del mismo puede participar en el metabolismo de compuestos necesarios para la construcción de membranas celulares en microorganismos o plantas, o en el transporte de moléculas a través de estas membranas, puede llevarse a cabo un ensayo de la actividad enzimática. Tales métodos de ensayo son bien conocidos para los expertos en la técnica, tal como se detalla en el Ejemplo 8 de los Ejemplos.

35 Fragmentos de ácidos nucleicos adicionales que codifican porciones biológicamente activas de un ASE pueden prepararse aislando una porción de una de las secuencias en SEQ ID NO: 2, expresando la porción codificada del ASE o péptido (por ejemplo, mediante expresión recombinante in vitro) y estableciendo la actividad de la porción codificada del ASE o el péptido.

40 La invención abarca adicionalmente moléculas de ácido nucleico que difieren de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO:1 (y porciones de las mismas) debido a la degeneración del código genético y codifica así el mismo ASE que es codificado por las secuencias de nucleótidos mostrados en SEQ ID NO:1. En otra realización, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2. En aun una realización adicional, la molécula de ácido nucleico de la invención codifica una proteína de *Isochrysis galbana* de longitud completa que es sustancialmente homóloga a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (codificada por un marco de lectura abierto mostrado en SEQ ID NO:1). Además de las secuencias de nucleótidos de ASE de *Isochrysis galbana* mostradas en SEQ ID NO:1 será evidente para los expertos en la técnica que los polimorfismos de las secuencias de ADN que llevan a cambios en las secuencias de aminoácidos de ASE pueden existir dentro de una población (por ejemplo, la población de *Isochrysis galbana*). Tales polimorfismos genéticos en el gen de ASE pueden existir entre individuos dentro de una población debido a una variación natural. Tal como se utiliza aquí, los términos "gen" y "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácidos nucleicos que comprenden un marco de lectura abierta que codifica un ASE, preferiblemente un ASE de *Isochrysis galbana*. Tales variaciones naturales pueden dar como resultado típicamente una varianza de 1-5% en la secuencia de nucleótidos del gen de ASE. Cualquiera y todas dichas variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes en el ASE que son el resultado de la variación natural y que no alteran la actividad funcional de las ASE se entienden dentro del alcance de la invención.

55 Las moléculas de ácido nucleico correspondientes a la variantes naturales y a homólogos que no pertenecen a *Isochrysis galbana* del ADNc del ASE de *Isochrysis galbana* de la invención pueden aislarse con base en su homología con el ácido nucleico de ASE de *Isochrysis galbana* divulgado aquí utilizando el ADNc de *Isochrysis galbana*, o una porción del mismo, como una sonda de hibridación de acuerdo con técnicas de hibridación estándar bajo condiciones de hibridación restrictivas. De acuerdo con lo anterior, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención tiene preferiblemente al menos 15 nucleótidos de longitud e hibridiza bajo condiciones restrictivas a la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1. más preferiblemente, el ácido nucleico tiene al

5 menos 25, 50, 100, 250 o más nucleótidos de longitud. Tal como se utiliza aquí, el término “hibridiza bajo condiciones restrictivas” pretende describir condiciones para hibridización y lavado bajo las cuales las secuencias de nucleótidos al menos 60% homologas una a la otra permanecen típicamente hibridizadas una a otra. Preferiblemente, las condiciones son tales que las secuencias de al menos 65%, más preferiblemente al menos 70%, y aun más preferiblemente al menos 75% o más homologas una a otra permanecen típicamente hibridizadas una a otra. Tales condiciones restrictivas son conocidas para los experimentados en la técnica y pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo preferido, no limitante de condiciones de hibridización restrictivas es la hibridización en cloruro de sodio-citrato de sodio 6X (SSC) a aproximadamente 45 grados centígrados, seguidos por uno o más lavados en 0.2 por SCS, SDS al 0.1% 50-65°C. Preferiblemente, una molécula de ácido nucleico de la invención que hibridiza bajo condiciones restrictivas a una secuencia de SEQ ID NO: 1 corresponde a una molécula de ácido nucleico de origen natural. Tal como se utiliza aquí, una molécula de ácido nucleico “de origen natural” se refiere a una molécula de ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que se presenta en la naturaleza (por ejemplo, codifica una proteína natural). En una realización, el ácido nucleico codifica un ASE natural de *Isochrysis galbana*.

15 Además de las variantes de origen natural de la secuencia de ASE que pueden existir en la población, el experimentado en la técnica vera de manera evidente que pueden introducirse cambios por mutación en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, llevando por lo tanto a cambios en la secuencia de aminoácidos del ASE codificado, sin alterar la capacidad funcional del ASE. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones de nucleótidos que llevan a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos “no esenciales” en una secuencia de SEQ ID NO: 1. Un residuo de aminoácido “no esencial” es un residuo que puede ser alterado a partir de una secuencia tipo silvestre de uno de los ASE (SEQ ID NO: 2) sin alterar la actividad de dicho ASE, mientras que un residuo de aminoácido “esencial” se requiere para la actividad del ASE. Otros residuos de aminoácidos, sin embargo, (por ejemplo, aquellos que no se conservan o solamente son semiconservados en el dominio que tiene actividad de ASE) pueden no ser esenciales para la actividad y así probablemente pueden ser susceptibles de alteración sin alterar la actividad de la ASE.

25 De acuerdo con la anterior, otro aspecto de la invención es pertinente a las moléculas de ácido nucleico que codifican ASEs que contienen residuos de aminoácidos modificados que no son esenciales para la actividad de la ASE. Tales ASE difieren en la secuencia de aminoácidos a partir de una secuencia contenida en SEQ ID NO: 2 reteniendo aun al menos una de las actividades de ASE descritas aquí. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, donde la proteína comprende una secuencia de aminoácidos al menos 50% homologa a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y es capaz de participar en el metabolismo de compuestos necesarios para la construcción de las membranas celulares en *Isochrysis galbana*, o en el transporte de moléculas a través de estas membranas, o tiene una o más actividades definidas en la tabla 2. Preferiblemente, la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico es al menos 50-60% homologa con una de las secuencias en secuencia ID NO: 2, más preferiblemente al menos 60-70% homologa con una de las secuencias en SEQ ID NO: 2, aun más preferiblemente al menos 70-80%, 80-90%, 90-95% homologa con una de las secuencias en secuencia ID NO: 2, y lo más preferiblemente al menos 96%, 97%, 98% o 99% homologa con una de las secuencias en SEQ ID NO: 2.

40 Para determinar el porcentaje de homología de dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo, una de las secuencias de SEQ ID NO: 2 y una forma mutante de la misma) o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación optima (por ejemplo, pueden introducirse brechas en la secuencia de una proteína o ácido nucleico para un alineamiento óptico con la otra proteína o ácido nucleico). Los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan entonces. Cuando una posición en una secuencia (por ejemplo, una de las secuencias de SEQ ID NO: 2) es ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la otra secuencia (por ejemplo, una forma mutante de la forma de secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 2), entonces las moléculas son homologas en esa posición (esto es, tal como se utiliza aquí “homología” de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a “identidad” de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de homología entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (esto es, porcentaje de homología = números de posiciones idénticas/ números totales de posiciones por cien).

50 Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un homólogo de ASE a una secuencia proteínica de SEQ ID NO: 2 puede crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1 de tal forma que se introducen una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse en una de las secuencias de SEQ ID NO: 1 o sus derivados por técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida a un sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos conservadoras se hacen en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos. Una “sustitución de aminoácidos conservadores” es una en la cual el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo glicina, aspargina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina,

triptófano), cadenas laterales ramificadas en β (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, istidina). Así, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un ASE es reemplazado preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, en otra realización pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificadora de ASE, tal como por mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden ser seleccionados en cuanto a una actividad de ASE descrita aquí para identificar mutantes que retengan la actividad de ASE. Después de la mutagénesis de una de las secuencias de SEQ ID NO: 1, la proteína codificada puede ser expresada de forma recombinante y la actividad de la proteína puede terminarse utilizando, por ejemplo, ensayos descritos aquí (véase en los Ejemplos).

Una técnica adicional conocida para la evolución y la mutagénesis dirigida de secuencias genéticas que codifican enzimas es la redistribución de genes (Stemmer, PNAS 1994, 91: 10747-10751, WO 97/20078 and WO 98/13487). La redistribución de genes es un método para la combinación de fragmentos de genes y pueden combinarse con un PCR proclive al error con el fin de potenciar adicionalmente la variabilidad genética de las secuencias resultantes y las actividades enzimáticas codificadas. Una premisa para tal método es un sistema de selección adecuado. En el caso de elongasas pueden utilizarse mediciones de metabolitos de alto rendimiento facilitadas por MALDI-TOF, cromatografía de gases-espectroscopía de masas, cromatografía de capa fina o cromatografía líquida-espectroscopía de masas u otras combinaciones adecuadas o métodos para monitorear la aparición de nuevos compuestos o productos en la fracción hidrófoba.

Además de las moléculas de ácido nucleico que codifican los ASE descritos más arriba, otro aspecto de la invención es pertinente a moléculas de ácido nucleico aislado que son antisentido con respecto a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que elonga el ácido α -linolénico (C_{18:3d9,12,15}) en al menos dos átomos de carbono y donde el ácido γ -linolénico (C_{18:3d6,9,12}) no es elongado, seleccionado del grupo consistente de

a) una secuencia de ácido nucleico representada en SEQ ID NO: 1,

b) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido representado en SEQ ID NO: 2,

c) derivados de una secuencia representada en SEQ ID NO: 1, que codifica polipéptidos que tienen al menos 50% de homología con la secuencia que codifica las secuencias de aminoácidos representadas en SEQ ID NO: 2 secuencias que funcionan como una elongasa.

Un ácido nucleico "antisentido" comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria con un ácido nucleico "en sentido" que codifica una proteína, por ejemplo, complementaria a la cadena codificadora de una molécula de ADN de doble cadena o complementaria con una secuencia de ARNm. De acuerdo con la anterior, un ácido nucleico antisentido puede formar puentes de hidrogeno con un ácido nucleico en sentido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a la cadena de codificación completa del ASE, o solamente a una porción de la misma. En una realización, una molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido frente a una "región de codificación" de la cadena codificadora de una secuencia de nucleótidos que codifica un ASE. El término "región de codificación" se refiere a la región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que son traducidos en residuos de aminoácidos (por ejemplo, la región de codificación completa que comienza con y termina con el codón de detención, esto es, el último codón antes del codón de detención). En otra realización, la molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido con respecto a "región de no codificación" de la cadena de codificación de una secuencia de nucleótidos que codifica ASE. El término "región de no codificación" se refiere a secuencias 5' y 3' que flanquean la región de codificación que no son traducidas en aminoácidos (esto es, también denominadas como regiones no traducidas 5' y 3'). También es posible usar la tecnología de repetición invertida combinando un fragmento antisentido con una porción del fragmento antisentido en el sentido de orientación enlazado bien sea mediante una secuencia adaptadora o un intrón escindible (Abstract Book of the 6th Intern. Congr. Of Plant Mol Biol. ISPMB, Quebec June 18-24,2000, Abstract No. S20-9 by Green et al.).

Dada las secuencias de cadena de codificación que codifican el ASE divulgado aquí (por ejemplo, las secuencias definidas en SEQ ID NO: 1), los ácidos nucleicos antisentido de la invención pueden diseñarse de acuerdo con las reglas de Watson y Crick de apareamiento de bases. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria con la región codificadora completa del ARNm del ASE, pero más preferiblemente es un oligonucleótido que es antisentido solamente una porción de la región codificadora o no codificadora del ARNm del ASE. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario con la región que rodea el sitio de inicio de la traducción del ARNm del ASE. Un oligonucleótido antisentido puede tener, por ejemplo, 5,10,15,20,25,30,35,40,45 o 50 y más nucleótidos en longitud. Un ácido nucleico antisentido de la invención puede ser construido utilizando síntesis química y reacciones de enlace enzimático utilizando procedimiento conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) puede ser sintetizado químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o de forma diversa nucleótidos modificados diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y en sentido,

por ejemplo, pueden utilizarse derivados forosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Ejemplos de nucleótidos modificados que pueden utilizarse para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metil uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, uracil-5-oxiacético acid (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, uracil-5-ácido oxiacético acid metil ester, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropyl) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, el ácido nucleico antisentido puede ser producido biológicamente utilizando un vector de expresión en el cual se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (esto es, ARN transcrito desde el ácido nucleico insertado será de una orientación antisentido con respecto a un ácido nucleico objetivo de interés, descrito más adelante en la siguiente subsección).

Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención se administran típicamente a una célula o se generan in situ de tal forma que hibridizan con o se enlazan a ARNm celular y/o ADN genómico codificando un ASE para de esa forma inhibir la expresión de la proteína, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o la traducción. La hibridización puede ser por complementariedad de nucleótidos convencional para formar un dúplex estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se enlaza a los dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco principal de la hélice doble. La molécula antisentido puede ser modificada de tal forma que se enlace específicamente a un receptor o a un antígeno expresado sobre la superficie celular seleccionada, por ejemplo, enlazando la molécula de ácido nucleico antisentido a un péptido o a un anticuerpo que se enlaza a un receptor o antígeno de la superficie celular. La molécula de ácido nucleico antisentido también puede ser administrada a células que utilicen los vectores descritos más abajo. Para alcanzar concentración intracelulares suficientes de las moléculas antisentido, se prefieren constructos de vector en los cuales la molécula de ácido nucleico antisentido esta colocada bajo el control de un promotor procariótico, viral o eucariótico, incluyendo promotores vegetales.

En otra realización, la molécula de ácido nucleico antisentido de la invención es una molécula de ácido nucleico anomérica. Una molécula de ácido nucleico anomérica forma híbridos específicos de doble cadena con ARN complementario en los cuales, al contrario de las unidades usuales, las cadenas corren paralelas una a otra (Gaultier et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido también puede comprender un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue et al. (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330).

En otra realización, un ácido nucleico antisentido es una ribozima. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad de ribonucleasa que son capaces de romper un ácido nucleico de cadena sencilla, tal como un ARNm, con respecto al cual tienen una región complementaria. Así, las ribozimas (por ejemplo, las ribozimas de cabeza de martillo (descritas en Haselhoff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591)) pueden utilizarse para romper catalíticamente transcritos de ARNm de ASE a los cuales inhiben la traducción de ARNm de ASE. Una ribozima que tiene especificidad por un ácido nucleico que codifica ASE puede diseñarse sobre la base de la secuencia de nucleótidos de un ADNc de ASE divulgado aquí en SEQ ID NO: 1 o sobre la base de una secuencia heteróloga que va a ser aislada de acuerdo con métodos enseñados en esta invención. Por ejemplo, un derivado de *Tetrahymena* L-19 IVS RNA puede construirse de tal forma que la secuencia de nucleótidos del sitio activo sea complementaria con la secuencia de nucleótidos que va a ser escindida en un ARNm que codifica ASE. Véase, por ejemplo, Cech et al. US 4,987,071 y Cech et al. US 5,116,742. Alternativamente, el ARNm del ASE puede utilizarse para seleccionar un ARN catalítico que tiene una actividad de ribonucleasa específica a partir de una reserva de moléculas de ARN. Véase Bartel, D. and Szostak, J.W. (1993) *Science* 261:1411-1418.

Alternativamente, la expresión genética del ASE puede inhibirse apuntando a secuencias de nucleótidos complementarias con la región reguladora de una secuencia de nucleótidos de ASE (por ejemplo, un promotor y/o potenciadores de ASE) para formar estructuras helicoidales triples que evitan la transcripción de un gen de ASE en células objetivo. Véase en general, Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Res.* 6(6): 569-84; Helene, C. et al. (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; y Maher, L.J. (1992) *Bioassays* 14(12):807-15.

50 B. Constructo de Gen

Otra realización de la invención es un constructo de gen novedoso que comprende un ácido nucleico aislado derivado a partir de una planta que codifica un polipéptido que elonga el ácido α -linolénico (C_{18:3d9,12,15}) en la menos dos átomos de carbono pero no el ácido γ -linolénico (C_{18:3d6,9,12}), o la secuencia genética de SEQ ID NO: 1, sus homólogos, derivados o análogos tal como se definieron más arriba los cuales han sido enlazados funcionalmente a una o más señales reguladoras, ventajosamente para la expresión incrementada del gen. Ejemplos de estas secuencias reguladoras son secuencias a las cuales los inductores o represores se enlazan y regulan así la expresión del ácido nucleico. Además de estas secuencias reguladoras novedosas, la regulación natural de estas secuencias frente a los genes estructurales reales puede estar presente aun, y, cuando sea apropiado, han sido modificadas genéticamente de forma que la regulación natural ha sido anulada y la expresión de los genes se ha incrementado. El constructo de gen puede, sin

embargo, tener también una estructura más simple, es decir que no se han insertado señales reguladoras adicionales con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 o sus homólogos, y el promotor natural con su regulación no ha sido eliminado. En vez de ello, la secuencia reguladora natural ha sido mutada de tal manera que no sucede más la regulación, y se potencia la expresión del gen. El constructo de gen puede comprender ventajosamente de forma adicional una o más de las llamadas secuencias potenciadoras enlazadas funcionalmente con el promotor y hacer incrementar la expresión de la secuencia de ácido nucleico posible. También es posible insertar en el extremo 3' de la secuencias de ADN secuencias ventajosas adicionales, tales como elementos reguladores o terminadores adicionales. Los genes de elongasa pueden estar presentes en una o más copias en el constructo de gen. Es ventajoso que genes adicionales estén presentes en el constructo de gen para la inserción de genes adicionales en los organismos.

Las secuencias reguladores ventajosas para el proceso novedoso están presentes, por ejemplo, en promotores tales como promotor *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacIq-*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *SP6-*, λ -PR- o λ -PL- y se utilizan ventajosamente en bacterias Gram-negativas. Secuencias reguladoras ventajosas adicionales están presentes, por ejemplo, en los promotores Gram-positivos *ami* y *SPO2*, en los promotores de levaduras o fúngicos *ADCI*, *MF α* , *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* o en los promotores vegetales *CaMV/35S* [Franck et al., Cell 21 (1980) 285 - 294], *PRP1* [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B33*, *nos* o en el promotor de ubiquitina o *faceolina*. También ventajosos con relación a esto son los promotores inducibles tales como los promotores escritos *EP-A-0388186* (inducibles por bencilen sulfonamida, , Plant J. 2, 1992: 397 - 404 (Gatz et al., Tetracyclin -inducible), *EP-A-0 335 528* (inducible por ácido abscísico) o *W93-21334* (inducible por etanol o ciclohexenol). Promotores vegetales útiles adicionales son promotor *FBPasa* citosólico o promotor *ST-LSI* de la patata (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), el promotor de pirofosfato amido transferasa fosforibosilo de la Glicina max (número de acceso banco número *U87999*) o el promotor específico de nodos descrito en *EP-A-0249676*. Promotores particularmente ventajosos son los promotores que permiten la expresión en tejidos que están involucrados en la biosíntesis de los ácidos grasos. más particularmente ventajosos son los promotores específicos de semillas tales como el promotor *usp*, *LEB4-*, *faseolina* o *napina*. Promotores particularmente ventajosos adicionales son promotores específicos para semillas que pueden ser utilizados para monocotiledoneas o dicotiledoneas y que están descritos en *US5,608,152* (promotor de *napina* de la colza), *WO98/45461* (promotor de *faseolina* de *Araobidopsis*), *US5,504,200* (promotor de *faseolina* de *Phaseolus vulgaris*), *WO91/13980* (promotor de *Bce4* de la Brassica), Baeumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992: 233-239 (promotor *LEB4* de leguminosas); tales promotores son útiles en dicotiledóneas. Los siguientes promotores son útiles por ejemplo en monocotiledóneas: promotor *LPT-2* o *LPT-1* de cebada (*WO95/15389* y *WO95/23230*), promotor de *ordehina* de la cebada y otros promotores útiles descritos en *WO99/16890*.

Es posible en principio utilizar todos los promotores y sus secuencias reguladoras como aquellas mencionadas más arriba para el proceso novedoso. También es posible y ventajoso además utilizar promotores sintéticos.

El constructo del gen puede, tal como se describió más arriba, comprender también genes adicionales que se insertan en los organismos. Es posible y ventajoso insertar y expresar en organismos huésped genes reguladores tales como genes para inductores, represores o enzimas que intervengan mediante su actividad enzimática en la regulación, o uno o más de todos los genes de una ruta biosintética. Estos genes pueden ser heterólogos u homólogos en su origen. Los genes insertados pueden tener su propio promotor o estar más bajo el control del promotor de la secuencia SEQ ID NO:1 o sus homólogos. El constructo del gen comprende ventajosamente, para expresión de los otros genes presentes, adicionalmente se cuentan secuencias reguladoras 3' y/o 5' para potenciar la expresión, la cuales son seleccionadas para la expresión óptima dependiendo del organismo huésped y del gen o genes seleccionados.

Estas secuencias reguladoras pretenden hacer una expresión específica de los genes y la expresión de proteína posible como se menciono más arriba. Esto puede significar, dependiendo del organismo huésped, por ejemplo que el gen se expresa o se sobreexpresa solamente después de la inducción, o que se expresa y/o sobreexpresa inmediatamente. Las secuencias o factores reguladores puede adicionalmente tener de forma preferible un efecto benéfico sobre la expresión de los genes introducidos e incrementarlos así. Es posible de esta manera para los elementos reguladores que se potencien ventajosamente al nivel de la transcripción utilizando señales de transcripción fuertes tales como promotores y/o potenciadores. Sin embargo, además, también es posible potenciar la traducción mediante, por ejemplo, la mejora de la estabilidad del ARNm.

Además el constructo del gen de la invención comprende adicionalmente genes de diferentes rutas bioquímicas, por ejemplo genes para la síntesis de vitaminas, carotinoides, azúcares tales como monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos, o genes de la biosíntesis de ácidos grasos, más preferiblemente el constructo de gen comprende genes para la biosíntesis de ácidos grasos tales como desaturasas, hidroxilasas, acil-ACP-tioesterasas, elongasas, acetilasas, sintetasas o reductasas tales como $\Delta 19-$, $\Delta 17-$, $\Delta 15-$, $\Delta 12-$, $\Delta 9-$, $\Delta 8-$, $\Delta 6-$, $\Delta 5-$, $\Delta 4$ -desaturasas, hidroxilasas, elongasas, *N12*-acetilinasas, *Acil-ACP-tioesterasas*, β -cetoacil-ACP-sintasas o β -cetoacil-ACP-reductasas. Preferiblemente el constructo del gen comprende genes para biosíntesis de ácidos grasos seleccionados del grupo consistente de $\Delta 19-$, $\Delta 17-$, $\Delta 15-$, $\Delta 12-$, $\Delta 9-$, $\Delta 8-$, $\Delta 6-$, $\Delta 5-$, $\Delta 4$ -desaturasas, hidroxilasas, elongasas, $\Delta 12$ -acetilinasas, *Acil-ACP-tioesterasas*, β -cetoacil-ACP-sintasas o β -cetoacil-ACP-reductasas.

C. Vectores de Expresión y Células Huésped Recombinantes

Otro aspecto de la invención es pertinente a vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica un ASE. Tal como se utiliza aquí, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido enlazada. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un circuito de ADN circular de doble cadena al cual puede ligarse los segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vectores es un vector viral, donde pueden ligarse segmentos adicionales de ADN en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la cual han sido introducidos (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) se integran en el genoma de una célula huésped por introducción en la célula huésped, y por lo tanto son replicados junto con el genoma del huésped. Adicionalmente, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están enlazados operativamente. Tales vectores se denominan aquí "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmidos" y "vector" pueden utilizarse de forma intercambiable puesto que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que prestan funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden al menos un ácido nucleico de la invención o al menos un constructo de gen de la invención en una forma adecuada para expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo cual significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células huésped que se vana utilizar para la expresión, las cuales están enlazadas de forma operativa a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, "enlazados de forma operativa" pretende indicar que la secuencia de nucleótidos de interés esta enlazada a la secuencia reguladora o secuencias reguladoras de una forma tal que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos y esta secuencias están fusionadas unas a otras de tal manera que ambas secuencias satisfacen la función propuestas adscrita a la secuencia usada (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción in vitro o una célula huésped cuando el vector es introducido en la célula huésped). El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se escriben por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) o vease: Gruber and Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, eds.: Glick and Thompson, Chapter 7, 89-108 incluyendo las referencias en las mismas. Las secuencias reguladoras se incluyen aquellas que gobiernan la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquellas que gobiernan la expresión directa de la secuencia de nucleótidos solamente en ciertas células huésped o bajo ciertas condiciones. Será evidente para los expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la escogencia de la célula huésped que va a ser transformada, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células huésped para producir así proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos tal como se describe aquí (por ejemplo, ASEs, formas mutantes de ASEs, proteínas de fusión, etc.).

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para expresión de ASEs en células procarióticas, eucarióticas. Por ejemplo los genes de ASE pueden expresarse en células bacterianas tales como *C. glutamicum*, células de insectos (utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levaduras y otras células fúngicas (véase Romanos, M.A. et al. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review, *Yeast* 8: 423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J. et al. (1991) Expresión de genes heterólogos en hongos filamentosos en *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., p. 396-428: Academic Press: San Diego; and van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J.F. et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), algas (Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology*, 1, 3:239-251), ciliados de los tipos : *Holotrichia*, *Peritrichia*, *Spirotrichia*, *Suctorina*, *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Colpidium*, *Glaucoma*, *Platyophrya*, *Potomacus*, *Pseudocohnilembus*, *Euplotes*, *Engelmanniella*, y *Stylonychia*, especialmente del genero *Stylonychia lemnae*, con vectores que siguen un método de transformación tal como se describe en WO98001572; y células de plantas multicelulares (véase Schmidt, R. and Willmitzer, L. (1988), High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants, *Plant Cell Rep.*: 583-586); *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, C Press, Boca Raton, Florida, chapter 6/7, p. 71-119 (1993); F.F. White, B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205-225 (y referencias citadas allí) o células de mamíferos. Células huésped adecuadas se discuten adicionalmente en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede ser transcrito y traducido in vitro, utilizando por ejemplo secuencias reguladoras del promotor T7 y T7 polimerasa.

La expresión de las proteínas en procarióticos se lleva cabo más frecuentemente con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión y de no fusión. Los vectores de fusión añaden un número de aminoácidos a una proteína codificada en los mismos, usualmente en el término amino de la proteína recombinante pero también en el término C o se fusionan con regiones adecuadas en las proteínas. Tales vectores de fusión sirven típicamente para tres propósitos: 1) para incrementar la expresión de la proteína

recombinante; 2) para incrementar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) para ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como un ligando en la purificación por afinidad. Frecuentemente, en los vectores de expresión por fusión, se introduce un sitio de ruptura proteolítica en la unión de la unidad estructural de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante de la unidad estructural de fusión subsecuentemente a la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento de cognados, incluyen el factor Xa, trombina y enteroquinasa.

Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), los cuales fusionan la glutatona S-transferasa (GST), la proteína de enlazamiento E de la maltosa, o la proteína A, respectivamente, con la proteína de recombinante objetivo. En una realización, la secuencia de codificación de la elongasa ASE es clonada en un vector de expresión pGEX para crear un vector que codifica una proteína de fusión que comprende, desde el término N hasta el término C, una proteína-X del sitio de ruptura de GST trombina. La proteína de fusión puede purificarse mediante cromatografía de afinidad utilizando resina de glutatona-agarosa. El ASE recombinante y no fusionado a la GST puede recuperarse por ruptura de la proteína de fusión con trombina.

Ejemplos de vectores de expresión de E.coli de no fusión inducibles adecuados incluyen pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315) y pET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89). La expresión del gen objetivo del vector pTrc se basa en la transcripción de ARN polimerasa huésped a partir de un promotor de fusión híbrido trp-lac. La expresión de del gen objetivo a partir del vector pET 11d se basa sobre la transcripción a partir de un promotor de fusión de T7 gn10-lac mediada por una ARN polimerasa viral coexpresada (T7 gn1). Esta polimerasa viral es suministrada por la cepa huésped BL21(DE3) o HMS174(DE3) a partir de un profago residente λ que acoge un gen T7 gn1 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5.

Otros vectores que son útiles en los organismos procarióticos son conocidos por una persona experimentada en la técnica; tales vectores son por ejemplo en E.coli pLG338, pACYC184, la serie pBR- tal como pBR322, la serie pUC- tal como pUC18 o pUC19, la serie M113mp-, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1, λ gt11 o pBdCl, en Streptomyces pIJ101, pIJ364, pIJ702 o pIJ361, en Bacillus pUB110, pC194 o pBD214, en Corynebacterium pSA77 o pAJ667.

Una estrategia para maximizar la expresión de proteína recombinante es expresar la proteína en una bacteria de huésped con una capacidad disminuida para romper proteolíticamente la proteína recombinante (Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácidos nucleicos del ácido nucleico que se va a insertar en un vector de expresión de tal manera que los codones individuales para cada aminoácido sean los utilizados preferiblemente en las bacterias escogidas por su expresión, tal como C. glutamicum (Wada et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118). Tal alteración de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención puede llevarse a cabo mediante técnicas de síntesis de ADN estándar.

En otra realización, el vector de expresión de ASE es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para la expresión en la levadura S. cerevisiae incluye pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) Gene 54:113-123), and pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vectores y métodos para la construcción de vectores apropiados para uso en otros hongos, tales como los hongos filamentosos, incluyen los que se detallan en: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge or in: More Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., p. 396-428: Academic Press: San Diego]. Vectores de levadura útiles adicionales son por ejemplo 2 μ M, pAG-1, YE6, YE13 o pEMBLye23.

Alternativamente, los ASEs de la invención pueden expresarse en células de insectos utilizando vectores de expresión de Baculovirus. Vectores de Baculovirus disponibles para expresión de proteínas en células de insectos cultivadas (por ejemplo, células Sf 9) incluyen la serie pAc (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow and Summers (1989) Virology 170:31-39).

Los vectores antes mencionados son solamente una pequeña revisión de posibles vectores útiles. Plásmidos adicionales son bien conocidos por los técnicos experimentados y se describen por ejemplo en: Cloning Vectors (Eds. Pouwels P.H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

En otra realización, un ácido nucleico de la invención se expresa en células de mamíferos utilizando un vector de expresión de mamífero. Ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) y pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195). Cuando se utilizan células de mamíferos, las funciones de control del vector de expresión son suministradas por elementos reguladores virales. Por ejemplo promotores usados comúnmente son derivados de polyomavirus, Adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40. Para otros sistemas de

expresión adecuados tanto para células procarióticas, eucarióticas véanse los capítulos 16 y 17 de Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

5 En otra realización, el vector de expresión en mamíferos recombinantes es capaz de dirigir la expresión de la ácido nucleico preferencialmente en un tipo de célula en particular (por ejemplo, elementos reguladores específicos para tejidos se utilizan para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos para tejidos son conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de promotores específicos para tejidos adecuados incluyen el promotor de albumina (específico para el hígado; Pinkert et al. (1987) *Genes Dev.* 1:268-277), promotores específicos linfoides (Calame and Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275), en particular promotores de receptores de células T (Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733) e inmonoglobulinas (Banerji et al. (1983) *Cell* 33:729-740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748), promotores específicos para neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamentos; Byrne and Ruddle (1989) *PNAS* 86:5473-5477), promotores específicos para el páncreas (Edlund et al. (1985) *Science* 230:912-916), y promotores específicos para las glándulas mamarias (por ejemplo, promotor de suero de leche; Patente de los Estados Unidos No. 4,873,316 y publicación de solicitud de patente europea No. 264,166). Promotores regulados en concordancia del desarrollo también son abarcados aquí, por ejemplo, los promotores de hox murínicos (Kessel and Gruss (1990) *Science* 249:374-379) y el promotor de feto proteína (Campes and Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546).

20 En otra realización los ASEs de la invención pueden expresarse en células vegetales unicelulares (tales como algas), véase Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology*. 1 (3):239-251 y referencias dentro de la misma, y plantas vegetales de plantas superiores (por ejemplo, los espermatofitos, tales como plantas de cultivo). Ejemplos de vectores de expresión en planta incluyen los detallados en: Becker, D., Kemper, E., Schell, J. and Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197; and Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation, *Nucl. Acid. Res.* 12: 8711-8721; *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in: *Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization*, eds.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, Sp. 15-38.

30 Un cassette de expresión en planta contiene secuencias reguladoras capaces de conducir la expresión de genes en células vegetales y que están enlazadas de forma operativa de forma que cada secuencia puede satisfacer su función tal como la terminación de la transcripción, tal como señales de poliadenilación. Señales de poliadenilación preferidas son aquellas que se originan del T-ADN del *Agrobacterium tumefaciens* tal como el gen 3 es conocido como octopina sintasa del plásmido Ti pTiACH5 (Gielen et al., *EMBO J.* 3 (1984), 835 ff) o equivalentes funcionales de los mismos pero también son adecuados otros terminadores funcionalmente activos en plantas.

35 Puesto que la expresión de genes en plantas frecuentemente no se limita a los niveles transcripcionales un cassette de expresión en plantas contiene preferiblemente otras secuencias enlazadas operativamente tales como potenciadores de la traducción tales como la secuencia de sobreconducción que contiene la secuencia líder 5'-no traducida del virus mosaico del tabaco que potencia la proteína en relación con el ARN (Gallie et al 1987, *Nucl. Acids Research* 15:8693-8711).

40 La expresión de genes en planta tiene que estar enlazada operativamente a un promotor apropiado que confiere expresión de genes en un momento, de una manera específica para célula o tejido. Se prefieren promotores que conduzcan la expresión constitutiva (Benfey et al., *EMBO J.* 8 (1989) 2195-2202) como aquellos derivados de virus vegetales tales como el CaAMV (Franck et al., *Cell* 21 (1980) 285-294) (véase también US 5,352,605 y WO 84/02913) o promotores vegetales tales como los de la pequeña subunidad Rubisco descrita en US 4,962,028. Adicionalmente los promotores del gene vATPasa tales como el fragmento de pares de bases 1153 del β -vulgaris (*Plant Mol Biol.* 1999, 39:463-475) puede utilizarse para conducir la expresión del gen ASE solo o en combinación con otros genes de biosíntesis de PUFA.

45 Otras secuencias preferidas para uso en el enlazamiento operativo o en los casetes de expresión del gen de plantas son las secuencias de objetivo necesarias para dirigir el producto de gen en su compartimiento de célula apropiado (para una revisión véase Kermodé, *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 4 (1996), 285-423 y las referencias citadas en la misma), tal como la vacuola, el núcleo, todos los tipos de plástidos tales como amiloplastos, cloroplastos, cromoplastos, el espacio extracelular, las mitocondrias, el retículo endoplasmático, los cuerpos aceitosos, los peroxisomas y otros compartimientos de las células vegetales.

55 La expresión en genes de plantas también puede facilitarse a través de un promotor inducible químicamente (para una revisión véase Gatz 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:89-108). Los promotores inducibles químicamente son especialmente adecuados si se desea que la expresión de los genes ocurra en una forma específica en el tiempo. Ejemplos de tales promotores son un promotor inducible por el ácido salicílico (WO 95/19443), un promotor inducible por la tetraciclina (Gatz et al., (1992) *Plant J.* 2, 397-404) y un promotor inducible por etanol (WO 93/21334).

También los promotores que responden a condiciones de tención biótica o abiótica son promotores adecuados tales como el promotor del gen PRP1 patógeno inducible (Ward et al., *Plant. Mol. Biol.* 22 (1993), 361-366), el promotor hsp80 del tomate inducible por calor (US 5,187,267), el promotor de α -amilasa de la patata inducible por frío (WO96/12814) o el promotor pinilo, inducible por heridas (EP-A-0 375 091).

5 Especialmente se prefieren aquellos promotores que confieren expresión del gen en tejidos y órganos donde ocurre la biosíntesis de lípidos y aceites, en células de semillas tales como la célula del endospermo y el embrión en desarrollo. Promotores adecuados son los promotores del gen napina de la colza (US 5,698,152) el promotor USP de la Vicia faba (Baeumlein et al., *Mol Gen Genet*, 1991, 225 (3):459-67), el promotor oleosina de *Arabidopsis* (WO98/45461), el
10 promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (US 5,504,200), el promotor Bce4 de la Brassica (WO 91/13980) o el promotor de legumina B4 (LeB4; Baeumlein et al., 1992, *Plant Journal*, 2 (2):233-9) así como promotores que confieren expresión específica en semillas en plantas monocotiledóneas tales como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, etc. Promotores adecuados para anotar son los promotores de gen lpt2 o lpt1 del gen de cebada (WO95/15389 y WO95/23230) o los descritos en WO99/16890 (promotores del gen ordeína de la cebada, el gen gluteína del arroz, el gen orzina del arroz, el gen prolamina del arroz, el gen gliadina del trigo, el gen glutelina del trigo, el gen zeína del arroz, el gen glutelina de la avena, el gen kacirina del sorgo, el gen secalina del centeno).

También especialmente adecuados son promotores que confieren expresión genética específica para los plástidos puesto que los plástidos son el compartimiento donde los precursores y algunos de los productos finales de la biosíntesis de lípidos son sintetizados. Promotores adecuados tales como el promotor de ARN-polimerasa viral se describe en WO95/16783 y WO97/06250 y el promotor clpP de *Arabidopsis* descrito en WO 99/46394.

20 La invención proporciona adicionalmente un vector de expresión recombinante que comprende un molécula de ADN de la invención clonado en el vector de expresión en una orientación antisentido. Esto es, la molécula de ADN se enlaza operativamente a una secuencia reguladora de una forma tal que permite la expresión (por transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido al ARNm del PSE. Las secuencias reguladoras enlazadas operativamente a un ácido nucleico clonado en la orientación antisentido pueden escogerse de tal forma que dirijan la
25 expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una variedad de tipo de célula, por ejemplo promotores y/o potenciadores virales, o secuencias reguladoras que puedan escogerse de forma que dirijan acción directa constitutiva, específica para tejidos o de tipo celular del ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en la forma de un plásmido, fagémido o virus atenuado recombinantes en el cual los ácidos nucleicos antisentido son producidos bajo el control de una región reguladora de alta eficiencia, cuya actividad puede determinarse por el tipo de célula en el cual se introduce el vector. Para una discusión de la expresión de la regulación del gen utilizando genes antisentido véase Weintraub, H. et al., *Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis*, *Reviews - Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986 and Mol et al., 1990, *FEBS Letters* 268:427-430.

Otro aspecto de la invención es pertinente a las células huésped en las cuales se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. El término "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se utilizan de forma
35 intercambiable aquí. Se entiende que tales términos se refieren no solamente a la célula objetivo en particular sino a lo progenie recombinante o progenie potencial recombinante de tal célula. Puesto que pueden ocurrir modificaciones en las generaciones subsiguientes debido bien sea a mutación o influencias ambientales, tal progenie recombinante puede en efecto no ser idéntica a la célula madre, pero se incluye aun dentro del alcance del término tal como se utiliza aquí.

Una célula huésped puede ser una célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo un ASE puede expresarse en célula bacterianas tales como *C. glutamicum*, células de insectos, células fúngicas o células de mamíferos (tales como células ovario de hámster chino (CHO) o células COS), algas, ciliados, células de plantas, hongos u otros microorganismos tales como *C. glutamicum*. Otras células huésped adecuadas son conocidas para los expertos en la técnica.

El ADN vector puede ser introducido en células procarióticas o eucarióticas a través de técnicas de transformación o transfección convencionales. Tal como se utilizan aquí los términos "transformación" y "transfección", conjugación y transducción se entienden como haciendo referencia a una variedad de técnicas reconocidas por el arte para introducir ácido nucleico foráneo (por ejemplo, ADN en una célula huésped, incluyendo coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, competencia natural, transferencia mediada por sustancias químicas o electroporación. Métodos adecuados para la transformación o transfección de células huésped incluyendo células vegetales pueden encontrarse en Sambrook, et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros manuales de laboratorio tales como *Methods in Molecular Biology*, 1995, Vol. 44, *Agrobacterium protocols*, ed: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Para una transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección utilizada, solamente una pequeña fracción de célula puede integrar el ADN foráneo en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos), se introduce generalmente en las células huésped junto con el gen de interés. Marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como higromicina y metotrexato, o, en plantas que, confieren resistencia a herbicidas tales como imidazolinonas, sulfonilurea, glifosato o glufosinato. Un

ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable puede ser introducido en una célula huésped en el mismo vector de forma que codifique un ASE o pueda ser introducido en un vector separado. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse, por ejemplo, mediante selección de fármacos (por ejemplo, células que hayan incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Para crear un microorganismo homológamente recombinante, se prepara un vector que contenga al menos una porción del gen ASE en el cual se ha introducido una eliminación, adición o sustitución para alterar por ese medio, por ejemplo, perturbar funcionalmente, el gen ASE. Preferiblemente, es el gen ASE de *Isochrysis galbana*, pero puede ser un homólogo de una planta relacionada o aun de un alga, mamífero, levadura o fuente de insectos. En una realización preferida, el vector está diseñado de tal forma que, por recombinación homóloga, el gen de ASE endógeno es perturbado funcionalmente (esto es, no codifica más una proteína funcional; también se denomina como un vector de suspensión). Alternativamente, el vector puede ser diseñado de tal manera que, por recombinación homóloga, el gen ASE endógeno es mutado o alterado de alguna otra forma pero aun codifica una proteína funcional (por ejemplo, la región reguladora corriente arriba puede ser alterada para mediante ello alterar la expresión del ASE endógeno). Para crear una mutación puntual a través de recombinación homóloga también pueden utilizarse híbridos de ADN-ARN conocidos como quimeroplastia mencionados en Cole-Strauss et al. 1999, *Nucleic Acids Research* 27(5):1323-1330 and Kmiec, *Gene therapy*. 1999, *American Scientist*. 87(3):240-247.

En el vector recombinante homológamente, la porción alterada del gen ASE es flanqueada en sus extremos 5' y 3' por ácido nucleico adicional del gen ASE para permitir que la recombinación homóloga ocurra entre el gen ASE exógeno portado por un vector y un gen ASE endógeno en un microorganismo o planta. El ácido nucleico ASE flanqueante es de suficiente longitud para una recombinación homóloga exitosa con el gen endógeno. Típicamente, se incluyen varios cientos de pares de bases hasta que kilo bases de ADN flanqueante (tanto en el extremo 5' como en el 3') en el vector (véase por ejemplo, Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. (1987) *Cell* 51: 503 para una descripción de vectores de recombinación homóloga o Strepp et al., 1998, *PNAS*, 95 (8) :4368-4373 para recombinación basada en ADNc en *Isochrysis galbana*). El vector se introduce en un microorganismo o célula vegetal (por ejemplo, a través de transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*, transformación biolística, polientilenglicol u otros métodos aplicables), y células en las cuales el gen ASE introducido se ha recombinado homológamente con el gen ASE endógeno, las cuales se seleccionan utilizando técnicas conocidas en el arte. En el caso de células vegetales, el gen AHAS descrito en Ott et al., *J. Mol. Biol.* 1996, 263:359-360 es especialmente adecuado para la expresión del gen marcador y la resistencia frente herbicidas tipo imidazolinona o sulfonilurea .

En otra realización organismos no humanos recombinantes tales como microorganismos pueden ser producidos de forma que contengan sistemas seleccionados que permiten una expresión regulada del gen introducido. Por ejemplo, la inclusión de un gen ASE en un vector que lo coloca bajo control del operón Lac permite la expresión del gen ASE solamente en presencia de IPTG. Tales sistemas reguladores son bien conocidos en la técnica. Organismos no humanos recombinantes significan un organismo que comprende una secuencia de ácido nucleico de la invención, un constructo de genes o un vector en la célula o dentro del genoma en un lugar que no es el lugar "natural" o en un lugar "natural" pero modificado de una forma tal que no es la manera natural; esto significa que la secuencia de codificación se modifica y/o que se modifica la secuencia reguladora. Modificar significa que los nucleótidos sencillos o uno o más codones están cambiados en comparación con la secuencia natural, preferiblemente uno o más codones, más preferiblemente de uno a seis codones.

Una célula huésped de la invención, tal como una célula huésped procariótica o eucariótica en cultivo, puede utilizarse para producir (esto es, expresar) un ASE. Un método alternativo puede aplicarse además en plantas mediante la transferencia directa de ADN en flores en desarrollo a través de electroporación o transferencia genética mediada por *Agrobacterium*. De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona adicionalmente métodos para producir ASEs utilizando las células huésped de la invención. En una realización, el método comprende cultivar la célula huésped de la invención (en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica un ASE, o en la cual su genoma ha sido introducido a un gen que codifica a un tipo silvestre o alterado de ASE), en un medio adecuado hasta que se produzca ASE. En otra realización, el método comprende adicionalmente aislar ASEs del medio o la célula huésped.

Las células huésped adecuadas en principio para admitir el ácido nucleico de la invención, el constructo de gen novedoso o el vector de la invención son todos organismos procarióticos o eucarióticos. Los organismos huésped ventajosamente utilizados son organismos tales como bacterias, hongos, levaduras, células no humanas animales o vegetales. Organismos ventajosamente adicionales son animales no humanos o preferiblemente plantas o partes de las mismas. Se usan preferiblemente hongos, levaduras o plantas, particularmente de forma preferible hongos o plantas, muy particularmente de forma preferible plantas tales como plantas oleaginosas que contienen altas cantidades de compuestos lipídicos tales como colza, primavera, canola, cacahuete, linaza, soja, cártamo, girasol, borraja o plantas tales como maíz, trigo, centeno, avena, triticual, arroz, cebada, almidón, manihot, pimienta, tagetes, plantas solanáceas tales como patata, tabaco, berenjena y tomate. Especies de *Vicia*, guisantes, alfalfa, plantas tipo arbusto (café, cacao, té), especies de *Salix*, árboles (palma de aceite, coco) y pastos perennes y cultivos de forraje. Plantas particularmente

preferidas de la invención son plantas oleaginosas tales como soja, cacahuete, colza, canola, girasol, cártamo, árboles (palma de aceite, coco).

D. ASE Aislado

Otro aspecto de la invención es pertinente a los ASEs aislados. Una proteína "aislada" o "purificada" esta sustancialmente libre de material celular cuando se produce por técnicas de ADN recombinante, o por precursores químicos u otros químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. El término "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de ASE en las cuales la proteína se separa de los componentes celulares de las células en las cuales es producida de forma natural o por recombinación. En una realización, el término "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de ASE que tienen menos de 30% (de peso seco) de proteína diferente a ASE (también denominada aquí como "proteína contaminante"), más preferiblemente menos de 20% de proteína diferente de ASE, aun más preferiblemente menos de 10% de proteína diferente de ASE, y los más preferiblemente menos de 5% de proteína diferente de ASE. Cuando el ASE es producido de forma recombinante también esta preferiblemente de forma sustancial libre de medio de cultivo, esto es el medio de cultivo representa menos del 20%, más preferiblemente menos del 10% y lo más preferiblemente menos del 5% del volumen de preparación de proteína. El término "sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de ASE en las cuales la proteína es separada de los precursores químicos u otras sustancias químicas que están involucradas en la síntesis de la proteína. En una realización, el término "sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas" incluye preparaciones de ASE que tienen menos de 30% (en peso seco) de precursores químicos o productos químicos diferentes de ASE, más preferiblemente menos de 20% de precursores químicos o productos químicos diferentes de ASE, aun más preferiblemente menos de 10% de precursores químicos o productos químicos diferentes de ASE, y lo más preferiblemente menos de 5% de precursores químicos o productos químicos diferentes de ASE. En realizaciones preferidas, las proteínas aisladas carecen de proteínas contaminantes del mismo organismo del cual se deriva el ASE. Típicamente, tales proteínas se producen mediante la expresión recombinante de, por ejemplo, un ASE de *Isochrysis galbana* en otras plantas diferentes a *Isochrysis galbana* o microorganismos tales como *C. glutamicum* o ciliados, algas u hongos.

Un ASE aislado de la invención o una porción del mismo puede participar en el metabolismo de compuestos involucrados innecesariamente para la construcción de membranas celulares en *Isochrysis galbana*, o en el transporte de moléculas a través de estas membranas, o tiene una o más de las actividades definidas en la Tabla 2. Preferiblemente, la proteína o porción de la mismas comprende una secuencia de aminoácidos que es suficientemente homologa a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de tal forma que la proteína o porción de la misma mantiene la capacidad de participar en el metabolismo de compuestos necesarios para la construcción de las membranas celulares en *Isochrysis galbana*, o en el transporte de moléculas a través de estas membranas. La porción de la proteína es preferiblemente una porción biológicamente activa tal como se describe aquí. En otra realización preferida, un ASE de la invención tiene secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2. En aun otra realización preferida, un ASE de la invención tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2. En aun otra realización preferida el ASE tiene una secuencia de aminoácidos que es codificada por una secuencia de nucleótidos que hibridiza bajo condiciones restrictivas, a una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. En aun otra realización preferida, el ASE tiene una secuencia de aminoácidos que es codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos 50-60%, preferiblemente al menos 60-70%, más preferiblemente al menos 70-80%, 80-90%, 90-95% y aun más preferiblemente al menos 96%, 97%, 98, 99% o más homologa a una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Los ASEs preferidos de la presente invención también preferiblemente poseen al menos una de las actividades de ASE descritas aquí. Por ejemplo, un ASE preferido de la presente invención incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que hibridiza bajo condiciones restrictivas a una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, que puede participar en el metabolismo de compuestos necesarios para la construcción de membranas celulares en *Isochrysis galbana*, o en el transporte de moléculas a través de estas membranas, o que tienen una o más de estas actividades definidas en la Tabla 2. En otras realizaciones, el ASE es sustancialmente homologo a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y retiene la actividad funcional de la proteína de una de las secuencia de SEQ ID NO: 2 si bien difieren en la secuencia de aminoácidos debido a la variación natural o mutagénesis, tal como se describió en detalle en la subsección I más arriba. De acuerdo con la anterior, en otra realización, el ASE es una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 50-60%, preferiblemente al menos 60-70%, y más preferiblemente al menos 70-80, 80-90, 90-95% y lo más preferiblemente al menos 96%,97%,98%,99% o más homologa a una secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID NO: 2 y que tiene al menos una de las actividades del ASE descritas aquí. En otra realización, la invención es pertinente a una proteína complete de *Isochrysis galbana* que es sustancialmente homologa a una secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID NO: 2.

Las porciones biológicamente activas de un ASE incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de aminoácidos de una ASE, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos de una proteína homologa a un ASE, que incluyen menos aminoácidos que un ASE de longitud completa o la proteína de longitud completa que es homologa a un ASE, y exhiben al menos una actividad de un ASE. Típicamente, las porciones biológicamente activas (péptidos, por ejemplo péptidos que tienen, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 o más aminoácidos de longitud) comprenden un dominio o estructura con al menos una actividad de un ASE. Además, otras porciones biológicamente activas, en las cuales se

eliminan otras regiones de la proteína, pueden prepararse por técnicas de recombinación y evaluarse para una o más de las actividades descritas aquí. Preferiblemente, las porciones biológicamente activas de un ASE incluyen uno o más dominios/estructuras seleccionados o porciones de los mismos que tienen actividad biológica.

5 Los ASEs son producidos preferiblemente por técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína es clonada en un vector de expresión (tal como se describe más arriba), el vector de expresión es introducido en una célula huésped (tal como se describió más arriba) y el ASE se expresa en la célula huésped. El ASE puede luego aislarse a partir de las células mediante un esquema de purificación de propiedad utilizado tecinas estándar de purificación de proteínas. Alternativamente a la expresión recombinante, un ASE, polipéptido o péptido puede sintetizarse químicamente utilizando técnicas de síntesis de péptidos estándar. Adicionalmente, el ASE nativo puede aislarse a partir de células (por ejemplo, células endoteliales), por ejemplo utilizando un anticuerpo anti-ASE, el cual puede ser producido por técnicas estándar utilizando un ASE de esta invención o un fragmento del mismo.

15 La invención también proporciona proteínas ASE quiméricas o de fusión. Tal como se utiliza aquí, una "proteína quimérica" de ASE o una "proteína de fusión" comprende un polipéptido ASE operativamente enlazado con un polipéptido diferente de ASE. Un "polipéptido de ASE" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a un ASE, mientras que un "polipéptido diferente de ASE" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a una proteína que no es sustancialmente homologa al ASE, por ejemplo, una proteína que es diferente del ASE y que es derivada del mismo o de un diferente organismo. Dentro de la proteína de fusión, el término "operativamente enlazado" pretende indicar que el polipéptido de ASE y el polipéptido diferente de ASE se fusionan uno con otro de tal manera que ambas secuencias satisfacen la función predicha adscrita a la secuencia usada. El polipéptido diferente de ASE puede ser fusionado en el término N o en el término C del polipéptido del ASE. Por ejemplo, en una realización la proteína de fusión es una proteína de fusión GST-ASE en la cual las secuencias de ASE son fusionadas en el extremo C-terminal de las secuencias GST. Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de ASE recombinante. En otra realización, la proteína de fusión es un ASE que contiene una secuencia de señal heteróloga en su término N. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamíferos), la expresión y/o secreción de un ASE puede incrementarse a través del uso de una secuencia de señal heteróloga.

30 Un ASE quimérico o una proteína de fusión de la invención se produce por técnicas estándar de recombinación de ADN. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos se unen entre si en un marco de acuerdo con las técnicas convencionales, por ejemplo, empleando extremos romos o extremos terminales predispuestos para el ligamiento, digestión por ruptura con enzimas de restricción para proveer los términos apropiados, llenado de extremos cohesivos cuando es apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables, y ligamiento enzimático. En otra realización, el gen de fusión puede ser sintetizado por técnicas convencionales que incluyen sintetizadores automáticos de ADN. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo utilizando cebadores de ancla que dan lugar a enlazamiento complementario entre dos fragmentos de gen consecutivos, los cuales pueden ser subsecuentemente conectados y reamplificados para generar un secuencia de gen quimérico (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992). Adicionalmente, muchos vectores de expresión están disponibles comercialmente capaces de codificar una estructura de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica ASE puede ser clonado de un vector de expresión tal que la estructura de fusión esta unida en marco al ASE.

45 Homólogos del ASE pueden generarse mediante mutagénesis, por ejemplo, por mutación puntual discreta o truncamiento del ASE. Tal que como se utiliza aquí el término "homologo" se refiere a una variante del ASE que actúa como un agonista o antagonista de la actividad del ASE. Un agonista del ASE puede retener sustancialmente las mismas, o un subconjunto, de las actividades biológicas del ASE. Un antagonista del ase puede inhibir una o más de las actividades de la forma de origen natural del ASE, mediante, por ejemplo, enlazamiento competitivo a un miembro secuencia abajo o secuencia arriba de la cascada metabólica del componente de la membrana celular que incluye el ASE, o enlazándose a una ASE que media en el transporte de compuestos a través de tales membranas, evitando por lo tanto que tenga lugar la translocación.

50 Se prevé que los homólogos del ASE pueden ser identificados seleccionando bibliotecas combinacionales de mutantes, por ejemplo, mutantes de truncamiento, del ASE para la actividad agonista o antagonista del ASE. Una biblioteca variegada de variantes de ASE se genera por mutagénesis combinacional a nivel del ácido nucleico y se codifica mediante una biblioteca de genes variegada. Una biblioteca variegada de variantes de ASE puede ser producida mediante, por ejemplo, ligación enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias genéticas tales que se expresable un conjunto degenerado de secuencias de ASE potencial como polipéptidos individuales, o, 55 alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para despliegue de fagos) que contenga el conjunto de secuencias de ASE en la misma. Hay una variedad de métodos que pueden ser utilizados para producir bibliotecas de homólogos de ASE potenciales a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia de genes degenerada puede llevarse a cabo en un sintetizador automático de ADN, y el gen sintético se liga entonces en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite proveer, en una mezcla, todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias de ASE 60

potenciales. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

5 Además, pueden utilizarse bibliotecas de fragmentos de ASE para generar una población variegada de fragmentos de ASE para escoger y subsecuente selección de homólogos de un ASE. Una biblioteca de fragmentos de secuencia de codificación puede generarse tratando un fragmento de PCR de doble cadena de una secuencia de codificación de ASE de una nucleasa bajo condiciones donde ocurra el cortesolamente aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN de doble cadena, renaturalizando el ADN para formar ADN de doble cadena que puede incluir pares sentido/antisentido de diferentes productos cortados, eliminando porciones de cadena doble de los dúplex reformados mediante tratamiento con S1 nucleasa, y ligando la biblioteca del fragmento resultante en un vector de expresión. Mediante este método, puede derivarse una biblioteca de expresión que codifica los fragmentos N-terminal, C-terminal y internos de diversos tamaños del ASE.

15 Se conocen varias técnicas en el arte para seleccionar los productos genéticos de bibliotecas combinacionales hechas por mutaciones o truncamiento puntuales, y para seleccionar bibliotecas de ADNc para productos genéticos que tengan una propiedad seleccionada. Tales técnicas son adaptables para la selección rápida de bibliotecas genéticas generadas por la mutagénesis combinacional de homólogos de ASE. Las técnicas más ampliamente usadas, que son adecuadas para análisis de alto rendimiento, para seleccionar grandes bibliotecas de genes típicamente incluyen clonar la biblioteca de gen en vectores de expresión replicables, transformando las células a propiedades con la biblioteca resultante de vectores, y expresando los genes combinacionales bajo condiciones en las cuales la detección de la actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto fue detectado. La mutagénesis de conjunto recursivo (REM), una técnica que potencia la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, puede utilizarse en combinación con las pruebas de selección para identificar homólogos de ASE (Arkin and Yourvan (1992) *PNAS* 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331).

25 Se prevé que, las pruebas basadas en células pueden ser explotadas para analizar una biblioteca de ASE variegada, utilizando métodos adicionales bien conocidos en la técnica.

E. Usos y Métodos de la Invención

30 Las moléculas de ácido nucleico, proteínas, homólogos de proteínas, proteínas de fusión, cebadores, vectores y células huésped descritas aquí pueden utilizarse en uno o más de los siguientes métodos: identificación de *Isochrysis galbana* y otros organismos relacionados; mapeo de genomas de organismos relacionados con *Isochrysis galbana*; identificación y localización de secuencias de *Isochrysis galbana* de interés; estudios evolutivos; determinación de regiones de ASE requeridas por función; modulación de una actividad de ASE. Modulación del metabolismo de uno o más componentes de la membrana celular; modulación de la membrana de transporte de uno o más compuestos; y modulación de la producción celular de un compuesto deseado tal como un producto químico fino, incluyendo PUFA.

35 Las moléculas de Ácido nucleico de ASE de la invención tienen una variedad de usos. Primero, pueden ser utilizadas para utilizadas para identificar un organismo como *Isochrysis galbana* o un pariente cercano del mismo. También pueden utilizarse para identificar la presencia de *Isochrysis galbana* o un pariente del mismo en una población mixta de organismos. La invención proporciona las secuencias de ácido nucleico de un buen número de genes de *Isochrysis galbana* sondeando el ADN genómico extraído de un cultivo de una población única o mixta de microorganismos bajo condiciones restrictivas con una sonda que barre una región de un gen de *Isochrysis galbana* que es único para este organismo, con lo que se puede establecer si este organismo está presente. Aunque la *Isochrysis galbana* por sí misma no se utiliza para la producción comercial de ácidos poliinsaturados, las algas son las únicas plantas conocidas además los mohos que producen más de un pequeño porcentaje de sus lípidos totales en forma de PUFAs. Por lo tanto, las secuencias de ADN relacionadas con los ASE son especialmente adecuadas para ser utilizadas para la producción de PUFA en otros organismos.

45 Adicionalmente, las moléculas de ácido nucleico y las moléculas de proteína de la invención pueden servir como marcadores para regiones específicas del genoma. Esto tiene utilidad no solamente en el mapeo del genoma, sino también para estudios funcionales de proteínas de *Isochrysis galbana*. Por ejemplo, para identificar la región del genoma a la cual una proteína de enlazamiento del ADN particular de la *Isochrysis galbana* se enlaza, el genoma de la *Isochrysis galbana* podría ser digerido, y los fragmentos incubados con la proteína de enlazamiento del ADN. Aquellos que se enlacen a la proteína pueden ser sondeados adicionalmente en las moléculas de ácido nucleico de la invención, preferiblemente con etiquetas fácilmente detectables; el enlazamiento de tal molécula de ácido nucleico al fragmento de genoma permite la localización de fragmentos sobre el mapa del genoma de la *Isochrysis galbana*, y, cuando se llevan a cabo múltiples veces con diferentes enzimas, facilita una rápida determinación de la secuencia de ácidos nucleicos a la cual se enlaza la proteína. Adicionalmente, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser suficientemente homologas a las secuencias de especies relacionadas de tal forma que estas moléculas de ácido nucleico pueden servir como marcadores para la construcción de un mapa genómico para algas relacionadas, tales como *Isochrysis galbana*.

Las moléculas de ácido nucleico de ASE de la invención también son útiles para estudios evolutivos y estructurales de proteína. Los procesos metabólicos y de transporte en los cuales participan las moléculas de la invención se utilizan en un amplia variedad de células procarióticas y eucarióticas; comparando las secuencias de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención con aquellas que codifican enzimas similares de otros organismos, puede establecerse la relación evolutiva de los organismos. De la misma forma, tal comparación permite un establecimiento de las regiones en las cuales la secuencia se conserva y en las cuales no, lo que puede ayudar en la determinación de aquellas regiones de las proteínas que son esenciales para el funcionamiento de la enzima. Este tipo de determinaciones de valor para los estudios de ingeniería proteínica y pueden dar una indicación de lo que la proteína puede tolerar en términos de mutagénesis sin perder la función.

La manipulación de las moléculas de ácido nucleico del ASE de la invención puede dar como resultado a la producción de ASEs que tengan diferencias funcionales con respecto a los ASEs de tipo silvestre. Estas proteína pueden ser mejoradas en eficiencia o actividad, pueden estar presentes en la célula en número mayor del usual, o pueden disminuir en eficiencia o actividad. La eficiencia o actividad mejorada significa por ejemplo que la enzima tenga una selectividad y/o una actividad mayor que la enzima original, preferiblemente al menos 10% más alta, particularmente de forma preferible al menos 20% más alta, lo más particularmente de forma preferible al menos 30% más alta actividad.

Hay un cierto número de mecanismos mediante los cuales la alteración de un ASE de la invención puede afectar directamente el rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción de un producto químico fino incorporando tal proteína alterada. La recuperación de los compuestos químicos finos a partir de cultivos a gran escala de ciliados, algas u hongos se mejora significativamente si las células secreta los compuestos deseados, puesto que tales compuestos pueden ser aislados fácilmente del medio de cultivo (en oposición a los que son extraídos de la masa de células cultivadas). La purificación de otra forma también puede ser mejorada si preferiblemente la célula almacena compuestos en un compartimiento especializado que tenga una clase mecanismo de concentración in vivo. En el caso de plantas que expresan ASEs el transporte incrementado puede llevar a una partición mejorada dentro del tejido y órganos vegetales. Bien sea incrementando el número o la actividad de moléculas transportadoras que exportan los productos químicos finos de la célula, puede ser posible incrementar la cantidad del producto químico fino producido que está presente en el medio extracelular, permitiendo así una mayor facilidad de recolección y purificación o, en el caso de las plantas una partición más eficiente. Por el contrario, con el fin de sobreproducir de forma eficiente uno o más productos químicos finos, se requieren cantidades incrementadas de los cofactores, moléculas precursoras, y compuestos intermedios para las rutas biosintéticas apropiadas. Incrementado el número y/o actividad de las proteínas de transporte involucradas en la importación de nutrientes, tales como fuentes de carbono (por ejemplo, azúcares), fuentes de nitrógeno (esto es, aminoácidos, sales de amonio), fosfato y azufre, puede ser posible mejorar la producción del producto químicos fino, debido a la eliminación de cualquier limitación en el suministro de nutrientes en el proceso biosintético. Los ácidos grasos tales como los PUFA y los lípidos que contienen PUFA son por si mismos productos químicos finos deseables, de manera que al optimizar la actividad o incrementar el número de uno o más de los ASE de la invención que participan en la biosíntesis de estos compuestos, o impidiendo la actividad de uno o más de los genes que están involucrados en la degradación de estos compuestos, puede ser posible incrementar el rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción de moléculas de ácidos grasos y lípidos en ciliados, algas, plantas, hongos, levaduras u otros microorganismos.

La ingeniería de uno o más genes de ASE de la invención también puede dar como resultado un ASE que tenga actividades alteradas que impactan indirectamente en la producción de uno más productos químicos finos deseados de algas, plantas, ciliados u hongos. Por ejemplo, los procesos bioquímicos normales del metabolismo dan como resultado la producción de una variedad de productos residuales (por ejemplo, peróxido de hidrogeno y otras especies con oxígeno reactivo) que pueden interferir de forma activa en estos mismos procesos metabólicos (por ejemplo, el peroxinitrilo es conocido por nitrar las cadenas laterales de la tirosina inactivando por lo tanto algunas enzimas que tienen tirosina en el sitio activo (Groves, J.T. (1999) Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2): 226-235)). Mientras que estos productos residuales son excretados normalmente, las células utilizadas para producción por fragmentación a gran escala son optimizadas para la sobreproducción de uno o más productos químicos finos, y así pueden producir más productos residuales de lo que es típico para una célula tipo silvestre. Optimizando la actividad de uno o más ASE de la invención, puede ser posible mejorar la viabilidad de la célula y mantener una actividad metabólica eficiente, y por lo tanto mejorar la producción del producto deseado tal como PUFAs. También, la presencia de niveles intracelulares altos del producto químico fino deseado puede realmente ser tóxica para la célula de manera que al incrementar la capacidad de la célula para secretar estos compuestos, se puede mejorar adicionalmente la viabilidad de la célula.

Adicionalmente, los ASEs de la invención puede ser manipulados de la tal manera que las cantidades relativas de diversas moléculas de lípidos y ácidos grasos producidos se alteren. Esto puede tener un efecto profundo sobre la composición en lípidos de la membrana de la célula. Puesto que cada tipo de lípido tiene propiedades físicas diferentes, una alteración de la composición en lípidos de una membrana puede alterar significativamente la fluidez de la membrana. Los cambios en la fluidez de la membrana pueden impactar el transporte de moléculas a través de la membrana, lo cual, como se explico previamente, puede modificar la exportación de productos residuales o los productos químicos finos producidos o la importación de nutrientes necesarios. Tales cambios en la fluidez de la membrana también pueden afectar profundamente la integridad de la célula; células con membranas relativamente más débiles son más susceptibles a los antibióticos y a las condiciones de tención biótica lo cual puede dañar o matar la

5 célula. Al manipular los ASEs involucrados en la producción de ácidos grasos y lípidos para la construcción de membranas tal que la membrana resultante tenga una composición de membrana más adecuada para las condiciones ambientales presentes en los cultivos utilizados para producir los productos químicos finos, deberían sobrevivir y multiplicarse una proporción más grande de las células. Números más grandes de células productoras se traducirían en rendimientos, producción o eficiencia mayor de la producción de los productos químicos a partir del cultivo.

10 Las estrategias de mutagénesis antes mencionadas para los ASEs de manera que se traduzcan en rendimientos incrementados de un producto quimo fino no significan que sean limitantes; las variaciones de estas estrategias será fácilmente evidentes para una persona experimentada en la técnica. Utilizando tales estrategias, e incorporando los mecanismos divulgados aquí, las moléculas de ácido nucleico y las moléculas de proteína de la invención pueden ser utilizadas para generar algas, ciliados, plantas, animales, hongos u otros microorganismos como *C. glutamicum* que expresan ácido nucleico y moléculas de proteínas de ASE mutadas, de tal manera que se mejora el rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción de un compuesto deseado. Este compuesto deseado puede ser un producto natural de las algas, ciliados, plantas, animales u hongos que incluye los productos finales de las rutas de biosíntesis e intermedios de las rutas metabólicas de origen natural, así como moléculas que no se presentan de forma natural en el metabolismo de dichas células, pero que son producidas por las células de la invención.

15 Otra realización de la invención es un método para la producción de PUFAs, comprendiendo dichos métodos el crecimiento de un organismo que comprende un ácido nucleico de la invención, un constructo de genes de la invención o un vector de la invención que codifica un polipéptido que elonga el ácido α -linolénico ($C_{18:3\Delta 9,12,15}$) en al menos dos átomos de carbono mientras que no se elonga el ácido γ -linolénico ($C_{18:3\Delta 6,9,12}$), seleccionado grupo consistente de

20 a) una secuencia de ácido nucleico representada en SEQ ID NO:1.

b) Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido representado en SEQ ID NO: 2,

c) Derivados de la secuencia representada en SEQ ID NO:1, la cual codifica polipéptidos que tienen al menos 50% de homología con la secuencia que codifica la secuencias de aminoácidos representadas en SEQ ID NO: 2 y secuencias que funcionan como una elongasa.

25 Mas preferiblemente la secuencia de ácido nucleico se deriva de una planta, preferiblemente del genero *Isochrysis*. La secuencia usada codifica por un polipéptido que elonga los ácidos grasos Δ -9.

Los PUFAs producidos por este método son preferiblemente moléculas de ácidos grasos C20 o C22 que tienen al menos dos dobles enlaces en la molécula de ácido graso, preferiblemente al menos tres dobles enlaces.

30 Los organismos que son útiles en el método de la invención para la producción de los PUFA son microorganismos tales como bacterias Gram-positivas o bacterias Gram-negativas o preferiblemente algas azules, ciliados tales como *Colpidium* o *Stylonichia*, hongos tales como *Mortierella* o *Thraustochytrium* o *Schizochytrium*, algas tales como *Phaeodactylum*, y/o plantas tales como maíz, trigo, centeno, avena tritical, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, especies de Brassica tales como colza, canola y tulipán, linaza, pimienta, girasol, borraja, primavera del amanecer y tagetes, plantas solanáceas tales como patata, tabaco, berenjena y tomate, especies de Vicia, guisantes, manihot, alfalfa, plantas tipo arbusto (café, cacao, té), especies de *Salix*, árboles (palma de aceite, coco) y pastos perennes y cultivos para forraje, bien sea directamente, por ejemplo, mohos u otras plantas donde la sobreexpresión u optimización de una proteína para la biosíntesis de ácidos grasos tiene un impacto directo sobre el rendimiento, producción y/o eficiencia de producción del ácido graso a partir de los organismos modificados.

35 Los PUFA pueden ser producidos en el proceso de la invención en forma de un aceite, lípido o ácido graso libre. Los PUFAs producidos por este método pueden ser aislados recolectando los organismos bien sea del cultivo en el cual están creciendo o del campo deshaciendo y/o extrayendo el material recolectado con un solvente orgánico. A partir de dicho solvente puede aislarse el aceite que contiene lípidos, fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos, triacilgliceroles y/o ácidos grasos libres con un contenido más alto de PUFAs. Mediante hidrólisis básica o ácida de los lípidos, pueden aislarse fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos o triacilgliceroles, los ácidos grasos libres que contienen un contenido más alto de PUFA. Alto contenido de PUFAs significa al menos 1%, preferiblemente 10%, de forma particular preferiblemente 20%, de la forma más particular preferiblemente 40% o más de PUFA que el organismo adicional que no tiene ácido nucleico adicional que codifique la elongasa de la invención.

40 Adema de los métodos antes mencionados, los lípidos de las plantas se extraen preferiblemente a partir del material vegetal tal como se describe en Cahoon et al. (1999) PNAS 96 (22): 12935-12940 and Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152: 141-145. Qualitative and quantitative lipid or fatty acid analysis is described atin Christie, William W., Advances in Lipid Metod- ology., Ayr/Scotland : Oily Press. - (Oily Press Lipid Library ; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989 Repr. 1992. - IX,307 pS. - (Oily Press Lipid Library ; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford : Pergamon Press, 1(1952) - 16(1977) bajo el titulo: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids.

Los PUFAs producidos por este método son preferiblemente moléculas de ácidos grasos C₂₀ o C₂₂ que tienen al menos dos dobles enlaces en la molécula de ácido graso, preferiblemente tres o cuatro dobles enlaces, preferiblemente tres dobles enlaces. Tales moléculas de ácidos grasos C₂₀ o C₂₂ pueden aislarse a partir de los organismos en la forma de un aceite, lípido o ácido graso libre. Los organismos que son útiles son por ejemplo los mencionados más arriba. Organismos preferidos son plantas transgénicas. Una realización adicional de la invención es un anticuerpo monoclonal o policlonal que interactúa específicamente con un polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos de la invención descrita más arriba y la cual es producida por un método conocido por el especialista en la técnica.

Una realización adicional de la invención es un kit que comprende una secuencia de nucleótidos de la invención, un constructo de genes tal como se reivindica, un vector como se reivindica o un anticuerpo como se describe más arriba. Dicho kit es útil por ejemplo para la identificación de la proteína, la secuencia de ácidos nucleicos.

Las estrategias de mutagénesis antes mencionadas para los ASE de manera que se produzca como resultado un rendimiento incrementado de un producto químico fino no pretenden ser limitantes; las variaciones de estas estrategias serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Utilizando tales estrategias e incorporando los mecanismos divulgados en ellas, las moléculas de ácido nucleico y las moléculas de proteína de la invención pueden ser utilizadas para generar algas, ciliados, plantas, hongos u otros microorganismos tales como *C. glutamicum* que expresan moléculas de ácido nucleico y de proteína de ASE mutadas de tal forma que el rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción de un compuesto deseado se mejore. El compuesto deseado puede ser cualquier producto natural de algas, ciliados, plantas, hongos o *C. glutamicum*, los cuales incluyen los productos finales de las rutas biosintéticas e intermedios de las rutas metabólicas de origen natural, así como moléculas que no se presentan de forma natural en el metabolismo de dichas células, pero que son producidas por dichas células de la invención.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos los cuales no deben considerados como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Procesos generales

a) Procesos y métodos generales de clonación

Los procesos de clonación tales como, por ejemplo, rupturas restrictivas, electroforesis en gel de agarosa, purificación de fragmentos de ADN, transferencia de ácidos nucleicos a membranas nitrocelulosa y nilón, unión de fragmentos de ADN, transformación de células de *Escherichia coli* y de levaduras, crecimiento de bacterias y análisis secuencial de ADN recombinante fueron llevados a cabo en Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) or Kaiser, Michaelis and Mitchell (1994) "Methods in Yeast Genetics" (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-451-3). La transformación y cultivo de algas tales como *Clorella* o *Phaeodactylum* se llevan a cabo como lo describe El-Sheekh (1999), *Biologia Plantarum* 42: 209-216; Apt et al. (1996), *Molecular and General Genetics* 252 (5): 872-9.

b) Productos químicos:

Los productos químicos fueron obtenidos, sino se mencionaba alguna otra cosa en el texto, en calidad p.a. de las compañías Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) y Sigma (Deisenhofen). Las soluciones fueron preparadas utilizando agua purificada, libre de pirógenos, designada como H₂ o en el texto que sigue, a partir de una planta de purificación de agua de un sistema Milli-Q (Millipore, Eschborn). Las endonucleasas de restricción, las enzimas modificadoras de ADN y los kits de biología molecular AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Biometra (Göttingen), Boehringer (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, EE UU), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) y Stratagene (Amsterdam, Países Bajos). Se utilizaron, sino se menciona otra cosa, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

c) Material de algas

Para este estudio, se usaron algas de las especies *Isochrysis galbana* CCAP927/1, obtenidas del Culture Collection of Algae and Protozoa, Centre for Coastal and Marine Sciences, Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, Argyll; UK.

d) Cultivo de algas

La Isochrysis galbana fue cultivada utilizando el medio f/2 que contiene 10% de medio orgánico tal como lo describe Guillard, R.R.L. [1975; Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L. and Chanley, M.H. (Eds.) Culture of marine Invertebrate animals, NY Plenum Press, pp. 29-60.]. La Isochrysis galbana fue cultivada a 14°C bajo luz continua y con una intensidad de luz de 30 microEinstein en recipientes de vidrio con agitación a 100 rpm.

El medio f/2 consiste de:

995.5 ml de agua de mar artificial que contiene:

1 ml NaNO₃ (75 g/l),

1 ml NaH₂PO₄ (5 g/l),

10 1 ml de solución de solución de elementos metálicos,

1 ml de Tris/Cl pH 8.0,

0.5 ml de solución de vitamina f/2

Solución de elementos metálicos en trazas:

Na₂EDTA (4.36 g/l),

15 FeCl₃ (3.15 g/l),

Elementos metálicos en traza primarios:

CuSO₄ (10 g/l),

ZnSO₄ (22 g/l),

CoCl₂ (10 g/l),

20 MnCl₂ (18 g/l),

NaMoO₄ (6.3 g/l)

Solución de vitamina f/2

Biotina: 10 mg/l,

Tiamina 200 mg/l,

25 Vitamina B12 0.1 mg/l

Medio orgánico:

Acetato de Sodio (1 g/l),

glucosa (6 g/l),

Succinato de sodio (3 g/l),

30 Bacto-Tripton (4 g/l),

Extracto de levadura (2 g/l).

Ejemplo 2: Aislamiento de ADN a partir de algas .

Los detalles para el aislamiento de ADN total se relacionan con la manipulación de un gramo de material fresco recolectado por filtración.

Regulador CTAB:

- 5 2% (p/v) de bromuro de N-cetil-N, N,N-trimetilamonio (CTAB).
- 100 mM de Tris HCl pH 8.0;
- NaCl 1.4 M;
- EDTA 20 mM

Regulador de N-laurilsarcosina:

- 10 10% (p/v) N-laurilsarcosina; 100 mM de Tris HCl pH 8.0;
- 20 mM EDTA.

El material fue homogeneizado bajo nitrógeno líquido con arena de cuarzo en un mortero para dar un polvo fino y se transfirió a copas Eppendorf de 2 ml. El material congelado fue cubierto entonces con una capa de 1 ml de regulador de descomposición (1 ml de regulador de CTAB, 100 ml del regulador de N-laurilsarcosina, 20 ml de β-mercaptoetanol y 10 ml de solución de proteinasa K, 10 mg/ml) y se incubó a 60°C durante una hora con agitación continua. El homogeneizado obtenido fue distribuido en dos recipientes Eppendorf (2 ml) y se extrajo dos veces por agitación con el mismo volumen de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1). Para la separación de fases, se llevó a cabo centrifugación a 8000 x g y a temperatura ambiente durante 15 minutos en cada caso. El ADN fue precipitado entonces a 70°C durante 30 minutos. El ADN precipitado fue sedimentado a 4°C y 10000g durante 30 minutos y se resuspendió en 100 microlitros del regulador TE (Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6). Para purificación adicional, el ADN fue tratado con NaCl (concentración final 1.2M) y fue precipitado de nuevo a 70°C durante 30 minutos utilizando dos veces el volumen de etanol absoluto. Después de una etapa de lavado con etanol al 70%, el ADN fue secado y subsecuentemente extraído en 50 µlitros de H2O+ARNasa libre de ADNasa (concentración final de 50mg/ml). El ADN fue disuelto durante la noche a 4°C y la digestión con ARNasa fue llevada a cabo subsecuentemente a 37°C durante una hora. El almacenamiento de ADN tuvo lugar a 4°C.

Ejemplo 3: Aislamiento de ARN total y de poli-(A)+ARN de algas

Para la investigación de los transcritos, se aislaron tanto el ARN total como el poli-(A)+ARN.

Los cultivos de algas fueron recolectados por centrifugación a 3000 g durante 5 minutos. Las pellas fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido (-70°C). El material del alga (1g) fue homogeneizado con un pistilo en un mortero bajo nitrógeno líquido. El material fue desintegrado hasta homogeneidad en dos volúmenes de regulador el cual era el reactivo de aislamiento TriPure™ (roche). El ARN total fue aislado siguiendo el protocolo del fabricante.

El aislamiento del Poli(A)+ ARN fue llevado a cabo utilizando el kit de aislamiento de ARNm de Amersham Pharmacia siguiendo las instrucciones del protocolo del fabricante. Después de la determinación de la concentración del ARN o del Poli(A)+ARN, el ARN fue precipitado por adición de 1/10 de volúmenes de acetato de sodio 3M pH 4.6 y dos volúmenes etanol y se almacena a -70°C.

Ejemplo 4: Construcción de biblioteca de ADNc

El ADNc de cadena doble fue sintetizado utilizando el kit de síntesis de ADNc de Stratagene siguiendo el protocolo del fabricante. Se paso de a través de una columna Sephacyl S-400 Spun de un kit de síntesis de ADNc (Amersham Pharmacia) para eliminar las moléculas adaptadoras y más pequeñas. El ADNc eluido de la columna fue extraído con fenol, precipitado con etanol y ligado a los brazos del vector Uni-Zap (Stratagene) y empacado en 11 fagos utilizando el kit de empacado Ready-To-Go Lambda (Amersham Pharmacia Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvo una biblioteca de 1x10⁶ pfu variando la mayoría de los insertos 0.4-2kb.

Ejemplo 5: Identificación del gen ASE1 y análisis del clon de ADNc Ig_ASE1

A partir de un alineamiento de secuencias de elongasas conocidas (de M. alpina, S. cerevisiae (Elo1, Elo2, Elo3), C. elegans (F56H11.4, F41H10.8)) se escogió la estructura común MYXYFL para el diseño del oligonucleótido.

ES 2 383 451 T3

El oligo complementario reverso

5'-A(A/G)(A/G)AA(A/G)TA(A/G)TAAII(G/A)TACAT-3' (I = dexosinosina)

Se sintetizo y utilizo PCR de conclusión con un cebador promotor universal T3 (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG- 3') utilizando una biblioteca de ADNc de Isochrysis galbana como patrón.

5 Las condiciones de PCR fueron

94°C para 3 minutos (1 ciclo)

94°C durante 15 segundos, 52°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos (4 ciclos)

94°C durante 15 segundos, 52°C durante 30 segundos (con decremento de un 1°C cada ciclo)

72°C durante 45 segundos (10 ciclos).

10 94°C durante 15 segundos, 42°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos (25 ciclos)

72°C durante 6 minutos (1 ciclo)

Se clono un producto de PCR de aproximadamente 650 bp y se secuencio y la secuencia de aminoácidos deducida se encontró que alineaba con la compilación de secuencia de elongasa putativa. El cebador específico para el gen (sentido)

15 5'-ACTCGAAGCTCTTCACATGG-3'

Fue sintetizado y utilizado en una reacción de PCR de biblioteca posterior con un cebador de adelanto M13 universal

(5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')

utilizando las siguientes condiciones:

94°C durante 3 minutos (1 ciclo)

20 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante (10 ciclos)

94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto 33 segundos (con un incremento de 3 segundos cada ciclo) (20 ciclos)

72°C durante 6 min (1 ciclo).

25 Se clono y secuencio un producto de PCR de aproximadamente 850 bp. Las dos secuencias de producto del PCR se superpusieron en 220 bp, confirmando que son finalmente derivadas de un gen individual.

Esos clones de ADNc aislados a partir de bibliotecas de ADNc como se describe en el Ejemplo 6 se utilizaron para el secuenciamiento del ADN de acuerdo con métodos estándar, en particular mediante el método de terminación de cadena utilizando el kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Alemania). El secuenciamiento fue llevado a cabo posteriormente a la recuperación del plásmido a partir de bibliotecas de ADNc a través de escisión in vivo y retransformación del DH10B sobre placas de agar (detalles de material y protocolo de Stratagene, Ámsterdam, Países Bajos).

30

El ADN del plásmido fue preparado a partir de cultivos hechos durante la noche de E. coli sobre medio de caldo Luria-Broth que contenía ampicilina [vease Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)].

35 Se utilizaron cebadores de secuenciamiento con las siguientes secuencias nucleótidos:

5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

5'-CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3'

5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3'

la secuencia completa de nucleótidos del ADNc consistió de aproximadamente 1064 bp. Contenía un marco de lectura abierta de 789 bp que codificaba 263 aminoácidos. La secuencia de proteínas comparte solamente baja identidad o similitud con genes conocidos tales como elongasas que se requieren para la elongación de ácidos grasos de longitud de cadena media en las levaduras (Toke & Martin, 1996, Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 271,18413-18422.).

Tabla 1. Alineamiento de elongasa de *Ischrysis galbana* con secuencias homologas

Gen	M.alpina	Humano	Ratón	Levadura	C. elegans
Ig_ASE1	27	25.5 (1) 20.2 (2)	24.3	21 (3) 23.2 (4) 23.6 (5)	19

Los valores de la tabla son identidades en porcentaje del alineamiento para par utilizando DNAMAN (Lynnon Biosoft). Parámetros usados: Matriz: BLOSUM, método de Alineamiento: K-tuple optimo: 2, brecha abierta: 10, penalidad de brecha: 4, extensión de brecha: 0.1; 1=ELOVL4; 2=Helol; 3=Elol; 4=Elo2; 5=Elo3.

Las secuencias han sido tomados ELOVL humano (artículo 1, secuencia 1), Helol human (artículo 1, secuencia 2), M.alpina (Glelo, artículo 3), C.elegans (artículo 4, Elovl4 de ratón (artículo 1), levadura (secuencia 3,4,5 de los artículos 5 y 6)

1. Zhang et al., *Nature Gen.* 27: 89-93 (2001)
2. Leonard et al., *Biochem. J.* 350: 765-770 (2000).
3. Parker-Barnes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8284-8289, (2000).
4. Beaudoin et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6421-6426. (2000)
5. Toke and Martin, *J. Biol. Chem.* 271: 18413-18422 (1996)
6. Oh et al., *J. Biol. Chem.* 272: 17373-17384 (1997).

Los alineamientos par a par del gen Ig_ASE1 y *Mortierella* y homólogos de ratón se muestran en la Figura 1 y Figura 2.

Para alineamientos. Se usaron los siguientes parámetros para los alineamientos:

Parámetros usados para los alineamientos: Alineamiento múltiple:

Alineamientos par a par:	Penalidad fija: 10
Ktuplo: 1	Penalidad de flotación: 10
Número de diagonales: 3	Tamaño de ventana: 5
Matriz de peso (proteína): PAM 250	Penalidad de brecha: 5

Ejemplo 6: Identificación de genes pro hibridización

Las secuencias de genes pueden utilizarse para identificar genes homólogos o heterólogos de ADNc o bibliotecas genómicas.

Los genes homólogos (por ejemplo, clones de ADNc de longitud completa homólogos a y homólogos) pueden aislarse a través de hibridización de ácidos nucleicos utilizando por ejemplo bibliotecas de ADNc: dependiendo de la abundancia del gen de interés se colocan en placa de 100 000 hasta 1 000 000 de bacteriófagos recombinantes y se transfieren a una membrana de nilón. Después de desnaturalizar con un álcali, se inmoviliza el ADN sobre la membrana por ejemplo

mediante entrecruzamiento con UV. La hibridización se lleva a cabo en condiciones de alta restricción. En la hibridización en solución acuosa el lavado se lleva a cabo a una fuerza iónica de NaCl 1M y a una temperatura de 68°C. las sondas de hibridización se generan por ejemplo mediante etiquetado por transcripción de (³²P) radioactivo en corte (High Prime, Roche, Mannheim, Alemania). Las señales se detectan por autorradiografía.

5 Los genes homólogos o heterólogos parcialmente que se relacionan pero no son idénticos pueden identificarse de forma análoga al procedimiento descrito más arriba utilizando hibridización y condiciones de lavado de baja restricción. Para hibridización acuosa la fuerza iónica nuevamente se mantiene en NaCl 1M mientras que la temperatura se disminuye progresivamente desde 68 hasta 42°C.

10 El aislamiento de las secuencias genéticas con homología solamente en un dominio distinto de (por ejemplo) 10-20 aminoácidos puede llevarse a cabo utilizando sondas de oligonucleótidos radio marcados sintéticas. Los oligonucleótidos radio marcados se preparan por fosforilación del extremo 5'-inicial de dos oligonucleótidos complementarios con T4 polinucleotidil quinasa. Los oligonucleótidos complementarios se fusionan y ligan para formar concatémicos. Los concatémicos de doble cadena son entonces radio marcados por ejemplo por transcripción por corte. La hibridización se lleva a cabo normalmente en condiciones de baja restricción utilizando altas concentraciones de oligonucleótidos.

Solución de hibridización de oligonucleótidos:

6 x SSC

fosfato de sodio 0.01 M EDTA (pH 8) 1 mM

SDS 0.5 %

20 ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100µg/ml

Leche seca desnatada 0.1%

25 Durante la hibridización la temperatura se disminuye paso a paso hasta 5-10°C por debajo de la Tm estimada para el oligonucleótido por debajo de la temperatura ambiente seguida por etapas de lavado de autorradiografía. El lavado se lleva a cabo con restricción extremadamente baja tal como por ejemplo tres etapas de lavado utilizando 4x SSC. Detalles adicionales son descritos por Sambrook, J. et al. (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press or Ausubel, F.M. et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons.

Ejemplo 7: Plásmidos para transformación de plantas

30 Para la transformación en plantas pueden usarse vectores binarios tales como pGPTV (Becker et al. 1992, Plant Mol. Biol. 20:1195-1197) o pBinAR (Höfgen and Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221-230). La construcción de los vectores binarios puede llevarse a cabo por ligamiento de ADNc en orientación sentido o antisentido en el T-DNA.

El 5'-iniciador en el ADNc de un promotor en plantas activa la transcripción del ADNc. Se localiza una secuencia de poliadenilación 3' en el ADNc.

35 La expresión específica en tejidos puede lograrse utilizando un promotor específico para tejidos. Por ejemplo la expresión específica para semillas puede lograrse clonando el promotor DC3 o LeB4 o USP 5'-iniciador en el ADNc. También puede utilizarse cualquier otro elemento promotor específico para semillas. Para la expresión constitutiva dentro de la planta completa puede utilizarse el promotor CaMV 35S.

40 Las proteínas expresadas pueden ser dirigidas a un compartimiento celular utilizando una señal de péptidos, por ejemplo para plástidos, mitocondrias o retículo endoplasmático (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423). El péptido de señalización se clona en 5'-iniciador en el marco para el ADNc con el fin de alcanzar la localización subcelular de la proteína de fusión.

Ejemplo 8: Transformación de Agrobacterium

45 La transformación de planta mediada por Agrobacterium puede llevarse a cabo utilizando por ejemplo la cepa de Agrobacterium C58C1 pGV2260 (Deblaere et al. 1984, Nucl. Acids Res. 13, 4777-4788) o GV3101 (pMP90) (Koncz and Schell, Mol. Gen. Genet. 204 (1986), 383-396) o LBA4404 (Clontech). La transformación puede llevarse a cabo por técnicas de transformación estándar (Deblaere et al., Nucl. Acids. TRes. 13 (1984), 4777-4788).

Ejemplo 9: Transformación de plantas

La transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* puede llevarse a cabo utilizando técnicas de transformación y regeneración estándar (Gelvin, Stanton B.; Schilperoort, Robert A, *Plant Molecular Biology Manual*, 2nd Ed. - Dordrecht : Kluwer Academic Publ., 1995. ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R.; Thompson, John E., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Boca Raton: CRC Press, 1993. - 360 Spp., ISBN 0-8493-5164-2).

5 Por ejemplo la colza puede transformarse a través de transformación de cotiledón o hipocotilo (Moloney et al., *Plant cell Report* 8 (1989), 238-242; De Block et al., *Plant Physiol.* 91 (1989, 694-701). El uso de antibióticos para la selección de *Agrobacterium* y la planta depende del vector binario y de la cepa de *Agrobacterium* utilizada para la transformación. La selección de la colza se lleva a cabo normalmente utilizando kanamicina como marcador vegetal seleccionable.

10 La transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* al lino puede llevarse a cabo por ejemplo una técnica descrita por Mlynarova et al. (1994), *Plant Cell Report* 13: 282-285.

La transformación de la soja puede llevarse a cabo utilizando por ejemplo una técnica descrita en EP 0424 047, US 322 783 (Pioneer Hi-Bred International) o en EP 0397 687, US 5 376 543, US 5 169 770 (University Toledo).

15 La transformación de plantas utilizando bombardeo de partículas, el consumo de ADN mediado por polietilenglicol o través de la técnica de fibra de carburo de silicio se describe por ejemplo en 322 783 (Pioneer Hi-Bred International) or in EP 0397 687, US 5 376 543, US 5 169 770 (University Toledo).

Ejemplo 10: Mutagénesis in vivo

20 La mutagénesis in vivo de microorganismos puede llevarse a cabo por el paso plásmido (u otro vector) de ADN a través de *E.coli* u otros microorganismos (por ejemplo *Bacillus* spp, o levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*) que están impedidas en sus capacidad para mantener la integridad de su información genética. Las cepas mutantes típicas tienen mutaciones en los genes para el sistema de reparación de ADN (por ejemplo, *mutHLS*, *mutD*, *mutT*, etc.; para referencia, vease Rupp, W.D. (1996) *DNA repair mechanisms*, in: *Escherichia coli and Salmonella*, p. 2277-2294, ASM: Washington.). Tales cepas son bien conocidas por los expertos en la técnica. El uso de tales cepas se ilustra, por ejemplo, en Greener, A. and Callahan, M. (1994) *Strategies* 7: 32-34. La transferencia de moléculas de ADN mutado en plantas se hace preferiblemente después de la selección y prueba en microorganismos. Las plantas transgénicas generan de acuerdo con diversos ejemplos dentro de la sección de Ejemplos de este documento.

Ejemplo 11: Definición de la expresión de un producto de gen recombinante en un organismo transformado

La actividad de un producto de gen recombinante en el organismo huésped transformado ha sido medida a nivel transcripcional y/o translacional.

30 Un método útil para establecer el nivel de transcripción del gen (un indicador de la cantidad de ARNm disponible para traducción del producto genético) es llevar a cabo un Northern blot (para referencia véase, por ejemplo, Ausubel et al. (1988) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: New York o dentro de la sección de Ejemplos antes mencionado), en la cual un cebador diseñado para enlazarse al gen de interés es etiquetado con un etiqueta detectable (usualmente radioactiva o quimioluminiscente), de tal forma que cuando el ARN total de un cultivo del organismo es extraído, analizado sobre un gel, transferido a una matriz estable e incubado con esta sonda, el enlazamiento y la cantidad de enlazamiento de la zona indican la presencia y también la calidad del ARNm para este gen. Esta información es evidencia del grado de transcripción del gen transformado. El ARN celular total puede ser preparado a partir de células, tejidos o células de órganos, tejidos u órganos por diversos métodos, todos bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en Bormann, E.R. et al. (1992) *Mol. Microbiol.* 6: 317-326.

40 Para establecer la presencia o cantidad relativa de proteína traducida desde este ARNm, pueden emplearse técnicas estándar, tales como un Western blot (véase, por ejemplo, Ausubel et al. (1988) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: New York). En este proceso, se extraen las proteínas celulares totales, se separan por electroforesis en gel, se transfieren a una matriz tal como nitrocelulosa, y se incuban con una sonda, tal como un anticuerpo, que se enlaza específicamente a la proteína deseada. La sonda esta etiquetada en general con una etiqueta quimioluminiscente o colorimétrica la cual puede ser detectada fácilmente. La presencia en cantidad de la etiqueta observada indica la presencia y cantidad de la proteína mutante deseada presente en la célula.

Ejemplo 12: Análisis del impacto de las proteínas recombinantes sobre la producción del producto deseado

50 El efecto de la modificación genética en plantas, hongos, algas, ciliados o sobre la producción de un compuesto deseado (tal como ácidos grasos) puede establecerse haciendo crecer los microorganismos o plantas modificados bajo condiciones adecuadas (tales como las descritas más arriba) y analizando el medio y/o el componente celular para la producción incrementada del producto deseado (esto es, lípidos o un ácido graso). Tales técnicas de análisis son bien conocidas para los expertos en la técnica, e incluyen espectroscopia, cromatografía de capa fina, métodos de tinción de varias clases, métodos enzimáticos y microbiológicos, y cromatografía analítica tal como cromatografía líquida de alto

rendimiento (véase, por ejemplo, Ullmann, Encyclo- pedia of Industrial Chemistry, vol. A2, p. 89-90 and p. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A. et al., (1987) Appli- cations of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, vol. 3, Chapter III: Product recovery and purification, pages 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A. et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F. and Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A. and Henry, J.D. (1988) Biochemical separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. B3, Chapter 11, páginas 1-27, VCH: Weinheim; and Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publi- cations.).

Además de los métodos antes mencionados, los lípidos de las plantas se extraen a partir del material vegetal tal como se describe en Cahoon et al. (1999) PNAS 96 (22): 12935-12940 and Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152: 141-145. Qualitative and quantitative lipid or fatty acid analysis is described by Christie, William W., Advances in Lipid Metodology., Ayr/Scotland : Oily Press. - (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989 Repr. 1992.- IX, 307 pagesS. - (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford : Pergamon Press, 1(1952) - 16(1977) under the title.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids.

Además de la medición del producto final de fermentación, también es posible analizar otros componentes de la rutas metabólicas utilizadas para la producción del compuesto deseado, tales como intermedios y subproductos, para determinar la eficiencia global de producción del compuesto. Los métodos de análisis incluyen mediciones de niveles de nutrientes en el medio (por ejemplo, azúcares, hidrocarburos, fuentes de nitrógeno, fosfatos y otros iones), mediciones de la composición y crecimiento de la biomasa, análisis de la producción de metabolitos comunes de las rutas biosintéticas, y medición de los gases producidos durante la fermentación. Métodos estándar para estas mediciones están delineados en Applied Microbial Physiology, A Practical Approach, P.M. Rhodes and P.F. Stanbury, eds., IRL Press, p. 103-129; 131-163; and 165-192 (ISBN: 0199635773) y las referencias citadas en la misma.

Un ejemplo es el análisis de ácidos grasos (abreviaturas: FAME, éster metílico de ácido graso; GC-MS, cromatografía gas líquido-espectrometría de masas; TAG, triacilglicerol; TLC, cromatografía de capa fina).

Una prueba inequívoca de la presencia de productos de ácidos grasos puede obtenerse mediante el análisis de los organismos recombinantes después de los procedimientos analíticos estándar: GC, GC-MS o TLC como se describe de manera variada por parte Christie y referencias en el mismo (1997, en: Advances on Lipid Metodology- Fourths ed.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, gas- chromatography-mass spectrometry methods, Lipids 33:343-353).

El material que va a ser analizado puede ser desintegrado a través sonicación, molienda con vidrio, nitrógeno líquido y trituración o través de otros métodos aplicables. El material tiene que ser centrifugado después de la desintegración. El sedimento es resuspendido en Aqua dest, se calienta durante 10 minutos a 100°C, se enfría sobre hielo y se centrifuga de nuevo seguido por extracción con ácido sulfúrico 0.5 M en metanol que contiene 2% de dimetoxipropano durante una hora a 90°C, lo que lleva a aceite hidrolizado y compuestos lipídicos resultantes en lípidos transmetilados. Esto esteres metílicos de ácidos grasos se extraen en éter de petróleo y se someten finalmente a análisis por GC utilizando una columna capilar (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0.,32 mm) a un gradiente de temperatura en 370°C y 240°C durante 20 minutos y 5 minutos a 240°C. La identidad de los esteres metílicos de los ácidos grasos resultantes tiene que ser definida mediante el uso de estándares disponibles a partir de fuentes comerciales (por ejemplo Sigma).

En el caso de ácidos grasos donde los estándares no están disponibles la identidad de la molécula tiene que demostrarse a través de la formación de derivados y subsecuente análisis por GC. Por ejemplo la localización de ácidos grasos con triples enlaces tiene que ser demostrada a través de GC-MS después de la formación de derivados con derivados de 4,4-dimetoxioxazolina (Christie, 1998, véase más arriba).

Ejemplo 13: productos de expresión en cepas de sistemas microbianos heterólogos, condiciones de crecimiento y plásmido.

La cepa de Escherichia coli XL1 Blue MRF' kan (Stratagene) fue utilizada para subclonar la nueva elongasa Ig_ASE1 a partir de Isochrysis galbana. Para la expresión funcional de este gen utilizamos la cepa de Saccharomyces cerevisiae INVSc 1 (Invitrogen Co.). Se cultivo E. coli en caldo Luria-Bertani (LB, Duchefa, Haarlem, Países Bajos) a 37°C. Cuando fue necesario, se adiciono ampicilina (100mg/litro) y se incluyo agar 1.5% (p/v) (Difco) para un medio LB solido. Se cultivo S. Cerevisiae a 30°C bien en medio YPG o en medio uracilo completo de caída mínima (CMdum; vease en: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.B., Coen, D.M., and Varki, A. (1995), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York.) que contenía bien sea 2% (p/v) de rafinosa o glucosa. Para el medio solido se incluyo de 2% (p/v) de agar Bacto™ (Difco). Se utilizaron plásmidos para clonar y la expresión fue pUC 18 (Pharmacia) y pYES2 (Invitrogen Co.).

Ejemplo 14: Clonación y expresión de una elongasa específica para ALA-PUFA (ASE de *Isochrysis galbana* en levadura)

a) Procedimientos de clonación

5 Para la expresión en levaduras, el gen *Ig_ASE1* de *Isochrysis galbana* fue modificado primero para crear sitios de restricción y en la secuencia de consenso de levadura para una traducción altamente eficiente (Kozak, M. (1986)). La mutaciones puntuales definen una secuencia que flanquea el codón iniciador AUG que modula la traducción por ribosomas eucarióticos (Cell 44, 283-292.). Se introdujo un sitio adyacente al codón de inicio. Para la amplificación del marco de lectura abierto se sintetiza un par de cebadores complementarios a sus extremos 5'- y 3'-.

Iniciador de avance: 5'-GGTACCATGGCCCTCGCAAACGA-3'

10 Iniciador reverso: 5'-TAGGACATCCACAATCCAT-3'

La reacción de PCR fue llevada a cabo con plásmido-ADN como patrón en un Thermocycler (Biometra) usando DNA (Stratagene) polimerasa (Stratagene) y el siguiente programa de temperaturas: 3 minutos a 96°C seguido por 25 ciclos con 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 55°C y 3 minutos a 72°C, un ciclo con 10 minutos a 72°C y de tención a 4°C.

15 El tamaño correcto del fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 800 bp fue confirmado por electroforesis en gel agarosa-TBE. El ADN amplificado fue extraído del gel con el kit QIAquick Gel Extraktion (QIAGEN) y se ligo en el sitio T/A del vector pCR 21 (Invitrogen) utilizando el kit Sure Clone Ligation (Pharmacia). Después de la transformación de *E. coli* XL1 Blue MRF' kan una mini preparación de ADN (Riggs, M.G. & McLachlan, A. (1986), se llevo a cabo una procedimiento de selección para grandes números de mini preparación de plásmidos. BioTechniques 4, 310-313.) con 24 transformantes resistentes a la ampicilina y se identificaron los clones positivos mediante análisis por restricción de BamHI. La secuencia del producto de PCR clonado fue confirmada por secuenciación utilizando el kit de reacción ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready (Perkin-Elmer, Weiterstadt).

25 El plásmido-ADN de la pCR-ASE1 fu restringido adicionalmente con *KpnI/SacI* y el fragmento de ADN resultante fue ligado al mismo sitio de restricción del vector disparador pYES2 de levadura-*E. coli* desfosforilado dando como resultado la pY2ASE1. Después de la transformación del *E. coli* y de la mini-preparación de ADN a partir de los transformantes, la orientación del fragmento de ADN dentro del vector fue revisada una vez mas. Se cultivo un clon para preparación de ADN maxi con el kit de extracción Nucleobond® AX 500 Plasmid- DNA (Macherey-Nagel, Düringen).

30 Las *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 fue transformada con pY2ASE1 y pYES2 mediante un protocolo con PEG/acetato de litio (Ausubel et al., 1995). Después de la selección sobre placas de agar CMdum que contenían 2% de glucosa se escogieron 4 transformantes pY2ASE1 y transformante pYES2 para cultivo posteriori y expresión funcional.

b) expresión funcional de la actividad de elongasa en levadura

35 Precultivo:

20 ml de medio líquido de CMdum contenía 2% (p/v) de rafinosa se inocularon con los clones de levadura transgénicos (pY2ASE1a-d, pYES2) y se cultivaron durante 3 días a 30°C, 200 rpm hasta que se alcanzo una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 1.5-2.

40

Cultivo Principal:

45 Para la expresión se suplementaron 20 ml de medio líquido de CMdum con 2% de rafinosa y 1% (v/v) de Tergitol NP-40 con el ácido graso que se va a probar con una concentración final de 0.003% (p/v). Los medios fueron inoculados con los precultivos a un OD_{600} de 0.05. La expresión fue inducida a un OD_{600} de 0.2 con 2% (p/v) de galactosa durante 16 horas, tiempo después del cual los cultivos habían alcanzado un OD de 0.8-1.2.

c) Análisis de ácidos grasos

50 Los ácidos grasos totales fueron extraídos de los cultivos de la levadura y analizados por cromatografía de gases. Para esto, se recolectaron celdas de 5 ml del cultivo por centrifugación (1000 x g, 10 minutos, 4°C) y se levaron una vez con NaHCO_3 100mM, pH 8.0 para retirar el medio residual y los ácidos grasos. Para la preparación de los esteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) las pellas de células fueron tratadas con H_2SO_4 1N metanólico y de metoxipropano al 2% (v/v) durante hora 80°C. Los FAMES fueron extraídos dos veces con 2ml de éter de petróleo, lavados una vez con NaHCO_3 100 mM, pH 8.0 y una vez con agua destilada y se secaron con Na_2SO_4 . El solvente orgánico fue vaporado bajo una corriente de argón y los FAMES fueron disuelto en 50 μl de éter de petróleo. Las muestras fueron separadas sobre una columna capilar ZEBRON ZB-Wax (30m, 0.32 mm, 0.25 μm ; Phenomenex) en cromatógrafo de gas Hewlett Packard 6850 con un detector de ionización de llama. La temperatura del horno se programa desde 70°C (con retención de 1 minuto) hasta 200°C a una rata de 20°C/minuto, luego a 250°C (retención de 5 minutos) a una rata de 5°C/minutos

y finalmente 260°C a una rata de 5°C/minuto. Se uso nitrógeno como gas transportador (4.5ml/minuto a 70°C). Los ácidos grasos fueron identificados por comparación con los tiempos de retención de FAMES estándar (SIGMA).

Los patrones de ácidos grasos de las cepas de levaduras transgénicas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Patrones de ácidos grasos en porcentaje molar de cepas de levaduras transgénica.

5

Inducción	- Sustrato		+ LA (18:2 n-6)		+ ALA (18:3 n-3)		+GLA (18:3 n-6)	
	+gal	-gal	+gal	-gal	+gal	-gal	+gal	-gal
16:0	28.7	30.2	27.0	28.9	26.6	28.9	30.0	31.1
16:1 n-9	41.6	42.4	30.7	25.4	30.1	26.4	24.3	24.6
18:0	6.8	6.1	5.7	5.8	6.3	6.3	6.8	6.2
18:1 n-9	22.9	21.3	16.5	13.4	18.4	16.6	14.7	13.4
18:2 n-6*	-	-	11.0	26.5	-	-	-	-
18:3 n-6*	-	-	-	-	-	-	24.2	24.8
18:3 n3*	-	-	-	-	10.2	21.8	-	-
20:2 n-6*	-	-	9.1	-	-	-	-	-
20:3 n-3	-	-	-	-	8.4	-	-	-
% Elongación	0	-	45.3	-	45.2	-	0	-

10

15

Explicación de la Tabla 2:

20 Elongación de ácidos grasos de diferentes sustratos suministrados a levaduras transgénicas que contienen pY2ASE1. Los ácidos grasos exógenos suministrados como sustratos para elongación se indican mediante un asterisco [*]. Los valores dados se expresan como porcentaje molar de esteres metílicos totales de ácidos grasos identificados por GC y FID. En el caso de sustratos elongados estos también se expresan como porcentaje de conversión. La expresión del transgen ASE1 fue inducida por adición de galactosa. Solamente se elongaron sustratos C₁₈ con un doble enlace en la posición Δ₉ por parte del marco de lectura abierto ASE1. Todos los valores representan la media de tres experimentos separados.

25 Los análisis por GC del FAMES preparados a partir de los lípidos totales de la levadura transformada con pY2ASE1 y cultivados en presencia de diferentes ácidos grasos exógenos (ALA, GLA, LA) se muestran en la Tabla 1, y sus patrones de ácidos grasos se muestran en porcentaje molar en la Tabla 1. La incorporación de GLA no produce ningún producto de elongación di-homo-GLA (20:3_{d8,11,4}) mientras que el ALA es elongado para producir C_{20:3d11,14,17} y el LA es elongado para producir C_{20:d11,14}.

30 Los clones de levaduras transgénicas transformados con pY2ASE y provistos con sustratos exógenos muestran un pico adicional en el cromatograma de gases (identificado con un asterisco [*] en las Figuras 3 A-D) que han sido identificados por comparación de los tiempos de retención como el ácido graso alimento/incorporado. Una cromatografía de gases/espectroscopia de masas puede dar soporte adicional para confirmar su identidad.

35 La Figura 3 A-D muestra esencialmente una grafica de trazas representativa de GC de los datos presentados en la Tabla 2. Explicación a las Figuras 3 A-D: los cromatogramas de GC de los esteres metílicos de los ácidos grasos extraídos de la levadura transgénica que contenía pY2ASE1. Los cultivos de levadura fueron cultivados en presencia (sindicada por un asterisco) o ausencia de ácidos grasos exógenos. Los ácidos grasos exógenos (en la forma de sales de sodio) fueron LA (ácido linoleico; 18:2^{9,12}, 18:2 n-6, véase Figura 3B), ALA (ácido α-linolénico; 18:3^{9,12,15}; 18:3 n-3, véase Figura 3A) GLA (ácido γ-linolénico; 18:3^{6,9,12}; 18:3 n-6, véase Figura 3C) o sin sustrato (Figura 3D). La Figura 3B representa la expresión del ASE1 ORF inducida por la adición de galactosa. Después de 24 horas, las células de levadura fueron recolectadas por centrifugación, lavadas para retirar el sustrato exógeno y metiladas. Los esteres metílicos de ácidos grasos fueron separados y detectados utilizando métodos estándar y los picos fueron identificados por comigración con estándares conocidos. Es claro que la IG-bajo ASE1 codifica una actividad de elongación

40

específica para Δ^9 -C₁₈-PUFA. Los productos identificados muestran que la secuencia de nucleótidos de Ig_ASE1 codifica para una elongasa Δ^9 selectiva de ácidos grasos C₁₈ a partir del alga *Isochrysis galbana*, lo cual lleva a la formación de nuevos ácidos grasos en levaduras transgénicas.

5 Experimentos adicionales de alimentación con varios otros ácidos grasos pueden llevarse a cabo para confirmar la selectividad al sustrato de esta elongasa en más detalle.

Ejemplo 15: Purificación del producto deseado a partir de organismos transformados en general.

10 La recuperación del producto deseado a partir de plantas u hongos, algas, células ciliadas o sobre nadantes de los cultivos anteriormente descritos pueden llevarse a cabo por diversos métodos bien conocidos en la técnica. Si el producto deseado no es secretado desde las células, las células, pueden ser recolectadas desde el cultivo mediante centrifugación a baja velocidad, las células pueden ser sometidas a lisis mediante técnicas estándar, tales como fuerza mecánica sonicación. Los órganos de las plantas pueden separarse mecánicamente de otros tejidos u órganos. Después de la homogeneización los residuos celulares son retirados por centrifugación, y la fracción sobrenadante que contiene las proteínas solubles se retiene para purificación adicional del compuesto deseado. Si el producto es secretado a partir de celular deseadas, entonces las células se retiran del cultivo por centrifugación a baja velocidad, y la fracción sobrenadante se retiene para purificación posterior.

15 La fracción sobrenadante de cada método de purificación es sometida a cromatografía con una resina adecuada, en la cual la molécula deseada bien es retenida sobre la resina de cromatografía a la vez que muchas de las impurezas en la muestra no lo son, o donde las impurezas son retenidas por la resina mientras que la muestra no lo es. Tales etapas de cromatografía pueden ser repetidas según sea necesario, utilizando las mismas o diferentes resinas de cromatografía. Una persona experimentada en la técnica debería estar bien versada en la selección de resinas de cromatografía apropiada y en su aplicación más eficaz para la purificación de una molécula en particular. El producto purificado puede ser concentrado por filtración o ultrafiltración, y almacenado a una temperatura a la cual se maximice la estabilidad del producto.

20 Hay una amplia variedad de métodos de purificación conocidos en la técnica y el método precedente de purificación no pretende ser limitante. Tales técnicas de purificación se describen, por ejemplo, en Bailey, J.E. & Ollis, D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill: New York (1986). La identidad de pureza de los compuestos aislados puede establecerse mediante técnicas estándar en el arte. Estas incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), métodos espectroscópicos, métodos de tinción, cromatografía de capa fina, NIRS, pruebas enzimáticas o pruebas microbiológicas. Tales métodos de análisis están revisados en Patek et al. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 133-140; Malakhova et al. (1996) *Biotekhnologiya* 11: 27-32; y Schmidt et al. (1998) *Bioprocess Engineer.* 19: 67-70. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (1996) vol. A27, VCH: Weinheim, p. 89-90, p. 521-540, p. 540-547, p. 559-566, 575-581 and p. 581-587; Michal, G. (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) *Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 17.

35 La identidad y pureza de los compuestos aislados puede establecerse por técnicas estándar en el arte. Estas incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) métodos espectroscópicos, métodos de tinción, cromatografía de capa fina, NIRS, pruebas enzimáticas, o microbiológicamente. Tales métodos analíticos están revisados en: Patek et al. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 133-140; Malakhova et al. (1996) *Biotekhnologiya* 11: 27-32; and Schmidt et al. (1998) *Bioprocess Engineer.* 19: 67-70. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (1996) vol. A27, VCH: Weinheim, p. 89-90, p. 521-540, p. 540-547, p. 559-566, 575-581 and p. 581-587; Michal, G. (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) *Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 17.

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

45 <110>University of Bristol

<120>New elongase gene and a process for the production of delta-9-polyunsaturated fatty acids

<130>NAE2091/2001

50 <140>2001_2091

<141>2001-03-21

<160>2

55 <170>PatentIn Ver. 2.1

ES 2 383 451 T3

<210>1
 <211>1064
 <212>DNA
 <213>Isochrysis galbana

5

<220>
 <221>CDS
 <222>(2)..(790)

10

<400>1

```

g atg gcc ctc gca aac gac gcg gga gag cgc atc tgg gcg gct gtg acc 49
Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr
      1             5             10             15

gac ccg gaa atc ctc att ggc acc ttc tgg tac ttg cta ctc aaa ccg 97
Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
      20             25             30

ctg ctc cgc aat tcc ggg ctg gtg gat gag aag aag ggc gca tac agg 145
Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg
      35             40             45

acg tcc atg atc tgg tac aac gtt ctg ctg gcg ctc ttc tct gcg ctg 193
Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu
      50             55             60

agc ttc tac gtg acg gcg acc gcc ctc ggc tgg gac tat ggt acg ggc 241
Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly
      65             70             75             80

gcg tgg ctg cgc agg caa acc ggc gac aca ccg cag ccg ctc ttc cag 289
Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln
      85             90             95

tgc ccg tcc ccg gtt tgg gac tgg aag ctc ttc aca tgg acc gcc aag 337
Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys
      100            105            110

gca ttc tat tac tcc aag tac gtg gag tac ctc gac acg gcc tgg ctg 385
Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
      115            120            125

gtg ctc aag ggc aag agg gtc tcc ttt ctc cag gcc ttc cac cac ttt 433
Val Leu Lys Gly Lys Arg Val Ser Phe Leu Gln Ala Phe His His Phe
      130            135            140

ggc gcg ccg tgg gat gtg tac ctc ggc att cgg ctg cac aac gag ggc 481
    
```

15

ES 2 383 451 T3

Gly	Ala	Pro	Trp	Asp	Val	Tyr	Leu	Gly	Ile	Arg	Leu	His	Asn	Glu	Gly	
145					150					155					160	
gta	tgg	atc	ttc	atg	ttt	ttc	aac	tcg	ttc	att	cac	acc	atc	atg	tac	529
Val	Trp	Ile	Phe	Met	Phe	Phe	Asn	Ser	Phe	Ile	His	Thr	Ile	Met	Tyr	
				165					170					175		
acc	tac	tac	ggc	ctc	acc	gcc	gcc	ggg	tat	aag	ttc	aag	gcc	aag	ccg	577
Thr	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Thr	Ala	Ala	Gly	Tyr	Lys	Phe	Lys	Ala	Lys	Pro	
			180					185					190			
ctc	atc	acc	gcg	atg	cag	atc	tgc	cag	ttc	gtg	ggc	ggc	ttc	ctg	ttg	625
Leu	Ile	Thr	Ala	Met	Gln	Ile	Cys	Gln	Phe	Val	Gly	Gly	Phe	Leu	Leu	
		195					200					205				
gtc	tgg	gac	tac	atc	aac	gtc	ccc	tgc	ttc	aac	tcg	gac	aaa	ggg	aag	673
Val	Trp	Asp	Tyr	Ile	Asn	Val	Pro	Cys	Phe	Asn	Ser	Asp	Lys	Gly	Lys	
	210					215					220					
ttg	ttc	agc	tgg	gct	ttc	aac	tat	gca	tac	gtc	ggc	tcg	gtc	ttc	ttg	721
Leu	Phe	Ser	Trp	Ala	Phe	Asn	Tyr	Ala	Tyr	Val	Gly	Ser	Val	Phe	Leu	
225					230					235					240	
ctc	ttc	tgc	cac	ttt	ttc	tac	cag	gac	aac	ttg	gca	acg	aag	aaa	tcg	769
Leu	Phe	Cys	His	Phe	Phe	Tyr	Gln	Asp	Asn	Leu	Ala	Thr	Lys	Lys	Ser	
				245					250					255		
gcc	aag	gcg	ggc	aag	cag	ctc	taggcctcga	gccggctcgc	gggttcaagg							820
Ala	Lys	Ala	Gly	Lys	Gln	Leu										
			260													
agggcgacac	gggggtggga	cgtctgcatg	gagatggatt	gtggatgtcc	ttacgcctta											880
ctcatcaatg	tectcccatc	tetccctctc	agaccttcta	ctagccatct	agaagggcag											940
ctcagagaacg	gataccgttc	cccctcccct	tccttttcgt	ctttgctttg	ccattgtttg											1000
tttgtctcta	ttttttaaac	tattgacgct	aacgcgttac	gctcgcaaaa	aaaaaaaaaa											1060
aaaa																1064

<210> 2
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Isochrysis galbana

<400> 2

ES 2 383 451 T3

Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr
 1 5 10 15

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
 20 25 30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg
 35 40 45

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu
 50 55 60

Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly
 65 70 75 80

Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln
 85 90 95

Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys
 100 105 110

Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
 115 120 125

Val Leu Lys Gly Lys Arg Val Ser Phe Leu Gln Ala Phe His His Phe
 130 135 140

Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu His Asn Glu Gly
 145 150 155 160

Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Ile Met Tyr
 165 170 175

Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Phe Lys Ala Lys Pro
 180 185 190

Leu Ile Thr Ala Met Gln Ile Cys Gln Phe Val Gly Gly Phe Leu Leu
 195 200 205

Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe Asn Ser Asp Lys Gly Lys
 210 215 220

Leu Phe Ser Trp Ala Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Gln Asp Asn Leu Ala Thr Lys Lys Ser
 245 250 255

Ala Lys Ala Gly Lys Gln Leu
 260

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado que comprende un secuencia de nucleótidos derivada de una planta que codifica un polipéptido el cual elonga ácido α -linolénico (C18:3^{9,12,15}) en al menos dos átomos de carbono y donde el ácido γ -linolénico (C18:3^{6,9,12}) no es elongado, seleccionado del grupo consistente de:
 - a) una secuencia de ácidos nucleicos representada en SEQ ID NO: 1
 - b) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido representado en SEQ ID NO:2,
 - c) derivados del secuencia representada en SEQ ID NO:1, la cual codifica polipéptidos que tienen al menos 50% de homología con la secuencia que codifica las secuencias de aminoácidos representadas en SEQ ID NO:2 y secuencias que funcionan como una elongasa.
2. Una secuencia de ácidos nucleicos aislada como se reivindica en la reivindicación 1, donde la secuencia se deriva de una planta.
3. Una secuencia de ácidos nucleicos aislada como se reivindica en la reivindicación 1, donde la secuencia derivada del genero Isochrysis.
4. Una secuencia de ácidos nucleicos aislada como se reivindica en la reivindicación 1, donde el polipéptido codificado por la secuencia elonga ácido grasos Δ -9.
5. Una proteína codificada por un ácido nucleico aislado tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicación 1 a 3.
6. Un constructo de gen que comprende un ácido nucleico aislado que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1 como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el ácido nucleico esta funcionalmente enlazado a una o más señales reguladoras.
7. Un constructo de gen como se reivindica en la reivindicación 6, que comprende genes adicionales para la biosíntesis de ácidos grasos.
8. Un constructo de gen como se reivindica en la reivindicación 6 o 7 donde los genes adicionales para la biosíntesis de ácidos grasos se seleccionan del grupo que consiste de Δ 19-, Δ 17-, Δ 15-, Δ 12-, Δ 9-, Δ 8-, Δ 6-, Δ 5-, Δ 4-desaturasas, hidroxilasas, elongasas, Δ 12-acetiltenasa, acil-ACP-tioesterasa, β -cetoacil-ACP-sintasa o β -cetoacil-ACP-reductasas.
9. Un vector que comprende un ácido nucleico como se reivindica en la reivindicación 1 o un constructo de gen como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
10. Un organismo transgénico no humano que comprende al menos un ácido nucleico como se reivindica en la reivindicación 1, un constructo de gen como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 o un vector como se reivindica en la reivindicación 9.
11. Un organismo transgénico no humano como se reivindica en la reivindicación 10, donde el organismo es un microorganismo, un animal no humano o una planta.
12. El organismo como se reivindica en la reivindicación 10 u 11, donde el organismo es una planta transgénica.
13. Un proceso para la producción de PUFA, comprendiendo dicho proceso el cultivo de un organismo transgénico que comprende un ácido nucleico como se reivindica en la reivindicación 1, un constructo de gen como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 o un vector como se reivindica en la reivindicación 9 el cual codifica un polipéptido que elonga ácido α -linolénico (C18:3^{9,12,15}) en al menos dos átomos de carbono y donde el ácido γ -linolénico (C18:3^{6,9,12}) no es elongado bajo condiciones en las cuales se producen PUFAs en dicho organismo.
14. El proceso como se reivindica en la reivindicación 13, donde los PUFAs producidos por el proceso son moléculas de ácidos graso C₂₀ o C₂₂ que tienen al menos dos dobles enlaces en la molécula de ácido graso.
15. El proceso como se reivindica en la reivindicación 13, donde las moléculas de ácido graso C₂₁ o C₂₂ son aisladas a partir del organismo en forma de un aceite, lípido o ácido graso libre.
16. El proceso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde el organismo es un microorganismo, un animal no humano o una planta.
17. El proceso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, donde el organismo es una planta transgénica.
18. El proceso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, donde el ácido graso C₁₈ es un ácido graso que tiene 3 dobles enlaces en la molécula.
19. Un anticuerpo, el cual interactúa específicamente con un polipéptido codificado con por una secuencia de nucleótidos como se reivindica en la reivindicación 1.
20. Una secuencia de nucleótidos antisentido, la cual es complementaria a la secuencia de nucleótidos como se reivindica en la reivindicación 1.
21. Un kit que comprende una secuencia de nucleótidos como se reivindica en la reivindicación 1, un constructo de gen como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, un vector como se reivindica en la reivindicación 9 o un anticuerpo como se reivindica en la reivindicación 19.

Fig. 1 Alineamiento por pares de elongasa de Isochrysis galbana (Ig_ASE1, fila superior) con elongasa de Mortierella alpina (M.alpina Gleolo, fila inferior). Las identidades se muestran en caracteres en negrilla.

```

Ig_ASE1      . . . . .MALANDAGERIWAAVTDEI. . . . . 20
M.alpinaGleolo MESIAPFLPSKMPQDLFMDLATAIGVRAAPYVDPLEAALVAQAEKYIPTIVHHTR 55
              . . . . .
              .LIGTFSYLLLKPLLRNSGLVDEKKGAYRTSMIWNVLLALFSAL. . . . . 64
              GFLVAVESPLARELPLMNPFFHLLIVLAVLVTVFVGMQIMKNFERFEVKTFFSLLH 110
              . . . . .SFYVTATALGWDYGTGAMLRRTGDTQPPLFQCFSPVWDSKLFWTAK 112
              NFCLVSIWAYMCGGILYEAYQANYGLFENAADHTFKGLPMAKMIWL. . . . . 156
              AFYYSKYVEYLDTAWLRV. . . . .SFLQAFHHFGAPWDVVVLCIRLHNEGVIWM 160
              .FYFSKINEFVDTMIMVLKNNRQISFLHVYHHSSIFTIWWLVTFVAPNGEAYFS 210
              FF.NSFIHTIMTYTYGLTAAGYKFKA..KPLITAMQICQVGGFLLVWDYINV.P 211
              AALNSFIHVIMYGYFFLSALGFKQVSFIKFIYITRSQMTQFCMMSVQSSWDMYAMK 265
              CFNSDKGKLESWAFNYAYVGSVFLFCHFYYQDN.LATKKSAAKAKQL. . . . . 258
              VLGRPGYPPFITALLWFYMWTLGLFYNFYRKNAKLAKQAKADAAKEKARKLQ 318
    
```

Fig. 2 Alineamiento por pares de polipéptidos de Ig_ASE1 (fila superior) y ratón (fila inferior). Las identidades se muestran en caracteres en negrilla.

IgASE1MALANDAGERIWAAVTDPEILIGTFSY	27
Elov14_ (Mus)	MGLLDSEPGSVLNAMSTAFNDTVEFYRWWTIADKRVADWPLMQSPWPTISISTL	55
	LLLLKPLLRNSGLVDEKKGAYRTSMIWN..VLLALFSALSFYVTATALGWDYGT	79
	YLLFVWLGPKWKDREPFQMRLLVLIYNFGMVLNLFIFRELFMGSYNAGYSYIC	110
	GAWLRRQTGDTPLFQCPSVWDSKLFWTWAKAFYYSKYVEYLDTAWLR.....	129
	QSDY.....SNDVNEVRIAAALWVYFVSKGVEYLDTVFFILRKN	151
	.VSFLQAFHHFGAPWDVYLGIRLHNEGVIFFMFF.NSFIHTIMYTYGLTAAGY	181
	NQVSFLHVYHHC'TMFTLMMWIGIKWVAGGQAFFGAQMNSFIHVIMYSYGLTAFGP	206
	KFKAKPLITAMQICQVGGFLLVWDYINVPCFNSDKGLFSWAFNYAYVGSVFL	236
	WIQKYLWVKRYL'TMLQLVQFHV'TIGHTALSLYTDCCPPKWMHWAL.IAYAISFIFL	261
	FCIIFPYQDNLATKKSAGKQL.....	258
	FLNFYTRTYNEPKQS.KTGTKPATNGISSNGVNKSEKALENGKPKQNGKPKGE	312

Figura 3A-D: Cromatogramas de HPLC de ésteres metílicos de ácidos grasos aislados a partir de levadura que expresan el producto genético Ig_ASE1

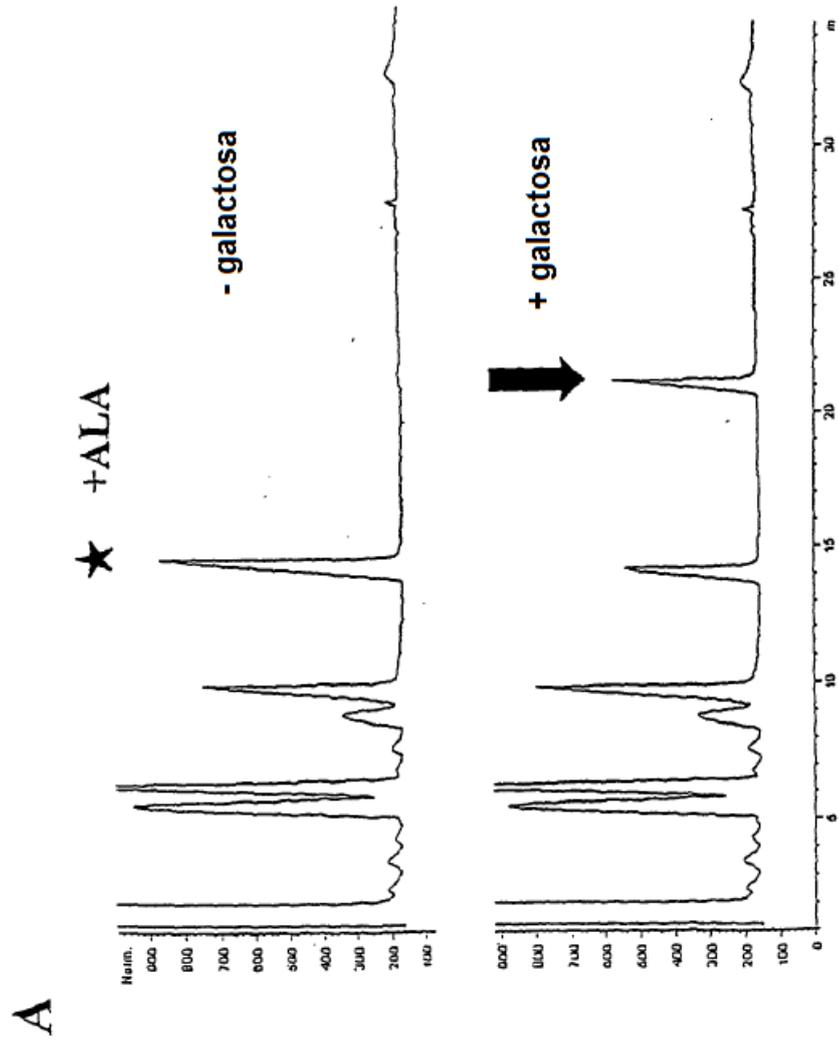


Figura 3 A-D: Cromatogramas de HPLC de ésteres metílicos de ácidos grasos aislados a partir de levadura que expresan el producto genético Ig_ASE1

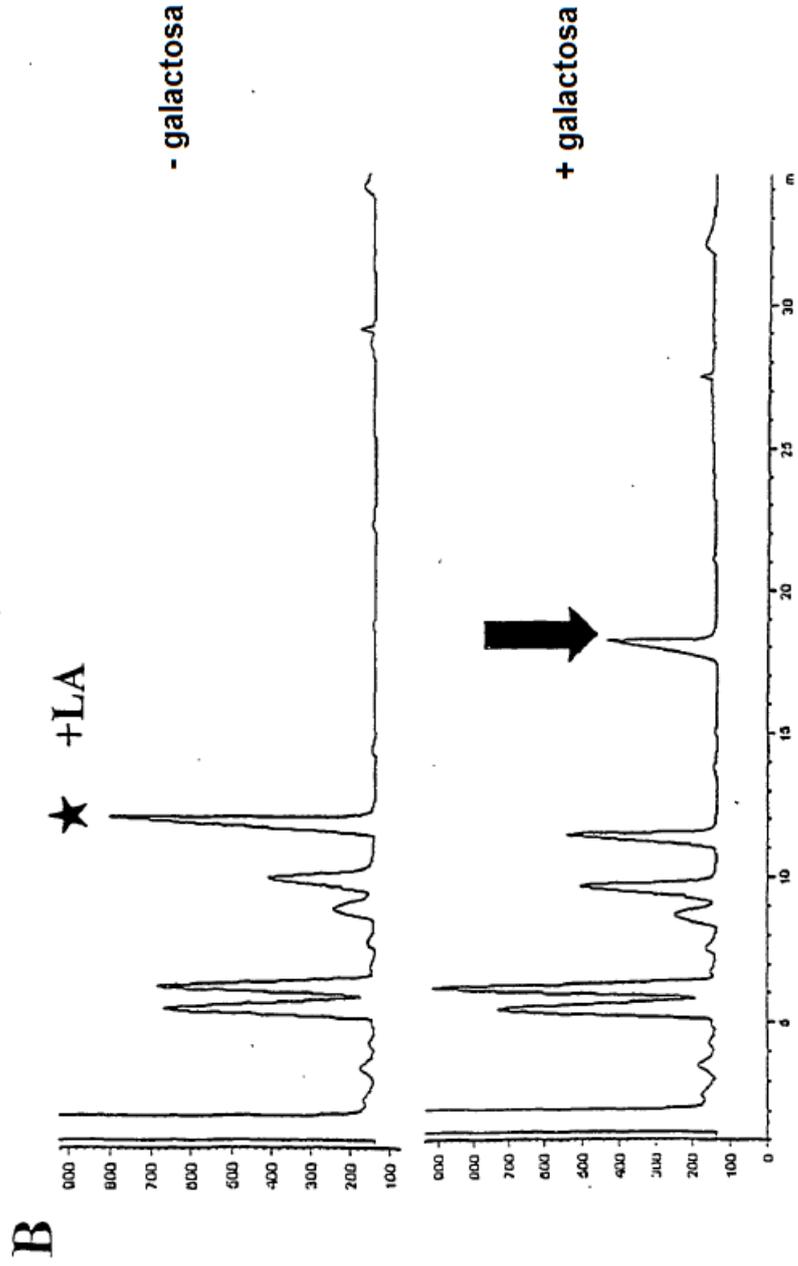


Figura 3 A-D: Cromatogramas de HPLC de ésteres metílicos de ácidos grasos aislados a partir de levadura que expresa el producto genético Ig_ASE1

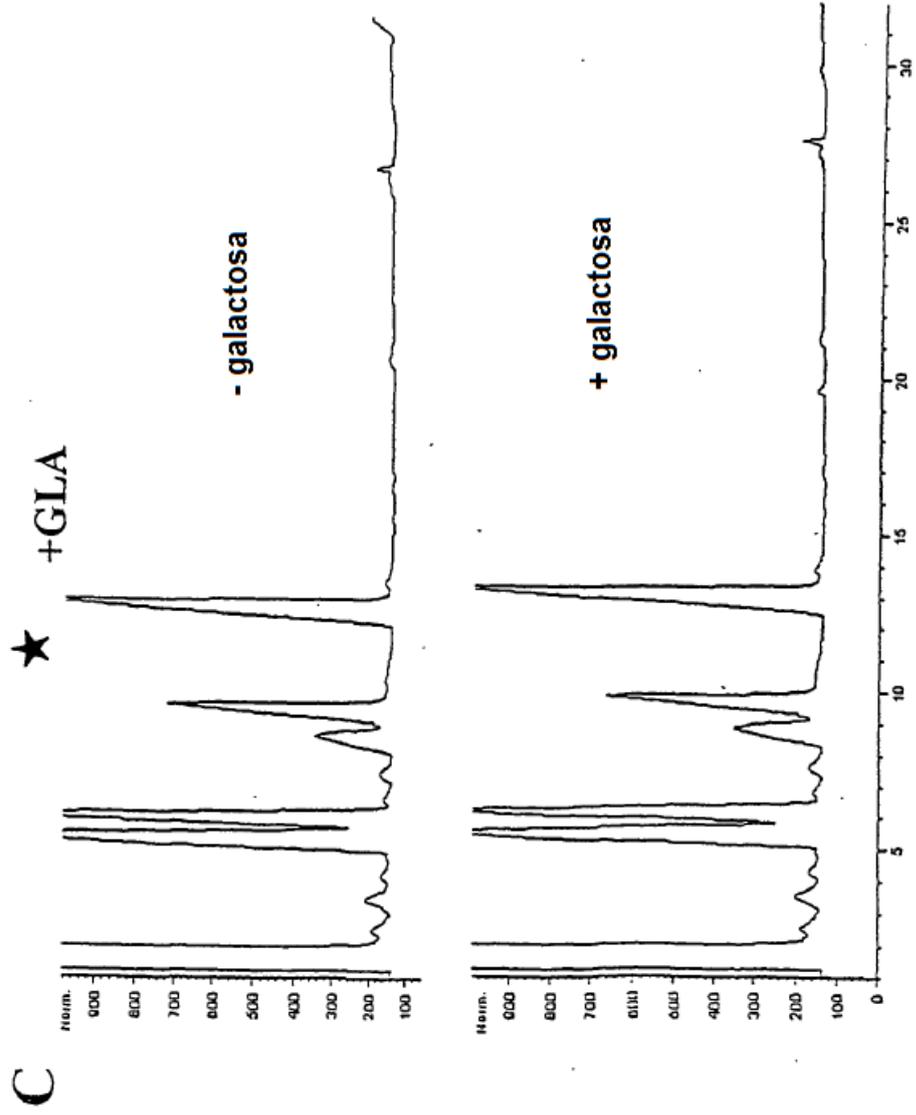


Figura 3 A-d: Cromatogramas de HPLC de ésteres metílicos de ácidos grasos aislados de levadura que muestran el producto genético lg_ASE1

