

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 490**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10009225 .3**
96 Fecha de presentación: **17.03.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **2302060**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2011**

54 Título: **Desaturasas**

30 Prioridad:
16.03.2002 GB 0206308
25.05.2002 GB 0212133
11.07.2002 GB 0216013
01.11.2002 GB 0225489

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.10.2012

73 Titular/es:
The University of York
Heslington,
York YO10 5DD , GB

72 Inventor/es:
Graham, Ian, Alexander y
Tonon, Thierry

74 Agente/Representante:
Lazcano Gainza, Jesús

ES 2 388 490 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

Desaturasas

- 5 La invención se relaciona con moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos n-3, particularmente ácido docosahexanoico, o variantes de los mismos; polipéptidos codificados por dichos ácidos nucleicos; células transfectadas con dichas secuencias de ácido nucleico y productos que comprenden dichas secuencias de ácido nucleico, polipéptidos y/o células.
- 10 El DHA, un ejemplo de un ácido graso n-3 puede obtenerse directamente de la dieta o derivarse del metabolismo del ácido linoléico y α -linolénico de la dieta. Para obtener suficientes cantidades de este ácido graso, los seres humanos tiene que comer alimentos ricos en DHA. Actualmente, la fuente dietética principal de DHA es el pescado o el aceite de pescado. Sin embargo, este tiene muchos problemas inherentes; el pescado acumula contaminantes, el aceite extraído tiene un olor desagradable, existe dificultad para controlar la proporción de ácidos grasos deseables
- 15 específicos a partir de esta fuente y ya que el pescado es una fuente en declive, la demanda en el mercado por el DHA no está siendo satisfecha. Además, los vegetarianos no tienen una fuente de alimentos alternativa obvia para el pescado y por lo tanto la hacen sin DHA o tienen que tomar suplementos puros.
- 20 Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA, por sus siglas en inglés) se derivan de los ácidos grasos esenciales (EFA, por sus siglas en inglés) el ácido linoleico (18:2n-6) y el ácido α -linolénico (18:3n-3), los compuestos parentales de las llamadas familias de EFA omega-3 y omega-6 por una serie alterna de reacciones de desaturación y elongación (Haag, 2001), ver la Figura 4. El principal producto del metabolito de la vía del n-6 en mamíferos es el ácido araquidónico (AA) (20:4n-6), mientras que los principales productos finales de la vía del n-3 son el ácido eicosapentanoico (EPA, por sus siglas en inglés) (20:5n-3) y ácido docosahexanoico (DHA, por sus
- 25 siglas en inglés, 22:6n-3). La biosíntesis de 18:3n-3 a partir de 18:4n-3 involucra la acción de una $\Delta 6$ desaturasa (Horrobin DF, 1992). Esto es seguido por una reacción de elongación para 20:4n-3 (*Sprecher y otros*, 1995) y una desaturación $\Delta 5$ para 20:5n-3 (*Sprecher y otros*, 1995). La visión convencional es que existe después una etapa de elongación posterior que convierte 20:5n-3 en 22:5n-3, lo que es seguido después por una etapa final de desaturación que involucra la actividad de una $\Delta 4$ desaturasa para producir ADH (22:6n-3).
- 30 Durante la evolución, los seres humanos han consumido una dieta que contiene aproximadamente igual relación de ácidos grasos esenciales n-3 y n-6 (1-2:1), pero en los últimos 100-150 años se ha observado un crecimiento de la tendencia de las dietas occidentales hacia el consumo de más ácidos grasos n-6, lo que resulta en una alteración de la relación a 30:1 (Simonpolous, 1999). Aunque un incremento en el consumo de ácidos grasos n-6 se caracteriza por problemas cardiovasculares tales como incremento de la viscosidad de la sangre, vasoespasmo y vasoconstricción, los ácidos grasos n-3 se asociaron con propiedades promotoras de la salud. Por ejemplo, los ácidos grasos n-3 se describieron como antiinflamatorios, antitrombóticos, antiarrítmicos, hipolipidémicos y vasodilatadores (Simonpolous, 1999). Como tal, la función del DHA en la prevención y/o tratamiento de enfermedades tales como la enfermedad coronaria del corazón, hipertensión, diabetes tipo II, enfermedades
- 35 oculares, artritis, fibrosis quística y esquizofrenia y ha sido el foco de muchísima investigación médica.
- 40 El efecto de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 en enfermedades cardiovasculares ha mostrado que el consumo dietético de DHA puede disminuir el riesgo de infarto del miocardio, hipertensión y complicaciones asociadas con la cirugía cardíaca. Un número de estudios poblacionales correlacionan el consumo de DHA con los factores de riesgo cardiovascular. Por ejemplo, un estudio de una población de esquimales en Canadá (426 sujetos de 18-74 años), que consumen tradicionalmente grandes cantidades de alimentos marinos ricos en ácidos grasos n-3, mostraron que los ácidos grasos n-3, tales como el DHA se asociaron positivamente con las concentraciones de colesterol-HDL y se asociaron inversamente con las concentraciones de triacilglicerol y la relación del total al colesterol HDL (*Dewailly y otros*, 2001). Se concluyó que el alto consumo dietético de ácidos grasos n-3 en la dieta de los esquimales fue probablemente responsable de la baja tasa de mortalidad por enfermedades isquémicas del corazón en esta población.
- 45 Los ácidos grasos esenciales son componentes estructurales de todos los tejidos y son indispensables para la síntesis de la membrana celular. Se encontró que el cerebro, la retina y otros tejidos neuronales son particularmente ricos en DHA, donde este se involucra en el desarrollo neuronal y la maduración de los sistemas sensoriales (*Uauy y otros*, 2000). Una gran parte de la investigación que compara infantes alimentados con leche de pecho comparada con la leche de fórmula, que es deficiente en DHA y otros ácidos grasos omega 3, concluyó que la presencia de DHA es crítica durante el desarrollo de los recién nacidos (Horrocks y *otros*, 1999). El DHA forma 25% del complemento de ácido graso de los glicoesfingolípidos del cerebro y es un componente importante de los bastones de la retina, y por lo tanto una deficiencia en DHA durante el desarrollo del infante se ha asociado con una reducción
- 60 en la función cognitiva y la agudeza visual. Además, las deficiencias en DHA se han asociado con el síndrome de alcoholismo fetal, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, fibrosis quística, fenilcetonuria y adrenoleucodistrofia.

Para satisfacer esta demanda creciente de ácidos grasos n-3 tales como el DHA se han realizado un número de aproximaciones. Los métodos para mejorar el contenido de DHA de la carne mediante la manipulación de la alimentación animal ha sido satisfecha con poco éxito. El cultivo de micro-organismos marinos tales como el *Cryptocodinium cohnii* y *Schizochytrium* sp, que son ricos en fuentes de DHA también ha sido satisfecho con éxito limitado ya que el cultivo de algas es técnicamente exigente y costoso (Ashford y otros, 2000).

Ha habido una investigación limitada enfocada en la identificación de genes involucrados en la biosíntesis de los ácidos grasos n-3 en algas. En un reporte, se describió la identificación de un ADNc que codifica una nueva actividad de elongación específica del ácido graso poliinsaturado C 18- Δ^9 a partir de la microalga que produce ácido docosahexanoico (DHA), *Isochrysis galbana* (Qi y otros, 2002). Esta elongasa de 30 kDa, designada IgASE1, comparte solamente homología limitada con las proteínas animales y fúngicas con actividad de elongación. Cuando la IgASE se expresó en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se mostró que alarga específicamente los ácidos grasos poliinsaturados C 18- Δ^9 , ácido linoleico (C18:2n-6, $\Delta^9,12$) y ácido alfa-linolénico (C18:3, $\Delta^9,12,15$), al ácido eicosadienoico (C20:2, $\Delta^{11,14}$) y ácido eicosatrienoico (C20:3 $\Delta^{11,14,17}$), respectivamente. Se concluyó que una ruta principal para la síntesis del ácido eicosapentanoico (C20:5 $\Delta^{5,11,14,17}$) y el ácido docosahexanoico (C22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$) en *I. galbana* puede involucrar una vía de desaturación de Δ^8 . Se piensa que las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas son enzimas microsomales que son un componente de un sistema de tres enzimas que incluye NADH-citocromo b_5 reductasa, citocromo b_5 , y la desaturasa respectiva (Sprecher,1981).

Se ha identificado un número de $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas. En plantas tales como la hierba borraja (*Borago officinalis*), se identificó la $\Delta 6$ desaturasa (Sayanova y otros, 1997). Las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas se identificaron en humanos (Hyekyung y otros, 1999 y Cho y otros, 1999, respectivamente), en animales tales como el nemátodo; *Caenorhabditis elegans* (Michaelson y otros, 1998 y Napier y otros, 1998) y en microorganismos eucariotas tales como el hongo *Mortierella alpina* (Huang y otros, 1999 y Knutzon y otros, 1998). En el ser humano, las actividades $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasa se encontraron en el músculo esquelético, pulmón, placenta, riñón y páncreas, pero se expresan a altos niveles en el hígado, cerebro y corazón (Hyekyung y otros, 1999). En todos estos tejidos sin embargo, se encontró que la actividad $\Delta 6$ desaturasa es superior que la de la $\Delta 5$ desaturasa. Los genes para ambas enzimas residen en el cromosoma 11, en una orientación inversa, y están separados por <11,000 pares de base (Hyekyung y otros, 1999). Una $\Delta 4$ desaturasa que puede introducir un enlace doble en la posición 4 del n-6 22:5 n-3 y 22:4 que resulta en la producción de DHA y ácido docosapentanoico se identificó en los hongos marinos *Thraustochytrium* sp (Qiu y otros, 2001).

El almacenamiento celular de ácidos grasos en triacilglicerol requiere que los ácidos grasos se activen primero a sus ésteres de acil-CoA a través de la acción de la enzima acil-CoA sintetasa. Las acil-CoA se producen por la acil-CoA sintetasa a partir de ácido graso, ATP y Coenzima A. Las acil-CoA sintetasas pueden exhibir especificidad de sustrato por diferentes longitudes de cadena o diferentes grados de saturación del ácido graso. Por ejemplo, una acil-CoA sintetasa preferente del araquidonato (20:4 n-6) se identificó en rata (Kang y otros, 1997). Esta enzima tiene una alta afinidad por el araquidonato y EPA y baja afinidad por el palmitato. Varias isoformas de las acil-CoA sintetasas se identificaron además en *Arabidopsis* (Schnurr y otros, 2000).

La acil CoA:diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) cataliza la etapa final enzimática en la producción de triacilgliceroles en plantas, hongos y mamíferos. La enzima es la responsable de transferir un grupo acilo a partir de acil-CoA a la posición sn-3 de 1,2-diacilglicerol (DAG) para formar triacilglicerol (TAG). La primera clonación de un gen DGAT fue a partir de ratón (Cases y otros, 1998). Un homólogo de *Arabidopsis* del gen DGAT de ratón se reportó posteriormente y se encontró que estaba presente como un gen de copia única (Hobbs y otros, 1999). Jako y otros, (2001) mostraron que el mutante de *Arabidopsis Tagl* que se afecta en el gen DGAT y tiene un fenotipo de ácido graso y aceite reducido puede complementarse por la expresión del ADNc DGAT. Jako y otros, (2001) mostraron además que la sobre-expresión específica en la semilla del ADNc DGAT en *Arabidopsis* silvestre mejora la deposición de aceite y el peso de semilla promedio y se confirma así la importante función del DGAT para regular la cantidad de triacilgliceroles en la semilla y el tamaño del depósito en las semillas en desarrollo. Los estudios basados en la purificación de la proteína en los hongos oleaginosos *Mortierella ramanniana* resultaron en la identificación de una segunda clase de proteínas involucradas en la producción de TAG que son codificadas por la familia del gen *DGAT2* que no están relacionadas con la familia del gen *DGAT1* previamente identificado (Lardizabal y otros, 2001). Un homólogo humano del gen de *Mortierella ramanniana* *DGAT2* se identificó además (Cases y otros, 2001). Las especificidades del sustrato de las diferentes familias todavía tienen que determinarse.

Aunque las plantas superiores típicamente no bio-sintetizan los LPUFA tales como el DHA, son un objetivo atractivo para la manipulación genética, particularmente el bajo costo de producción del DHA en los aceites vegetales de un cultivo tal como colza de semilla oleaginosa. No existen reportes de plantas superiores que bio-sinteticen DHA, se ha reportado un número de intentos para introducir los genes de algas para manipular la capacidad biosintética de las plantas de semilla oleaginosa que producen LPUFA. Estas incluyen la introducción de desaturasas en plantas transgénicas para aumentar la producción de DHA, EPA y también de ácido estearidónico (18:4n-3).

En la presente descripción hemos descrito secuencias de ácido nucleico que codifican enzimas involucradas en el metabolismo del ácido graso n-3 y la manipulación de estas secuencias y las vías bioquímicas que comprenden

enzimas codificadas por estas secuencias, para proporcionar una fuente dietética alternativa de ácidos grasos n-3 y, particularmente, DHA. Las secuencias codifican las actividades elongasa, desaturasa, acil CoA sintetasa y diacilglicerol aciltransferasa del ácido graso n-3.

5 La secuencia presentada en la Figura 1a se describió primero en GB0204684.5 la que se considera una primera solicitud para esta secuencia y se incorpora como referencia.

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste de:

10 (i) la secuencia de ADN representada en la Figuras 3a, 3d;
 (ii) secuencias de ADN que hibridan a la secuencia identificada en (i) anteriormente; y
 (iii) secuencias de ADN que se degeneran como resultado del código genético a la secuencia de ADN definida en (i) y (ii).

15 En una modalidad preferida de la invención se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas a las secuencias descritas en (i), (ii) y (iii) anteriormente.

Las condiciones de hibridación/lavado rigurosas son bien conocidas en la materia. Por ejemplo, los híbridos de ácido nucleico que son estables después del lavado en 0.1 xSSC, 0.1% SDS a 60°C. Es bien conocido en la materia que las condiciones de hibridación óptimas pueden calcularse si se conoce la secuencia del ácido nucleico. Típicamente, las condiciones de hibridación usan 4 - 6 x SSPE (20x SSPE contiene 175.3g NaCl, 88.2g NaH₂PO₄ H₂O y 7.4g EDTA disuelto en 1 litro y el pH ajustado a 7.4); 5-10x solución de Denhardtts (50x solución de Denhardtts contiene 5g Ficoll (Type 400, Pharmacia), 5g polivinilpirrolidona y 5g de albúmina de suero bovino); 100µg-1.0mg/ml salmón sonificado/ADN de arenque; 0.1-1.0% dodecil sulfato de sodio; opcionalmente 40-60% formamida desionizada. La temperatura de hibridación variará dependiendo del contenido de GC de la secuencia objetivo de ácido nucleico pero estará típicamente entre 42°- 65° C.

En una modalidad preferida de la invención dichas moléculas de ácido nucleico se aíslan de una especie de alga.

30 Preferentemente dicha especie de alga se selecciona del grupo que consiste de: *Amphidinium carterae*, *Amphiphora hyalina*, *Amphiphora sp.*, *Chaetoceros gracilis*, *Coscinodiscus sp.*, *Cryptothecodinium cohnii*, *Cryptomonas sp.*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Haslea ostrearia*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata*, *Navicula sp.*, *Nitzschia closterium*, *Pavlova lutheri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Prorocentrum minimum*, *Rhizosolenia setigera*, *Skeletonema costatum*, *Skeletonema sp.*, *Tetraselmis tetrathele*, *Thalassiosira nitzschoides*, *Thalassiosira heterophorma*,
 35 *Thalassiosira pseudonana*, *Thalassiosira stellaris*.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

40 En una modalidad preferida de la invención dicho polipéptido es una variante de polipéptido y comprende la secuencia de aminoácido representada en la Figura 3b, 3c, dicha secuencia se modifica por supresión, adición o sustitución de al menos un residuo de aminoácido en donde dicha modificación mejora la actividad enzimática de dicho polipéptido.

45 Una variante de polipéptido puede diferir en la secuencia de aminoácido en una o más sustituciones, adiciones, supresiones, truncamientos que pueden estar presentes en cualquier combinación. Entre las variantes preferidas están aquellas que varían a partir de un polipéptido de referencia por las sustituciones de aminoácido conservativas. Tales sustituciones son aquellas que sustituyen un aminoácido por otro aminoácido de características similares. La siguiente lista no limitante de aminoácidos se considera remplazos conservativos (similar): a) alanina, serina, y treonina; b) ácido glutámico y ácido aspártico; c) asparagina y glutamina d) arginina y lisina; e) isoleucina, leucina, metionina y valina y f) fenilalanina, tirosina y triptófano. Las variantes más preferidas son las que mantienen o mejoran la misma función biológica y actividad que el polipéptido de referencia a partir del cual varía.

55 Un (unos) polipéptido(s) funcionalmente equivalente(s) de acuerdo con la invención es una variante en donde uno en que uno o más residuos de aminoácido se sustituyen con residuos de aminoácido conservados o no conservados, o uno en el que uno o más residuos de aminoácido incluye un grupo sustituyente. Las sustituciones conservativas son los reemplazos, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu y Ile; intercambio de los residuos hidroxilo Ser y Thr; intercambio de los residuos ácidos Asp y Glu; sustitución entre residuos amida Asn y Gln; intercambio de los residuos básicos Lys y Arg; y reemplazos entre los residuos aromáticos Phe y Tyr.

60 Adicionalmente, la invención caracteriza las secuencias de polipéptidos que tienen al menos 75% de identidad con las secuencias de polipéptidos como las que se describen en la presente descripción, o fragmentos y polipéptidos funcionalmente equivalentes de éstos. En una modalidad, los polipéptidos tienen al menos 85% de identidad, con mayor preferencia al menos 90% de identidad, aún con mayor preferencia al menos 95% de identidad, aún con

mayor preferencia al menos 97% de identidad, y con la máxima preferencia al menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la presente descripción.

5 Idealmente dicho polipéptido modificado tiene actividad elongasa, desaturasa, acil-CoA sintetasa o diacilglicerol aciltransferasa de ácido graso mejorada.

10 En una modalidad preferida adicional de la invención dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácido representada en las Figuras 3b, 3c. Preferentemente dicho polipéptido consiste de la secuencia de aminoácido representada en las Figuras 3b, 3c.

15 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un vector que incluye al menos un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

20 Un vector que incluye ácido nucleico de acuerdo con la invención necesita incluir un promotor u otra secuencia reguladora, particularmente si el vector se usa para introducir el ácido nucleico en las células para recombinación en el genoma para la transfección estable.

25 Preferentemente, el ácido nucleico en el vector está operativamente unido a un promotor adecuado u otros elementos reguladores para la transcripción en una célula huésped tal como un procarionta, (por ejemplo, bacteria), o eucariota (por ejemplo, célula de insecto, mamífero, planta o fúngico.). El vector puede ser un vector de expresión bi-funcional que funciona en múltiples huéspedes. En el ejemplo de los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de acuerdo con la invención este puede contener su promotor nativo u otros elementos reguladores y en el caso del ADNc este puede estar bajo el control de un promotor adecuado u otros elementos reguladores para la expresión en la célula huésped.

30 Por "promotor" se entiende una secuencia de nucleótidos corriente arriba del sitio de iniciación transcripcional y el cual contiene todas las regiones reguladoras requeridas para la transcripción. Los promotores adecuados incluyen los promotores constitutivos, específicos de tejido, inducibles, de desarrollo u otros promotores para la expresión en células de planta comprendidas en las plantas dependiendo del diseño. Tales promotores incluyen los promotores derivados de plantas, virales, fúngicos, bacterianos y animales capaces de funcionar en las células de plantas.

35 Los promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, el promotor CaMV 35S (Odell y otros (1985) *Nature* 313, 9810-812); actina del arroz (McElroy y otros (1990) *Plant Cell* 2: 163-171); ubiquitina (Christian y otros. (1989) *Plant Mol. Biol.* 18 (675-689); pEMU (Last y otros (1991) *Theor Appl. Genet.* 81: 581-588); MAS (Velten y otros (1984) *EMBO J.* 3. 2723-2730); promotor ALS (solicitud de Estados Unidos núm. de serie 08/409,297), y similares. Otros promotores constitutivos incluyen aquellos de las patentes de Estados Unidos núms. 5,608,149; 5,608,144; 5,604,121; 5,569,597; 5,466,785; 5,399,680, 5,268,463; y 5,608,142. Los promotores regulados por sustancias químicas se pueden usar para modular la expresión de un gen en una planta mediante la aplicación de un regulador químico exógeno. Según el objetivo, el promotor puede ser un promotor inducible por sustancias químicas, en donde la aplicación de la sustancia química induce la expresión génica, o un promotor reprimible por sustancias químicas, en donde la aplicación de la sustancia química reprime la expresión génica. Los promotores inducibles por sustancias químicas se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, el promotor In2-2 del maíz, que se activa mediante protectores herbicidas de bencensulfonamida, el promotor GST del maíz, que se activa mediante compuestos electrofílicos hidrófobos que se usan como herbicidas pre-emergentes, y el promotor PR-la del tabaco, que se activa mediante ácido salicílico. Otros promotores de interés regulados por sustancias químicas incluyen los promotores que responden a los esteroides (ver, por ejemplo, el promotor inducible por glucocorticoides en Schena y otros (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 88: 10421-10425 y McNellie y otros (1998) *Plant J.* 14(2): 247-257) y los promotores inducibles por tetraciclina y reprimibles por tetraciclina (ver, por ejemplo, Gatz y otros (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227: 229-237, y patentes de los Estados Unidos núms. 5,814,618 y 5,789,156, incorporadas en la presente como referencia.

40 Cuando se desea una expresión mejorada en tejidos particulares, pueden usarse promotores específicos de tejido. Los promotores específicos de tejido incluyen aquellos descritos por Yamamoto y otros (1997) *Plant J.* 12(2): 255-265; Kawamata y otros (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7): 792-803; Hansen y otros (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3): 337-343; Russell y otros (1997) *Transgenic Res.* 6(2): 157-168; Rinehart y otros (1996) *Plant Physiol.* 112(3): 1331-1341; Van Camp y otros (1996) *Plant Physiol.* 112(2): 525-535; Canevascni y otros (1996) *Plant Physiol.* 112(2): 513-524; Yamamoto y otros (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5): 773-778; Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20: 181-196; Orozco y otros (1993) *Plant Mol. Biol.* 23(6): 1129-1138; Mutsuoka y otros (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 90(20): 9586-9590; y Guevara-Garcia y otros (1993) *Plant J.* 4(3): 495-50. En una modalidad preferida de la invención dicho promotor específico de tejido es un promotor que es activo durante la acumulación de aceite en el desarrollo de las semillas oleaginosas, ver Broun y otros (1998) *Plant J.* 13(2): 201-210.

50 "Operativamente unido" significa unido como parte de la misma molécula de ácido nucleico, adecuadamente posicionada y orientada para que el promotor inicie la transcripción. El ADN operativamente unido a un promotor está "bajo regulación de iniciación transcripcional" del promotor.

En una modalidad preferida, el promotor es un promotor inducible o un promotor de desarrollo regulado.

- 5 Los vectores particulares son constructos de ácido nucleico que operan como vectores de planta. Los procedimientos y vectores específicos previamente usados con amplio éxito en las plantas son descritos por Guerineau y Mullineaux (1993) (Plant transformation and expression vectors. En: Plant Molecular Biology Labfax (Croy RRD ed) Oxford, BIOS Scientific Publishers, pp 121-148. Los vectores adecuados pueden incluir vectores derivados de virus de plantas (ver, por ejemplo, EP-A-194809).
- 10 Los vectores pueden incluir además marcadores genéticos seleccionables tales como los que confieren fenotipos seleccionables tales como resistencia a herbicidas (por ejemplo, canamicina, higromicina, fosfinotricina, clorsulfurón, metotrexato, gentamicina, espectinomicina, imidazolinonas y glifosato).
- 15 Alternativamente, o adicionalmente, dichos vectores son vectores adecuados para la transfección de células de mamífero o la transfección de células de levadura. En el último ejemplo, se prefieren los vectores multi-copias tales como los vectores 2µepisomales. Alternativamente, los vectores CEN de levadura y los vectores de integración como los vectores YIP son adecuados para la transformación de las especies de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia* spp.
- 20 Resultará evidentes a una persona con experiencia en la técnica que un vector de acuerdo con la invención puede incluir moléculas de ácido nucleico que codifican diferentes actividades enzimáticas para facilitar el suministro de diferentes actividades enzimáticas a una célula transfectada o transformada para reconstituir las vías enzimáticas.
- 25 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una célula transfectada o transformada con al menos un vector o molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.
- 30 Preferentemente dicha célula se transforma o transfecta con al menos dos moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Preferentemente aún dicha célula se transforma con al menos tres moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, con mayor preferencia aún, cuatro moléculas de ácido nucleico.
- 35 En una modalidad preferida adicional de la invención dicha célula se transforma con moléculas de ácido nucleico que codifican para las actividades de elongasa, desaturasa, acil-CoA sintetasa y diacilglicerol aciltransferasa para proporcionar una célula en la cual se reconstituye al menos parte de una vía biosintética del ácido graso 3-n.
- 40 En aún una modalidad preferida adicional de la invención dichas moléculas de ácido nucleico son aquellas moléculas descritas en la presente descripción. En particular, las moléculas de ácido nucleico que comprenden las secuencias como se representan por las Figuras 3a, 3d.
- 45 En una modalidad preferida de la invención dicha célula se selecciona del grupo que consiste de: células de mamífero (por ejemplo, células de ovario de hámster chino); células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces* spp, *Pichia* spp); células de algas (por ejemplo, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlamydomonas reinhardtii*); células de plantas.
- 50 En una modalidad preferida de la invención dicha célula es una célula de planta.
- 55 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una planta que comprende una célula de acuerdo con la invención.
- 60 En una modalidad preferida de la invención dicha planta se selecciona de: maíz (*Zea mays*), canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), lino (*Linum usitatissimum*), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), frijol de soya (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), boniato (*Ipomoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Anana comosus*), cítricos (*Citrus* spp.) cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), banana (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifer indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia intergrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), avenas, cebada, vegetales y ornamentales.
- 65 Preferentemente, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, cereales y leguminosas, maíz, trigo, patatas, tapioca, arroz, sorgo, mijo, mandioca, cebada, chícharo), y otros cultivos de raíz, tubérculo o semilla. Los cultivos de de semilla importantes son la colza de semilla oleaginosa, remolacha azucarera, maíz, girasol, frijol de soya, sorgo, y lino (linaza). Las plantas de horticultura a las que se aplica la presente invención pueden incluir lechuga, endivia, y crucíferas vegetales que incluyen repollo, brócoli, y coliflor. La presente invención puede aplicarse en tabaco, cucurbitáceas, zanahoria, frutilla, girasol, tomate, pimienta.

- 5 Las plantas de grano que proporcionan semillas de interés incluyen plantas de semilla oleaginosa y plantas leguminosas. Las semillas de interés incluyen semillas de grano, tales como maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, centeno, etc. Las plantas de semilla oleaginosa incluyen algodón, frijol de soya, cártamo, girasol, Brassica, maíz, alfalfa, palma, coco, etc. Las plantas leguminosas incluyen frijol y chícharos. Los frijoles incluyen guar, algarrobo, alholva, frijol de soya, frijol de jardín, caupí, frijol mungo, frijol lima, haba, lentejas, garbanzo, etc.
- 10 Resultará evidente que las plantas transgénicas adaptadas para la producción de ácidos grasos n-3, en particular DHA, pueden comerse directamente o usarse como una fuente para la extracción de ácido graso esencial del cual el DHA pudiera ser un constituyente.
- 15 De acuerdo con aún un aspecto adicional de la invención se proporciona una semilla que comprende una célula de acuerdo con la invención.
- En una modalidad preferida adicional de la invención dicha célula es una célula de levadura, preferentemente del género *Saccharomyces spp*, preferentemente levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae*.
- 20 El género *Saccharomyces spp* se usa en la fermentación de cerveza y la preparación de vino y además como un agente en la pastelería, particularmente pan. La levadura es un constituyente principal de los extractos vegetales de los cuales Marmite[™] es un ejemplo típico. La levadura se usa además como un aditivo en la alimentación animal. Resultará evidente que las cepas de levadura diseñadas mediante ingeniería genética pueden proporcionarse las cuales se adaptan para sintetizar ácidos grasos n-3. Estas cepas de levaduras pueden usarse después en productos alimenticios y en la preparación de vino y cerveza para proporcionar productos que tienen un contenido mejorado de ácido graso n-3 y en particular de DHA.
- 25 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un producto alimenticio que comprende una célula de levadura de acuerdo con la invención.
- 30 En una modalidad preferida de la invención dicho producto alimenticio se selecciona del grupo que consiste de: vino; cerveza; pan, productos de cocción (por ejemplo, pan, pastel); extractos vegetales.
- En una modalidad preferida adicional de la invención dicho vino o cerveza es no alcohólica.
- 35 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un proceso de fermentación que comprende una célula de levadura de acuerdo con la invención.
- En una modalidad preferida de la invención dicho proceso de fermentación comprende las etapas de:
- 40 i) proporcionar un recipiente que contiene una célula de levadura de acuerdo con la invención y constituyentes requeridos para la fermentación y biosíntesis de ácido graso; y
ii) proporcionar condiciones que conduzcan a la fermentación de la composición líquida contenida en dicho recipiente.
- 45 De acuerdo con otro aspecto adicional de la invención, se proporciona un producto alimenticio animal que comprende una célula de acuerdo con la invención.
- En una modalidad preferida de la invención, dicha célula es una célula de planta o célula de levadura.
- 50 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para modular el nivel de ácido graso n-3, en particular DHA, o variantes del mismo, en una célula de planta que comprende;
- 55 i) proporcionar una célula de planta de acuerdo con la invención;
ii) regenerar la célula de planta en una planta; y
iii) monitorear la producción de ácido graso n-3 por dicha planta.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para la producción y opcionalmente la extracción de ácidos grasos n-3, en particular DHA, que comprende:
- 60 i) proporcionar una célula de acuerdo con la invención;
ii) proporcionar condiciones que conduzcan al crecimiento de dicha célula; y
iii) extraer los ácidos grasos n-3 o variantes de los mismos de dicha célula.
- 65 De acuerdo con aún un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para la producción y opcionalmente la extracción de ácido graso n-3, particularmente DHA, que comprende:

- i) proporcionar una célula de planta de acuerdo con la invención;
- ii) regenerar dicha célula en una planta; y
- iii) extraer los ácidos grasos n-3 o variantes de los mismos de dicha planta.

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporcionan ácidos grasos n-3, particularmente DHA, o variantes de los mismos, obtenibles por el(los) método(s) de acuerdo con la invención.

En una modalidad preferida de la invención dicho ácido graso n-3, o variante del mismo, se usa como un producto farmacéutico.

10 En una modalidad preferida adicional de la invención dicho ácido graso n-3, o variante del mismo, se usa en la fabricación de un medicamento para usar en el tratamiento de condiciones que se beneficiarían a partir de administración de ácidos grasos n-3, o variantes de los mismos.

15 En una modalidad preferida de la invención dicha condición se selecciona del grupo que consiste de: arritmias cardíacas; artritis reumatoide; enfermedad de Crohn; esquizofrenia; cáncer; síndrome de alcoholismo fetal; trastorno de hiperactividad con déficit de atención; fibrosis quística; fenilcetonuria; depresión unipolar; hostilidad agresiva; adrenoleucodistofia; enfermedad coronaria del corazón, hipertensión, diabetes tipo II, enfermedades oculares.

20 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un animal transgénico no humano que comprende al menos una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

25 De acuerdo con aún un aspecto adicional de la invención se proporciona un recipiente de reacción que comprende al menos un polipéptido de acuerdo con la invención, sustratos de ácido graso y co-factores caracterizado porque dicho recipiente se adapta para la conversión de dichos sustratos de ácidos grasos a ácidos grasos n-3, en particular ácido docosahexanoico.

30 En una modalidad preferida de la invención dicho recipiente comprende polipéptidos que tienen actividades elongasa, desaturasa, acil-CoA sintetasa y diacilglicerol aciltransferasa para proporcionar un recipiente en el cual se reconstituye al menos parte de una vía biosintética del ácido graso 3-n.

35 En una modalidad preferida adicional de la invención dichos polipéptidos son aquellas moléculas de proteína descritas en la presente descripción. En particular, las moléculas de proteína que comprenden las secuencias se representan por las Figuras 3b, 3c.

En una modalidad preferida de la invención dicho al menos un polipéptido se expresa por una célula de acuerdo con la invención.

40 En una modalidad preferida de la invención dicho(s) polipéptido(s) es/son solubles. Alternativamente dicho(s) polipéptido(s) está/están inmovilizados.

En una modalidad preferida adicional de la invención dicho recipiente es un biorreactor.

45 Resultará evidente para una persona con experiencia en la técnica que un polipéptido de acuerdo con la invención tiene utilidad con respecto a *la biosíntesis in vivo* de ácidos grasos n-3 a través de la transformación o transfección de ácidos nucleicos que codifican dicho(s) polipéptido(s) en células huésped adecuadas. Los ácidos grasos puede después extraerse de dichas células o los alimentos que comprenden dichas células pueden comerse. Las células que expresan dicho(s) polipéptido (s) pueden incubarse además bajo condiciones de crecimiento adecuadas para facilitar la síntesis de ácidos grasos. Alternativamente, dicho(s) polipéptido (s) pueden purificarse a partir de un cultivo de células de algas o manufacturarse de manera recombinante y usarse en un biorreactor para sintetizar ácidos grasos *in vitro*. Resultará evidente además que la invención involucra, entre otros, la reconstitución de al menos parte de una vía biosintética de ácido graso n-3 de algas, en una célula *o in vitro*, proporciona una fuente de ácidos grasos n-3 que es una alternativa a la explotación de las algas en biorreactores o el consumo de pescado.

55 Una modalidad de la invención se describirá ahora como ejemplo solamente y con referencia a la figura 3a:

La Tabla 1 representa el análisis de ácido graso de células de *P. lutheri* en dos etapas de crecimiento.

60 La Figura 1a representa la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico que comprende una elongasa de ácido graso, *PIEL01*; la Figura 1b la secuencia de aminoácido que comprende *PIEL01*;

La Figura 2a representa la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico que comprende una elongasa de ácido graso, *PIEL02*; la Figura 2b la secuencia de aminoácido que comprende *PIEL02*.

La Figura 3a representa la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico que comprende desaturasa de ácido graso, *PIDES1*; la Figura 3b la secuencia de aminoácido que comprende *PIDES1*; la Figura 3c representa una secuencia de aminoácido de longitud completa de *PIDES1*; la Figura 3d representa la secuencia de ácido nucleico de longitud completa de *PIDES1*.

5 La Figura 4a representa la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico que comprende desaturasa de ácido graso, *PIDES2*; la Figura 4b la secuencia de aminoácido que comprende *PIDES2*;

10 La Figura 5 representa una comparación de secuencias entre las proteínas *PIDES1*, *PIDES2*, de *Pavlova lutheri* y la proteína FAD4 de *Thraustochytrium* sp.

La Figura 6a representa la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico que comprende acil-CoA sintetasa, *PIACS1*; la Figura 6b la secuencia de aminoácido que comprende *PIACS1*;

15 La Figura 7a representa la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico que comprende diacilglicerol aciltransferasa, *PIDGAT2-1*; la Figura 7b la secuencia de aminoácido que comprende *PIDGAT2-1*; la Figura 7c la secuencia de longitud completa de una molécula de ácido nucleico que codifica *PIDGAT2-1*; la Figura 7d secuencia de aminoácido de longitud completa del polipéptido *PIDGAT2-1*;

20 La Figura 8a representa la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico que comprende una elongasa de ácido graso, *PIELO1*; la Figura 8b la secuencia de aminoácido que comprende *PIELO1*; y

La Figura 9 es una representación esquemática de la biosíntesis de ácido graso de cadena larga.

25 **Materiales y Métodos**

Cultivo de *Pavlova lutheri*

30 *Pavlova lutheri* (CCAP 931/1) se obtuvo a partir de la colección de cultivo de algas y protozoos (Dunstaffnage Marine Lab., Oban, PA34 4AD, Escocia, Reino Unido).

El medio de crecimiento usado en todos los experimentos fue medio de agua de mar artificial enriquecido (EASW), preparado en lotes de 20 l como es descrito por Harrison y *otros* (1980), y modificado por Thompson y *otros* (1991). El medio se modificó además mediante el incremento de las concentraciones de macronutrientes de NaNO₃ y Na₂SiO₃·9H₂O a 1 mM, y NaH₂PO₄ a 200 μM. El silicato se disolvió separado en agua destilada desionizada y el pH se ajustó a aproximadamente 8.0 con 50% HCl antes de que se adicionara al medio. Este medio se tamponó a pH 8.0 mediante la adición de 20 mM de ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfónico] (HEPES) y 20 mM de NaOH. El medio preparado fresco se filtró a través de un filtro de membrana de 0.22 μm Millipore™ GS en un reservorio de propileno estéril de 20 l. Después se despachó por 0.5l en frascos de vidrio cónicos de 1 l y se esterilizó en autoclave (30 min, 120°C). Los cultivos en lote se cultivaron a 15°C con iluminación constante 50 μE m⁻² S⁻¹, y la aireación proporcionada por la agitación de los frascos a 150 rpm.

45 La densidad celular se monitoreó mediante el conteo de células con un hemacitómetro. Ya que las células de *Pavlova lutheri* son móviles, primero se incubaron en azida sódica 20 mM para inmovilizar antes del conteo.

La concentración de nitrato se determinó periódicamente durante el tiempo de cultivo midiendo el cambio de la absorbancia del medio a 220 nm, de acuerdo con el método descrito por Collos y *otros*. (1999).

Aislamiento del ARN total y Poli(A)⁺ a partir de *P. lutheri*

50 El cultivo de algas se cosechó por centrifugación a 4,500 rpm por 15 min. La bolilla de células se suspendió en 1 volumen de tampón de extracción (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, 75 mM NaCl, 1 % SDS v/v, 7.8 % β-mercaptoetanol v/v, en agua DEPC tratada), y se adicionó un volumen de 25:24:1 fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (v/v). Después de la centrifugación a 13,000 rpm a 4 °C por 10 min, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se adicionó 1 volumen de 24:1 cloroformo:alcohol isoamílico v/v. Después de una segunda ronda de centrifugación, la fase superior se transfirió a un tubo fresco y se adicionó LiCl hasta una concentración final de 2 M. Esta solución se incubó por 1h a -20 °C, y después se centrifugó a 13,000 rpm a 4 °C por 15 min. La bolilla resultante se re-suspendió en agua DEPC tratada y el ARN se precipitó mediante la adición de 0.1 volumen de acetato sódico 3 M, pH 5.5 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto seguido por incubación por 20 min a 4 °C. Esta muestra se centrifugó después a 13,000 rpm a 4 °C por 15 min y la bolilla resultante se lavó con 70 % etanol, se secó y re-suspendió en agua DEPC tratada. La cantidad y calidad del extracto se estimó mediante la medición de la densidad óptica a 260 y 280 nm (1 O.D._{260 nm} = 40 μg/ml ARN). Una alícuota del extracto se visualizó además en un gel de agarosa 1 % (p/v) que contenía bromuro de etidio.

Para la construcción de la genoteca de ADNc, el poli(A)⁺ ARN se preparó con el kit de aislamiento de ARNm Poly(A) Quick® (Stratagene) a partir de células cosechadas durante la fase exponencial.

Construcción de la genoteca de ADNc y excisión del fagómodo pBluescript.

El ADNc de extremo adaptado, de cadena doble sintetizado usando un kit de síntesis de ADNc (Stratagene) se pasó a través de una columna de filtración de gel Sepharose CL-2B (Stratagene) para eliminar los adaptadores y las moléculas de ADNc pequeñas. El ADNc eluido de la columna se extrajo con fenol, se precipitó con etanol y se ligó a los brazos del vector Uni-ZAP XR (Stratagene) antes del empaque en el fago λ usando el extracto de empaque Gigapack III Gold (Stratagene). Una genoteca primaria de 3×10^6 unidades formadoras de placa (pfu) se obtuvo con la mayoría de los insertos examinados en el intervalo de 0.3 a 1.5 kb. La genoteca se amplificó posteriormente.

Después de la amplificación, la genoteca de ADNc se eliminó usando el fago auxiliar resistente a la interferencia ExAssist™ (Stratagene). Los fagómeros eliminados se colocaron en placas como colonias de bacterias individuales siguiendo las instrucciones del fabricante. La presencia del inserto se verificó por PCR usando cebadores universales y se seleccionaron los clones que contienen ADNc mayores que 0.2 kb para la secuenciación.

Secuenciación y análisis de secuencias.

Las reacciones de secuenciación se prepararon con el kit de secuenciación cíclico ABI Prism Big Dye-Terminator (PE Applied Biosystems), usando el cebador T3 universal, y se corrieron en un secuenciador ABI3700 (96-capilares) (PE Applied Biosystems). Las etiquetas de secuencia expresada (EST) resultantes se procesaron de manera que todas las secuencias vectores se eliminaron y se examinaron posteriormente usando algoritmos de alineación de secuencia de nucleótidos estándar para identificar los clones EST con secuencias de superposición. Estas secuencias de superposición se agruparon después en cóntigos. Estos cóntigos se anotaron por comparación con las bases de datos de nucleótidos y péptidos no redundantes disponibles del National Centre for Biotechnology Information (NCBI). Las bases de datos del NCBI se descargaron a un servidor local Silicon Graphics lo que permitió que se realizara la anotación de miles de EST como un trabajo en lotes usando el algoritmo de alineación de secuencia BLAST 2 (Altschul y otros, 1997).

Los clones *PIELO1*, *PIELO2*, *PIDES7*, *PIDES2*, *PIACSI* y *PIDGAT2-1* se identificaron sobre la base de la homología con otros genes de elongasa/desaturasa/acil-CoA sintasa o diacilglicerol aciltransferasa de ácido graso en las bases de datos de proteína y nucleótido del NCBI.

Análisis funcional de los ORFS *PIELO1*, *PIELO2*, *PLDES1*, *PIDES2*, *PIACS1* y *PIDGAT2-1* por expresión heteróloga.

La caracterización funcional de la secuencia de aminoácido codificada por *PIELO1* y *PIELO2* se realizará bajo los protocolos previamente descritos (Jaworski y otros, 2001 (o referidos como: patente de Estados Unidos núm. 6,307,128); Qi y otros, 2002). Con este fin, muchas especies de sustratos de ácido graso serán considerados: saturado (16:0, 18:0, 20:0, 22:0), monoinsaturado (16:1, 18:1, 20:1) y poliinsaturado (20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3) (figura 4).

La caracterización funcional de la secuencia de aminoácido codificada por *PIDES1* y *PIDES2* se realizará bajo los protocolos previamente descritos (Qiu y otros, 2001). Con este fin, muchas especies de sustratos de ácido graso serán considerados: saturado (16:0, 18:0), monoinsaturado (16:1, 18:1) y poliinsaturado (18:2n-6, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3; 20:2n-6, 20:3n-3; 20:3n-6, 20:4n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:4n-6, 22:5n-3 y 22:5n-6).

La caracterización funcional de la secuencia de aminoácido codificada por *PIACS1* se realizará bajo los protocolos previamente descritos (Kang y otros, 1997). Con este fin, muchas especies de sustratos de ácido graso serán considerados: saturado (8:0, 10:0, 12:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0), monoinsaturado (14:1, 16:1, 18:1) y poliinsaturado (18:2n-6, 18:3n-3, 18:3n-6, 20:4n-6, 20:5n-3 y 22:6n-3).

La caracterización funcional de la secuencia de aminoácido codificada por *PIDGAT2-1* se realizará bajo los protocolos previamente descritos (Lardizabal y otros, 2001; Cases y otros, 2001, Zou y otros, 1999). Con este fin, la actividad DGAT se ensayará mediante la incorporación de [¹⁴C] diacilglicerol en TAG en presencia de muchas especies de sustratos de acil CoA graso que son representativas de los ácidos grasos que particionan a TAG en *P. lutheri*. Estos incluyen: 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:4, 20:5 y 22:6.

Análisis de ácidos grasos y extracción de TAG

Las células de alga (2 ml de medio de cultivo) se cosecharon durante el período experimental por centrifugación a 13,000 rpm por 15 min. Cincuenta μ g de tripentadecanoína (15:0-TAG) se adicionaron a la bolilla como un estándar interno. La bolilla se suspendió después en 1 ml de 2:1 cloroformo:metanol (v/v) y se congelaron en nitrógeno líquido. Después de 1 hora a 4°C, los restos celulares se descargaron por centrifugación y se adicionaron 0.3 ml de

0.9% KCl al sobrenadante. Después de la centrifugación, la fase del fondo se transfirió a un Ependorf 2 ml y se enjuagó KCl con 0.5 ml de cloroformo. Las fases de cloroformo se concentraron y secaron. El extracto FA se suspendió en 0.2 ml de hexano, y este volumen se dividió en 2 fracciones de 0.1 ml. La primera fracción se secó, y el extracto lípido se suspendió en 0.2 ml de hexano. Esto representó el extracto lípido total. La segunda fracción se usó para aislar los TAG por cromatografía hidrófoba. Las columnas de extracción en fase sólida Bond Elut (Varian) 1 ml con empaque de Si 100 mg se usaron para particionar los TAG de otros lípidos en los extractos de algas. Este protocolo se adaptó a partir de un método descrito por Yongmanitchai y Ward (1992). El eluato se secó y el extracto TAG se suspendió en 0.2 ml de hexano. Los productos de estas dos extracciones se analizaron por GC como se describió previamente por Larson y Graham (2001).

La misma metodología se empleará para extraer lípidos y ácidos grasos de células de levadura para realizar el análisis funcional de *PIEL01*, *PIEL02* y *PIDES 1* a continuación de la alimentación de los diferentes ácidos grasos como se detalló anteriormente.

Composición de ácidos grasos de las células de *P. lutheri*

Tabla 1: Composición de ácidos grasos (% molar) de células de *P. lutheri* en dos etapas de crecimiento.

El punto importante a destacar a partir de los datos presentados en la tabla 1 es que *P. lutheri* no produce ácidos grasos 20:0, 22:0, 24:0, 20:1, 22:1 pero sí produce 20:5n-3 y 22:6n-3. La secuencia de aminoácidos derivada del gen *PIEL01* como se muestra en la Figura 2 tiene una estrecha homología con las elongasas de la planta que están involucradas en la producción de ácidos grasos C20 y C22 saturados y monoinsaturados. *P. lutheri* no produce tales ácidos grasos. Por lo tanto se concluye que el producto génico *PIEL01* está involucrado en la producción de los ácidos grasos 22:5 y 22:6 los que se encuentran en *P. lutheri*.

Clonación y caracterización de los genes *PLEL01*, *PIEL02*, *PIDES 1*, *PIDES 2*, *PLACS1* y *PIDGAT2-1*

El primer paso de secuenciación de 5,719 clones de ADNc de una genoteca de ADNc preparada a partir de *P. lutheri* resultó en la identificación de 34 clones de ADNc a partir de un solo gen que da una secuencia de aminoácido predicha que tiene una identidad significativa y con genes de elongasa de ácido graso de una variedad de organismos (Figura 3). Esta abundancia de copias del gen elongasa indica que se expresó a un nivel significativo en células *P. lutheri* que son productoras de DHA y proporciona pruebas adicionales que el gen *PIEL01* codifica un polipéptido de elongasa 3-cetoacil-CoA sintasa que cataliza la condensación de malonil-CoA con acil-CoA en la conversión de ácido eicosapentanoico a ácido ω -docosapentanoico el que a su vez se convierte a ácido docosahexanoico.

La secuenciación de 5,719 clones de ADNc de la genoteca de *P. lutheri* resultó además en la identificación de seis clones de ADNc a partir de un solo gen que da una secuencia de aminoácido predicha que tiene una identidad significativa con los genes desaturasa de ácido graso de una variedad de organismos (Figura 2a y 2b). Este gen elongasa se designó *PIEL02*.

La secuenciación de 5,719 clones de ADNc de la genoteca de *P. lutheri* resultó además en la identificación de cuatro clones de ADNc a partir de un solo gen que da una secuencia de aminoácido predicha que tiene una identidad significativa con los genes desaturasa de ácido graso de una variedad de organismos (Figura 3a, 3b, 3c y 3d). Este gen desaturasa se designó *PIDES 1*.

La secuenciación de 5,719 clones de ADNc de la genoteca de *P. lutheri* resultó además en la identificación de tres clones de ADNc a partir de un solo gen que da una secuencia de aminoácido predicha que tiene una identidad significativa con los genes desaturasa de ácido graso de una variedad de organismos (Figura 4a y 4b). Este gen desaturasa se designó *PIDES 2*.

La secuencia de aminoácidos derivada de *PIDES 1* y *PIDES 2* contienen ambas un motivo histidina típico de los genes desaturasa de ácido graso tal como el gen $\Delta 4$ desaturasa del hongo marino *Thraustochytrium* sp. que está involucrado en la producción de DHA y ácido docosapentanoico (Qiu y otros, 2001) (Fig.5).

La secuenciación de 5,719 clones de ADNc de la genoteca de *P. lutheri* resultó además en la identificación de doce clones de ADNc a partir de un solo gen que da una secuencia de aminoácido predicha que tiene una identidad significativa con los genes de acil-CoA sintetasa de una variedad de organismos (Figura 6a y 6b). Este gen de acil-CoA sintetasa se designó *PIACS1*.

La secuenciación de 5,719 clones de ADNc de la genoteca de *P. lutheri* resultó además en la identificación de un clon de ADNc que da una secuencia de aminoácido predicha que tiene una identidad significativa con los genes de diacilglicerol aciltransferasa 2 de muchos organismos (Figura 7a y 7b). Este gen de diacilglicerol aciltransferasa 2 se designó *PIDGAT2-1*.

La secuencia de proteína y ADNc de longitud completa de *PIELO1* se describe en las Figuras 8a y 8b respectivamente.

REFERENCIAS

- 5
1. Uauy R, Mena P, Rojas C Essential fatty acids in early life: structural and functional role. Proc Nutr Soc 2000 Feb;59(1):3-15
- 10
2. Dewailly E, Blanchet C, Lemieux S, Sauve L, Gingras S, Ayotte P, Holub BJ. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease risk factors among the Inuit of Nunavik. Am J Clin Nutr 2001 Oct;74(4):464-73
3. Salem N y otros (1994) "Arachidonate and docosahexaenoate biosynthesis in various species and compartments in vivo." World Review of Nutrition and Dietetics, vol. 75, pp. 114-119.
- 15
4. Haag, M. Depressive Symptoms in Schizophrenia. The Medicine Journal, noviembre 2001. Páginas 1-7.
5. Qi B, Beaudoin F, Fraser T, Stobart AK, Napier JA, Lazarus CM. Identification of a cDNA encoding a novel C18-Delta(9) polyunsaturated fatty acid-specific elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana*. FEBS Lett 2002 enero 16;510(3):159-65
- 20
6. Ashford A, Barclay WR, Weaver CA, Giddings TH, Zeller S. Electron microscopy may reveal structure of docosahexaenoic acid-rich oil within *Schizochytrium* sp. Lipids 2000 dic;35(12):1377-86
7. Hammond BG, Mayhew DA, Robinson K, Mast RW, Sander WJ. Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium* sp. Regul Toxicol Pharmacol 2001 jun;33(3):356-62
- 25
8. Simonpolous AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. Am. J. Clin. Nutr. 1999;70 (3); 560S-569S.
9. Horrocks LA & Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). Pharmacol. Res. 1999;40(3):211.
- 30
10. Collos, Y., Mornet, F., Sciandra, A., Waser, N., Larson, A., Harrison, P.J., 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar levels of nitrate in marine phytoplankton cultures. Journal of Applied Phycology 11, 179-184.
- 35
11. Harrison, P.J., Waters, R.E., Taylor, F.J.R., 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. Journal of Phycology 16,28-35.
12. Larson, T.R. , Graham I.A., 2001. A novel technique for the sensitive quantification of acylCoA esters from plant tissues. The Plant Journal 25, 155-125.
- 40
13. Thompson, P.A., Harrison, P.J. , Parslow, J.S., 1991. Influence of irradiance on cell volume and carbon quota for ten species of marine phytoplankton. Journal of Phycology 27, 351-360.
- 45
14. Yongmanitchai, W., Ward, O.P., 1992. Separation of lipid classes from *Phaeodactylum tricornutum* using silica cartridges. Phytochemistry 31, 3405-340.
15. Broun P, Boddupalli S, Somerville C. 1998. A bifunctional oleate 12-hydroxylase: desaturase from *Lesquerella fendleri*. Plant J 13(2): 201-10 Schnurr JA, Shockey J, Browse J. 2000 Characterization of an acyl-CoA synthetase from *Arabidopsis thaliana*. Biochem Soc Trans. Dic;28(6):957-8.
- 50
16. Kang MJ, Fujino T, Sasano H, Minekura H, Yabuki N, Nagura H, Iijima H, Yamamoto TT. 1997 A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. Proc Natl Acad Sci Estados Unidos. Abril 1;94(7):2880-4.
17. Qiu X, Hong H, MacKenzie SL. 2001 Identification of a Delta 4 fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. J Biol Chem. Agosto 24;276(34):31561-6.
- 55
18. Cases S, Smith SJ, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Novak S, Collins C, Welch CB, Lusic AJ, Erickson SK, Farese RV Jr. 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. Proc Natl Acad Sci Estados Unidos. Oct 27;95(22):13018-23.
19. Hobbs DH, Lu C, Hills MJ. 1999. Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis thaliana* and its functional expression. FEBS Lett. 11;452(3):145-9.
- 60
20. Jako C, Kumar A, Wei Y, Zou J, Barton DL, Giblin EM, Covello PS, Taylor DC. 2001. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. Plant Physiol. 126(2):861-74.
21. Lardizabal KD, Mai JT, Wagner NW, Wyrick A, Voelker T, Hawkins DJ. 2001. DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family: purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity. J Biol Chem. 19;276(42):38862-9.

Cases S, Stone SJ, Zhou P, Yen E, Tow B, Lardizabal KD, Voelker T, Farese RV Jr. 2001. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem.* Oct 19;276(42):38870-6.

5 Zou J, Wei Y, Jako C, Kumar A, Selvaraj G, Taylor DC. 1999. The *Arabidopsis thaliana* TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene. *Plant J.* 19(6):645-53.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste de:
- 10
- i) la secuencia de ADN como se representa en la Figura 3a o 3d o que codifica para una secuencia de aminoácido como se representa en la Figura 3b o 3c;
- ii) secuencias de ADN que hibridan bajo condiciones rigurosas de hibridación a la secuencias identificadas en (i) anteriormente y que codifican un polipéptido que tiene actividad desaturasa de ácido graso; y
- 15
- 10 iii) secuencias de ADN que se degeneran como resultado del código genético a la secuencia de ADN definida en (i) y (ii) y codifica una desaturasa de ácido graso.
2. Un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.
- 15
3. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácido representada en la Figura 3b o la Figura 3c.
- 20
4. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 caracterizado además porque dicho polipéptido consiste de la secuencia de aminoácido representada en la Figura 3b o 3c.
- 25
5. Un vector que incluyen al menos una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.
6. Un vector de acuerdo con la reivindicación 5 en donde dicho ácido nucleico está operativamente unido a un promotor.
- 25
7. Un vector de acuerdo con la reivindicación 6 dicho promotor es un promotor inducible o un promotor de desarrollo regulado.
- 30
8. Una célula aislada que comprende un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7.
9. Una célula de acuerdo con la reivindicación 8 dicha célula se selecciona del grupo que consiste de: una célula de mamífero, una célula de levadura, una célula de alga o una célula de planta.
- 35
10. Una célula de acuerdo con la reivindicación 9 dicha célula es una célula de planta.
11. Una planta que comprende una célula de acuerdo con la reivindicación 10.
- 40
12. Una planta de acuerdo con la reivindicación 11 en donde dicha planta se selecciona del grupo que consiste de: maíz (*Zea mays*), canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), lino (*Linum usitatissimum*), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), frijol de soya (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), cacahuetes (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), boniato (*Iopmoea batatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Cofea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Anana comosus*), cítricos (*Citrus* spp.) cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia senensis*), banana (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifer indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia intergrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), avenas, cebada, vegetales y ornamentales.
- 45
13. Una semilla que comprende una célula de acuerdo con la reivindicación 10.
- 50
14. Un proceso de fermentación en donde dicho proceso comprende las etapas de:
- 55
- i) proporcionar un recipiente que contiene una célula de acuerdo con la reivindicación 9 y constituyentes requeridos para la fermentación y biosíntesis de ácido graso; y
- ii) proporcionar condiciones que conduzcan a la fermentación de la composición líquida contenida en dicho recipiente.
- 60
15. Un método para modular el nivel de ácidos grasos o variantes de los mismos en una célula de planta que comprende;
- 65
- i) proporcionar una célula de planta de acuerdo con la reivindicación 10;
- ii) regenerar la célula de planta en una planta; y
- iii) monitorear la producción de ácido graso por dicha planta.
16. Un método para la producción y opcionalmente la extracción de ácidos grasos que comprende:

- i) proporcionar una célula de acuerdo con la reivindicación 9 o 10;
- ii) proporcionar condiciones que conduzcan al crecimiento de dicha célula; y
- iii) extraer los ácidos grasos o variantes de los mismos de dicha célula.

- 5
17. Un método para la producción y opcionalmente la extracción de ácidos grasos que comprende:
- i) proporcionar una célula de planta de acuerdo con la reivindicación 10;
 - ii) regenerar dicha célula en una planta; y
 - iii) extraer los ácidos grasos o variantes de los mismos de dicha planta.
- 10
18. Un recipiente de reacción que comprende al menos un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, y sustratos de ácido graso caracterizados porque dicho recipiente se adapta para la conversión de los sustratos de ácido graso contenidos en el mismo.
- 15
19. Un recipiente de reacción de acuerdo con la reivindicación 18 en donde dicho polipéptido se expresa por una célula de acuerdo con la reivindicación 9 o 10.
- 20
20. Un recipiente de reacción de acuerdo con la reivindicación 18 o 19 en donde dicho recipiente es un biorreactor.

Figura 1 a

CACGAGGCTCGTGCCGAATTCGGCACGAGGGCTGCGCGACGACAAGGAC
 GACGGCAGCCTGAGTGCAGACGAGCGATTTCTTCGCTCGACGATCACGGP
 TTGGGGCAATTTTTCGACGAGTCCGTCGACTTCCAGATGAAGCTTTTTC
 AGCGCAACCAGATCTCCGAGCGCTGCTACTTCCACCTGGCATCCGCGCC
 TACCGCAAGGGCGAGCGGACTTTGACTTTTCGATGGCCGCGCGCGCA
 GGAGTTCGAGACTGTCGTCTTACGACCGTGCAGAGCTGCTCGCCAAG
 CGGGCGTAAAGCCGCGAGATATCGACATCCTCGTCTCAACTGCTCGCTC
 TTCAACCCGACGCCATCGCTGGCTGGATGCTGATCAACCACTACCAGAT
 GAAGGACTCCGTACAGAGCTACTCACTTGGCGGGATGGGTTGCTCAGCGG
 GACTCATCTCAATCCACTCGCAAAGGACCTGCTGCAGGTCTACCCGCGC
 AAGCGCGGCTCGTCATCTCGACGGAGAATACACGCAAAATTTTACCA
 GGGCAACGAAAAGTCGATGCTCATCTCGAACACGCTTTCGGAATGGGG
 GCGCGCGGCTCTCCTCTCGGGCCGCCACGCGACCGCGCGCTCGCCAAG
 TATCAACTGCTGCACACCGTCCGACGACACAAGGGCGCGACCCGGAAGC
 GTACCGGTGCGTCTTCCAGGAGGAGGACAAGGGCGGGCACGTGGGCGTGC
 GCCTGTGAAAGACGTGATGAGTGCAGCGCGCGCGCGATGAAGACCAAC
 ATCTCCGTCCTCGCGCTCTGATTTCTGCGCGTTTCTGAGCAGGTCCGATT
 TCTCGCAAACTACGTTGCGCGCAAGTGGCTGCGAATGAAAGGCGTGAAGG
 GATACGTGCCGACTTCAACAACGGCCGTGCGAGCACTTTTGCATCCACAG
 GGCGGGCGCGCGGTGCTCGACGCGCTGCGAGGCGAACTTGTGCTCTCAGA
 TTACTACCTCGAGCCGAGCCGTTACTCCCTGTGGCGCTGGGGTAACGTCT
 CAAGCGCCTCAGTCTGGTACGAGCTCGACTGGCTCGAAAAGTCCGGCCGC
 ATCCGGCGGGCGACAAGGTGTGGCAGATTGGGTTTGGCAGCGGCTTCAA
 GTGCAACTCGGCCGCTGCGCGGGCGTGCAGAGCGATGCCCTAGCTACGCC
 GGGCGCGTCCGATTGCCAGTGGTTCGTGACAGACAGTCACTGACGAG
 TGCGGAGTGACGTCTGACGCGCTTCCCCCCCCCGCCACCCTCCACTC
 CACTCCTTCACTCTCACTCAATCGCGGGCGCCAGAGCAGGAGCGCGC
 TCGTCTCGCCATCACCGCTTGTAGTCTCGCGCGCTCGAGCGAGCGC
 GCGTCCATGAGCGGCACGGACGGAAGCGGAAGAAGAGCCACATCACAGC
 AGAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGACTAGTTCTCTTACCGCGCTGC
 CGAGCTCAAGCACGGCCGCGTGTGCATGCTCGCCGTACCGGCATGCTTG
 TCCAGGAGGTGACTCGTGGCCGGCACCCGACGGCGTCTTCAAGGCGCCG
 ACGCCGCTCGGGCGGCTCTCGACCGTGCAGCGCTCGGCTCATCCAGCT
 CATCGTCTTCTCGGCATCATCGAGGTGCGCTCGGCGAACTACCAGGGCC
 GCGTGC CGCGGACCTTGGCTTTGACCGGCTCGG

Figura 1b

RGLVPNSARGLRDDKDDGSLSATSDFFRSTITD CGNFCDE
 SVDFOMKLFERNQISERCYFPPIRAAYRKBERDFDFSMAA
 ARKEFETVVFVTTVDELLAKTGVKPRDIDILVVNCSLFPNPT
 PSLAAIVINH YQM KDSVQSYSLGGMGCSAGLISIH LAKDL
 LQVYPRKRALVISTENITQNFYQGNBKSM LISNTLFRMGG
 AAVLLSGRHADRRVAKYQLLHTV RTHKGADPDAYRCV FQE
 EDKAGHVGVRLSKDVM ECAGAMKTNISVLA PLILP VSEQ
 VRFLANYVAR KWL R M KGVKGYVPDFTTAVQHFCIHTG GRA
 VLDA LQANLSLSDY YLEPSRYS LWRWGNVSSASVWYELDW
 LEKSGRI RRGDKVWQIGFGSGFKCNSAVWRACRAM P

Figura 2a

GCACGAGGCCCTCGTGCCGAATTCGGCACGAGGCGGCGCTGTGGTCTGTGGT
TACCGACGTACGACGAGTTTGTGATGGGCTTTCGTTTCGTCGACCGCGAG
AAGATCGGCGTGCAATGGTTCGACCAGGGCGTGATTACCTCTGCGGAGTG
GGCGGCCATCTCGGTCGACAAGCACATGTCCTTCTCTCCGACGCGGCCG
AGTTACGGGCGACCACTGGATCATCCCGCTCGTCGCGGTTCGCACTCTAC
CTCGTGATGATCGTCTCGGCCCAATGATCATGGCCAACCGGCCGCGCT
CCCGTGAATGGGCTCGCCTGCGCGTGGAACTGGTTCCTGGCCGCATTCA
GCACCTTCGGCGTGGCTTGCACGTGGCACTGTATCTTCACCAGGCTGCGT
AGCCGCGGCTTCGAGAGCACGACGTGCGGCAGCGCCATGTTTCATGTCGCA
GGGGTACGTTGGCTTGGCAATGCTGCTCTTCTACTCCAAGCTCTTCG
AGTTGATCGACACTTCTCTCTCATCGCGAAGAAGGCGGATGTGATCTTC
CTGCATTGGTACCACACGTCAACCGTGTGCTCTACTGCTGGCACTCGCA
CTCGGTCCGGATACCGAGCGGGATCTGGTTCGCCCGGATGAACTACTTTG
TGCACGCCATCATGTACTCTACTTTGCGATGACGAGATGGTCCGCGC
TACCGCAAGCTCGTCCGGCCGTACGCGCGGCTGATTACGACCTTCAGAT
CTCGCAGATGTTCTCGTCCGCCATCGTCAACGGCTCGATCATTTACTTCA
CGTCGCTCGGGCACGCATGCAAGTCGAGCAAGACGAAACACGATCCTGAGC
TGGCTGATGTACCTCAGCTACTTTGTGCTATTTCGGACTGCTCTACCTGCG
CAATTACATCCTTGGTACACATGGCAAGCCGGCGGGCAAGCGCGCAAGG
GCAAGGCGGAATAGTGCAGGGCCGGGGAGGCGGTGCCACC CGCGCTCG
CAAAGCGGTGCGCTCCTTGCCGAGATGCGACGAGAGTCGAAGAGGTGAA
ACCTCCTTAAATAATGCTACTCCTAGATTTTCGCTTGTGCTTCCGTAT
AGATGGTCAAGCC

Figura 2b

H E A S C R I R H E A A L W S W L P T Y D E F V D G L S F V D R E K I G V H M V
D Q G V I T S A E W A A I S V D K H M S F F S D A A E F T G D H W I I P L V A V
A L Y L V M I V V G P M I M A N R P P L P V N G L A C A W H W P L A A F S T F J
V A C T W H C I F T R L R S R G F E S T T C G S A M F M S Q G Y V G L A M L L F
I Y S K L F B L I D T F F L I A K K A D V I F L H W Y H H V T V L L Y C W H S H
S V R I P S G I W F A A M N Y F V H A I M Y S Y F A M T Q M G P R Y R K L V R P
Y A R L I T T L Q I S Q M P V G L I V N G S I I Y P T S L G H A C K S S K T N T
I L S W L M Y L S Y F V L F G L L Y L R N Y I L G T H G K P A G K R A K G K A B

Figura 4 a

GCACGAGGGTGTGCTACCTGCTGTACGTCTCCCTCGGCTCGATGTACAT
CTTCTGCAACTTTGCCGTGTGCGCACACGCACCTGCCCATCGTTGAGGCCG
ACCAGCACGCCACCTGGGTTGAGTACTCGGCCAACCACACGACCAACTGC
GCGCCCTCGTGGTGGTGCGACTGGTGGATGTCTTACCTCAACTACCAGAT
CGAGCATCATCTGTTCCTCGTCCATGCCGCAATTCGCCACCCGACGATCG
CGCCGCGCGTCAAGGCGCTCTTCGAGAAGCACGGGCTGCACTATGACGTG
CGCGGCTACTTTGAGGCGATGGCCGACACGTTTATGAACCTTGACAAGGT
CGGCAACGCGCACGAGCACAAACCATTAGGCCGTAGCCGCTTGGAAGAGG
CCTCCTGCATACGCGGCGACGCGTCGGCGCGCGGCGGCGTGCACGGGAGC
ACAAAGTGATGGATGGACCTTGGGCGACGCCGACGGCCAAGGAGTGGTTG
TCTCTGTCTGTCGCCAGGGCCAGGAGCCAGGGGCAGGGTTGCAGAGCTT
GGGCGCGATTGGAGGACAGGGCCGGGCGCGTCCGCGTTCGCGAGTCTGGCG
AGGCGCTCTGCGAGCTCTGCACGACTGCGCCAGAGGCGTGCAGCGCGCGC
GCGAGTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 4b

A R G C C Y L L Y V S L G S M Y I F C N F A V S H T H L P I V E A D Q H A T W V
E Y S A N H T T N C A P S W W C D W W M S Y L N Y Q I E H H L F P S M P Q F R H
P T I A P R V K A L F E K H G L H Y D V R G Y F E A M A D T F M N L D K V G N A
H E H N H

Figura 5

TspFAD4	MTVGYDESI PFBQVRAHNEFDANCAIHGHVYDVTKFASVHPGDD I ILLAQKEATVLYET
FlDES1	-----
FlDES2	-----
TspFAD4	YHVRGVSDAVLRKYRIGKLPDGGGANKEKERTLSGLSSASYTTWNSDFYRVMRERVVAR
FlDES1	-----
FlDES2	-----
TspFAD4	LKERQKARRGGYBLNI KAPLLLVGFWSSLYNMCTLDPSFGAILAAMS LGVFAAPVOTCIQ
FlDES1	-----
FlDES2	-----
TspFAD4	HDGNKGAFAQSRNVNKVAGWTLDMIGASGHWEPQHVLGRHPYTNLI EEENG LQKVSOKK
FlDES1	-----
FlDES2	-----
TspFAD4	MDTKLADQSSDFDVPSTYFNRRLHPMHQKRWYHRFQHIYGFPIFGFWYINKVVTDQVGVV
FlDES1	-----
FlDES2	-----
TspFAD4	LRKRLFPQIDAECRYASFWYVARFWMKALTVLYMVALPCYMQGPNHGLKLFALAHFTCGE
FlDES1	-----
FlDES2	-----
TspFAD4	VLATMFI VNIH IEGVEYASKDAVXGTMAPFKTMHGVTPMNTRIKVEEASKSGAVVKSIV
FlDES1	-----
FlDES2	-----ARGCCYLLYVSLGSMYIFCNPAVSHTHLP IV
TspFAD4	PLDDGWA VVQCQTSVNWSVG-SWFWNHPSGGLNHQIEBHLFPGLSHETYYHIQDVPQSTC
FlDES1	-----HEANVG-GYWLGVINGGLNFQIEBHLFPRLHHSYYAQIAPVVRTHI
FlDES2	EADQRATWVEYSANHTTNCAPSWWCWMSYLNYYQIEBHLFPSPQFRHPTIAPRVKALF
TspFAD4	AEYGVYPYQHEPSIWTAYWIMLEHLRQLGNEETHESWQRAA
FlDES1	EKLQFKYRHFPTVGSNLS SMLQHMGRKGTTPGABKGGKAB
FlDES2	EKHGLHYDVR-GYFEMADTFMNLDKVGNAREHNN-----

Figura 6 a

GCACGAGGCCTCTTCGGCTGGGGGCTCGACGACCGCTCGCCAAGTATGA
 CAAGGGCGGCGTCCGCCCGGCTTCCTGTACAACCGCGGTCGTCTTCTCGT
 CGGTGCAGGCGCTGCTCGGCGGTGCGTGCATGATGGTCCGCCGGCTCC
 GCGCCCTCTCCGCGACGTGCAGAAGTTGTGCAATCGTGCTTCAACGC
 GCCGCTTCGCCAAGGCTACGGCCTCACCAGACGTGCGCGGCGACGACGC
 TCTGCGCGCTGCACGACAACAGCCGTCGCAAGTTGGGCCCGCCGCGAGGAG
 TCGGCGTGCATCACGCTGCGCGACTGGGAGGAGGGCAACTACCGCAACCG
 CGACGCCAACGACCCCGCCATCGGGATGCGGCGCGGCGAGATCCTGATCG
 GTGGGCCCGCCGCTCTGCTCGGCTACTACGTGAACGAGCGCGCGCCGAC
 GCGGACGTGGTGAAGCGCAACCGGAGGACTTTGTGACGATCAACCGGCAT
 GCGCTTCTTCTGCTCGGCGACATCGGCCAGATCACGCCGAGCGGCTGCG
 TGCAGATTATCGACCGAAGAAGGACCTCGTCAAGCTGCAGCAGGGCGAG
 TACGTGCGCTCTCCAAGGTGGAGAACGCGCTCAAGAACTCGTCTACAC
 GCAGATCCCGTACGTCTACCGCTCTCATCCAAGAGCTACTGCATCGCGC
 TCCTCTGCCCGCAGCACGCGGCGATCGCCAGCTCGCCGCTCGCTGCGAG
 ATCAGCGGCAAGGAGCTTTCGAGCTGTGCGCGCACCCGCGAGATCGTCCG
 GGCCGTGCTCAAGGACCTGCAGGCGCAGTCAAGGCGGCCAAGCTCGCGG
 GCTTCGAGACGCCGAGCAAGCTCATCCTCGTGTGCGACGAGTGGACCGTT
 GAGAATGACATGCTCACCAAGCATGAAGATCAAGCGCAAGCCAATCGC
 TGACCGGCACGCGAGCGAGATCAAGGCCGTTTACGTCTGAGCCCGGCTCT
 TTTTGTACAACCTCGAGAGCGCCACTGTCTTGATGGCGCGCGCTGTCTGT
 TGTGCAGGCCGTCCGCAATTGACCGCGGCGCTTGAACGCAAGGCAGGCGCA
 AGGCGCGGGAGGGATTGCTGGGGATGGCGGCTGCCCGAGTTGCTGAGCAG
 AAGGCAGTCTCCGGCTCTCGACAGGTGGCGCCCGTTGTGCAGAAATGTTCCG
 CAGCCCTCCCCCTCGGGCGGCTGCCATTGCGGGCAGCGCTCGCACATG
 TGCTGCGCTCCGCGCGCCACGCCACGGCCACCAACGCGTGTGCCTGCCG
 TCACGCGCCGCGCCCGTGGGAACGACCGTTGCCCTCGCAC

Figura 6b

A R G L F G W A L D D A L A K Y D K G G V G P G F L Y N A V V F S S V Q A L L G
 G R V R M M V A G S A P L S A D V Q K F V Q S C F N A P L R Q G Y G L T E T C A
 A T T L C A L H D N T P S Q V G P P Q E S A C I T L R D W E E G N Y R N R D A N
 D P A I G M R R G E I L I G G P A V C L G Y Y V N E R A P D A D V V K R N A E D
 F V T I N G M R F F C S G D I G Q I T P S G C V Q I I D R K K D L V K L Q Q G E
 Y V A L S K V E N A L K N S S Y T Q I P Y V Y A L S S K S Y C I A L L C P Q H A
 A I R Q L A A S L Q I S G K E L S B L C A H P Q I V A A V L K D L Q A Q C K A A
 K L A G F E T P S K L I L V S D E W T V E N D M L T T T M K I K R K P I A D R H
 A S E I K A V Y V

Figura 7 a

GCACGAGGGCTCGACCTACTGCCCGCGCTGCGCGGCAAGATGCGCTGGCT
CGCGGCGAGCGTGTCTTTTCGGCTTCCCATCGTGCAGAGCTCACCCFTT
GGACCGGCTGCATCGACGCGCGCCGCTCGGTTGCCGAGAGTGCCTGCGT
GGCGGCTACTCAGTCGGCTACTGCCCGGCGGAGCAGGAGCAGCTGCG
CACGCGCTACGGGCGGAGTCGGTATATTTGCGCAAGCGCTTTGGCTTCG
TCAAGCTTGCGCTCCGCTTCGGCGTGCCGCTCGTGCCTGGGTACGTGTT
GGGTGCGTCGACCTGTACCACTTCATCCCTGCTCTTCTCGGCGCGCGA
GTGGCTCGTGCCTCTCTCGGCGTGTGCGTGCCCGTGTGCTTCGGAGCGT
GGGGCGTGCCCATGGCGCCGCTTGCTGTGCCGCTCAACGTCGTGATCGGC
CGGCCGATCAAGCTGCCGCGCAACCCTGAGCCGACCGATGAGGACGTCGC
GCGCGCGCTCGACCAAGTACATCGCCGCGCTGCGCGCGCTCTTTGACGAGA
ACAAGGCGCGCTTTGGCTATGCCGACCGGAGCTGGAGGTGTGCTGATTG
TGAAGAAGTGTCAATTGAAGGTCCGCGTCAGCAGGCGCACCGCGACCAAG
CCACTCACGTCTTGATCGCTGAACCGCCGTGAACGATGCCGTTGCGACAC
GCTTGAAGATGGCCAGAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 7 b

A R G L D L L P A L R G K M R W L A A S V L F R L P I V R E L T L W T G C I D A
R R S V A E S A L R G G Y S V G V L P G G E Q E Q L R T R Y G R E S V Y L R K R
F G F V K L A L R F G V P L V P G Y V F G C V D L Y H T S S L L F S A R E W L V
R S L G V C V P V C F G A W G V P M A P L A V P L N V V I G R P I K L P R N P R
P T D E D V A R A L D Q Y I A A L R A L P D E N K A R F G Y A D R E L E V C

Figura 7 c

ACTGCGTGTACACAGCATGGCGGGCTCGCGCGGTTGACGCGCTCGTCTGAGCGCGTTTAC
GGCGTTCGTGCAGATCGGCGTGTGGGCGCTCACGCCCGTGGGCATTGCGTGGGCCCTCGC
GTTCCACTGGAAGGTGACGCTGCCGCTGCTCGCCCTTTATCTCGCGTCGTACCTCGACGG
CGCCGAGGTGCGCGTCAAGCGCGTGCAGCGCGTGGCCGGCGTTCTCCCGGCATTTTTGGCT
GTTACGTTTATGCGCAGGGTCTACCGGCAGCGCGTTCACGTGCCAGCTGGCCCTCGAGGC
CGAGGAGCAGATCATCCTAGCGCTGCATCCGCACGGCTCGATGGCGGACTACCGCGCGAT
CCTCGACGGCCAGCTGCTCGACCTACTGCCCGCGCTGCGCGGCAAGATGCGCTGGCTCGC
GGCGAGCGTCTCTTTGGCTTCCCATCGTGCAGGAGCTCACCCCTTTGGACCGGCTGCAT
CGACGCGCGCGCTCGGTGCGGAGAGTGCCTGCGTGGCGGCTACTCAGTCGGCGTACT
GCCCGCGGCGAGCAGGAGCAGCTGCGCACGCGCTACGGGCGCGAGTCGGTATATTTGCG
CAAGCGCTTTGGCTTCGTCAAGCTTGCCTCCGCTTCGGCGTCCGCTCGTGCCTGGGTA
CGTGTTCGGGTGCGTCGACCTGTACCACACTTCATCCCTGCTCTTCTCGGCGCGGAGTG
GCTCGTGCCTCTCTCGGCGTGTGCGTGCCTCGGAGCGTGGGGCGTGCCCAT
GGCGCCGCTTGCTGTGCCGCTCAACGTCGTGATCGGCCGGCCGATCAAGCTGCGCGCAA
CCCTGAGCCGACCGATGAGGACGTCGCGCGCGCTCGACACAGTACATCGCCGCGCTGCG
CGCGCTCTTTGACGAGAACAAAGGCGCGCTTTGGCTATGCGACCGCGAGCTGGAGGTGTG
CTGATTGTGAAGAAGTGTCAATTGAAGGTGGCGTCAACAGGCGCACCCGCGACCAAGCCA
CTCACGTCTTGATCGCTGAACCGCCGTGAACGATGCCGTTGCGACACGCTTGAAGATGGC
CAGAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 7d

MAARAVDALV VSAFTAFVQI GVWALTPVGI AWALAFHWKV TLPLLALYLA SYLDGAEVRV
KRVRAWPAFS RHFWLPTFMR RVYRQRVHVP AGLEAEBQII LALHPHGSMA DYRAILDGQL
LDLLPALRGK MRWLAASVLF RLPVIRELTL WTGCIDARRS VABSALRGGY SVGVLPGGEQ
EQLRTRYGRE SVYLRKRFGF VKLALRFGVP LVPGYVFGCV DLYHTSSLLF SAREWLVRSL
GVCVPVCFGA WGVFMAPLAV PLNVVIGRPI KLPRNPEPTD EDVARALDQY IAALRALFDE
NKARFGYADR ELEV C

Tabla 1: Composición de ácido graso (% molar) de células *P. lutheri* en diferentes etapas del ciclo de crecimiento. Cada valor representa la media \pm SD de dos réplicas de un frasco

Ácidos grasos	Fase exponencial		Fase estacionaria	
	189 h ^a	285 h	353 h	452 h
<i>En extracto total</i>				
14:0	12.19 \pm 2.08	11.33 \pm 0.44	11.07 \pm 0.12	11.08 \pm 0.03
16:0	26.05 \pm 2.93	21.62 \pm 0.61	16.40 \pm 0.20	25.26 \pm 0.17
16:1n-7	21.92 \pm 3.60	23.78 \pm 1.34	20.28 \pm 0.29	27.56 \pm 0.37
18:0	8.27 \pm 0.90	3.48 \pm 0.35	2.93 \pm 0.13	1.39 \pm 0.24
18:1n-9	ND^b	0.93 \pm 0.08	8.22 \pm 0.12	2.32 \pm 0.07
18:2n-6	ND	2.43 \pm 0.15	2.33 \pm 0.02	3.66 \pm 0.03
18:3n-3	ND	ND	ND	0.38 \pm 0.01
18:4n-3	ND	4.72 \pm 0.20	5.81 \pm 0.11	4.39 \pm 0.03
20:3n-3	ND	ND	ND	0.27 \pm 0.01
20:5n-3	13.94 \pm 1.48	14.44 \pm 0.73	15.21 \pm 0.39	14.87 \pm 0.23
22:6n-3	8.62 \pm 1.74	7.90 \pm 0.43	7.35 \pm 0.15	5.89 \pm 0.03
<i>En extracto TAG</i>				
14:0	11.93 \pm 0.08	6.96 \pm 0.66	6.83 \pm 0.03	7.63 \pm 0.18
16:0	43.04 \pm 1.59	22.94 \pm 0.76	20.16 \pm 0.70	29.74 \pm 0.95
16:1n-7	37.70 \pm 2.23	33.52 \pm 5.12	39.39 \pm 3.10	37.40 \pm 1.42
18:0	ND	1.52 \pm 2.15	0.62 \pm 0.87	0.91 \pm 0.53
18:1n-9	ND	2.66 \pm 2.28	0.60 \pm 0.85	3.40 \pm 0.10
18:2n-6	ND	7.93 \pm 4.31	3.33 \pm 1.66	6.15 \pm 0.31
18:4n-3	ND	ND	ND	0.92 \pm 0.16
20:5n-3	7.33 \pm 0.73	6.02 \pm 1.07	5.31 \pm 0.16	8.50 \pm 0.42
22:6n-3	ND	3.69 \pm 0.91	3.31 \pm 0.64	1.97 \pm 0.07

^a, tiempo de incubación

^bND, no detectado

Figura 8 a

GGCACGAGGGGAGATGGCGGCGCCGACATCGCCGTACGGCGCGGAATCGCCGCGCGCGGTACGCGTAC
 CCGGAGCGTGCAAATGTCAAGATGTCGAGGGCGCTGCGGTACTCGACGAGGGCGTGACCCGCTCGTTAT
 TCACAGCTCGCAGATCCTCGCCGCGCGCTGCTCGTCACGGCCGCGTCAACCACCTTCCCAAGATCACCG
 TCGCGGACCTCGCCGAGATCTGGCGCTCGCTGCAGATCGACGTGGCGTACGCGTTCCGCGCTGACTGCGGTG
 GCCGTGTGCTTCTCGGCTACTACGCTCTCCGCCACCCGCGCCCGTCTACCTCGTCGACTTCGCCACGTG
 GCAGCTGCGCGACGACAAGGACGACGGCAGCCTGAGTGCAGCAGAGCGATTTCTTCCGCTCGACGATCACGG
 ATTGCGGCAATTTTGGCGACGAGTCGGTTCGACTTCCAGATGAAGCTTTTGGAGCGCAACCAGATCTCCGAG
 CGCTGTACTTCCACCTGGCATCCGCGCCTACCGCAAGGGCGAGCGGACTTTGACTTTTCGATGGCCGC
 CGCGCGCAAGGAGTTCGAGACTGTCTCTTCAAGACCGTTCGACGAGCTGCTCGCCAAGACGGGCGTAAAGC
 CGCGAGATATCGACATCCTCGTCGTCAACTGCTCGCTCTTCAACCAGCGCCATCGCTGGCTGCGATCGTG
 ATCAACCACTACCAGATGAAGGACTCCGTACAGAGCTACTCACTTGGCGGGATGGGTGCTCAGCGGGACT
 CATCTCAATCCACCTCGCAAAGGACCTGCTGCAGGTCTACCCCGCAAGCGCGCGCTCGTCATCTCGACGG
 AGAATCACGCAAAATTTTACCAGGGCAACGAAAAGTCGATGCTCATCTCGAACACGCTCTTCCGAATG
 GCGGCGCCGCGCTCCTCTCCGGCCGCCACGCCGACCGGCGCGTCCGCAAGTATCAACTGCTGCACAC
 CGTCCGCACGCACAAGGGCGCGGACCCGGACGCGTACCGGTGCGTCTTCCAGGAGGAGGACAAGGGCGGGC
 ACGTGGGCGTGCGCTGTGAAAGACGTGATGGAGTGCGCCGCGCGCGATGAAGACCAACATCTCGTTC
 CTCGCGCTCTGATTCGCGCCGTTCTGAGCAGGTCCGATTTCTCGCAAACCTACGTTGCGCGCAAGTGGCT
 GCGAATGAAAGGCGTGAAGGATACGTGCCGACTTCACAACGGCCGTCAGCACTTTTGCATCCACACGG
 GCGGCGCGCGGTGCTCGACGCGCTGCAGGCGAAGTGTGCTCTCAGATTACTACCTCGAGCCGAGCCGT
 TACTCCCTGTGGCGCTGGGGTAAAGTCTCAAGCGCCTCAGTCTGGTACGAGCTCGACTGGCTCGAAAAGTC
 CGGCCGATCCGGCGGGCGACAAGGTGTGGCAGATTGGTMTGGCAGCGGCTTCAAGTGAACCTCGGCCG
 TCTGGCGGGCGTCCGAGCGATGCCCTAGCTACGCCGCGCGCTCCGCATTGCCAGTGGTTCTGTACAGAC
 AGTCACACTGACGAGTGGGAGTGACGCTGACGCTTCCCCCCCCCGCCACCACCTCCACCTCCACCTC
 CTTCACTCTCACTCAATCGCGCGGCCGAGCAGGAGCGCGCTCGTGTCTGCCATCACCGCCTGTAGT
 CCTCGCGCCGCTCGAGCGAGCGCGCTCCATGAGCGGCACGACGCGAAGCGGAAGAGGCCACATCACA
 GCAGAAAAAATAAAAAAAAAAATCGAGACTAGTTCTCTACCGCGTGCAGGCTCAAGCACGGCCGC
 GTGTGCATGCTCGCCGTACCGGATGCTTGTCCAGGAGTGTACTCGTGGCCGGCACCCGACGGCGTCTT
 CAAGGCGCCGACCCGCTCGGCGCGCTCTCGACGCTGCCGGCGCTCGGCCCTCATCCAGCTCATCGTCTTC
 TCGGCATCATCGAGGTGCGCTCGGCGAAGTACAGGGCCGCGTGCCCGCGACCTTGGCTTTGACCCGCTC
 GG

Figura 8 b

MAAPTSPYGA ESPRAAYAYP ERANVKMSEA LRVLDEGVHP LVIHSSQILA AALLVTAAVN
 HFPKITVADL ABIWRSLQID VAYAFALTAV AVLLLGYYAL RHPRFVYLD FATWQLRDDK
 DDGSLSATSD FFRSTITDCG NFDDESVDFO MKLFERNQIS ERCYFPFGIR AYRKGERDFD
 PSMAARKEF BTVVFTTVDE LLAKTGVKPR DIDILVVNCS LFNPTPSLAA IVINHYQMKD
 SVQSYSLGGM GCSAGLISIH LAKDLLQVYP RRKALVISTE NITQNFYQGN EKSMLISNTL
 FRMGGAAVLL SGRHADRRVA KYQLLHTVRT HNGADPDAYR CVFQEEKAG HVGVRLLSKDV
 MBCAGAAMKT NISVLAPLIL PVSEQVRFIA NYVARKWLRM KGVKGYVPDF TTAVQHFCIE
 TGGRAVLDAL QANLSLSDYY LEPSRYSLWR WGNVSSASVW YELDWLEKSG RIRRGDKVWQ
 IGFSGGFKCN SAVWRACRAM P